

高效液相色谱法测定 8 种不同类型保健食品中的 β -胡萝卜素

张丽¹, 刘海波¹, 孙宁宁², 李红梅¹, 李涛^{1*}, 乔蓉霞¹

(1. 陕西省食品药品监督检验研究院, 西安 710056; 2. 西安碑林药业股份有限公司, 西安 710048)

摘要: **目的** 建立不同剂型保健品中 β -胡萝卜素的提取分离方法和同时测定国内常用的 8 种保健品中 β -胡萝卜素含量的高效液相色谱测定方法。**方法** 采用 Agela C₁₈ 色谱柱(250 mm×2.1 mm, 4.5 μ m)进行分离, 甲醇-乙腈-三氯甲烷(80:15:5, V:V:V)为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.2 mL/min, 检测波长为 450 nm。**结果** β -胡萝卜素的线性关系良好, 相关系数为 0.9996, 检测限为 0.08 mg/L, 胶囊样品、片剂样品、颗粒样品的加标回收率分别为 95.6%、96.4%、96.2%。**结论** 该方法简单、快速、准确, 可用于不同剂型保健品中 β -胡萝卜素的测定。

关键词: 高效液相色谱法; β -胡萝卜素; 保健食品

Determination of β -carotene in 8 kinds of health products by high performance liquid chromatography

ZHANG Li¹, LIU Hai-Bo¹, SUN Ning-Ning², LI Hong-Mei¹, LI Tao^{1*}, QIAO Rong-Xia¹

(1. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710056, China; 2. Xi'an Beilin Pharmaceutical Limited by Share Ltd., Xi'an 710048, China)

ABSTRACT: Objective To establish the extraction methods of β -carotene from different types of samples and establish a method for the determination of β -carotene in health products by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Agela C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 4.5 μ m) was used for separation, and methanol-acetonitrile-trichloromethane (80:15:5, V:V:V) was used as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was 1.2 mL/min, and the detection wavelength was 450 nm. **Results** β -carotene had a good linear relationship with a correlation coefficient of 0.9996. The limit of detection was 0.08 mg/L. The standard recovery rates of capsule, tablet and particle samples were 95.6%, 96.4% and 96.2%, respectively. **Conclusion** This method is simple, rapid and accurate, which can be used for determination of β -carotene in different kinds of health products.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; β -carotene; health products

基金项目: 国家自然科学基金项目(21375049, 31401575)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (21375049, 31401575)

*通讯作者: 李涛, 副主任药师, 主要研究方向为食品及保健食品检验、食品安全快速检测技术研究。E-mail: westyx@126.com

*Corresponding author: LI Tao, Associate Chief Pharmacist, Shaanxi Institute for Food and Drug Control, No.21, Kejiwu Road, Gaoxin District, Xi'an 710065, China. E-mail: westyx@126.com

1 引言

β -胡萝卜素是 V_A 的前体, 在人体内可以转化为 V_A , 是人体重要的营养素, 具有缓解眼疲劳、抗氧化、解毒、抗癌、预防心血管疾病等功能^[1-3]。 β -胡萝卜素因其强大的功能而受到青睐。目前市场上出现了许多以胡萝卜素为主要成分的保健食品, 其主要功效成分就是 β -胡萝卜素。因为 β -胡萝卜素是脂溶性成分, 难以溶于水, 且在空气中易氧化, 见光易分解, 为了解决这些问题, 故很多产品通过 β 环糊精包裹微囊化后, 来保持 β -胡萝卜素的稳定性^[4-8]。

目前, 我国测定 β -胡萝卜素的方法有分光光度法^[9]、高效液相色谱法^[10]薄层色谱法^[11]。但这些方法的前处理未考虑到 β -胡萝卜素的不稳定性和产品的微囊化, 存在提取效率低和前处理过程复杂且损失大的问题。另外, 有的方法采用 SPE 柱纯化样品, 增加了检验成本。本文前处理采用水和石油醚(60~90 °C)-丙酮(1:1, $V:V$)提取的方法。本方法中用水将微囊均匀分散, 用丙酮破坏样本中的微囊, 释放出 β -胡萝卜素, 再通过石油醚(60~90 °C)将其有效地萃取到有机层中。本实验对国内常见的 8 种不同剂型的保健食品中 β -胡萝卜素进行分析研究, 以期建立一种操作简便、准确有效的提取方法。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

美国戴安 U3000 高效色谱仪(配二极管阵列检测器, 变色龙软件, 美国热电公司); FS400D 多功能搅拌机(德国 IKA 公司); ME204 电子天平(北京赛多利斯公司); LXJ-IIIB 高速冷冻离心机(美国热电公司)。

