

高效液相色谱法测定糕点中的栀子黄

张旭*

(国家食品质量监督检验中心, 北京 100094)

摘要: **目的** 改进 GB/T5009.149-2003《食品中栀子黄的测定 第一法 高效液相色谱法》的方法。**方法** 样品经甲醇:甲酸(6:4, V:V)洗脱, 采用 Agilent Extend C₁₈ 反相色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以甲醇:0.2%氨水(50:50, V:V) 为流动相(等度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 进样量 20 μL, 经配有二极管阵列检测器(DAD)的高效液相色谱仪(high performance liquid chromatograph, HPLC)进行测定。**结果** 本方法检出限为 3.2 mg/kg, 栀子黄中藏花酸和藏花素峰面积的相对标准偏差分别为 1.6%、2.5%, 在 5~50 μg/mL 范围内有较好的线性, $Y=1.34X-0.54$, $r^2=0.9998$, 不同浓度的回收率在 91.2%~98.4%之间。**结论** 本方法简单、高效、准确度高, 回收率和重现性良好, 适用检测的食品类别范围较宽, 具有推广应用价值。

关键词: 栀子黄; 高效液相色谱法; 栀子苷; 藏花酸; 藏花素

Determination of gardenia yellow cake by high performance liquid chromatography

ZHANG Xu*

(Nation Food Quality & Safety Supervision and Inspection Center, Beijing 100094, China)

ABSTRACT: Objective To improve the method of GB/T 5009.149-2003 *Determination of crocin in food by high performance liquid chromatography*. **Methods** After eluted with methanol:formic acid (6:4, V:V), samples were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) equipped with diode array detection (DAD), using Agilent extend C₁₈ reversed-phase chromatographic column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with methanol: 0.2% ammonia water (50:50, V:V) as mobile phase (isocratic elution) at a flow rate of 1.0 mL/min, and injection volume of 20 μg. **Results** The detection limit of the method was 3.2 mg/kg. The RSDs of the peak area of crocetin and crocin in gardenia yellow were 1.6% and 2.5%, respectively. And they had a good linearity in the range of 5~50 μg/mL, $Y=1.34X-0.54$, $r^2=0.9998$. The recoveries were between 91.2%~98.4%. **Conclusion** This method is simple, efficient, accurate, and has good recovery rate and reproducibility, which is suitable for the detection of a wide range of food categories, and has the value of popularization and application.

KEY WORDS: gardenia yellow; high performance liquid chromatography; geniposide; crocetin; crocin

*通讯作者: 张旭, 助理工程师, 主要研究方向为食品质量安全分析检测。E-mail: ericzhangxu@sina.com

*Corresponding author: ZHANG Xu, Assistant Engineer, Nation Food Quality & Safety Supervision and Inspection Center, Beijing 100094, China. E-mail: ericzhangxu@sina.com

1 引言

栀子黄(gardenia yellow)是从栀子果中提取出来的一种食用天然色素,主要成分为藏花素和藏花酸^[1,2],是一种罕见的水溶性类胡萝卜素,在人体内可以转化为维生素A,可补充人体维生素的不足,还具有清热祛火、凉血利胆、降低胆固醇的作用,具有一定的营养保健功能,是国内外使用最广泛、稳定性较好的食用天然黄色素之一。栀子黄可用于果汁(味)型饮料、配制酒、糕点上彩妆、冰棍、雪糕、膨化食品、果冻、面饼、糖果和栗子罐头等。最新发布的GB 2760-2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》^[3]对食品中栀子黄的添加范围及限量做出明确规定。

目前,测定栀子黄的方法主要有液相色谱法、气相色谱-质谱法、薄层层析法等^[4,5]。我国食品中栀子黄的测定通常按照食品安全国家标准(GB/T 5009.149-2003)^[2]液相色谱法进行测定,该方法选择栀子苷作为对照品,由于栀子苷为白色结晶,栀子黄中主要提供色价成分为藏花素和藏花酸,在可见光谱下有特定吸收波长,因此该法不能完成栀子黄含量的准确测定。本研究通过测定藏花素和藏花酸,改善了测定栀子黄的高效液相色谱测定方法。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

2.1.1 仪器

Agilent 1100型高效液相色谱仪,Agilent G1315C二极管阵列检测器(美国安捷伦公司);BSA124S电子分析天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司)。

甲醇、氨水、氢氧化钠(分析纯,北京化工厂);实验室用水为超纯水。

栀子黄对照品(纯度>95%,北京化学试剂公司)。

2.1.2 样品

蛋糕,购自本地超市。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制

准确称取栀子黄标准品50 mg,以超纯水定容至100 mL容量瓶中,标准储备液浓度为500 $\mu\text{g/mL}$ 。吸

取标准储备液0、1、2、4、6、8、10 mL以水定容100 mL,得浓度为0、5、10、20、30、40、50 $\mu\text{g/mL}$ 标准使用液。

2.2.2 样品前处理

称取2.00 g粉碎处理的样品,以约20 mL纯净水溶解后备用。称取聚乙酰胺粉(5.00 g)置于G3型砂芯漏斗,以60 $^{\circ}\text{C}$ 温水(pH=4)滤洗2次(约30 mL/次)。备用试样经聚乙酰胺粉吸附后,用甲醇:甲酸(6:4, V:V)洗脱液洗脱至无色,收集洗脱液(用10%NaOH溶液调至pH=7)以水定容至25 mL涡旋,离心后上机测定。

