

HPLC 法测定加工食品中叶黄素的含量

杨文文¹, 邱静^{2,3}, 高贵¹, 侯士聪^{1*} (1. 中国农业大学理学院, 北京 100193; 2. 中国农业科学院质量标准与检测技术研究所, 农产品质量与食品安全重点实验室, 北京 100081; 3. 农业部农产品质量与安全重点实验室, 北京 100081)

摘要 [目的] 建立一种快速、高效检测加工食品中叶黄素含量的方法。[方法] 取 5 g 加工食品加入 10 ml 含 0.1% BHT 的乙腈振荡提取 10 min, 重复提取 1 次, 混匀提取液, 加入 NaCl 促进有机相与水相分层, 3 000 r/min 离心 3 min, 有机相经无水 NaSO₄ 干燥后, 过 0.22 μm 滤膜进高效液相色谱检测。色谱条件为 Agilent HC-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-水 (95/5, V/V) 为流动相, 流速为 1.0 ml/min, 检测波长 446 nm。[结果] 该方法线性范围良好, 在 0.5~50.0 μg/ml 范围内, 回归方程为 $y = 1\,978.8x - 385.97$ ($R^2 = 0.999\,6$), 添加回收率为 93.21%~103.54%。[结论] 该方法简单, 操作方便, 对仪器设备要求低, 适用于样品量较大的加工食品中叶黄素含量测定。

关键词 叶黄素; 加工食品; 高效液相色谱

中图分类号 S509.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)24-10108-02

Determination of Lutein Content in Processed Food by HPLC

YANG Wen-wen et al (College of Science, China Agricultural University, Beijing 100193)

Abstract [Objective] The High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method was founded to determine the lutein content in processed food. [Method] Five gram sample with 10 ml 0.1% BHT acetonitrile was oscillated for 10 min to extract the lutein, and then the extraction was repeated once. After blending the two extracts, NaCl was added to promote stratification between the organic phase and the water phase. After centrifugation, the extract was dried by anhydrous NaSO₄ and filtrated by 0.22 μm filter before sample injection for detection. The samples were separated on Agilent HC-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), eluted with mixture of acetonitrile and water (95/5, V/V) at 1 ml/min, and the detection wavelength was 446 nm. [Result] In the range of 0.5–50.0 μg/ml, regression equation was $y = 1\,978.8x - 385.97$ ($R^2 = 0.999\,6$), showing good linearity. The added recovery was 93.21%–103.54%. [Conclusion] The developed method was simply and convenient, being suitable for determination of lutein in processed food of major quantity specimen.

Key words Lutein; Processing food; HPLC

叶黄素属于类胡萝卜素, 是一种含氧的抗氧化剂^[1]。医学研究表明, 它能够预防老年性黄斑变性、抗氧化、清除自由基、抗癌、减少心血管病、保护眼睛^[2-3]。叶黄素的主要来源是绿叶蔬菜, 如菠菜、甘蓝、南瓜和其他蔬菜, 一些水果和蛋黄中也含有叶黄素^[4-6]。

叶黄素是一种天然色素, 呈鲜艳的黄色, 着色能力强, 能广泛应用于糕点、糖果、调料及饲料中作为着色剂使用, 具有安全无毒、着色力强、色泽鲜艳、口感好等特点。欧美等国家因叶黄素良好的着色能力和稳定安全等特性, 已将其列为食品着色剂。我国 GB2760-2011 食品安全国家标准食品添加剂使用标准允许叶黄素作为着色剂使用, 并规定了其在乳制品、饮料等食品中的最大使用量^[7]。

叶黄素作为一种优良的食品添加剂和营养增强剂, 是目前功能性食品成分研究中的热点。但对其的研究多集中于天然食品中叶黄素的提取与应用, 很少关注加工食品中叶黄素含量, 没有系统科学的方法来测定加工食品中叶黄素含量的方法。笔者建立了适用于测定加工食品中叶黄素的方法, 该方法简便、快速、适应性好, 能满足相关限量标准要求。

1 材料与方

1.1 材料 桃汁、橙汁、格瓦斯、山楂果茶、果冻、粗粮八宝粥、草莓果酱等供试食品原料购自超市。主要试剂: 叶黄素 (≥95%), 二丁基羟甲基苯 (BHT), 阿拉丁试剂有限公司;

