

高效液相色谱法测定保健食品中番茄红素的含量

吴先富¹, 韦日伟², 冯玉飞¹, 肖新月^{1*}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629; 2. 梧州食品药品检验所, 梧州 543002)

摘要: **目的** 建立保健食品中番茄红素高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)含量测定方法。**方法** 色谱柱为 Grace Apollo C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-乙酸乙酯(95:5, V:V)为流动相等度洗脱, 柱温 30 °C, 流速 1 mL/min, 检测波长 472 nm。**结果** 番茄红素在 1.01~50.45 μg/mL 浓度范围内线性关系良好($r^2=0.9997$), 高、中、低 3 个浓度水平下的加样回收率为 96.20%~105.44%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)值不大于 2.50%。采用该方法对市售 7 个厂家的产品进行测定, 发现不同厂家产品中番茄红素的含量相差很大, 其中 3 个厂家的含量低于其标示量, 质量问题值得引起关注。**结论** 本文建立的方法简单、准确, 同时精密度、重复性良好, 是对现有国家标准方法 GB/T 22249-2008 的有效改进, 可用于番茄红素保健食品的质量控制。

关键词: 番茄红素; 保健食品; 高效液相色谱法

Determination of lycopene in health food by high performance liquid chromatography

WU Xian-Fu¹, WEI Ri-Wei², FENG Yu-Fei¹, XIAO Xin-Yue^{1*}

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. Wuzhou Institute for Food and Drug Control, Wuzhou 543002, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of lycopene in health food by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Chromatographic separation was performed on Grace Apollo C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) at 30 °C of column temperature. Methanol-ethyl acetate (95:5, V:V) was adopted as mobile phase for isocratic elution. The flow rate was at 1 mL/min. The detection wavelength was 472 nm. **Results** Lycopene had a good linear relationship in the concentration range of 1.01~50.45 mg/mL ($r^2=0.9997$). And the recoveries were between 96.20% and 105.44% at 3 different levels of concentration with $RSD \leq 2.50\%$. This method was used to determine the products of 7 manufacturers in the market, and it was found that the content of lycopene in different manufacturers varied greatly, among which the content of 3 manufacturers was lower than the labeled quantity, and the quality problem was worthy of attention. **Conclusion** This method is simple, accurate, precise and repeatable, which is an effective improvement on the existing national standard method GB/T 22249-2008 and can be used for quality control of lycopene in health food.

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

*通讯作者: 肖新月, 研究员, 主要研究方向为药品质量控制和药品标准物质研究。E-mail: xiaoxy@nifdc.org.cn

*Corresponding author: XIAO Xin-Yue, Professor, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China. E-mail: xiaoxy@nifdc.org.cn

1 引言

番茄红素是植物中分布很广的一种类胡萝卜素,为脂溶性直链不饱和碳氢化合物,具有淬灭活性氧、消除人体自由基、减缓动脉粥样硬化、预防癌症、抗老化、增强免疫力、保护皮肤等多种生理功能^[1-6]。番茄红素被联合国粮农组织(Food and Agriculture Organization, FAO)、联合国食品添加剂专业委员会(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA)和世界卫生组织(World Health Organization, WHO)认定为 A 类营养素,作为具有营养、着色双重作用食品添加剂广泛应用于保健食品、医药和化妆品行业。近年来,以番茄红素为功效成分的保健食品在国内外市场大量涌现,但品质参差不齐,因此建立快速、有效的番茄红素含量测定方法对于评价这类保健食品的质量十分必要。

目前,番茄红素的常用分析方法主要有紫外分光光度法^[7,8]和高效液相色谱法^[9-11],前者由于专属性较差,容易受到其他类似色素如 β -胡萝卜素的干扰,使得测定值往往大于真实值,而后者由于良好的分离效果和检测能力,在番茄红素的检测中应用更加广泛。国家标准 GB/T 22249-2008《保健食品中番茄红素的测定》中采用了高效液相色谱法^[12]。但该标准方法在实际使用中存在以下问题:1)抗氧化剂焦性没食子酸难以直接溶解于提取溶剂二氯甲烷中;2)番茄红素在甲醇等极性溶剂中溶解度较小,以甲醇-乙腈(50:50, V:V)为流动相会出现色谱峰过宽,与相邻峰的分离度差的现象,尤其在进样量大时容易分叉,严重影响峰形。本研究针对性地对国标方法中抗氧化剂溶液的配制方法和流动相组成及比例进行了改进,并采用新建立的高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定了 7 个厂家的保健食品中番茄红素的含量,通过与产品标示量的比较,对其进行质量评价,以期为保健食品中番茄红素的检测提供依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Shimadzu LC-20AD 高效液相色谱仪(包括二元高压泵系统、自动进样器、柱温箱、PDA 检测器、Shimadzu LabSolution 色谱工作站,日本岛津公司);XS105DU 电子分析天平(瑞士梅特勒公司);KQ-300DA 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

