

微乳液超高效液相色谱法测定中药保健品中的乙二胺四乙酸铁钠

林仁权*, 夏海鸣, 孟 琪, 桑 娴, 戚荣平

(杭州市拱墅区疾病预防控制中心(杭州市拱墅区卫生监督所), 杭州 310022)

摘 要: **目的** 建立微乳液超高效液相色谱法测定中药保健品中的乙二胺四乙酸铁钠(NaFeEDTA)分析方法。**方法** 样品经简单处理, 稀释后通过0.22 μm 微孔滤膜进行过滤, 即可直接上机, 以Waters BEH C_{18} 柱(2.1 mm $\times$ 150 mm, 1.7 μm)为色谱柱, 以28.8 g/L 十二烷基硫酸钠(SDS)水溶液-50 g/L 正丁醇-8 g/L 正庚烷-0.40 g/L 磷酸水溶液为流动相, 流速为0.20 mL/min, 检测波长为254 nm, 柱温为30 $^{\circ}\text{C}$, 使用外标法进行定量测定。**结果** 在选定实验条件下, NaFeEDTA质量浓度在0.50~30.0 $\mu\text{g/mL}$ 内具有良好的线性关系($r \geq 0.999$), 检出限为50 mg/kg。NaFeEDTA回收率为92.0%~99.0%。对样品重复测定6次, 其峰面积的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为3.8%。**结论** 该方法操作简单、重现性好, 可用于中药保健品中NaFeEDTA含量的检测。

关键词: 乙二胺四乙酸铁钠; 微乳液相色谱法; 中药保健品

0 引 言

中药保健品是指以中草药为原料或者添加中草药提取物的一系列保健品。黄芪当归铁片就是一种中药保健品, 主要由黄芪提取物、大枣提取物、白芍提取物、当归提取物、乙二胺四乙酸铁钠组成, 能够补铁、稳定神经情绪、调理血气, 有效改善缺铁性贫血引起的症状。乙二胺四乙酸铁钠(NaFeEDTA)是一种性质稳定的铁营养强化剂, 铁锈味较小、胃肠刺激小^[1-2]且人体吸收率高^[3-5], 被认为是目前最具发展前景的铁营养补充剂^[6]。目前中药保健品中NaFeEDTA添加量按《食品营养强化剂使用标准》(GB 14880—2012)的要求添加。食品中NaFeEDTA的定量测定的方法报道较多, 主要包括分光光度法^[7-8]、毛细管区带电泳法^[9-10]、极谱法^[11-12]、离子色谱法^[13-14]、高效液相色谱法^[15-19]等。

微乳液相色谱法(microemulsion liquid chromatography, MELC)是一种新的色谱形式, 是使用微乳为流动相的一种反相液相色谱法。微乳是由表面活性剂、助表面活性剂、油相和水相接适当比例混合而成的, 具有无色透明、各向同性、低黏度等特点, 属于热力学稳定体系。近年来, MELC已被应用于多组分的分离、药物及杂质的分离与生物样品分析检测^[20-22], 但关于MELC在中药保健品检测中的应用却鲜有报道。中药保健品成分极为复杂, 在传统高效液相色谱法中, 样品不经过前处理, 易导致严重的干扰并损害色谱柱。而MLEC中的表面活性剂具有极强的增溶能力, 支持各类样品直接进样测定, 从而简

化样品制备过程^[23]。因此, 本研究采用流动相直接稀释中药保健品, 运用MELC测定中药保健品中NaFeEDTA的含量, 为检测中药保健品提供简单高效的检测手段。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

当归黄芪铁片样品全部为市售产品。

NaFeEDTA标准品(纯度98.4%, 坛墨质检科技股份有限公司); 甲醇、乙腈(色谱纯, 德国Merck公司); 乙酸乙酯、正己烷、正庚烷(色谱纯, 天津市四友精细化学品有限公司); 磷酸二氢钾(分析纯, 西陇科学股份有限公司); 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、十二烷基硫酸钠(SDS)、磷酸、氢氧化钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相色谱仪(配备二极管阵列检测器)、Waters BEH C_{18} 柱(2.1 mm $\times$ 150 mm, 1.7 μm)(美国Waters公司); BSA223S 电子天平(精度1 mg, 德国赛多利斯公司); TG16-WS 台式高速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司); 0.22 μm 微孔过滤膜(上海安谱实验科技股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备

