

高效液相色谱法检测保健食品中的番茄红素

王梅*, 任炼, 袁平, 唐雪林

(重庆市永川食品药品检验所, 重庆 402160)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法测定保健食品中番茄红素的分析方法。**方法** 用含有 0.1% 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚抗氧化剂的甲醇:二氯甲烷(10:90, *V:V*)作为提取溶液。通过 Agilent Eclipse XDB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱; 甲醇:乙酸乙酯(85:15, *V:V*)作为流动相, 二极管阵列检测器, 检出波长 475 nm, 色谱柱温 25 °C, 流速 1.0 mL/min, 进样体积 10 μL, 作为检测条件。**结果** 番茄红素在 0~200 μg/mL 范围内线性良好, 相关系数 $r=0.9995$, 最低检出限为 0.0815 μg/mL, 平均回收率在 89.7%~109.8%之间, RSD 为 8.4%。**结论** 本方法可以准确、快速地检测保健食品中的番茄红素。

关键词: 保健食品; 番茄红素; 高效液相色谱法

Determination of lycopene in health food by high performance liquid chromatography

WANG Mei*, REN Lian, YUAN Ping, TANG Xue-Lin

(Chongqing Yongchuan Institute for Food and Drug Control, Chongqing 402160, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of lycopene in health food by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Mixed solution of methyl alcohol: dichloromethane (10:90, *V:V*) with 0.1% 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) antioxidants were used as extraction solutions. The extracting solutions were injected into HPLC system equipped with a diode array detector (DAD) at the absorption wavelength of 475 nm, with an Agilent Eclipse XDB-C₁₈ reverse phase column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), which was kept at 25 °C. The mobile phase was composed of 85% methanol and 15% ethyl acetate at a flow rate of 1.0 mL/min. The injection volume was 10 μL. **Results** The linearity range was 0~200 μg/mL ($r=0.9995$), the limit of detection (LOD) was 0.0815 μg/mL, and the average recoveries were between 89.7% and 109.8% with RSD of 8.4%. **Conclusion** This method can accurately and quickly determine the lycopene in healthy food.

KEY WORDS: healthy food; lycopene; high performance liquid chromatography

1 引言

番茄红素(lycopene)是自然界中广泛存在的一种类胡萝卜素(carotenoids), 属于含非氧化分子的脂溶性色素^[1], 具有清除自由基、抑制前列腺癌细胞生长、增强免疫力、DNA 修复、防癌、预防心血管疾病和慢性病等生理作用

^[2-7]。番茄红素作为增强免疫力类保健食品的功效成分, 越来越多的用于保健食品生产。

目前, 检测番茄红素的方法主要有分光光度法^[8]、薄层色谱法^[9]和高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[10]等。分光光度法易受其他色素影响, 薄层色谱法耗时长、不易定量^[11,12], 而 HPLC 具有分

*通讯作者: 王梅, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品、化妆品检测。E-mail: 594257784@qq.com

*Corresponding author: WANG Mei, Master, Engineer, Chongqing Yongchuan Institute for Food and Drug Control, Chongqing 402160, China. E-mail: 594257784@qq.com

离效果好、干扰少、耗时短、能准确定量、检出浓度更低等优点^[13,14]。GB 1886.78-2016《食品添加剂 番茄红素(合成)》^[15]适用于食品与其他类胡萝卜素生产中常用的合成中间体作为原料经维地稀缩合反应制得食品添加剂番茄红素,不适用于直接以番茄红素作为原料制成的保健食品中番茄红素的检测。GB/T 22249-2008《保健食品中番茄红素的测定》^[16]是以焦性没食子酸-二氯甲烷作为提取溶剂,焦性没食子酸的目的是为了延缓番茄红素的分解,由于焦性没食子酸不溶于二氯甲烷,且不稳定,必须严格控制检测时间,通过加大流速,提高柱温等方式,达到快速准确的检测。因此,需要一种稳定性更好的抗氧化性试剂替代焦性没食子酸,以有效提高保健食品中番茄红素测定的准确性。本文以含有番茄红素的胶囊保健品为试验材料,优化提取方法,改进流动相,建立一种快速、准确检测保健食品中番茄红素的高效液相色谱法,旨在保障市场的规范化,保护广大消费者的权益。