甲醇、乙腈、乙酸乙酯、丙酮均为色谱纯, 美国迈瑞达科技有限公司; 纯净水, 杭州娃哈哈集团有限公司。主要仪器: Waters2695 型高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; THZ-D 台式恒温振荡器, 太仓市实验设备厂; 超声波清洗机, 昆山市超声仪器有限公司; 涡旋混合仪、分析研磨机, 德国 IKA 集团; 低速离心机, 北京京立离心机有限公司; 电子天平, 梅特勒-托利多国际股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 待测样品的提取。液体样品混匀, 固体样品磨碎混匀后, 准确称取 5 g 于离心管, 加入 10 ml 提取剂 (含 0.1% BHT 的乙腈), 振荡 10 min, 移取上清液, 残渣再加入 10 ml 提取剂振荡 10 min, 移取并合并 2 次提取液, 加 5 g NaCl 促进有机相与水相分层, 3 000 r/min 离心 3 min 后, 取 2 ml 上述上清液经无水 NaSO₄ 干燥后, 过 0.22 μm 有机滤膜, 准备进样分析。操作过程中尽量避免。

1.2.2 高效液相色谱条件。色谱柱: Agilent HC-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (95/5, V/V); 流速: 1.0 ml/min; 进样量: 10 μl; 检测波长: 446 nm。

1.2.3 标准溶液的配制与曲线绘制。准确称取叶黄素对照品 1 mg 溶解于 10 ml 0.1% BHT 甲醇溶液, 配制成标准储备液, 避光保存于 -20 °C 冰箱。将储备液稀释成 0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0 μg/ml, 按照上述色谱条件进行 HPLC 测定, 作峰面积对浓度的标准曲线, 求出直线回归方程。

1.2.4 样品分析。在相同的液相色谱条件下, 分别将标准溶液和样品溶液进液相色谱, 以保留时间定性, 以峰面积定量。

基金项目 “十二五”农村领域国家科技计划课题 (2011BAD23B05-4)。
作者简介 杨文文 (1988-), 女, 河北平山人, 硕士研究生, 研究方向: 食品添加剂分析, E-mail: yangwenwen08@126.com。* 通讯作者, 教授, 从事有机合成、残留分析研究。

收稿日期 2013-07-22

2 结果与分析

2.1 样品前处理条件的选择

2.1.1 提取剂的选择。叶黄素易溶于有机溶剂,在乙腈、丙酮、乙酸乙酯中的溶解度分别为 100、800、800 mg/L,该试验选择了乙酸乙酯、丙酮、乙腈 3 种提取剂提取试样中的叶黄素。由于乙酸乙酯与液体样品很难混溶,提取作用较差,回收率为零,不适合作为提取试剂;当用丙酮作为提取剂时,回收率偏高(平均值为 116.79%),可能是丙酮的溶解性较好,提取过程中,其他色素物质造成了干扰;虽然叶黄素在乙腈中的溶解度较小,但乙腈作为提取剂时,叶黄素的添加回收率平均为 98.78%,结果较理想,说明乙腈能够将样品中的叶黄素全部提取出来,满足分析测定要求。该试验最终选择乙腈作为提取剂。

2.1.2 提取方式的选择。该试验比较了超声和振荡 2 种提取方式,提取剂为 10 ml 含 0.1% BHT 的乙腈,提取 2 次。由表 1 可以看出,超声和振荡 2 种提取方式对回收率的影响差别不大。当添加水平较低时,2 种提取方式都造成回收率偏高,随着添加水平的提高,回收率水平下降,这可能是由于标准曲线误差造成的。在相同添加水平条件下,超声提取的回收率较振荡提取方式高。2 种方式均能满足提取要求。

表 1 提取方式对叶黄素添加回收率的影响

提取方式	添加水平//μg/g	回收率//%
超声	1	134.32
	2	92.28
	4	86.97
振荡	1	109.76
	2	92.78
	4	85.66

2.1.3 提取剂体积及提取次数。以含 0.1% BHT 的乙腈为提取液,振荡提取,考察提取剂体积及提取次数对回收率的影响。由表 2 可以看出,提取 1 次或者提取液体积较少时,回收率较低,因为此时试样中的叶黄素未被完全提取;当提取次数为 3 次时,回收率仅为 78.61%,可能是由于较长的前处理过程造成了叶黄素的分解。最终确定提取次数为 2 次,每次加提取液 10 ml。

表 2 提取次数对叶黄素添加回收率的影响

提取次数	提取液体积//ml	回收率//%
1	10	76.23
2	10 + 5	84.45
2	10 + 10	98.78
3	10 + 10 + 10	78.61

2.2 色谱条件的选择 以乙腈为溶剂时,叶黄素在波长 446 nm 处有最大吸收峰,流动相为乙腈 - 水(95:5),流速为 1 ml/min,能快速有效地分离叶黄素,见图 1。在样品中,目标峰与基质中其他杂峰分离良好。