番茄红素对照品(批号 520028-201401,含量以 95.9%计,中国食品药品检定研究院);焦性没食子酸(含量>99.0%,优级纯,日本东京化成工业株式会社);甲醇(色谱纯,美国赛默飞世尔公司);二氯甲烷、乙酸乙酯(色谱纯,

美国霍尼韦尔公司)。

市售番茄红素保健食品 7 批,编号为 Y1~Y7,分别来源于 A~G 7 个厂家。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液的制备

(1)焦性没食子酸-二氯甲烷溶液的制备:称取焦性没食子酸 1.0 g,加入 10 mL 甲醇溶解,再用二氯甲烷稀释至 1000 mL,混匀,即得。

(2)对照品储备液的制备:精密称取番茄红素对照品 10.52 mg,置于 100 mL 棕色容量瓶中,加焦性没食子酸-二氯甲烷溶液溶解并稀释至刻度,混匀,即得。

(3)供试品溶液的制备:取各批次样品若干,片剂去包衣后粉碎,胶囊(软胶囊)取内容物,混匀,精密称取约 0.5 g,置于 50 mL 棕色容量瓶中,加焦性没食子酸-二氯甲烷溶液 40 mL,超声(功率 300 W,频率 45 kHz)提取 30 min,放冷,用焦性没食子酸-二氯甲烷溶液定容至刻度,混匀。精密量取上述溶液 1 mL 置于 25 mL 棕色容量瓶中,用焦性没食子酸-二氯甲烷溶液稀释至刻度,混匀,过 0.45 μ m 微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.2.2 色谱条件

Grace Apollo C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相甲醇-乙酸乙酯(95:5, V:V),等度洗脱;柱温 30 $^{\circ}$ C;流速 1 mL/min;检测波长 472 nm;进样体积 10 μ L。

2.3 方法学考察

分别精密量取 2.2.1 项下对照品储备液 0.5、2.5、5、10、25 mL,置于 50 mL 棕色容量瓶中,用焦性没食子酸-二氯甲烷溶液稀释至刻度,混匀,得系列对照品溶液。按照 2.2.2 项下条件将上述溶液分别进样测定,记录色谱图,以番茄红素峰面积 Y 为纵坐标,浓度 $X(\mu\text{g/mL})$ 为横坐标进行线性回归,计算回归方程。同时分别以信噪比(S/N)3:1 和 10:1 为基准测定检测限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantity, LOQ)。并测定该方法的精密度、稳定性、重复性及加标回收率。

3 结果与分析

3.1 色谱条件

在 2.2.2 项下条件记录的样品色谱图见图 1,结果显示,番茄红素的保留时间为 19.717 min,拖尾因子为 1.21,与相邻色谱峰的分离度为 2.2,理论塔板数大于 5000,系统适用性符合要求。

3.2 方法学考察

3.2.1 线性范围

番茄红素在 1.01~50.45 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性关系良好,回归方程为 $Y=138705X-75583(r^2=0.9997)$,LOD 为

0.05 μg/mL, LOQ 为 0.10 μg/mL。

3.2.2 精密度实验

番茄红素峰面积的 RSD 值为 0.34%, 表明仪器精密度良好。

3.2.3 稳定性实验

供试品溶液和对照品溶液中番茄红素峰面积的 RSD 值分别为 1.60%和 0.92%, 表明样品溶液和对照品溶液在 16 h 内稳定。

3.2.4 重复性实验

6 份供试品溶液中番茄红素的平均含量为 16.51 mg/g, RSD 值为 2.40%, 表明方法的重复性良好。

3.2.5 加样回收实验

回收率结果见表 1。不同浓度水平下番茄红素的加样回收率为 96.20%~105.44%, RSD 值均不大于 2.50%, 表明方法的准确度良好。

3.3 样品含量测定

分别取 7 个厂家的样品, 按照 2.2.1 项下方法制备供

试品溶液, 再按 2.2.2 项下色谱条件进行测定, 记录峰面积, 根据建立的标准曲线计算样品中番茄红素的含量, 结果见表 2。可以看出, 不同厂家的样品中番茄红素的含量相差很大, 与其标示量相比, 近半数不合格。

