

高效液相色谱法同时测定红心鸭蛋中 5 种类胡萝卜素含量

蔡翔宇*, 秦 富, 司露露, 欧玉玲

(南宁海关技术中心, 南宁 530021)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法同时测定红心鸭蛋中辣椒红素、虾青素、叶黄素、玉米黄素、角黄素 5 种类胡萝卜素的方法。**方法** 样品经乙腈提取, 浓缩后用正己烷脱脂。采用 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ (4.6 mm×100 mm, 4 μm) 色谱柱分离, 以 20 mmol/L 乙酸铵和乙腈作为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 二极管阵列检测器, 波长 471 nm, 25 min 完成检测。**结果** 5 种类胡萝卜素可以实现基线分离, 线性关系良好, 相关系数均在 0.999 以上, 样品在 3 个浓度水平的加标回收率为 84.39%~93.42%(n=6)。**结论** 该方法简便、快捷、准确, 可用于红心鸭蛋中 5 种类胡萝卜素的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 红心鸭蛋; 类胡萝卜素

Simultaneous determination of 5 kinds of carotenoids in red yolk of duck's eggs by high performance liquid chromatography

CAI Xiang-Yu*, QIN Fu, SI Lu-Lu, OU Yu-Ling

(Technology Center of Nanning Customs, Nanning 530021, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of 5 carotenoids including capsacin, astaxanthin, lutein, zeaxanthin and capsacin in duck eggs with red hearts by high performance liquid chromatography. **Methods** Samples were extracted with acetonitrile. After being concentrated, the acetonitrile phase was defatted by hexane. Chromatographic separation was performed on an Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈(4.6 mm×100 mm, 4 μm)column with acetonitrile-20 mmol/L ammonium acetate as mobile phase by gradient elution. The flow-rate was 1.0 mL/min. Photo-diode array detector was applied and was set at 471 nm. The analysis process could be completed in 25 min. **Results** The results showed that the baseline separation was obtained for the 5 carotenoids. All the 5 carotenoids had excellent linear relationships ($r>0.999$). The recoveries of samples at 3 concentration levels were 84.39%–93.42% ($n=6$). **Conclusion** This method is simple, rapid, highly sensitive and with good repeatability. It can be used for determination of 5 carotenoids in red yolk of duck's eggs.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; red yolk of duck's eggs; carotenoids

基金项目: 海关总署科技计划项目(2017IK040)

Fund: Supported by the General Administration of Customs Research Projects (2017IK040)

*通讯作者: 蔡翔宇, 中级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全研究。E-mail: 116152205@qq.com

*Corresponding author: CAI Xiang-Yu, Engineer, Technology Center of Nanning Customs, Nanning 530021 China. E-mail: 116152205@qq.com

1 引言

随着人们生活水平的不断提高,人们对食品的要求不仅仅停留在营养的需求方面,对视觉的需求方面也有了更高的追求。蛋黄着色是一个天然的过程,类胡萝卜素是形成蛋黄色泽主要的着色因素^[1],由于禽类本身不能合成这些类胡萝卜素,需要从所摄食的食物中获取,并沉积到蛋黄中^[2-4],因此,在饲料中加入不同比例的该类色素,能使蛋黄颜色发生改变,以此吸引消费者^[5]。饲料添加剂用的类胡萝卜素,是以饲料为媒介,转移至禽产品内,最后还是被人以食品形式食用^[6],因此对于类胡萝卜素的使用仍然存在安全风险。目前我国还未有针对蛋类中类胡萝卜素含量的检测标准,监管难度大。

从结构上来说,类胡萝卜素是聚异戊二烯化合物^[7]。类胡萝卜素的性质不稳定,易受光、热、酸、碱等环境影响,给鸭蛋中类胡萝卜素含量的测定增加了难度。目前,类胡萝卜素的主要分析方法是高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC),但还未见有能同时测定蛋中多种类胡萝卜素方法的报道。样品前处理目前主要是利用柱层析^[8]、有机试剂提取^[9-11]、皂化^[12,13]等手段,步骤繁琐,且需要用到大量丙酮、石油醚、氯仿、乙酸乙酯等易挥发的有毒试剂,对检测人员危害较大。本研究将建立一种可同时测定红心鸭蛋中辣椒红素、虾青素、叶黄素、玉米黄素和角黄素5种类胡萝卜素的高效液相色谱法,该方法具有操作简便、多组分同时分析的特点,以期对红心鸭蛋的质量安全监控提供技术保障。