2.3 标准曲线 在规定的色谱条件下,将标准溶液系列进样测定,在 0.5 ~ 50.0 μg/ml 范围内,回归方程为 $y =$

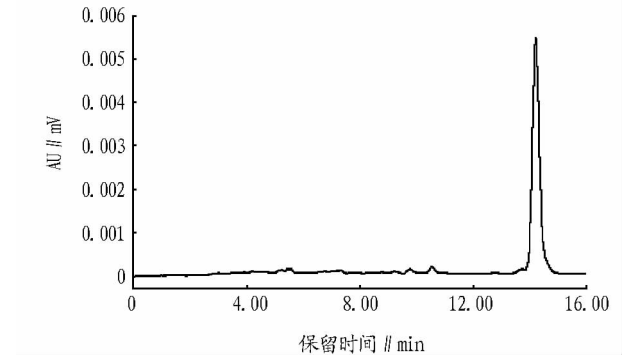


图 1 叶黄素在桃汁基质中的液相色谱

1 978.80x - 385.97($R^2 = 0.9996$)。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验。取浓度为 1 μg/ml 的叶黄素溶液进样,连续测定 6 次。试验结果显示,相对标准偏差 RSD 为 0.38%,表明该方法精密度良好。

2.4.2 重现性试验。取同一批次桃汁饮料,进行样本处理,做重复性考察。试验显示,相对标准偏差(RSD)为 4.41%($n = 6$),表明此检测方法有较好的重复性。

2.4.3 回收率试验。试验测定了该方法对于不同基质的添加回收率(表 3),回收率水平 93.21% ~ 101.54%,能够满足分析检测要求。

表 3 不同基质的添加回收率

基质	平均添加回收率//%	基质	平均添加回收率//%
桃汁	94.59	果冻	101.54
山楂果茶	98.78	粗粮八宝粥	93.21

2.5 方法应用 应用该方法测定了多种食品基质中叶黄素含量,其中粗粮八宝粥中叶黄素含量最高,为 48.01 μg/g,其次是山楂果茶和桃汁,分别为 5.96 μg/g 和 3.06 μg/g,而果冻、草莓果酱和格瓦斯饮料中未检出叶黄素。

表 4 不同加工食品中叶黄素含量

试样	叶黄素含量//μg/g	试样	叶黄素含量//μg/g
桃汁	3.06	果冻	NA
橙汁	1.50	粗粮八宝粥	48.01
格瓦斯	NA	草莓果酱	NA
山楂果茶	5.96		

注:NA 指未检出。

3 结论

该试验以乙腈为提取剂,经振荡处理,提取加工食品中的叶黄素,通过高效液相色谱法进行测定,该方法对样品的前处理简单快速,对操作仪器要求低,特别适合样品量较多的试验。利用建立的方法测定了果汁、粗粮制品等基质中的叶黄素含量,其中粗粮八宝粥、山楂果茶等食品富含叶黄素,可以指导科学合理饮食。

(下转第 10214 页)

段的总报销费用 Y , 用 ε 表示费用误差 (表 7)。定义: $Y = n * \text{rate} * 1\,000; \varepsilon = 1\,000 * n * (\pm t_{\alpha/2} \frac{s}{\sqrt{n}})$ 。

表 6 关于歙县人民医院 (2009 年 8 月) 各年龄段医保报销比例的总体均值估计

年龄 岁	n	$\text{rate}(\bar{x})$	s^2	均值的置信限	
				90% 置信下限	90% 置信上限
1~5	79	0.240	0.100	0.221	0.259
6~10	18	0.324	0.122	0.273	0.374
11~15	17	0.292	0.100	0.250	0.335
16~20	41	0.366	0.108	0.337	0.394
21~25	29	0.324	0.132	0.283	0.366
26~30	32	0.336	0.119	0.300	0.371
31~35	44	0.368	0.093	0.345	0.392
36~40	83	0.381	0.097	0.363	0.399
41~45	101	0.379	0.111	0.360	0.397
46~50	93	0.382	0.115	0.362	0.401
51~55	108	0.395	0.095	0.380	0.410
56~60	135	0.383	0.098	0.369	0.397
61~65	82	0.382	0.098	0.365	0.400
66~70	72	0.403	0.093	0.384	0.421
71~75	105	0.438	0.090	0.423	0.453
76~80	82	0.422	0.099	0.403	0.440
81~85	34	0.403	0.115	0.369	0.436
86 以上	12	0.407	0.105	0.353	0.461