2 材料与方法

2.1 材料、试剂与仪器

市售番茄红素保健食品(威海紫光生物科技开发有限公司)。

二氯甲烷(分析纯,成都市科龙化工试剂厂);石油醚(分析纯,重庆川东化工(集团)有限公司);丙酮(优级纯,成都市科龙化工试剂厂);乙酸乙酯(色谱纯,成都市科隆化学品有限公司);甲醇、乙腈(色谱纯,Merck KGaA);2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol, BHT)(色谱纯,阿拉丁);番茄红素标准品(纯度:95.9%,中国食品药品检定研究院)。

Waters e2695 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);IDH 20 超声波提取仪(爱安姆科技(北京)有限公司)。

2.2 样品处理优化

准确称取 0.2000~0.3000 g(精确至 0.0001 g)市售番茄红素保健食品至 25 mL 离心管,分别加入含有 0.1%BHT 的二氯甲烷、石油醚、乙酸乙酯、丙酮提取溶剂各 10 mL,超声 30 min(超声仪中加入冰块保持低温),定容至刻度。

精密吸取上述提取液各 2.0 mL,加入甲醇稀释至 10 mL,观察现象,过 0.45 μm 滤膜后待用。尽量在避光条件

下提取。以甲醇:乙腈(50:50, V:V)为流动相,不同溶剂的提取液和稀释后的溶液进行上机检测。

2.3 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm);检测波长为 475 nm,色谱柱温 25 ℃,流速 1.0 mL/min,进样体积 10 μL。

2.4 流动相选择与优化

分别以甲醇:乙腈(50:50, V:V)、甲醇:乙酸乙酯(50:50, V:V)、甲醇:乙酸乙酯(85:15, V:V)作为流动相,比较不同流动相对保健食品中番茄红素的分离效果。

3 结果与分析

3.1 不同溶剂的提取效果

保健食品成分复杂,提取溶剂显得尤为重要。尤其番茄红素是一种易被氧化的功能性物质,提取及检测过程中物质的不稳定性常导致定量不准确。因此,本研究选用 BHT 作为抗氧化剂^[12]。以二氯甲烷、石油醚、乙酸乙酯、丙酮等 4 种溶剂对胶囊型保健品中的番茄红素进行提取,提取溶剂的溶解效果见表 1。通过结果比较,稀释后样品峰面积均出现增大,二氯甲烷提取液稀释后峰面积增大 10 倍左右,峰分离效果和纯度较其他几种溶剂好。综合上述条件:选择用含有 0.1%BHT 的甲醇和二氯甲烷混合液作为提取溶剂,由于稀释后析出油脂状物质,继续优化甲醇和二氯甲烷的比例,当甲醇:二氯甲烷=10:90(V:V)时效果最好。因此,选用含有 0.1%BHT 的甲醇:二氯甲烷(10:90, V:V)混合溶液作为提取溶剂,具有较好的提取效果。

3.2 流动相的优化

以番茄红素标准品为参照,以优化后提取条件提取的样品为测试样品,选择甲醇:乙腈和甲醇:乙酸乙酯 2 种组合的流动相进行检测。结果显示,样品与标准品出峰时间相同,当流动相为甲醇:乙腈(50:50, V:V)时,出峰时间为 17 min,只有一个峰,峰面积为 220000 μV·S,但峰的纯度较低,包裹有其他物质;以甲醇:乙酸乙酯(50:50, V:V)为流动相时,出峰时间为 5 min,有 2 个未完全分离的峰,峰纯度较低,峰面积达到 11000000 μV·S,但较甲醇-乙腈作流动相好。

表 1 不同溶剂提取保健品中番茄红素的效果分析
Table 1 Effects of different solvents on the extraction of lycopene from health care products