准确称取约0.50 g经粉碎的当归黄芪铁片(精确到1 mg), 置于100 mL容量瓶中, 加水, 混匀, 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴15 min后, 放

* 通信作者: 林仁权, 主任技师, 研究方向为理化检验和研究工作。E-mail: linrq007@163.com

冷,加水至刻度,摇匀后,吸取 1.00 mL 上清液于 50 mL 容量瓶中,加流动相溶液至刻度,摇匀后,经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤后进样。

1.3.2 标准溶液

1000 mg/L NaFeEDTA 标准溶液的制备:准确称取标准物质 NaFeEDTA 100.0 mg 于 100 mL 棕色容量瓶内,加水溶解并定容至刻度,混匀,制成质量浓度为 1000 mg/L 的标准储备液,备用。

标准工作溶液的制备:吸取一定量的标准储备液于 10 mL 容量瓶中,用流动相溶液定容,逐级稀释配制成质量浓度为 0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、30.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作溶液。

1.3.3 液相色谱条件

色谱柱: Waters BEH C_{18} 柱(2.1 mm $\times$ 150 mm, 1.7 μm); 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 0.20 mL/min; 流动相: 28.8 g/L SDS 水溶液-50 g/L 正丁醇-8 g/L 正庚烷-0.40 g/L 磷酸水溶液; 进样量为 10 μL ; 检测器: 二极管阵列检测器(PDA); 检测波长: 254 nm。

2 结果与分析

2.1 条件优化

2.1.1 表面活性剂类型对色谱峰的影响

用于制备微乳流动相的表面活性剂,最常用的阴离子表面活性剂是 SDS,阳离子表面活性剂是 CTAB。本研究在最佳色谱条件下,仅仅改变表面活性剂,考察了 SDS、CTAB 表面活性剂对色谱峰分离的影响。从图 1 中可以看出,当使用 CTAB 时,目标物色谱峰几乎无保留,很快被洗脱下来;当使用 SDS 作为表面活性剂时,目标物色谱峰有保留,分离较好,所以选择 SDS 进行后续实验。

2.1.2 表面活性剂浓度对色谱峰的影响

在 MELC 中,物质在微乳流动相、固定相和水三者间进行分配,表面活性剂的浓度一定要大于其临界胶束浓度,临界胶束浓度才能形成微乳液。在较低浓度下,分析目标物的保留时间过大;浓度过高时,流动相的黏度增加,导致黏度效应,柱压增高。SDS 临界胶束浓度大约在 0.01 mol/L,因此,选择超过临界胶束浓度以上的 0.05、0.10、0.20 mol/L 和 0.30 mol/L SDS 进行实验。从图 2 可以看出,随着 SDS 浓度的增加,分析物的保留时间明显缩短,这可能是随着 SDS 浓度的增加,被测物分配到微乳流动相的程度也增加,化合物迅速从固定相中释放出来,从而减少了溶质的保留时间,因此在柱上的保留随之降低。当 SDS 浓度为 0.05 mol/L,从图 2 可以看出目标峰变形,拖尾严重,综合考虑柱压力,样品分析时间和色谱峰对称性,选定 SDS 浓度为 0.10 mol/L,即为 28.8 g/L SDS 水溶液。

2.1.3 助表面活性剂类型对色谱峰的影响

在 MELC 中,因表面活性剂在固定相上的吸附减缓了传质速率,降低了色谱柱柱效,常添加助表面活性剂。本研究中

选择了乙腈、正丁醇、异戊醇作为助表面活性剂。图 3 显示了不同助表面活性剂对色谱峰的影响。从图 3 中可以看出,当使用极性较大的助表面活性剂乙腈时,色谱峰拖尾,分离效果不佳。当使用极性较小的助表面活性剂正丁醇时目标分析物峰高而尖,分析时间合适,因此,选择正丁醇作为助表面活性剂。

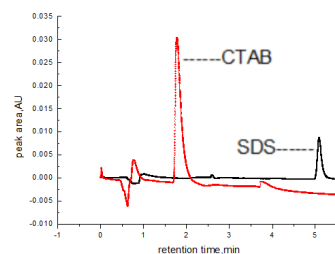
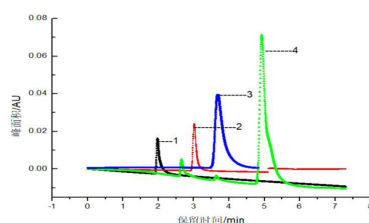


