

RP - HPLC 法测定红花中红花红色素的含量

王慧琴^{1,3}, 谢明勇¹, 傅博强², 王小如²

(1. 南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 江西 南昌 330047; 2. 厦门大学 化学系 现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005; 3. 江西师范大学 化学化工学院, 江西 南昌 330027)

摘要: 经从红花 (*Carthamus tinctorius* L) 中分离纯化、HPLC 检测、质谱鉴定得红花红色素纯品, 并用其作为标准品, 采用反相高效液相色谱法, 测定了不同产地红花和商业红花产品中红花红色素的含量。该方法准确性高、重现性好, 平均回收率为 98.1%。

关键词: 红花红色素; 分离; 纯化; 质谱; 反相高效液相色谱

中图分类号: O652.63; O657.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2004)06-0098-03

Determination of Carthamin in Safflower (*Carthamus tinctorius* L) by RP - HPLC

WANG Hui-qin^{1,3}, XIE Ming-yong¹, FU Bo-qiang², WANG Xiao-ru²

(1. Key Laboratory of Food Science of MOE, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. Department of Chemistry and the Key Laboratory of Analytical Sciences of MOE, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. School of Chemistry and Chemical Engineering of Jiangxi Normal University, Nanchang 330027, China)

Abstract: The carthamin, extracted from the safflower (*Carthamus tinctorius* L), was purified and identified by MS. It was then used as a standard for the reversed phase high performance liquid chromatographic determination of carthamin in safflower collected from different areas and in commercial safflower products. HPLC separation was carried out on an Alltima C₁₈ column (5 μm, 150 × 4.6 mm) with a mixture of acetonitrile, methanol and water (30 : 10 : 60 by volume) at pH = 3 as mobile phase. The linear range was 0.05 ~ 0.2 g/L with a correlation coefficient of 0.999. The average recovery and RSD were 98.1% and 1.9%, respectively.

Key words: Carthamin; Separation; Purification; MS; HPLC

红花 (*Carthamus tinctorius* L) 在亚洲的一些国家长期被用作天然食用色素、染料和药材。红花红色素是从红花中提取出来的一种红色素, 在日本, 该色素已被用于巧克力等高脂类食品的着色以及口红、胭脂一类的高档化妆品中^[1]。红花红色素作为一种天然抗氧化剂也能提高小鼠的耐缺氧能力, 具有一定的抗氧化活性^[2]。

红花红色素分析方法还未见报道。在已发表的红花红色素的制备工艺的论文中^[3], 是用分光光度法来折算含量的。红花中的有效成分主要是各种色素(红色素和黄色素)。光度法测定会引进其它色素的干扰。本文分离纯化了红花中红花红色素, 并首次用反相高效液相色谱法测定了不同产地红花和商业红花产品中红花红色素的含量。该方法准确度和重复性好, 结果令人满意。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

液相色谱仪: Waters 公司, 515 二元高压梯度系统, 515 泵, 2487 紫外可见检测器, PCM 泵控制器, Millennium³² 色谱工作软件, Alltima C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。质谱仪: Finnigan Mat LCQ (API)。

红花原料: 新疆红花, 由新疆红花红油脂工业有限责任公司提供; 河南红花、内蒙古红花, 由江西省外外贸公司提供; 商业红花产品, 由新疆红花红油脂工业有限责任公司提供。

乙腈, Fisher 公司(色谱纯), 实验用水为 Milli-Q 超纯水, Sephadex LH-20, 瑞士安玛西亚公司; 其它试剂均为分析纯。

收稿日期: 2003-11-11; 修回日期: 2004-10-12

作者简介: 王慧琴(1972-), 女, 江西景德镇人, 博士。

1.2 红花红色素标准品的制备

参照文献[4]方法略作修改,进行分离,纯化。新疆红花 50 g 用水浸泡过夜,过滤,红花残渣用水洗至水溶液无色后,把红花残渣拧干,加 800 mL 0.1 mol/L K_2CO_3 , 超声 10 min, 过滤,在滤液中加入 0.5 mol/L 的柠檬酸,调节 pH 至酸性,过夜,离心,收集沉淀。所得沉淀依次用水、乙醇、乙醚洗,真空干燥。然后取一定量的红花红色素粗品,溶解在甲醇中,反复过 Sephadex LH-20 柱,用甲醇做洗脱剂,分管收集红花红色素部分,用 HPLC 检测所收集部分的纯度,合并纯度大于 99% 的部分,减压浓缩至干,得红花红色素纯品。用 MS 确定其相对分子质量,与文献一致。