	二氯甲烷	石油醚	乙酸乙酯	丙酮
超声前	完全溶解、澄清透明、深红色	未完全溶解、有沉淀物、橙红色	未完全溶解、有沉淀物、橙红色	未完全溶解、有沉淀物、橙红色
超声后	未有明显变化	颜色变深、仍未完全溶解	颜色变深、仍未完全溶解	颜色变深、仍未完全溶解
稀释后	出现浑浊、析出油脂状物质	析出少量油脂状物质	析出少量油脂状物质	析出少量油脂状物质

以甲醇:乙酸乙酯为流动相,优化流动相比例。当甲醇:乙酸乙酯为(85:15, *V:V*)时,通过光谱比较,番茄红素峰已完全分离(见图 1),且番茄红素的峰纯度较高(见图 2、图 3)。

3.3 线性范围和检测限

番茄红素用含 0.1%BHT 的甲醇:二氯甲烷(10:90, *V:V*)配制成 2.0 mg/mL 标准储备液,于-20 ℃冰箱中避光暂时保存。用含 0.1%BHT 的甲醇:二氯甲烷(10:90, *V:V*)稀释成 0、2.5、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0 μg/mL 的系列标准溶液,现配现用。

将番茄红素系列标准溶液上机检测(标准品色谱图见图 4,标准品光谱图见图 5,试剂空白色谱图见图 6),在上述优化的色谱条件下测定。以浓度为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线。其线性回归方程为 $Y=77258X-71659$,相关系数 r 为 0.9995。本方法检出限为 0.0815 μg/mL ($S/N=3$)。