2.2.3 色谱条件

反相 Agilent Extend C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm);柱温 25 $^{\circ}\text{C}$;流动相:甲醇:0.2%氨水(50:50, V:V);流速为1.0 mL/min,进样量为20 μL ;DAD检测器检测波长:430 nm^[6-12]。

3 结果与讨论

3.1 波长的选择

GB/T 5009.149-2003中栀子苷的吸收波长为240 nm,为紫外波长。可见波长的吸收范围为400~600 nm,对于橘黄色的特定吸收波长为400~460 nm,经过190~630 nm扫描标准品,参照谱图(图1)发现,栀子黄在430 nm处有最大吸收,本方法选取430 nm作为测定吸收波长。

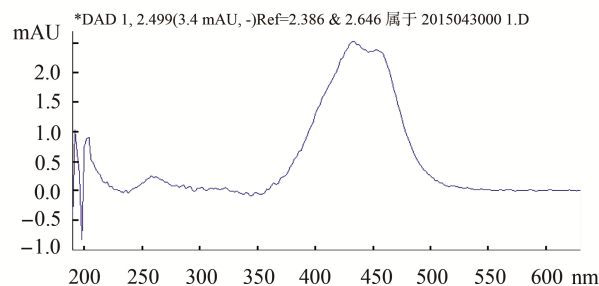


图1 藏花素、藏花酸吸光度图谱

Fig.1 Absorbance spectrum of crocetin and crocin

3.2 色谱柱及流动相的选择

根据文献^[13-15],使用Agilent SB C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)、Agilent XDB C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)、TC C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)、资生堂 HELIX、

Agilent RP C₁₈/NH C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)等色谱柱均不能很好地分离栀子黄中的藏花素及藏花酸(图2)成分, 本实验采用 Agilent Extend C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)进行分离, 分离效果较好。另外栀子黄在 pH 4~9 条件下较为稳定, 改变流动相的 pH 值后, 选择 0.2% 氨水和甲醇作为流动相, 保留时间稳定, 重现性较好。

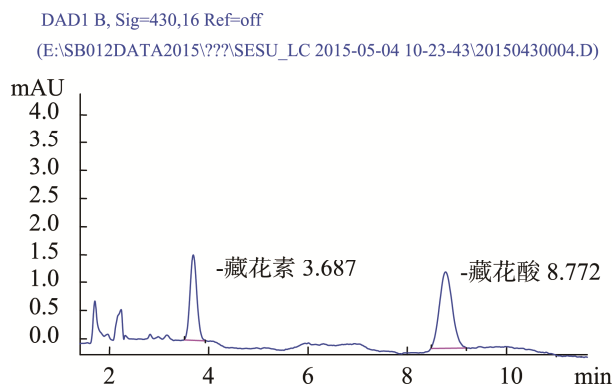


图2 藏花素、藏花酸标准图谱

Fig. 2 Standard spectrum of crocetin and crocin

3.3 校准曲线

经选定的色谱条件, 对标准使用液进行分析。由

于栀子黄的主要成分为藏花酸和藏花素, 以标准系列浓度作为横坐标, 2 个峰面积(藏花酸和藏花素)加和作为纵坐标绘制工作曲线。栀子黄线性回归方程为 $Y=1.34X - 0.54$, $r^2=0.9998$, 线性良好。

3.4 精密度及检出限

根据以上色谱条件, 选取 50 μg/mL 浓度的标准使用液进行测定, 重复进样 6 次后, 栀子黄中藏花酸及藏花素峰面积的相对标准偏差分别为 1.6%、2.5%, 如表 1 所示。根据高效液相色谱仪 3 倍信噪比计算得出检出限为 3.2 μg/mL。

3.5 样品加标回收率

根据上述色谱条件, 选择 3 水平进行加标样品测定, 加标浓度为 5、25、100 μg/mL。加标样品回收率为 91.2%~98.4%, 见表 2。

4 结论

栀子黄作为类胡萝卜素天然色素, 具有着色稳定, 色彩鲜亮等特点, 同时在人体内能够转化成维生素 A, 具有特定的保健功能, 是较安全的食品添加剂。本研究中的高效液相色谱法对栀子黄中主要 2 种物质成分进行测定, 可信度高, 稳定性好, 快速灵敏。

表 1 方法精密度试验结果

Table 1 Results of precision test of the method

		1	2	3	4	5	6	RSD(%)
实测值	藏花酸	50.2	49.8	48.3	48.7	48.5	48.9	1.6
(μg/mL)	藏花素	50.8	51.3	49.8	49.2	49.7	49.5	2.5