图 1 不同表面活性剂对色谱峰分离的影响



注: 1. 0.30 mol/L; 2. 0.20 mol/L; 3. 0.10 mol/L; 4. 0.05 mol/L。

图 2 不同表面活性剂浓度对色谱峰分离的影响

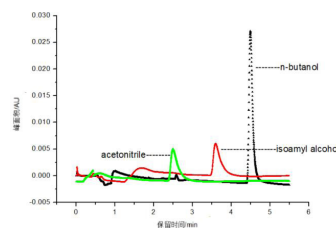


图 3 不同助表面活性剂对色谱峰分离的影响

2.1.4 助表面活性剂浓度对色谱峰的影响

为了得到助表面活性剂的合适浓度,分别选择 5%、10% 正丁醇为流动相进行实验。图 4 显示了流动相中不同浓度的正丁醇对色谱峰分离的影响。结果显示,正丁醇浓度越高,目标分析物出峰越快。当正丁醇质量分数为 10% 时,目标分析物色谱峰与样品基质干扰峰接近;当正丁醇的体积分数为 5% 时,此时与样品基质干扰峰分离较好,分离度(R)大于 1.5。综合考虑样品分析时间及与干扰物的分离情况,最终确定助表面活性剂的比例为 5%,即为 50 g/L 正丁醇水溶液。

2.1.5 油相类别和浓度的优化

微乳油相通常有乙酸乙酯、正己烷、正庚烷等,增加油的含量,流动相中有机相的比例增加,溶质的保留时间降低,油相的类型改变也能改变溶质的保留时间。油相的含量一般在 12 g/L(体积分数)内,其最佳含量约为 8 g/L^[24]。本研究使用乙酸乙酯、正己烷时,不能很好分离复杂样品中目标分析物,分离效果不好,尝试采用正庚烷时,取得较好结果,因此选用常用浓度为 8 g/L 的正庚烷。

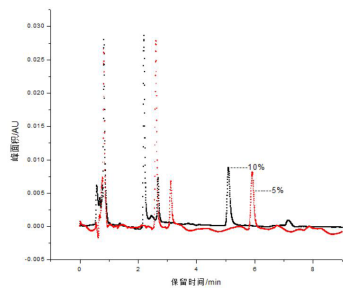
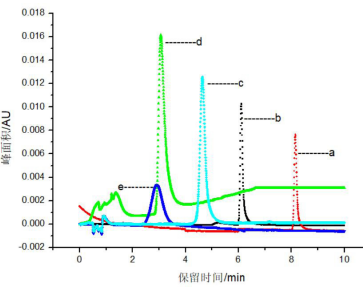


图 4 不同助表面活性剂浓度对色谱峰分离的影响

2.1.6 磷酸对色谱峰的影响

在色谱条件的优化中，流动相的 pH 必须首先考虑。这是因为不同分析物的理化性质不同，在不同 pH 的流动相中存在的形式不同。在中性条件下，有部分 FeEDTA^- 在流动相中发生水解反应以阴离子 FeEDTAOH^{2-} 的形式存在，引起组分的保留性质发生变化。因此， NaFeEDTA 的分离需要在酸性条件下进行。在 pH 的优化中，本研究选择加 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g/L 磷酸，微乳流动相按 1.3.3 节进行配制，配制好的微乳流动添加不同量磷酸。色谱分离结果如图 5 所示，在当添加 0.4 g/L 磷酸时，目标分析物峰形较好且分析保留时间适宜。因此，选择流动相添加 0.4 g/L 磷酸。

综上所述，通过实验优化，得到了最佳的色谱条件：28.8 g/L SDS 水溶液-50 g/L 正丁醇-8 g/L 正庚烷-0.4 g/L 磷酸水溶液为流动相，柱温 30℃。在最佳色谱条件下，注入 10 μL 用流动相溶液配制的标准溶液，在 0.20 mL/min 的流速下，在 254 nm 处得到的标准溶液色谱图，如图 6 所示。