3.4 精密度和重复性

将提取的样品重复检测 6 次,色谱峰的保留时间波动小于 0.1 min,峰面积相对偏差(RSD)为 0.5%。实验方法精密度良好。

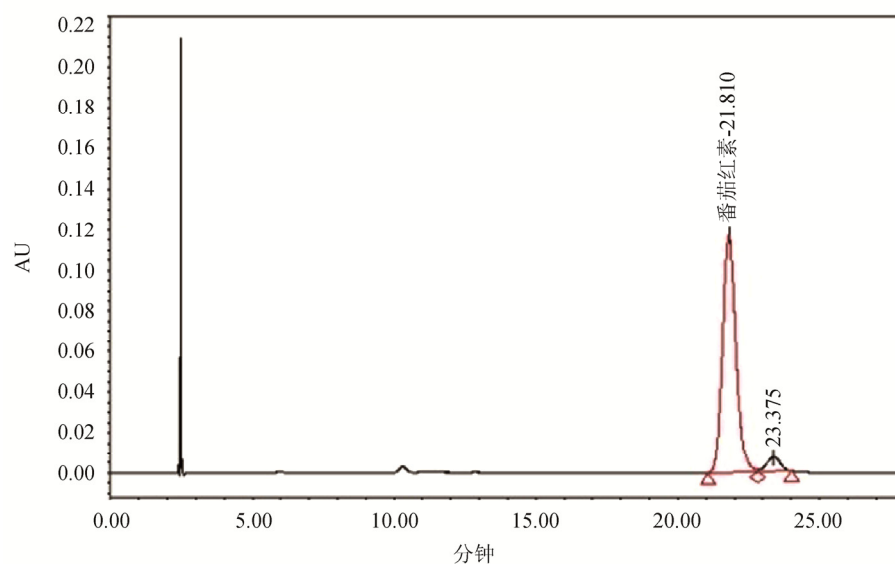


图 1 样品色谱图

Fig. 1 Chromatogram of sample

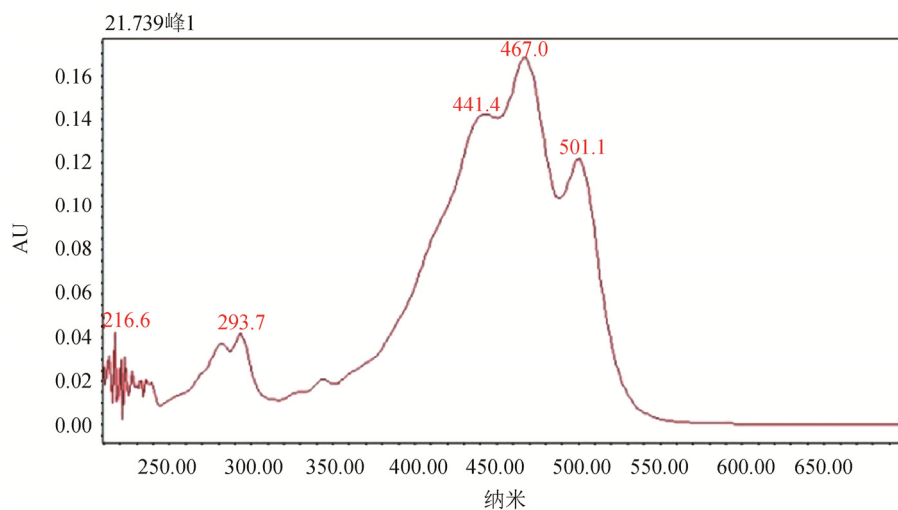


图 2 峰 1(番茄红素)的光谱图

Fig. 2 Spectrogram of peak 1 (lycopene)