表 2 方法回收率试验结果

Table 2 Results of recovery test of the method

	含量(μg/mL)	加标量(μg/mL)	检测量(μg/mL)	回收率(%)
藏花酸	24.8	5	29.4	92.3
藏花素	21.7	5	26.3	91.2
藏花酸	24.8	25	49.2	97.6
藏花素	21.7	25	45.9	96.8
藏花酸	24.8	100	119.4	94.6
藏花素	21.7	100	120.1	98.4

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典(第一部)[S].
The pharmacopoeia of the People's Republic of China (the First) [S].
- [2] GB/T5009.149-2003 食品安全国家标准 食品中栀子黄的测定 第一法 高效液相色谱法[S].
GB/T5009.149-2003 National food safety standards-Determination of gardenia yellow in food-The first method-high performance liquid chromatography [S].
- [3] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2014 National food safety standards-Using standard of food additives [S].
- [4] 丁呈华, 曹丰璞, 杨浩, 等. 高效液相色谱法同时测定栀子黄、柠檬黄和日落黄色素[J]. 许昌学院学报, 2010, 29(5): 101, 102.
Ding CH, Cao FY, Yang H, *et al.* Simultaneous determination of gardenia yellow, tartrazine and sunset yellow by high performance liquid chromatography[J]. J Xuchang Univ, 2010, 29(5): 101, 102.
- [5] 陈艳华, 于中军. 高效液相色谱法测定蛋糕中的栀子黄[J]. 中国实用医药, 2010, 5(24): 155.
Chen YH, Yu ZJ. Determination limit of gardenia yellow in cake by HPLC [J]. China Prac Med, 2010, 5(24): 155.
- [6] 李永利, 张焱, 翟志雷. 高效液相色谱法测定食品中栀子黄[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(1): 72, 150.
Li YL, Zhang Y, Zhai ZL. Determination of cape jasmine yellow in food by HPLC [J]. Chin J Health Lab Technol, 2008, 18(1): 72, 150.
- [7] 张怡光, 唐仕欢, 贾蕾, 等. 含栀子保健食品配方原料应用分析[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(22): 4470, 4474.
Zhang YG, Tang SH, Jia Q, *et al.* Analysis on formula raw materials application of health food containing gardeniae fructus [J]. China J Chin Mater Med, 2014, 39(22): 4470, 4474.
- [8] 杨祖英, 周伟. 食品中天然色素越桔红、栀子黄和姜黄的测定[J]. 卫生研究, 1989, 18(1): 36, 39.
Yang ZY, Zhou W. Natural pigment in food, the color, the determination of gardenia yellow and turmeric [J]. J Health Res, 1989, 18(1): 36, 39.
- [9] 艾志录, 张晓宇, 乔明武, 等. 天然食用色素栀子黄的应用特性研究[J]. 食品工业科技, 2003, 24(12): 69, 73.
Ai ZL, Zhang XY, Qiao MW, *et al.* Study on the application characteristics of natural edible pigment gardenia yellow [J]. Sci Technol Food Ind, 2003, 24(12): 69, 73.
- [10] 陈阳, 赵璨, 张浩, 等. 栀子黄 OD 值、色价与西红花苷和栀子苷的相关性研究[J]. 食品科技, 2010, 35(5): 262, 270.
Chen Y, Zhao C, Zhang H, *et al.* Relationship investigation between OD values, colour value and crocins and geniposide contents in gardenia yellow [J]. Food Sci Technol, 2010, 35(5): 262, 270.
- [11] 高彦祥, 李媛媛. 栀子黄色素提取与精制研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2005, 35(3): 14, 25.
Gao YX, Li YY. Research progress on extraction and purification of gardenia yellow pigment [J]. China Food Addit, 2005, 35(3): 14, 25.
- [12] 周伟娥, 凌云, 张元, 等. 高效液相色谱法测定肉制品中栀子黄色素含量[J]. 食品科学, 2016, 37(2): 187, 192.
Zhou WE, Ling Y, Zhang Y, *et al.* Determination of gardenia yellow in meat products by high performance liquid chromatography [J]. Food Sci, 2016, 37(2): 187, 192.
- [13] 宋丹萍, 张宏, 李琪. 国内外食用色素标准的比较及检测方法的研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(3): 295, 300.
Song DP, Zhang H, Li Q. Comparison of national standards for edible pigments between china and foreign countries and progress on analytical techniques [J]. Food Sci, 2014, 35(3): 295, 300.
- [14] 熊福军, 王志高, 彭文博, 等. 膜集成技术在栀子黄色素提取中的应用研究[J]. 食品与发酵科技, 2015, 51(6): 7, 31.
Xiong FJ, Wang ZG, Peng WB, *et al.* Study on refining gardenia yellow pigment with membrane [J]. Food Ferment Technol, 2015, 51(6): 7, 31.
- [15] 方恩华, 陈鹭平, 吴茗梅, 等. 高效液相色谱法检测果冻中的姜黄素类化合物[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(12): 4980, 4984.
Fang EH, Chen LP, Wu MM, *et al.* Determination of curcuminoids in jelly by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(12): 4980, 4984.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



张旭, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全分析测定。
E-mail: ericzhangxu@sina.com