2 材料与amp;方法

2.1 仪器、试剂与材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪(配二级阵列管检测器,美国安捷伦公司); KQ-400DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); SIGMA3-18K 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); R-300 旋转蒸发器(瑞士步琦公司); Milli-Q Integral 10 超纯水机(美国 Millipore 公司)。

辣椒红素(95%, 加拿大 TRC 公司); 玉米黄素(89.6%, 美国 Stanford Chemicals 公司); 叶黄素(89.1%, 美国 Stanford Chemicals 公司); 虾青素(98.1%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 角黄素(98.3%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。

乙腈、二氯甲烷、正己烷(色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 正丙醇(分析纯, 广东光华科技股份有限公司); 无水硫酸钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 实验用水由 Milli-Q Integral 10 超纯水机制备。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液配制

精密称取辣椒红素、玉米黄素、叶黄素、虾青素和角

黄素标准品 10 mg 分别置于不同的 100 mL 容量瓶中,用少量二氯甲烷溶解,再用乙腈定容至刻度,配制成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。用时根据具体情况用乙腈稀释成适当浓度的系列标准工作溶液。

2.2.2 色谱条件

色谱柱: Agilent Poroshell 120EC- C_{18} (4.6 mm \times 100 mm, 4 μm) 色谱柱; 柱温 $35\text{ }^\circ\text{C}$; 进样量 5 μL ; 波长 471 nm; 流动相 A: 20 mmol/L 乙酸铵, 流动相 B: 乙腈; 流速 1.0 mL/min 梯度洗脱程序如表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间/min	流动相 A 比例/%	流动相 B 比例/%
0	15	85
12	15	85
15	0	100
20	0	100
25	15	85

2.2.3 样品前处理

准确称取均质样品 5.0 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 乙腈及 5 g 无水硫酸钠后,涡旋混匀 1 min,超声提取 10 min,再以 4000 r/min 离心 5 min,将上清液转移至 100 mL 旋转蒸发瓶中。对离心管中的残渣每次用 20 mL 乙腈再重复提取 2 次,合并 3 次收集的乙腈相,加入 5 mL 正丙醇,于 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 旋转蒸发浓缩至干,用 5 mL 乙腈溶解并转移至 15 mL 离心管中,加入 3 mL 正己烷,涡旋 1 min,以 4000 r/min 离心 5 min,弃去上层正己烷相,下层乙腈相过 0.22 μm 滤膜后,上机分析。

3 结果与分析

3.1 提取条件的选择

类胡萝卜素属于弱极性化合物,可溶于大部分有机溶剂中,不溶于水,因此参考相关文献^[14],选择石油醚、二氯甲烷、乙腈、丙酮等有机溶剂作为提取试剂进行考察。石油醚由于极性太低,提取的效率较差。丙酮由于挥发性较大,在减压浓缩中极易暴沸,难以操作。二氯甲烷和乙腈的提取效率较高,但二氯甲烷的沸点低,在实验过程中对人员和环境的危害大。鸭蛋中存在大量的蛋白质和脂肪,用乙腈作为提取试剂可具有使蛋白质变性、减少脂肪进入提取液的优点,并加入无水硫酸钠吸收液中的水分,提高提取效果。在减压蒸发中加入正丙醇,可有效防止溶剂暴沸。最终选择使用正己烷对液进一步脱脂,减少杂质的干扰,有利于上机分析。