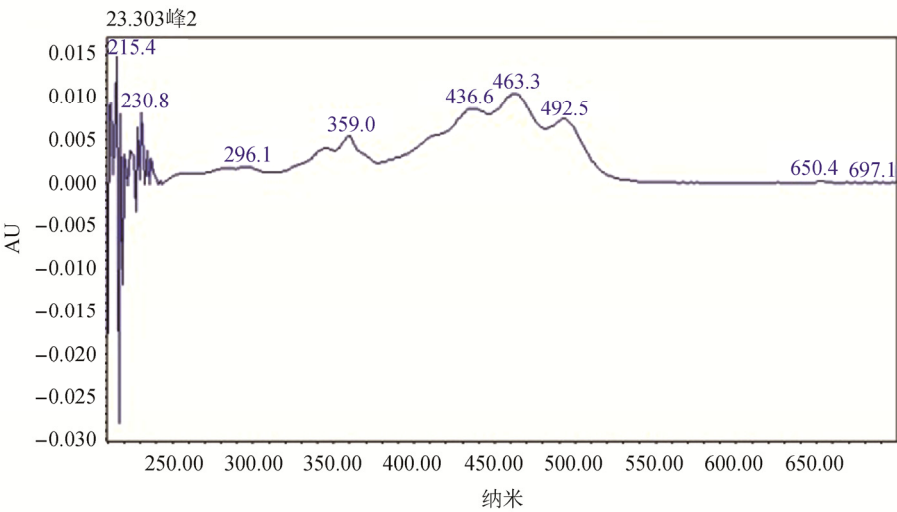


图 3 峰 2 的光谱图
Fig. 3 Spectrogram of peak 2

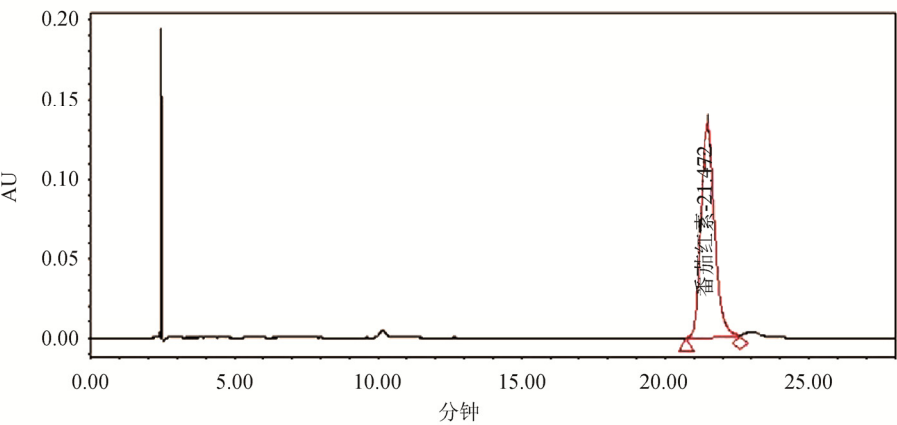


图 4 标准品色谱图
Fig. 4 Chromatogram of standard

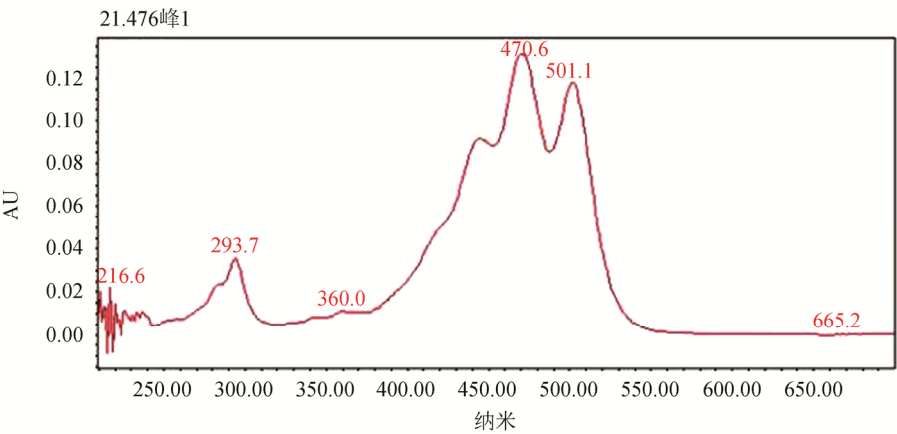


图 5 番茄红素标准品光谱图
Fig. 5 Spectrogram of lycopene standard

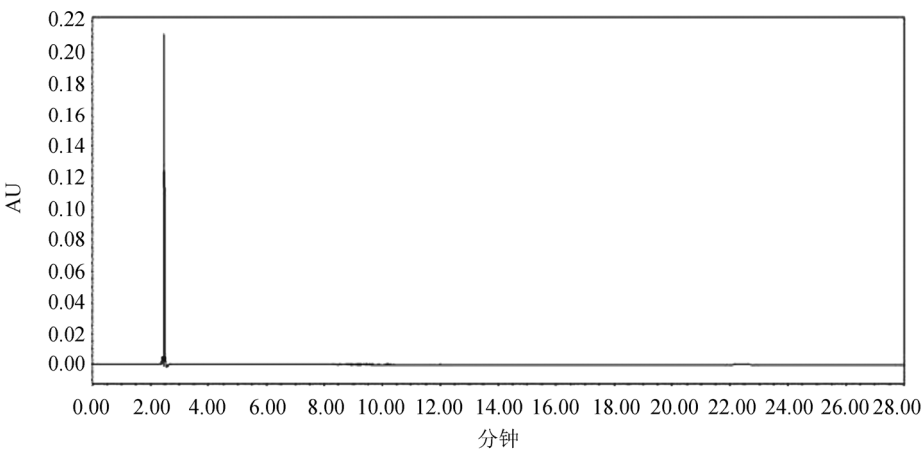


图 6 空白色谱图
Fig. 6 Chromatogram of blank

称取 6 份 0.2 g 样品, 按照优化条件提取并测定, 结果见表 2。RSD 值为 2.4%, 重复性良好。

3.5 回收率

通过向样品中添加已知浓度的番茄红素标样评价本方法的回收率(表 2), 每个样品重复 6 次。平均回收率在 89.7%~109.8%之间, RSD 为 8.4%。

表 2 HPLC 检测胶囊中番茄红素的回收率 Table 2 Recoveries of lycopene determined by HPLC						
组别	样品质量(g)	加标量 (mg)	测定值 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.2073	1062.57	953.24	89.7	98.1	8.4
2	0.2188	1062.57	1126.14	106.0		
3	0.2263	1062.57	1167.03	109.8		
4	0.2049	1062.57	1044.10	98.3		
5	0.2023	1062.57	997.58	93.9		
6	0.2037	1062.57	965.44	90.9		

4 结 论

本研究综合分析保健品中番茄红素的提取和检测方法, 由于番茄红素是一个易氧化的物质, 在制备标准品和提取溶剂中都加入 BHT 试剂。甲醇: 二氯甲烷(10:90, *V:V*), 甲醇:乙酸乙酯(85:15, *V:V*)为流动相, 最低检出限为 0.0815 μg/mL。该方法有较好的精密度、重复性和较高的回收率, 能够快速、简便、准确地检测保健品中的番茄红素。

参考文献

[1] Shen Y, Zhang X, Prinyawiwatkul W, *et al.* Simultaneous determination of

red and yellow artificial food colourants and carotenoid pigments in food products [J]. Food Chem, 2014, 157(8): 553–558.