注：a. 0.5 g/L；b. 0.4 g/L；c. 0.3 g/L；d. 0.2 g/L；e. 0.1 g/L。

图 5 磷酸对色谱峰分离的影响

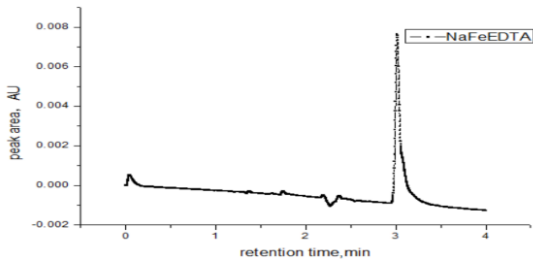


图 6 最佳色谱条件下标准溶液的色谱图

2.2 加标回收率及重复性试验

当归黄芪铁片中铁含量标示值为 730 mg/100 g，相当于添加 NaFeEDTA 含量为 48 mg/g。称取适量市售当归黄芪铁片，将一定量 NaFeEDTA 标准加入其中，按 1.3.1 节进行前处理和

检测，计算回收率和相对标准偏差 (RSD)。经检测计算，样品回收率在 92.0%~99.0% 之间，平均回收率为 95.9%。结果表明建立的方法回收率结果满意，结果见表 1。

表 1 回收率试验结果

本底值 (mg/g)	NaFeEDTA 加标量 (mg/g)	回收值 (mg/100g)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
48	20.0	17.7	88.5	92.0
	20.0	18.5	92.5	
	20.0	19.0	95.0	
48	50.0	47.0	94.0	96.7
	50.0	48.0	96.0	
	50.0	50.0	100.0	
48	100.0	97.0	97.0	99.0
	100.0	101.0	101.0	
	100.0	99.0	99.0	

称取样品各 6 份，按 1.3.1 节进行处理，进样检测，具体测定结果如表 2 所示，峰面积的 RSD 为 3.8%，说明该方法的重复性良好。

表 2 重复性试验结果 ($n=6$)

浓度(mg/g)	峰面积						RSD (%)
	1	2	3	4	5	6	
48	19024	18515	17682	19807	18653	19201	3.8

2.3 线性关系及检出限

在本方法的实验条件下， NaFeEDTA 在 0.50~30.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好线性关系，通过计算峰面积 (Y) 与浓度 (X , $\mu\text{g/mL}$) 得线性方程为 $Y=4005.167X-962.788$ ，相关系数 $r=0.9995$ 。同时，根据标准得出最低检出浓度 0.50 $\mu\text{g/mL}$ ，计算得出方法的检出限为 50 mg/kg。

2.4 实际样品测定

购买不同品牌的市售当归黄芪铁片，对不同品牌药保健品中 NaFeEDTA 进行测定，实验结果见表 3，样品色谱图见图 7，试验结果与样品添加标示量结果基本相符，RSD 在 2.2%~3.5% 之间，均小于 5%，可见检测方法准确可靠，满足实际检测要求。

表 3 不同品牌药保健品中 NaFeEDTA 测定结果

品牌	Fe 标示量 (mg/100 g)	以铁计测定平均值 (mg/100 g)	RSD (%)
麦金利牌	730	748	2.2
九芝堂	730	758	3.2
康恩贝	730	779	3.5
北京同仁堂	730	764	2.7

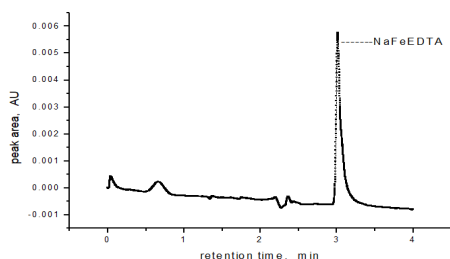


图7 中药保健品样品色谱图

3 讨论与结论

本研究通过考察微乳流动相体系中表面活性剂、油相和助表面活性剂的种类及浓度、流动相的酸度等对 NaFeEDTA 分离的影响,确定了微乳流动相的组成。应用优化后的色谱条件,确保 NaFeEDTA 与中药保健品中复杂成分完全分开,且分析时间短。该法样品处理简单,仅需将样品粉碎、溶解、稀释后经微孔滤膜过滤便可进样分析,这样既可节省分析时间又可减少样品的用量。该法为检测中药保健品或中药制剂中 NaFeEDTA 的分离及快速测定提供了一种可能。由于 MELC 的理论研究及中药保健品分析方面的应用较少,有待于在今后的工作中做进一步研究。