β -胡萝卜素标准品(纯度 91.5%, 美国 Sigma 公司); 石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正己烷、丙酮、2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(butylated hydroxytoluene, BHT)、二氯甲烷(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 Sigma 公司)。

样品为 8 种市售保健品, 详细信息见表 1。

2.2 色谱条件

Agela C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-乙腈-三氯甲烷(80:15:5, $V:V:V$); 流速: 1.2 mL/min; 检测波长: 450 nm; 柱温: 35 °C; 进样体积: 10 μ L。

2.3 β -胡萝卜素标准储备液制备

准确称取 β -胡萝卜素标准品 20.24 mg, 加入二丁基羟基甲苯(BHT)0.25 g, 用二氯甲烷溶解, 转移至 100 mL 棕色容量瓶中定容至刻度, 制成浓度为 185.2 μ g/mL 的

表 1 8 种保健品的详细信息
Table 1 Detailed information about 8 kinds of health products

样品	名称	剂型	生产厂家	标识含量/(mg/100 g)
1 [#]	β -胡萝卜素胶囊	胶囊剂	陕西百年健康药业有限公司	723
2 [#]	复合维生素片	片剂	陕西天成元生物科技有限公司	590
3 [#]	β -胡萝卜素含片	片剂	陕西易仁康科技有限公司	500
4 [#]	营养素泡腾冲剂	颗粒剂	武汉莱恩生物科技有限公司	310
5 [#]	β -胡萝卜素口服液	口服液	北京和方堂科技有限公司	420
6 [#]	β -胡萝卜素咀嚼片	片剂	西安利君药业有限公司	320
7 [#]	β -胡萝卜素颗粒	颗粒剂	湖北中新药业有限公司	385
8 [#]	叶黄素酯压片糖果	片剂	湖北海利斯唯生物科技有限公司	486

储备液。

2.4 工作曲线的绘制

精密量取 β -胡萝卜素标准储备液 0.1、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 于一系列的 25 mL 容量瓶中, 加二氯甲烷溶液定容至刻度, 摇匀, 得到系列曲线溶液, 质量体积浓度为 0.7408~37.04 μ g/mL。

2.5 样品制备

取样品适量, 研细混匀, 取样品 0.2~1.0 g (含 β -胡萝卜素约 0.5~1.5 mg), 精密称定, 置 50 mL 具塞比色管中, 加水 10 mL, 涡旋振荡使其在水中分散均匀, 加入提取溶剂 10 mL, 涡旋震荡 1 min, 静置分层后, 吸取上层液体, 于 50 mL 容量瓶中, 依法再用提取液反复提取 2 次, 提取液合并于容量瓶中, 用提取剂定容至刻度, 摇匀, 通过 0.45 μ m 的滤膜过滤, 供测定。

β -胡萝卜素所用的溶剂 8 种样品材料分别用 8 种不同的萃取溶剂进行 β -胡萝卜素提取(见表 2)。

计算公式: $X=C \times V/m \times 100$

式中: X : β -胡萝卜素含量, mg/100 g; C : β -胡萝卜素的浓度, μ g/mL; V : 定容体积, mL; m : 取样量, g。

2.6 数据统计分析

本实验通过单因素考察, 以提取溶剂作为因素, 以保健食品测得含量作为水平进行考察, 通过数据直观考察提取溶剂的特异性。

表 2 8 种不同的提取溶剂
Table 2 Eight kinds of extractive solvents

序号	溶剂	参考文献
1	石油醚	[12]
2	三氯甲烷	[13]
3	乙酸乙酯	[14]
4	二氯甲烷	[15]
5	正己烷-丙酮	[16]
6	甲醇-四氢呋喃	[14]
7	水和石油醚(60~90 °C)-丙酮(1:1, V:V)	本研究
8	水和石油醚(60~90 °C)-丙酮(1:2, V:V)	本研究

3 结果与分析

3.1 最佳色谱条件的选择

参考相关文献报道, 考察甲醇、乙腈、三氯甲烷、异丙醇、甲酸、丙酮、四氢呋喃为不同配比进行流动相筛选实验^[14], 结果表明, 甲醇-乙腈-三氯甲烷(80:15:5, V:V:V), 流速 1.2 mL/min, 能将保健品中的 β -胡萝卜素完全分离且分析时间在 15 min 以内, 且样品中无杂峰干扰信号响应较高(图 1)。将 2.4 的标准曲线溶液注入液相色谱仪中, 记录峰面积(结果见表 3)。

