

婴幼儿配方食品中叶黄素的提取及测定

单 艺¹, 姜毓君^{1,*}, 陈 一², 王象欣¹, 鄂来明¹

(1. 东北农业大学 黑龙江省乳品工业技术开发中心, 黑龙江 哈尔滨 150086;

2. 河北北方学院农林科技学院, 河北 张家口 075000)

摘 要: 比较婴幼儿配方食品中叶黄素的 3 种提取方法: 氢氧化钾皂化法、丙酮提取法和正己烷提取法, 从中得出最佳提取方法为正己烷萃取法。选用色谱柱 YMC Carotenoid(4.6mm × 250mm, 5 μm) 以甲醇、甲基叔丁基醚为流动相进行梯度洗脱, 流速为 1 mL/min, 于 445nm 波长处测定婴幼儿配方食品中叶黄素的含量。该方法操作简便, 提取效率高(平均回收率为 95.4%), 重现性好(RSD 为 0.93%), 检出限为 2 μg/100g, 可以准确的测定婴幼儿配方食品中叶黄素的含量。

关键词: 叶黄素; 婴幼儿配方食品; 高效液相色谱; 提取

Extraction and Determination of Lutein in Formulated Foods for Infant and Young Children

SHAN Yi¹, JIANG Yu-jun^{1,*}, CHEN Yi², WANG Xiang-xin¹, E Lai-ming¹

(1. Heilongjiang Dairy Industry Technical Development Center, Northeast Agricultural University, Harbin 150086, China;

2. College of Agricultural and Forestry, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: Three methods for extracting lutein from formulated foods for infant and young children such as potassium hydroxide saponification, acetone extraction and *n*-hexane extraction were compared, and the *n*-hexane extraction method was found to be the best of them. An HPLC method for the determination of lutein was developed based on the selected extraction method. The chromatographic separation was performed on a YMC Carotenoid (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) using a mobile phased composed of methanol and methyl tertiary butyl ether under a gradient elution mode at a flow rate of 1 mL/min. Lutein was detected at the wavelength of 445 nm. The method was characterized by easy operation and high extraction efficiency (95.4% average recovery), and good reproducibility (0.93% RSD). The detection limit was 2 μg/100 g. It allowed accurate determination of lutein in formulated foods for infant and young children.

Key words: lutein; formulated foods for infant and young children; high performance liquid chromatography; extraction
中图分类号: TS252.7 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2012)04-0189-04

叶黄素(lutein)是一种天然类胡萝卜素, 属于萜类化合物的一种^[1], 在化妆品、饮料和食品行业中作为食品添加剂和保健食品原料被广泛使用^[2]。美国 FDA 早在 1995 年就批准了叶黄素作为食品补充剂用于成人食品及婴幼儿食品中^[3]。2001 年叶黄素被 JECFA(FAO/WHO 食品添加剂联合委员会)批准为没有 ADI(日允许摄入量)的食品着色剂^[4]。国内 2006 年年底也批准了叶黄素作为着色剂在饮料、焙烤食品、冷冻食品、果冻和果酱类食品上的应用, 添加量为 50~150mg/kg; 同时也批准了叶黄素可以作为营养强化剂添加到婴幼儿或儿童配方食品中, 添加量为 300~4230g/kg^[5]。目前, 对于叶黄素的测定国内外已有一些方法, 如分光光度法、薄层层

析法、高效液相色谱法^[6]、质谱法^[7-9]。由于婴幼儿配方食品成分复杂, 尚未有专门针对婴幼儿配方食品中叶黄素测定的国家标准。本实验以现行国标中测定叶黄素的方法^[10-11]为基础, 结合婴幼儿配方食品的性质, 开发出适合于婴幼儿配方食品中叶黄素的测定方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

叶黄素对照品(纯度 > 99%) 美国 Chromadex 公司; 甲基叔丁基醚(MTBE, 色谱纯); 无水乙醇、正己烷、2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)、丙酮为色谱纯, 其他试剂均为国产分析纯。