3.2 色谱条件优化

本研究比较了 Agilent ZORBAX SB- C_8 (4.6 mm \times 250 mm,

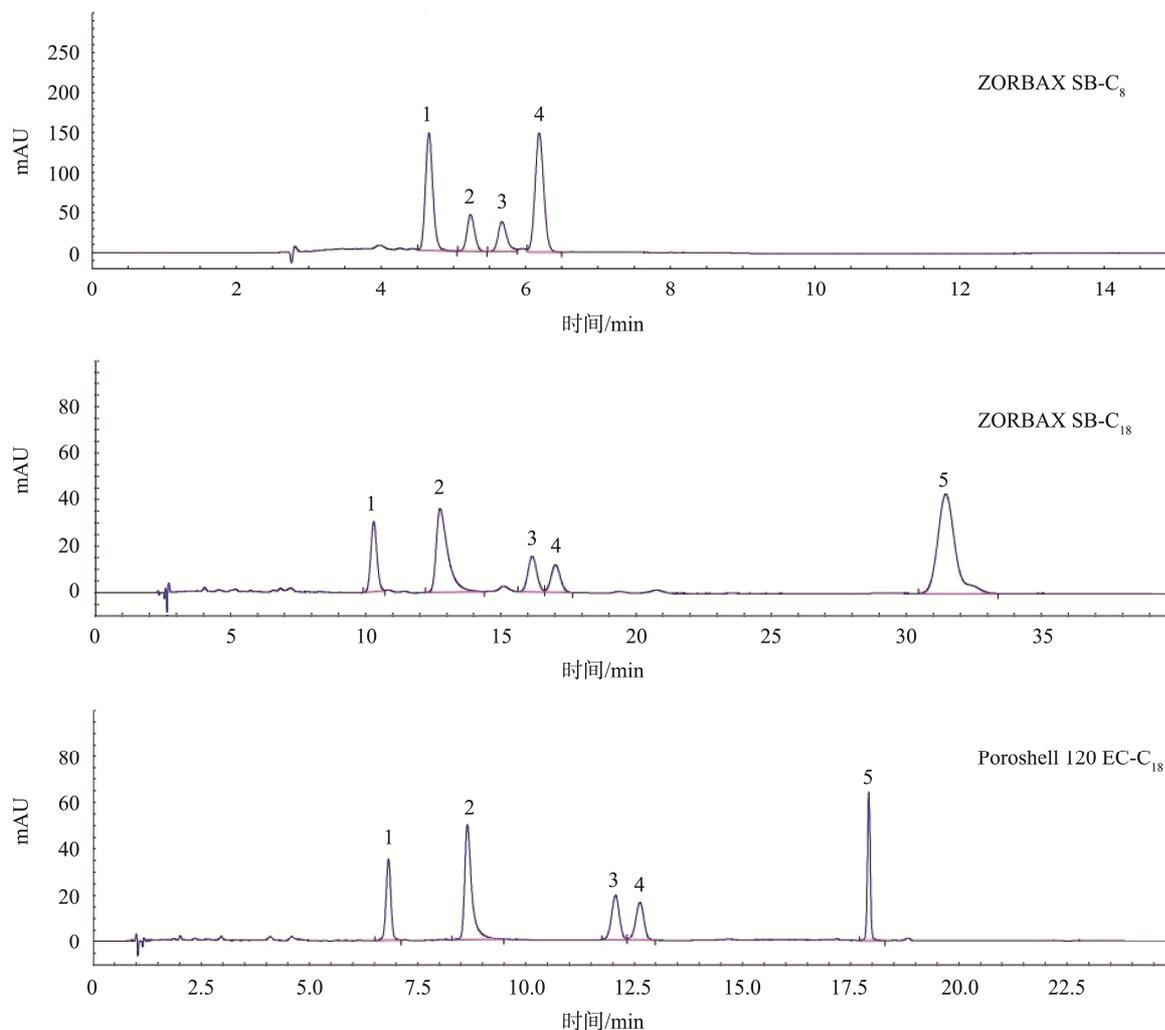
5 μm)、Agilent ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)和 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈(4.6 mm×100 mm, 4 μm)色谱柱对 5 种类胡萝卜素的分离效果。在相同条件下, ZORBAX SB-C₈ 色谱柱出峰过早, 辣椒红素和虾青素在相同时间出峰, 无法分开。ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱能对 5 种类胡萝卜素达到完全分离, 但整体出峰时间较晚, 影响检测效率, 且角黄素的峰型拖尾严重。使用 Poroshell 120 EC-C₁₈ 色谱柱时, 5 种类胡萝卜素整体出峰较快, 分离度较好, 峰型尖锐, 如图 1 所示。