1.3 红花红色素标准溶液的配制

称取 5 mg 所制备的红花红色素标准品,溶解在 25 mL 无水甲醇中,使用时稀释至不同浓度。

1.4 供试样品溶液的制备

供试样品在 60 °C 干燥,称取 1.0 g 红花,用水洗至无色,除去红花黄色素,红花残渣用 15 mL 丙酮浸泡,收集丙酮溶液,红花残渣再用丙酮浸泡,合并两次所得丙酮溶液。浓缩至干,用适量甲醇溶解,过 0.45 μ m 的滤膜,作为供试样品。

1.5 色谱条件

色谱柱: Alltima C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); KR100-5 C_{18} (Kromasil), 150 \times 4.6 mm; 流动相: 乙腈-甲醇-水(体积比 30:10:60)(用磷酸调节 pH 为 3.0)。流速: 0.8 mL/min; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μ L, 检测波长: 518 nm。

1.6 实验方法

取适量的红花红色素贮备液,以甲醇为溶剂,依次配制质量浓度为 0.050、0.067、0.1、0.15、0.2 g/L 的溶液,按上述色谱条件,依次分析各标准溶液,以峰面积(A)对质量浓度(g/L)作图,绘制响应值与质量浓度的关系曲线。

2 结果与讨论

2.1 红花红色素的 MS 结构鉴定

红花红色素的化学结构如图 1 所示。用质谱对红花红色素进行结构解析,分别获得在正、负离子模式下的质谱图(见图 2)。

图谱结果显示,正离子模式下,出现 $[M+Na]^+$ 峰,和 $[M+K]^+$ 峰, m/z 分别为 933 和 949; 负离子模式下,出现 $[M-H]^-$ 准分子离子峰, m/z 为 909。该质谱解析的结果表明,所得红花红色素的相对分子质量为 910,与文献值一致^[4],并可和 K、Na 形成稳定的盐。因此,所得红花红色素被确认为该化合物纯品,可作为标准品用于产品中红花红色素含量的测定。

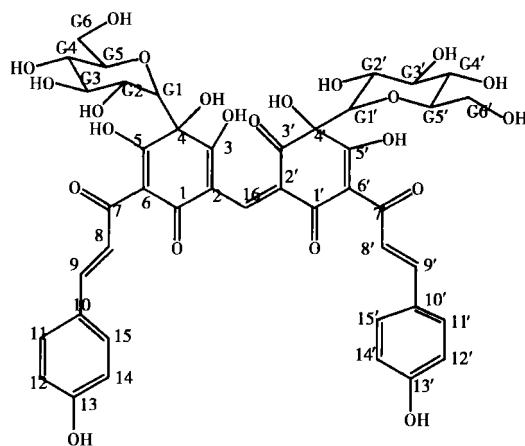


图 1 红花红色素的结构
Fig. 1 Structure of carthamin

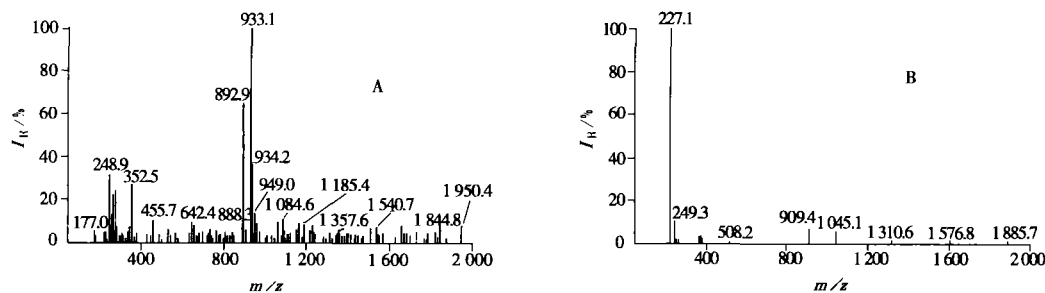


图 2 所得红花红色素在正(A)负(B)离子模式下的质谱图
Fig. 2 Positive(A) and negative(B) API-MS spectra of carthamin