参考文献

- [1] 王波,詹思延,夏惜惜,等.乙二胺四乙酸铁钠与硫酸亚铁改善铁缺乏的效果比较:对照试验的系统评价[J].现代预防医学,2011,38(07):1240-1243,1246.
- [2] LE HT, JOOSTEN M, JANNEKE M, *et al.* The effect of NaFeEDTA on sensory perception and long term acceptance of instant noodles by vietnamese school children [J]. Food Qual Pref, 2007, 18(04): 619-626.
- [3] WANG B, ZHAN SY, SUN J, *et al.* Social mobilization and social marketing to promote NaFeEDTA-fortified soya sauce in an iron-deficient population through a public-private partnership [J]. Public Health Nutr, 2009, 12(10): 1751-1759.
- [4] YANG Z, SIEKMLANN J, SCHOFIELD D. Fortifying complementary foods with NaFeEDTA-considerations for developing countries [J]. Matern Child Nutr, 2011, 7(03): 123-128.
- [5] ZHU L, DENNIS DM. Tissue iron distribution and urinary mineral excretion vary depending on the form of iron (FeSO_4 or NaFeEDTA) and the route of administration (oral or subcutaneous) in rats given high doses of iron [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(21): 8793-8799.
- [6] 杨建春,刘培燕,刘戌年.新型铁强化剂NaFeEDTA的研究进展[J].环境卫生学杂志,2003,30(04):206-207.
- [7] 张文德,王竹天,刘玉欣.铁强化酱油中NaFeEDTA含量的分光光度检验方法研究[J].卫生研究,2007,36(02):166-168.
- [8] 陈湛,肖雪花,陆云婷,等.有色酱油NaFeEDTA含量测定与底色干扰的排除[J].中国卫生检验杂志,2005,15(03):322-323.
- [9] 魏峰,霍军生,黄建,等.毛细管区带电泳法分离测定铁强化酱油中乙二胺四乙酸铁钠[J].卫生研究,2006,35(01):103-106.
- [10] 唐美华,陈国松,于文涛.毛细管区带电泳法测定强化铁酱油中NaFeEDTA的含量[J].食品科学,2005,26(11):194-196.
- [11] 魏峰,霍军生,狄蕊,等.方波伏安法检测酱油和食盐中乙二胺四乙酸铁钠[J].食品科学,2012,33(10):274-277.
- [12] 李彦,张文德.单扫示波极谱法测定强化酱油中NaFeEDTA含量[J].中国食品卫生杂志,2008,20(04):308-310.
- [13] 李迎丽.离子色谱法测定铁强化酱油中NaFeEDTA的含量[J].中国卫生工程学,2009,8(05):299-300.
- [14] 蔡梦华,陈秀蝶,吴图杨,等.离子色谱法测定饼干中乙二胺四乙酸铁钠方法研究[J].中国卫生检验杂志,2012,22(08):1770-1771,1776.
- [15] 魏峰,李文仙,黄建,等.反相离子对高效液相色谱法测定铁强化酱油中的乙二胺四乙酸铁钠[J].色谱,2006,24(01):58-61.
- [16] 狄蕊,霍军生,魏峰,等.高效液相色谱法检测酱油中NaFeEDTA[J].食品科学,2013,34(18):150-153.
- [17] 魏峰,狄蕊,李文仙,等.面粉中NaFeEDTA的HPLC检测方法[J].粮油食品科技,2007,15(04):56-57.
- [18] 关炳峰,杜瑞,陈红,等.高效液相色谱法测定小麦粉中乙二胺四乙酸二钠的方法优化[J].食品安全质量检测学报,2020,11(02):516-520.
- [19] 李硕,李莉,曹进.高效液相色谱法检测面粉中的乙二胺四乙酸二钠[J].食品安全质量检测学报,2017,8(02):639-645.
- [20] 吴宏星,郑艾妮,苏草茵,等.微乳液相色谱法同时分离7种水溶性维生素[J].色谱,2017,4:439-444.
- [21] 陈莉婧,张忠义,张守尧.清开灵注射液中黄芩苷含量的微乳液相色谱法测定[J].分析测试学报,2009,10:1217-1220.
- [22] JANCIC B, IVANOVIC D, MEDENICA M, *et al.* Evaluation of a liquid chromatographic method for analysis of indinavir and degradation products arising from hydrolysis of its amide bond [J]. Chromatographia, 2005, 62(5/6): 233-238.
- [23] TAKENAKA S, TONOKI T, TAIRA K, *et al.* Adaptation of *Pseudomonas* sp. strain 7-6 to quaternary ammonium compounds and their degradation via dual pathways [J]. Appl Environ Microb, 2007, 73(06): 1797-1802.
- [24] LI N, HOU XZ, YANG W, *et al.* Influence factors of the separation of steroids using oil-in-water microemulsion liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr, 2009, 27(03): 323-327.