比较了乙腈-甲醇-二氯甲烷、乙腈-乙酸乙酯、甲醇-水、乙腈-水、20 mmol/L 乙酸铵-乙腈体系对 5 种类胡萝卜素的分离效果。叶黄素和玉米黄素均为带有羟基的类胡萝卜素, 互为同分异构体, 仅有一个双键位置不同^[9]。由于结构上极其相似, 用乙腈-甲醇-二氯甲烷、乙腈-乙酸乙酯和甲醇-水体系均无法实现叶黄素和玉米黄素的有效分离。用

乙腈-水可以实现 5 种组分的完全分离, 但虾青素的峰型有拖尾情况, 在水相中添加 20 mmol/L 的乙酸铵后, 发现 5 种组分整体的信号响应值有所提高, 虾青素的拖尾情况也得到改善, 5 种类胡萝卜素混合标准溶液色谱图见图 2, 样品的色谱图见图 3。

3.3 化合物最佳波长的选择

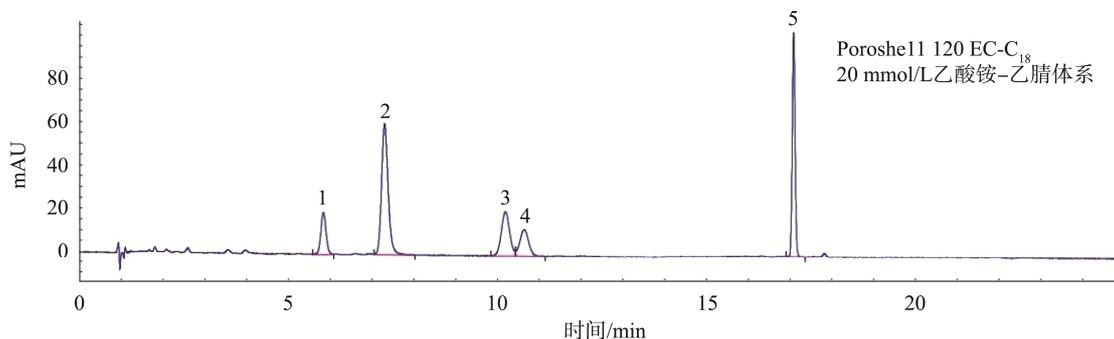
由于类胡萝卜素分子内存在共轭多烯及几种助色基团, 所以通常在 400~600 nm 范围内有最大吸收^[15]。用二极管阵列检测器对 5 种类胡萝卜素在 350~600 nm 的波长范围内进行扫描, 结果如图 4 所示, 辣椒红素、虾青素和角黄素在 471 nm 左右的波长下有最大吸收, 叶黄素和玉米黄素在 450 nm 和 471 nm 均有较大吸收, 在 471 nm 波长下测定 5 种类胡萝卜素, 均显示出较好分离效果和响应信号, 因此选用 471 nm 波长。



注: 1. 辣椒红素; 2. 虾青素; 3. 叶黄素; 4. 玉米黄素; 5. 角黄素。

图 1 不同色谱柱的分离效果

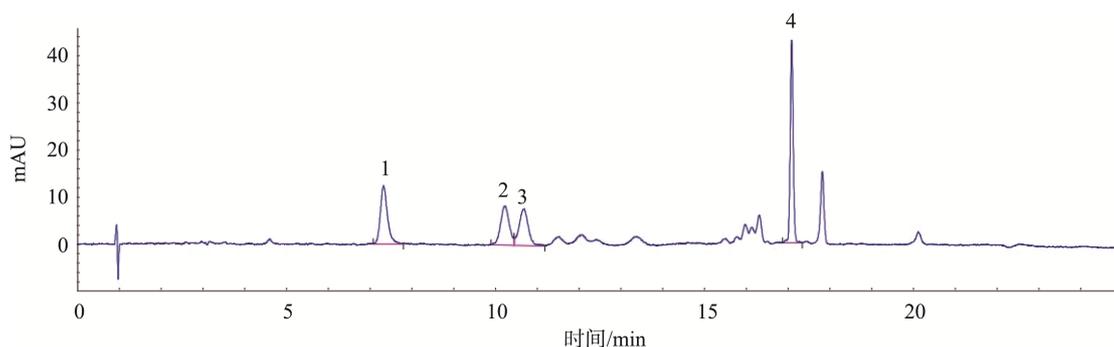
Fig.1 Separation effect of different chromatographic columns