[2] Zhou SK, Zhang RL, Bi TN, *et al.* Inhibitory effect of lycopene against the growth of human gastric cancer cells [J]. Afr J Tradit Complem, 2016, 13(4): 184–190.

[3] Borel P, Desmarchelier C, Dumont U, *et al.* Dietary calcium impairs tomato lycopene bioavailability in healthy humans [J]. Br J Nutr, 2017, 116(12): 2091–2096.

[4] Manach C, Milenkovic D, Tom VDW, *et al.* Addressing the inter-individual variation in response to consumption of plant food bioactives-towards a better understanding of their role in healthy ageing and cardiometabolic risk reduction [J]. Mol Nutr Food Res, 2016, DOI: 10.1002/mnfr.201600557.

[5] Han GM, Han XF. Lycopene reduces mortality in people with systemic lupus erythematosus: A pilot study based on the third national health and nutrition examination survey [J]. J Dermatol Treat, 2016, 27(5): 430.

[6] Roldan-Gutierrez JM, Luque de Castro MD. Lycopene: the need for better methods for characterization and determination [J]. Trac-Trend Anal Chem, 2007, 26: 163–170

[7] Yang CM, Yen YT, Huang CS, *et al.* Growth inhibitory efficacy of lycopene and β-carotene against androgen-independent prostate tumor cells xenografted in nude mice [J]. Mol Nutr Food Res, 2011, 55(4): 606–612.

[8] Davis AR, Fish WW, Perkins-Veazie P. A rapid hexane-free method for analyzing lycopene content in watermelon [J]. J Food Sci, 2003, 68: 328–332

[9] 刘博, 黄新异, 邸多隆, 等. 番茄红素软胶囊质量标准研究 [J]. 食品科技, 2009, 34(3): 243–245.

Liu B, Huang XY, Di DL, *et al.* Study on quality standard for lycopene soft gels [J]. Food Sci Technol, 2009, 34(3): 243–245.

[10] Cucu T, Huvaere K, Bergh MAVD. A simple and fast HPLC method to determine lycopene in foods [J]. Food Anal Method, 2012, 5(5): 1221–1228.

[11] 程家丽, 刘婷婷, 马彦宁, 等. 液相色谱法测定保健食品中番茄红素的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(11): 4653–4658.

- Cheng JL, Liu TT, Ma YN, *et al.* Uncertainty evaluation of the determination of lycopene in health food by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(11): 4653–4658.
- [12] 刘婷婷, 程家丽, 张雪松, 等. 保健食品中番茄红素测定方法的建立 [J]. *中国食物与营养*, 2017, 23(3): 37–39.
- Liu TT, Cheng JL, Zhang XS, *et al.* Determination on lycopene in health foods by HPLC [J]. *Food Nutr China*, 2017, 23(3): 37–39.
- [13] 陈冬东, 郗存显, 彭涛, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定保健食品中的番茄红素 [J]. *食品科学*, 2012, 33(20): 206–211.
- Chen DD, Xi CX, Peng T, *et al.* Determination of lycopene in dietary supplements by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2012, 33(20): 206–211.
- [14] Ho KKHY, Ferruzzi MG, Liceaga AM, *et al.* Microwave-assisted extraction of lycopene in tomato peels: Effect of extraction conditions on all- trans, and cis -isomer yields [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2015, 62(1): 160–168.
- [15] GB 1886.78-2016 食品安全国家标准 食品添加剂 番茄红素(合成)[S]. GB 1886.78-2016 National standard of food safety-Food additive-Lycopene (composite) [S].
- [16] GB/T 22249-2008 保健食品中番茄红素的测定[S]. GB/T 22249-2008 Determination of lycopene in healthy foods [S].

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



王 梅, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品、化妆品检测。
E-mail: 594257784@qq.com