收稿日期: 2011-03-09

作者简介: 单艺(1981—), 女, 工程师, 博士研究生, 研究方向为乳品科学。E-mail: shanyi_1@sina.com

* 通信作者: 姜毓君(1971—), 男, 教授, 博士, 研究方向为乳品科学。E-mail: yujun_jiang@163.com

0.5g/100mL 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)乙醇溶液、40g/100mL 氢氧化钾的乙醇溶液、0.1g/100mL BHT 的丙酮溶液、0.1g/100mL BHT 的正己烷溶液。

1.2 仪器与设备

2695 高效液相色谱仪(带 2487 紫外检测器、Empower 色谱工作站) 美国 Waters 公司; Lambda 25 紫外分光光度计 美国 PerkinElmer 公司; QGC-12T 干热式氮吹仪 上海泉岛科贸有限公司; BS210S 型电子天平 北京赛多利斯天平有限公司; 超纯水仪 英国 Elga 公司; 旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂; 空气浴振荡器 哈尔滨市东明医疗仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 叶黄素标准品纯度的校正

称取约 10mg 叶黄素样品, 用无水乙醇溶解定容到 100mL, 配成叶黄素储备液。取 1mL 储备液, 放入 25mL 容量瓶中, 用无水乙醇定容, 得到叶黄素标准溶液, 待紫外分光光度计测定。以无水乙醇做空白对照, 测定其 445nm 的吸光度 A_{445} 。

叶黄素标准溶液质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)= $10000/2550 \times A_{445} \times P$

式中: 2550 为乙醇中叶黄素的吸光系数, 即 1g/100mL 溶液的理论吸光度; 10000 为 1g/100mL 与 $\mu\text{g/mL}$ 单位转换; A_{445} 为在 445nm 的吸光度; P 为纯度修正系数, 以叶黄素波峰面积/总波峰面积计算得到。

1.3.2 高效液相色谱条件

色谱柱: YMC Carotenoid C₃₀(4.6mm $\times$ 250mm, 5 μm); 流动相: A 为甲醇, B 为甲基叔丁基醚; 流速 1mL/min; 检测波长 445nm; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积 10 μL 。

表 1 梯度洗脱条件

Table 1 Linear gradient condition

时间/min	0	10	11	16	23
甲醇/%	85	78	10	10	85
甲基叔丁基醚/%	15	22	90	85	15

1.3.3 前处理方法

1.3.3.1 皂化法

称取混合均匀的样品 0.5g(精确到 0.1mg), 置于 100mL 三角烧瓶中, 加入 5mL 40 $^{\circ}\text{C}$ 的蒸馏水, 使样品充分溶解。加入 5mL 0.5g/100mL BHT 乙醇溶液, 加入 2mL 40g/100mL 氢氧化钾乙醇溶液, 混合均匀, 充氮保护, 盖上瓶盖, 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴振荡器皂化 30min。

将皂化液转入 250mL 分液漏斗中, 加入 50mL 含 0.1g/100mL BHT 的丙酮溶液, 在分液振荡器中振荡萃取 5min 后静置分层, 留取上层, 将其余溶液放于另一 250mL 分液漏斗中, 重复上次萃取过程二次, 合并上层清液到第一个漏斗中, 滤液经无水硫酸钠脱水后, 在

40 $^{\circ}\text{C}$ 氮气流条件下, 旋转蒸发至近干, 用含 0.1g/100mL BHT 的丙酮溶液转移至 20mL 具塞试管中。在氮吹仪上吹干, 流动相定容至 2mL, 0.45 μm 滤膜过滤后, 用高效液相色谱仪测定。

1.3.3.2 丙酮提取法

准确称取样品 0.1g(精确到 0.001g), 置于 50mL 聚丙烯离心管中。在闭光条件下, 加入 1mL 水, 漩涡振荡使样品溶解, 加入 1mL 乙醇, 加入 10mL 含 0.1g/100mL BHT 丙酮溶液, 振荡提取约 3min。以 3500r/min 离心 5min, 移取上清液至 15mL 离心管, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹至近干, 流动相定容至 2mL, 0.45 μm 滤膜过滤后, 用高效液相色谱仪测定。