3.2 最佳提取溶剂的选择

β -胡萝卜素是脂溶性的, 考察提取 β -胡萝卜素的溶剂有石油醚(30~60 °C)、三氯甲烷、水和石油醚(60~90 °C)-丙酮(1:1, V:V)、水和石油醚(60~90 °C)-丙酮(1:2, V:V)、乙

酸乙酯、二氯甲烷、正己烷作为样品中 β -胡萝卜素的提取剂, 并采用国标 GB 5009.83-2016 的方法进行测定比较。通过 SPSS 单因素方差分析, 得到 $C_{\text{石油醚}} < C_{\text{乙酸乙酯}} < C_{\text{二氯甲烷}} < C_{\text{三氯甲烷}} < C_{\text{正己烷-丙酮}} < C_{\text{乙醇-石油醚}} < C_{\text{水-石油醚(60~90 °C)-丙酮(1:2)}} < C_{\text{国标}} < C_{\text{水-石油醚(60~90 °C)-丙酮(1:1)}}$ 。结果表明, 水和石油醚(60~90 °C)-丙酮(1:1, V:V)对样品中 β -胡萝卜素提取效率最高, 与国标测定的结果接近。水将微囊均匀分散在水中(这时液体呈混悬状态), 再通过丙酮破壁, 用石油醚(60~90 °C)使其转移至有机溶剂中, 且提取物在上层, 易于用胶头滴管吸取, 操作简便, 损失量少, 比较适用于大批量的样品检验。最终确定提取剂为水和石油醚(60~90 °C)-丙酮(1:1, V:V)。见表 4。

3.3 线性关系、检出限和定量限

将 2.4 得到的曲线溶液按照 2.2 的色谱条件进行检测, 以浓度作为横坐标(X), 峰面积作为纵坐标(Y)进行回归分析, 回归方程为 $Y=1.280X-1.073$ 。结果表明, β -胡萝卜素在该范围内呈良好线性关系, 线性相关系数为 0.9996。

在本方法实验条件下, 将标曲溶液最低浓度连续稀释至, 以色谱峰响应值大于 3 倍信噪比(S/N)的质量浓度为检出限浓度, 以大于 10 倍信噪比(S/N)的质量浓度为定量限。本方法的检出限为 0.08 $\mu\text{g/mL}$, 定量限为 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.4 回收率及精密度实验

取 3 种典型剂型样品, 样品 1 为硬胶囊, 样品 2 为片剂, 样品 3 为颗粒剂, 各取 6 份, 按照 2.5 方法提取测定, 结果平均相对标准偏差分别为 3.25%、2.96%、2.47%, 结果见表 5。另取 β -环糊精 1 g 6 份, 前 2 份加入 β -胡萝卜素储备液 0.2 mL, 中间 2 份加 0.4 mL, 后 2 份加 1.0 mL, 再依 2.5 提取测定, 结果回收率为 95.6%、96.4%、96.2%, 结果见表 6。