3.4 抗氧化剂溶液配制方法的优化

由于番茄红素中存在多个反式共轭双键, 容易被氧化, 因此在对照品使用及样品处理过程中需要加入抗氧化剂, 最常用的为焦性没食子酸。在 GB-T 22249-2008 中, 规定抗氧化剂溶液的配制方法为将 5 g 焦性没食子酸用二氯甲烷溶解并稀释至 100 mL, 但由于焦性没食子酸的极性较大, 即使在较高温度下长时间超声也难以完全溶解于二氯甲烷。因此, 在本方法中对抗氧化剂的浓度和配制方法进行了优化, 经考察发现将焦性没食子酸先溶于少量极性溶剂甲醇中, 再用二氯甲烷稀释, 不会引起固体析出, 同时不影响样品提取效率。另外稳定性考察发现, 将抗氧化剂浓度由原来的 5%降至 0.1%, 不影响对照品和样品溶液的稳定性。

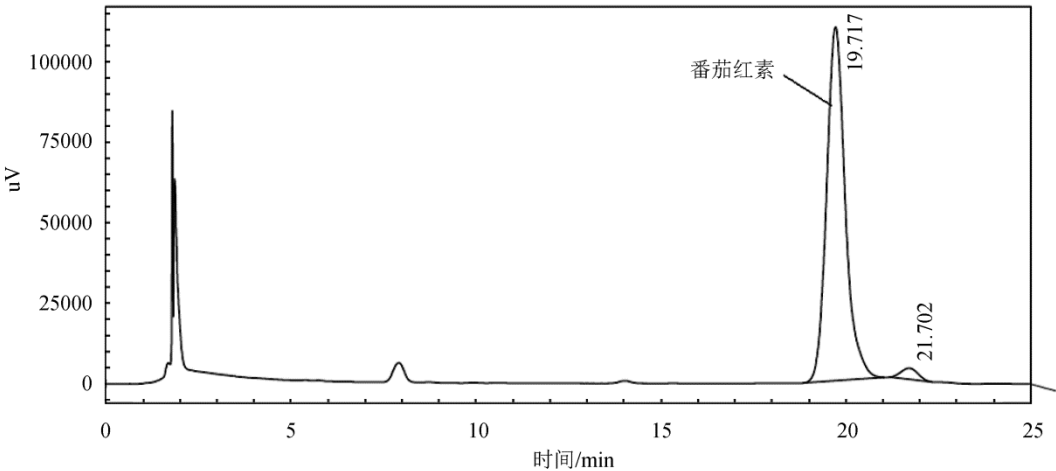


图 1 样品(Y-1)的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatogram of typical sample (Y-1)

表 1 加样回收实验结果
Table 1 Results of recovery tests

浓度水平	称样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
低	0.2846	4.70		7.85	96.20	98.82	2.42
	0.2897	4.78	3.28	8.04	99.40		
	0.2893	4.78		8.09	100.88		
中	0.3128	5.16		9.77	105.44	104.02	2.50
	0.3067	5.06	4.37	9.48	101.02		
	0.2964	4.89		9.51	105.60		
高	0.2876	4.75		10.46	104.63	103.24	1.28
	0.2947	4.87	5.46	10.49	103.08		
	0.2997	4.95		10.52	102.00		

表 2 样品含量测定结果
Table 2 Content of lycopene in samples

样品编号	厂家	剂型	标示量	含量/(mg/g)	结论
Y-1	A 厂家	软胶囊	2.26 g/100 g	1.651 g/100 g	不合格
Y-2	B 厂家	软胶囊	1 g/100 g	1.227 g/100 g	合格
Y-3	C 厂家	软胶囊	20 mg/640 mg	43.616 mg/640 mg	合格
Y-4	D 厂家	胶囊	≥7.0 g/100 g	1.724 g/100 g	不合格
Y-5	E 厂家	软胶囊	10 mg/250 mg	11.198 mg/250 mg	合格
Y-6	F 厂家	片剂	无	0.46	/
Y-7	G 厂家	片剂	10 mg/620 mg	0.242 mg/620 mg	不合格