1.3.3.3 正己烷提取方法

准确称取样品 0.1g(精确到 0.001g)置于 10mL 指型瓶中, 在闭光条件下, 加入 1mL 水, 漩涡振荡使样品溶解, 加入 1mL 乙醇, 漩涡振荡 10s。加入 3mL 0.1g/100mL BHT 的正己烷溶液, 手动往复振摇 10min。以 3500r/min 离心 5min。将上层有机层取出, 收集到指型瓶中。重复 0.1g/100mL BHT 的正己烷溶液萃取步骤两次, 合并有机层。于 30 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹至近干, 流动相定容至 2mL, 0.45 μm 滤膜过滤后, 用高效液相色谱仪测定。

2 结果与分析

2.1 叶黄素标准储备液质量浓度的测定

将叶黄素标准溶液在 200~600nm 波长范围内进行扫描, 根据二极管阵列检测器获得的光谱图(图 1)可知, 叶黄素在 445nm 处有最大吸收, 故选择 445nm 为检测波长。

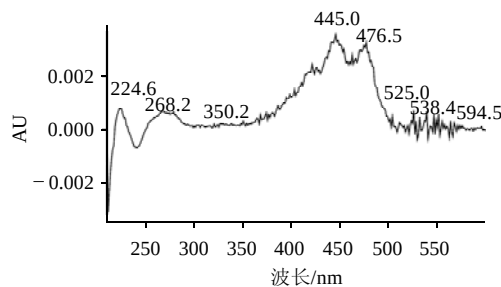


图 1 叶黄素标准品全波长扫描曲线

Fig.1 Full-wavelength scanning spectrum of lutein standard solution

根据 1.3.1 节方法, 计算得叶黄素标准溶液纯度修正系数, 最后得出校正后质量浓度为 0.328 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 叶黄素标准曲线的测定

配标准制工作液制作系列标准曲线, 按上述色谱条件测定色谱峰面积, 以峰面积为纵坐标(Y), 质量浓度

($\mu\text{g/mL}$)为横坐标(X)进行分析。得线性回归方程 $Y = 359362X - 32.74$ ($r = 0.9998$), 叶黄素对照品在 $0.0164 \sim 0.492 \mu\text{g/mL}$ (质量浓度) 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.3 检出限

对于婴幼儿配方食品中。当信噪比 $R_{SN} = 3$ 时, 皂化法取样量为 0.1g , 定容体积为 2mL 时, 方法的检出限为 $10 \mu\text{g}/100\text{g}$ 。丙酮提取法、正己烷提取法的取样量为 0.5g , 定容体积为 2mL 时, 方法的检出限为 $2 \mu\text{g}/100\text{g}$ 。

2.4 样品前处理方法比较

叶黄素在结构中存在大量的双键, 对光、热、氧等十分敏感^[12]。因此, 在叶黄素的提取和测定过程中应避免光、室温操作, 提取剂中加入抗氧化剂 BHT。为了抑制分析过程中叶黄素的降解, 优化加入不同浓度抗氧化剂(BHT)对萃取效率的影响(表 2)。结果显示当 BHT 质量浓度在 $0.01 \sim 0.1\text{g}/100\text{mL}$ 范围内时叶黄素的萃取量随着 BHT 质量浓度的增加而增加; 当 BHT 质量浓度达到 $0.1\text{g}/100\text{mL}$ 后, 随着 BHT 质量浓度的增加叶黄素萃取量的变化不大。故选择在萃取剂中加入抗氧化剂(BHT)的质量浓度为 $0.1\text{g}/100\text{mL}$ 。

表 2 不同的抗氧化剂(BHT)质量浓度萃取叶黄素的含量

Table 2 Results obtained for lutein determination based on extraction in the presence of different concentrations of BHT

BHT 溶液质量 浓度/($\text{g}/100\text{mL}$)	0	0.01	0.05	0.10	0.15	0.2
叶黄素含量/($\mu\text{g}/100\text{g}$)	49.45	54.34	58.99	62.48	63.40	64.04

本实验对皂化法、丙酮提取法、正己烷提取法进行比较。叶黄素易溶于非极性有机试剂, 在极性较大的有机溶剂中溶解度较小^[13]。一种极性较大的溶剂和一种较小的溶剂组成的二元混合溶剂对叶黄素的浸取效率要比纯溶剂高。因此, 实验选取乙醇-丙酮、乙醇-正己烷为提取试剂。