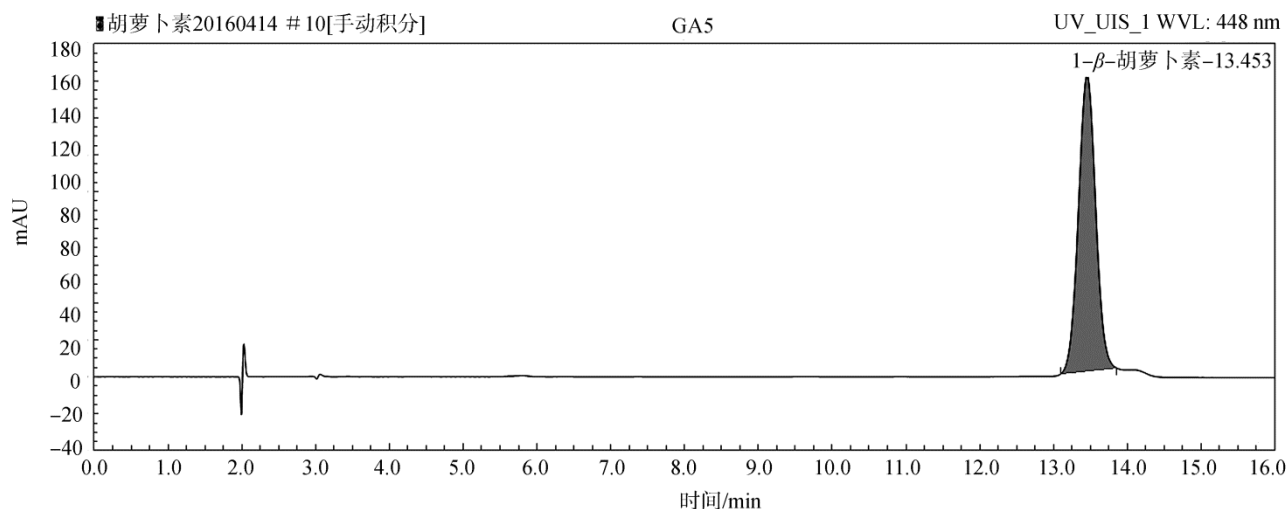


图 1 β -胡萝卜素标准品 HPLC 色谱分析
Fig. 1 HPLC chromatogram of β -carotene standard

表3 标准曲线结果
Table 3 Results of standard curve

标曲	1	2	3	4	5	6	7
浓度/($\mu\text{g/mL}$)	0.7408	3.704	7.408	14.852	22.22	29.63	37.04
峰面积	1.705	5.961	10.854	19.854	29.435	38.564	48.361

表4 8种溶剂系统提取 β -胡萝卜素的含量(mg/100 g)
Table 4 Contents of β -carotene by 8 kinds of solvent systems(mg/100 g)

样品 /(mg/100 g)	石油醚	三氯甲烷	乙酸乙酯	二氯甲烷	正己烷- 丙酮	乙醇- 石油醚	水和石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$)- 丙酮(1: 1, V:V)	水和石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$)- 丙酮(1: 2, V:V)	国标
1 [#]	2.5	2.3	2.6	2.7	44	52	854	654	826
2 [#]	2.2	2.1	2.1	2.3	28	31	689	436	671
3 [#]	2.3	2.6	2.0	2.8	26	29	569	269	542
4 [#]	2.3	2.9	1.9	2.1	22	24	364	195	325
5 [#]	1.9	2.1	2.2	2.4	23	25	469	294	439
6 [#]	1.9	1.5	1.8	1.1	18	16	369	159	325
7 [#]	1.3	1.6	2.3	2.0	26	20	429	206	408
8 [#]	1.3	1.9	1.1	1.5	32	23	526	354	504

表5 精密度实验结果(n=6)
Table 5 Experimental results of precision (n=6)

样品名称	含量/(mg/100 g)						相对标准偏差/%
β -胡萝卜素胶囊	723	726	752	780	715	714	3.25
复合维生素片	585	594	558	548	575	591	2.96
β -胡萝卜素颗粒	385	386	386	360	384	385	2.47

表6 加标回收实验结果(n=6)

Table 6 Experimental results of added standard recovery (n=6)

序号	加标浓度 /($\mu\text{g/mL}$)	测定浓度 /($\mu\text{g/mL}$)	回收率 /%	平均回收率 /%
1	0.7408	0.7052	95.2	95.6
2	0.7408	0.7111	96.0	
3	1.480	1.422	96.1	96.4
4	1.480	1.446	96.7	
5	3.705	3.586	96.8	96.2
6	3.705	3.542	95.6	

4 结论

通过合理的实验设计, 考察8种不同的试剂对保健品中的 β -胡萝卜素提取的结果, 其中提取剂水和石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$)-丙酮(1:1, V:V)操作简便, 损失量少, 能很快把保健食品中 β -胡萝卜素提取分离, 进行检测。通过HPLC测定含量, 其线性关系, 检出限, 定量限, 精密度, 稳定性和回收率显示, 该方法用于测定 β -胡萝卜素的含量, 结果令人满意。

参考文献

- [1] Utermann F, Muller C. Influence of aw value and storage temperature on the multiplication and enterotoxin formation of staphylococci in dry-cured raw [J]. *Int J Food Microbiol*, 1992, 16(2): 109-115.
- [2] Zhang P, Omaye ST. Antioxidant and prooxidant roles for β -carotene, α -tocopherol and ascorbic acid in human lung cells [J]. *Toxicol Vitro*, 2001, 15(1): 13-24.
- [3] Kalanithi N, Eu JL, Karin R, *et al.* Effect of a carotene concentrate on the growth of human breast cancer cells and pS2 gene expression [J]. *Toxicology*, 2000, (10): 117-126.
- [4] Leach G, Oliveira G, Morais R. Spray-drying of *Dunaliella salina* to produce a beta-carotene rich powder [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1998, 20(2): 82-85.
- [5] Schrooyen PM, Van DMR, De-Kruif CG. Microencapsulation: Its application in nutrition [J]. *Proc Nutr Soc*, 2001, 60(4): 475-479.
- [6] Augustin MA, Sanguansri L, Margetts C, *et al.* Microencapsulation of food ingredients [J]. *Food Australia*, 2001, 53(7): 220-223.
- [7] Brazel CS. Microencapsulation: offering solutions for the food industry [J]. *Cere Foods World*, 1999, 44(6): 388-393.
- [8] Winning M. Micro-encapsulated colours- natural colours with improved stability [J]. *Agro Food Ind Hi-tech*, 1995, 6(5): 13-15.
- [9] 丁贵平, 袁建兴. 分光光度法检测保健食品中的微囊化 β -胡萝卜素[J]. *食品工业科技*, 2005, 26(2): 187-188.