表 7 关于歙县 (2009 年 8 月) 各年龄段医保费用估计

年龄//岁	$Y//\text{元}$	年龄//岁	$Y + \varepsilon//\text{元}$	年龄//岁	$Y - \varepsilon//\text{元}$
56~60	51 705	56~60	53 595	56~60	49 815
71~75	45 990	71~75	47 565	71~75	44 415
51~55	42 660	51~55	44 280	51~55	41 040
41~45	38 279	41~45	40 097	41~45	36 360
46~50	35 526	46~50	37 293	46~50	33 666
76~80	34 604	76~80	36 080	76~80	33 046
36~40	31 623	36~40	33 117	36~40	30 129
61~65	31 324	61~65	32 800	61~65	29 930
66~70	29 016	66~70	30 312	66~70	27 648
1~5	18 960	1~5	20 461	1~5	17 459
31~35	16 192	31~35	17 248	31~35	15 180
16~20	15 006	16~20	16 154	16~20	13 817
81~85	13 702	81~85	14 824	81~85	12 546
26~30	10 752	26~30	11 872	26~30	9 600
21~25	9 396	21~25	10 614	21~25	8 207
6~10	5 832	6~10	6 732	6~10	4 914
11~15	4 964	11~15	5 695	11~15	4 250
>86	4 884	>86	5 532	>86	4 236

通过结合住院病人的人数与住院费用报销比例这两因素, 受益情况分析表明: 56~60 岁受益最大, 其次是 71~75 岁, 再次是 51~55 岁。

3 结论

通过样本数据统计分析可以看出, 参与新农合医疗看病的人群在 21~80 呈现普遍性, 说明普及度大; 就性别而言女性比男性偏多; 若是从年龄角度考虑, 参与医保的看病人群在 56~60 岁最突出; 同时, 在 66 岁以上年龄段中, 71~75 岁和 66~70 岁人数也有所凸显, 说明医保受益在这些年龄段得到很好的体现; 而在 6~35 岁年龄段中, 21~25 就诊人数最多, 研究发现, 处于生育期的女性占有很大比例。

方差分析的结果说明不同地区 and 不同调查月份的交互作用对住院病人的人数无显著影响, 进一步认为人数分布情况相同。从最终受益情况分析, 56~60 岁受益最大, 其次是 71~75 岁, 再次是 51~55 岁, 这很好的体现了国家在新农合制度上对老年人起到一定的保障。

通过对就诊人群受益情况的统计分析, 提出以下建议: (1) 新型农村合作医疗制度应该就不同层次、不同结构、不同年龄的人群, 制定多层次、不同的筹资和报销政策^[6]。

(2) 随着中国迈入老龄化社会, 应该提高对老年人医保待遇, 尤其是对于人数比例不足 1% 的 85 岁以上老年人, 可以对他们每年给予一定额度的免费医疗, 这样更是体现了对高龄老年人的特殊照顾。

(3) 特殊病症 (如癌症、高血压、脑梗塞), 在老年人中发病率偏高, 建议对此可以采取一些额外补助措施, 更好的照顾这部分群体。

参考文献

[1] 赵燕凤. 婴儿断奶与“四病”发病关系的调查[J]. 浙江预防医学, 2002, 14(8): 28.

[2] 李文. 上海市黄浦区半淞街道社区婴儿保健服务需求调查[J]. 中华医学写作杂志, 2005, 12(10): 878-879.

[3] 何晓群. 多元统计分析[M]. 北京: 中国人民大学出版社, 2004.

[4] 高惠璇. 应用多元统计分析[M]. 北京: 北京大学出版社, 2005.

[5] 黄燕. SAS 统计分析及应用[M]. 北京: 机械工业出版社, 2006.

[6] 于淼. 浅谈新型农村合作医疗制度筹资政策的公平性[J]. 牡丹江医学院学报, 2008, 29(6): 79.

[7] GUO M L, LI Y, XU H Z, et al. Issues concerning Migrant Workers' Participation in the New Rural Cooperative Medical System and Countermeasures[J]. AsianAgriculturalResearch, 2012, 4(5): 32-35, 42.

(上接第 10109 页)

参考文献

[1] RAO A V, RAO L G. Carotenoids and human health[J]. Pharmacological Research, 2007, 55(3): 207-216.

[2] 卢艳杰, 姚惠源. 黄体素、玉米黄素及其生理功能研究现状[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(2): 80-84.

[3] SNODDERLY D M. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 1995, 62(6): 1448-1461.

[4] MANGELS A R, HOLDEN J M, BEECHER G R, et al. Carotenoid content

of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data[J]. Journal of the American Dietetic Association, 1993, 93(3): 284-296.

[5] JOHNSON E J. The role of carotenoids in human health[J]. Nutrition in Clinical Care, 2002, 5(2): 56-65.

[6] MURILLO E, MELÉNDEZ-MARTÍNEZ A J, PORTUGAL F. Screening of vegetables and fruits from Panama for rich sources of lutein and zeaxanthin[J]. Food Chemistry, 2010, 122(1): 167-172.

[7] 中华人民共和国卫生部. GB 2760-2011, 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.