3.5 色谱流动相的优化

针对 GB/T 22249-2008 方法中使用的流动相甲醇-乙腈(50:50, V:V)容易引起色谱峰过宽且分离度不好的缺点,考察了多种流动相系统,包括甲醇-乙腈-二氯甲烷,甲醇-四氢呋喃-水,乙腈-二氯甲烷,甲醇-乙酸乙酯等,主要原则为加入对番茄红素溶解度较好的低极性溶剂。结果发现,甲醇-乙酸乙酯(95:5, V:V)条件下的分离效果最好,峰形尖锐,且流动相的组成相对简单,容易配制,减少了二氯甲烷或四氢呋喃等毒性较大或易挥发的溶剂使用。

4 结 论

本研究建立了保健食品中番茄红素的 HPLC 含量测定方法,具有精密度、稳定性、重复性良好,准确度高等特点,是对 GB-T 22249-2008 方法作出的有效改进,有利于该类保健食品的质量控制。同时,采用建立的方法对市场多个品牌的番茄红素产品进行测定后发现,近半数产品的含量低于其标示量,说明该类保健食品质量参差不齐,值得引起重视。

参考文献

[1] Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, β_2 carotene and other carotenoids as antioxidants [J]. Am J Clin Nutr, 1995, 62(6S): 1315S-1321S.

[2] Rissanen T, Voutilainen S, Nyyssöen K, *et al.* Lycopene, atherosclerosis, and coronary heart disease [J]. Exp Biol Med, 2002, 227(10): 900-907.

[3] Chew BP, Park JS. Carotenoid action on the immune response [J]. J Nutr, 2004, 134(1): 257S-261S.

[4] Watzl B, Bub A, Briviba K, *et al.* Supplementation of a low-carotenoid diet with tomato or carrot juice modulates immune functions in healthy men [J]. Ann Nutr Metab, 2003, 47(6): 55-261.

[5] 张为国, 谢国建, 刘先军, 等. 番茄红素对胃癌细胞 SGC-7901 生长的抑制作用[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(3): 292-295.

Zhang WG, Xie GJ, Liu XJ, *et al.* The inhibitory effect of lycopene on growth of gastric carcinoma a cells SGC-7901 [J]. Chin Pharm Bull, 2005, 21(3): 292-295.

[6] 唐湘宇, 孙文清, 王蕾, 等. 番茄红素对高脂血兔血管脂质过氧化损伤的影响及机制探讨[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(2): 158-163.

Tang XY, Sun WQ, Wang L, *et al.* Study of mechanisms and effects of lycopene on lipid peroxidation injure in hyperlipemia rabbits [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2006, 11(2): 158-163.

[7] 侯纯明, 何美, 周鑫. 番茄红素检测方法的建立[J]. 食品科学, 2007, 28(5): 295-298.

Hou CM, He M, Zhou X. Simplified method for quantitative analysis of lycopene [J]. Food Sci, 2007, 28(5): 295-298.

[8] 郑丽丽, 陈文, 谢巧, 等. 番茄红素片中番茄红素的含量测定[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2006, 24(5): 579-581.

Zhen LL, Chen W, Xie Q, *et al.* Determination of lycopene tablets by UV spectrophotometry [J]. J Shihezi Univ (Nat Sci Ed), 2006, 24(5): 579-581.

[9] 薛颖, 武兴德, 陈杭. 高效液相色谱法测定番茄及其制品中的番茄红素[J]. 中国食品卫生杂志, 2002, 14(5): 17-19.

Xue Y, Wu XD, Chen H. Determination of lycopene in tomato products [J]. Chin J Food Hyg, 2002, 14(5): 17-19.

[10] Lu DQ, Lu XY, Lu KF, *et al.* RP-HPLC determination of lycopene in microcapsules [J]. J Chin Pharm Sci, 2007, 16(1): 65-68.

[11] 陈向明, 赵娟娟, 吕青志, 等. 高效液相色谱法测定果蔬汁饮料中的番茄红素[J]. 光谱实验室, 2012, 29(4): 2238-2240.

Chen XM, Zhao JJ, Lv QZ, *et al.* Determination of lycopene in fruit and vegetable juice drink by HPLC [J]. Chin J Spectros Lab, 2012, 29(4): 2238-2240.

[12] 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 health foods [S].

(责任编辑: 武英华)

作者简介

吴先富, 副研究员, 主要研究方向为药物分析和药品标准物质研究。
E-mail: wuxf99@163.com

肖新月, 研究员, 主要研究方向为为药物分析和药品标准物质研究。
E-mail: xiaoxy@nifdc.org.cn