2.2 HPLC 测定条件选择

2.2.1 检测波长的选择 选择红花红色素的 λ_{max} 518 nm 为测量波长以提高测量灵敏度。

2.2.2 流动相的选择 主要考察了几组流动相: 乙腈-水(体积比 20/80), 乙腈-水(体积比 30/70), 乙腈-水(体积比 50/50), 乙腈-甲醇-水(体积比 30/10/60), 以上体系均用磷酸调节 pH 为 3。结果前两种分析时间较长, 第 3 种出峰较早, 但峰形不好, 和杂质峰分离得不好, 第 4 种出峰时间合适, 杂质峰与被测红花红色素的峰分离较好。因此本实验选择乙腈-甲醇-水(体积比 30/10/60, pH=3) 作流动相。红花红色素含量测定的干扰主要是红花黄色素(safflower yellow) 和红花红色素的前体(pre-carthamin)^[6]。流动相的酸度对红花红色素与其它杂质峰的分离及峰形的影响很大。是否能得到好的分析结果, pH 选择是否得当是关键。本实验用磷酸调节 pH 改善峰形, pH 分别采用 5.0、4.0、3.0, 结果发现 pH 为 3.0 时分离效果最佳, 峰形对称性较好。在最佳色谱条件下所得标准品及样品色谱图见图 3。

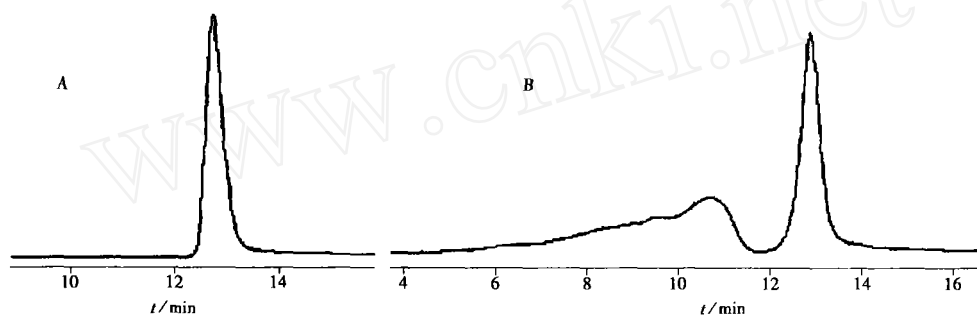


图 3 红花红色素标准品(A)和样品(B)的色谱图
Fig. 3 Chromatograms of carthamin standard(A) and sample(B)

2.3 回归方程和线性范围

按上述条件, 对各组分的标准溶液依次测定, 得红花红色素的线性回归方程为: $A = 9 \times 10^6 \cdot C - 21\ 804$ (A 为峰面积, C 为红花红色素溶液的质量浓度, g/L), 相关系数为 0.999, 线性范围为 0.05 ~ 0.2 g/L。

2.4 样品分析

按 1.4 的方法制备样品, 测定结果见表 1。

2.5 回收率试验

取同一样品溶液 6 份, 精密加入确定量的红花红色素标准溶液, 定容后分别进样测定, 红花红色素平均回收率为 98.1%, RSD 为 1.9%, 表明该方法的准确度和精密度都很高。

表 1 不同地区红花及商业红花中红花红色素的含量 ($n=6$)
Table 1 Analytical results of carthamin in safflower collected from different regions and in commercial safflower products ($n=6$)

Sample	$\bar{w}(\text{carthamin}) / 10^{-3}$	RSD s/r/%
Xinjiang safflower(新疆红花)	4.5	0.68
Henan safflower(河南红花)	4.4	0.2
Inner Mongolia safflower(内蒙古红花)	3.6	1.0
Safflower from drugstore(市购红花)	2.6	0.55
Yixin safflower tea(红花红养神怡心茶)	4.7	0.9
Huoli safflower tea(红花红养心活力茶)	4.8	1.0

参考文献:

- [1] 乐光锐. 红花的营养和理化特性及其综合利用[J]. 贵州农业科学, 1996, 1: 60 - 63.
- [2] 郑虎占, 董泽宏, 余 靖. 中药现代研究与应用 3[M]. 北京: 学苑出版社, 1997. 2067 - 2069.
- [3] 吴德意. 红花红色素的提取工艺及产品质量控制[J]. 化工进展, 2003, 22(1): 26 - 28.
- [4] KIM J B, CHO M H, HAHN T R, *et al.* Efficient purification and chemical structure identification of carthamin from *Carthamus tinctorius* L[J]. Agric Chem Biotech, 1996, 39: 501 - 505.
- [5] ONODERA J I, HEITARO O, MASAHIDE O, *et al.* The structure of safflorin - A, A component of safflower yellow[J]. Chemistry Letters, 1981. 433 - 436.
- [6] RUDOMETOVA N V, PASPOVSKIJ A P, BLOHINA E A. Method of isolation and identification of carthamin in Safflower. Application 's perspectives in Russian food products[C]. Vth International Safflower Conference 2001 USA: 305.