采用氢氧化钾皂化法萃取样品, 尽管氢氧化钾有很好的去除脂肪的作用, 但样品出现严重的蛋白结块现象。采用丙酮法提取样品, 丙酮与水层分离不明显, 出现乳化现象。同时, 氮气吹干后, 由于脂肪的存在, 导致大量白色析出物。采用正己烷提取, 未出现结块和乳化现象, 且氮吹仪吹干时间短。

2.5 高效液相色谱图

从图 2 可以看出, 叶黄素标准品的保留时间为 8.627min ; 图 3 显示, 样品中叶黄素的保留时间为 8.800min , 与标准品中叶黄素的保留时间基本一致。

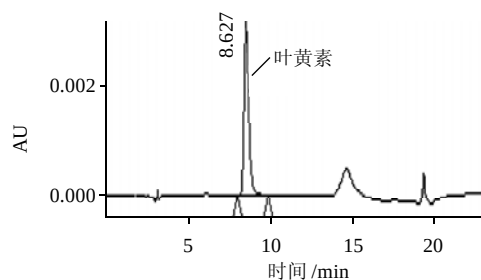


图 2 叶黄素标准品色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of lutein standard solution

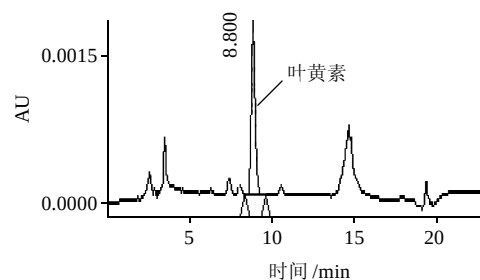


图 3 婴幼儿配方食品中叶黄素色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of lutein in a real sample

2.6 加样回收率实验

取已知质量浓度样品, 分别加入 3 个梯度的叶黄素标准品, 每个梯度做 3 个平行, 按 1.3.3 节方法进行处理。

表 3 3 种提取方法回收率

Table 3 Recovery rates of three extraction methods for lutein in a known sample

方法	加标水平/ ($\mu\text{g/mL}$)	加标前含 量/($\mu\text{g/mL}$)	加标后含 量/($\mu\text{g/mL}$)	回收 率/%	平均回 收率/%	RSD/%
皂化法	0.45	0.102	0.470	85.1	77.7	8.72
	0.20	0.102	0.230	76.0		
	0.10	0.102	0.145	71.9		
丙酮提取法	0.45	0.102	0.506	91.7	90.5	1.23
	0.20	0.102	0.271	89.6		
	0.10	0.102	0.182	90.1		
正己烷提取法	0.45	0.102	0.523	94.7	95.4	0.93
	0.20	0.102	0.291	96.4		
	0.10	0.102	0.192	95.0		

从表 3 可以看出, 皂化法提取婴幼儿配方食品中叶黄素, 回收率低, 且 RSD 值较高。叶黄素在强碱条件下不稳定, 在皂化提取过程中易导致叶黄素分解^[14]。样品结块, 导致浸提不完全, 平行性较差。不同有机溶剂的提取效果相差很大, 这与目标物的溶解度、分子极性、材料的亲和性等因素有关^[15]。正己烷提取法与丙酮提取法相比较, 回收率高, RSD 值较低。叶黄素在

正己烷中的溶解度大于丙酮, 丙酮提取样品时, 会出现乳化现象, 导致叶黄素提取不完全。

2.7 重现性实验

每天取3份样品, 按1.3.3节方法进行样品处理, 上机, 连续测定3d, 得到9次平行测定相对标准偏差见表4。皂化法的RSD($n=9$)为6.18%, 丙酮提取法的RSD($n=9$)为1.62%, 正己烷提取法的RSD($n=9$)为0.865%, 对于同一样品, 正己烷提取法测定值最高, 重现性好, 皂化法的测定值最低, 且重现性差。

表4 重现性实验结果
Table 4 Results of reproducibility test

测定时间	次数	皂化法 / ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	丙酮提取 法 /($\mu\text{g}/100\text{g}$)	正己烷提取法 / ($\mu\text{g}/100\text{g}$)
第1天	1	63.85	73.56	79.05
	2	65.87	73.75	80.47
	3	64.99	76.67	79.49
	4	60.87	74.87	80.83
第2天	5	59.98	76.32	80.77
	6	61.57	73.99	79.72
	7	68.89	75.21	80.65
第3天	8	69.87	76.58	79.49
	9	70.98	75.65	80.74
平均值		65.21	75.18	80.13
RSD/%		6.18	1.62	0.86