Ding GP, Yuan JX. A spectrophotometric method to measure the content of

- the microencapsulated β -carotene in health foods has been established [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2005, 26(2): 187-188.
- [10] 李赫, 陈敏. 反相高效液相色谱法同时测定保健品中的四种类胡萝卜素[J]. *色谱*, 2006, 24(5): 475-478.
Li H, Chen M. Simultaneous determination of four carotenoids in health products by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr*, 2006, 24(5): 475-478.
- [11] 苏昭仑, 李丹, 张喜金. 反相高效液相色谱法快速测定复方维生素片中微囊化测定 β -胡萝卜素[J]. *中国食品卫生杂志*, 2017, 29(1): 56-59.
Su ZL, Li D, Zhang XJ, *et al.* Papid determination of β -carotene in compound vitamin tablets by reverse-phase high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Food Hyg*, 2017, 29(1): 56-59.
- [12] 彭光华, 李忠, 张声华. 薄层色谱法分离鉴定枸杞子中的类胡萝卜素[J]. *营养学报*, 1998, 20(1): 76-78.
Peng GH, Li Z, Zhang SH. Separation and identification of carotenoids in gardenia by thin layer chromatography [J]. *Acta Nutr Sin*, 1998, 20(1): 76-78.
- [13] 陈敏敏, 朱海生, 温庆芳, 等. UPLC 测定草莓果实中类胡萝卜素含量[J]. *果树学报*, 2013, 30(4): 706-711.
Chen MD, Zhu HS, Wen QF, *et al.* UPLC determination of carotenoids in strawberry fruit [J]. *J Fruit Sci*, 2013, 30(4): 706-711.
- [14] 蔡伟江, 黄康惠. 高效液相色谱法测定保健食品中 β -胡萝卜素[J]. *食品研究与开发*, 2016, 37(4): 161-163.
Cai JW, Huang KH. Determination of β -carotene in health foods by HPLC [J]. *Food Res Dev*, 2016, 37(4): 161-163.
- [15] 郑群雄, 杜美霞, 徐小强, 等. 高效液相色谱法测定 15 种蔬菜中的 β -胡萝卜素[J]. *食品科学*, 2012, 33(14): 238-241.
Zheng QX, Du MX, Xu XQ. Determination of β -carotene in 15 vegetables by high performance liquid chromatography [J]. *Food Sci*, 2012, 33(14): 238-241
- [16] 胡小明, 蔡万玲, 代斌. 天然 β -胡萝卜素的提取工艺条件研究[J]. *食品工艺技术*, 2006, 27(10): 133-136.
Hu XM, Cai WL, Dai B. Study on extraction conditions of natural β -carotene [J]. *Scie Technol Food Ind*, 2006, 27(10): 133-136.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



张 丽, 工程师, 主要研究方向为食品及保健食品检验。
E-mail: zhangl406@163.com



李 涛, 副主任药师, 主要研究方向为食品及保健食品检验、食品安全快速检测技术研究。
E-mail: westyx@126.com

“食品添加剂”专题征稿函

食品添加剂是为改善食品色、香、味等品质, 以及为防腐和加工工艺的需要而加入食品中的人工合成或者天然物质。食品添加剂是食品工业发展的必然产物, 食品添加剂法规和标准是保证其安全使用和保护消费者健康的重要措施。

鉴于此, 本刊特别策划“食品添加剂”专题。专题将围绕**添加剂种类**(酸度调节剂、抗结剂、消泡剂、抗氧化剂、漂白剂、膨松剂、着色剂、护色剂、酶制剂、增味剂、营养强化剂、防腐剂、甜味剂、增稠剂、香料等)、**添加剂作用及原理**、**添加剂的开发与应用**、**添加剂的滥用误用**、**添加剂的安全标准法规等**或您认为**该领域有意义的话题**展开讨论。计划在**2018年9月**出版。

鉴于您在该领域的成就, 主编**吴永宁**研究员特邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在**2018年8月20号**前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 再次感谢您的关怀与支持!

感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com (备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者登录-注册投稿-投稿选择“专题: 食品添加剂”)

E-mail: jfoods@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部