3 结 论

3.1 选用色谱柱 YMC Carotenoid (4.6mm $\times$ 250mm, 5 μm)以甲醇、甲基叔丁基醚为流动相进行梯度洗脱, 流速为1mL/min, 测定婴幼儿配方食品中叶黄素的含量。经过全波长扫描, 确定叶黄素在445nm波长下有最大吸收。

3.2 本实验通过研究, 总结出婴幼儿配方食品中叶黄素测定的操作要点包括避光、室温条件操作, 以及提取剂中加入0.1g/100mL抗氧化剂BHT等。通过采用二元混合提取剂进行提取, 从而提高了婴幼儿配方食品的溶解效率以及叶黄素的提取率。

3.3 本实验以现行的叶黄素测定国家标准为基础, 结合婴幼儿配方食品的性质, 研究3种不同的提取方法(氢氧化钾皂化法、丙酮提取法、正己烷提取法), 通

过比较这3种提取方法回收率(分别为77.7%、90.5%、95.4%)、重现性RSD(分别为6.18%、1.62%、0.86%)、检出限(分别为10、2、2 $\mu\text{g}/100\text{g}$), 确定了正己烷提取法为最佳方法。该法操作简便、快速, 萃取时不易发生乳化、结块, 并且提取效率高(平均回收率为95.4%), 重现性好(RSD为0.93%), 检出限低(2 $\mu\text{g}/100\text{g}$), 可准确的测定婴幼儿配方食品中叶黄素的含量, 是一种在检测实践中可以广泛应用的方法。

参考文献:

- [1] DAVID J, HART K, JOHN S. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK[J]. Food Chem, 1995, 54(1): 101-111.
- [2] 胡宪, 张莉华. 叶黄素的毒理学安全性[J]. 食品工业科技, 2009(4): 296-298.
- [3] GRANADO F, OLIMEDILLA B, BLANCO I. Bioavailability of α -+ β -carotene in type 1 diabetic patients[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2001, 2(3): 151-198.
- [4] 李亚慧, 董诗源. 食品中叶黄素的研究与应用[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(3): 287-288.
- [5] 李颖, 吴雪祥. HPLC法同时测定多种食品添加剂的方法研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(9): 1093-1094.
- [6] YOUNG J C, ABDEL-AAL EL-SM, RABALSKI I, et al. Identification of synthetic regioisomeric lutein ester and their quantification in a commercial lutein supplement[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(13): 4965-4972.
- [7] 李大婧, 宋江峰, 刘春泉. 万寿菊花超临界萃取物的气相色谱-质谱分析[J]. 食品科学, 2010, 31(18): 338-341.
- [8] 程红艳, 陈军辉. 反相高效液相色谱-电喷雾质谱法测定苜蓿中的叶黄素[J]. 食品科学, 2010, 31(18): 206-211.
- [9] LAKSHMINARAYANA R, ARUNA G, SANGEETHA R K, et al. Possible degradation of lutein *in vitro* and *in vivo*: isolation and structural elucidation of lutein metabolites by HPLC and LC-MS[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2008, 45(7): 982-993.
- [10] GB/T 23187—2008 饲料中叶黄素的测定: 高效液相色谱法[S].
- [11] GB/T 23209—2008 奶粉中叶黄素的测定: 液相色谱-紫外检测法[S].
- [12] 王闯, 宋江峰, 李大婧, 等. 叶黄素微胶囊化研究[J]. 食品科学, 2011, 32(2): 43-47.
- [13] 宋昊, 何泽超. 万寿菊中叶黄素的提取[J]. 化工设计, 2003, 13(4): 10-12.
- [14] 黄小春, 吴灵英. 用高效液相色谱法快速测定蛋黄中的叶黄素[J]. 饲料广角, 2007(13): 37-39.
- [15] 周海胜, 蒋凌志, 黄梅. 蛋白酶预处理对玉米蛋白粉中叶黄素提取的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(20): 52-57.