注: 1. 辣椒红素; 2. 虾青素; 3. 叶黄素; 4. 玉米黄素; 5. 角黄素。

图 2 5 种类胡萝卜素混合标准溶液色谱图

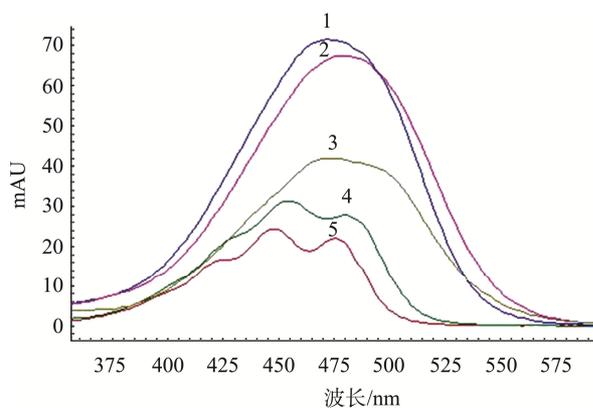
Fig.2 HPLC chromatogram of 5 carotenoids



注: 1. 虾青素; 2. 叶黄素; 3. 玉米黄素; 4. 角黄素

图 3 样品色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of sample



注: 1.角黄素; 2.虾青素; 3.辣椒红素; 4.叶黄素; 5.玉米黄素。

图 4 5 种类胡萝卜素的紫外吸收光谱图

Fig.4 UV-absorption spectra of 5 carotenoids

3.4 标准曲线与检出限

取浓度分别为 0.5、1、2、5、10、20 mg/L 的标准序

列溶液, 以峰面积(Y)为纵坐标, 以浓度(X)为横坐标作图, 绘制标准曲线。通过逐渐降低样品中所添加的标准溶液的浓度, 当各化合物信噪比(signal to noise ratio, S/N)为 3 时, 其质量浓度定义为方法检出限(limit of detection, LOD)。各化合物线性方程、相关系数、检出限结果见表 2。

表 2 各化合物的线性方程、相关系数和检出限
Table 2 Regression equations, correlation coefficients and detection limits of 5 carotenoids

化合物	线性方程	相关系数 (r)	检出限 /(mg/kg)
辣椒红素	$Y=16.68545X+1.73546$	0.99991	2.5
虾青素	$Y=65.40209X+0.104565$	0.99999	1.0
玉米黄素	$Y=28.24842X+0.140187$	0.99993	2.5
叶黄素	$Y=17.66359X+2.95034$	0.99987	2.5
角黄素	$Y=46.89563X+1.29087$	1.00000	1.0

3.5 加标回收率和精密度

同一批次红心鸭蛋中添加 3 个浓度水平的标准溶液,按照 2.2.3 所述方法进行前处理,每个加标水平平行测定 6 次。由表 3 可见,3 种不同浓度水平的加标回收率在 84.39%~94.76%之间,相对标准偏差(relative standard derivation, RSD)在 1.07%~3.02 之间,说明方法的回收率好、精密度高。

3.6 实际样品检测结果

采集当地市场上销售的 21 份红心鸭蛋样品进行检测,结果见表 4。21 份样品均未检出辣椒红素,有 3 份样品检出虾青素,含量在 1.41~63.2 mg/kg 之间,样品中均含有叶黄素、玉米黄素和角黄素,含量分别在 1.78~30.5 mg/kg、3.92~32.9 mg/kg 和 1.15~17.9 mg/kg 范围内。

表 3 方法的回收率和精密度($n=6$)
Table 3 Recoveries and precision of samples ($n=6$)

化合物	样品含量/(mg/kg)	加标量/(mg/kg)	平均回收率/%	RSD/%
辣椒红素	ND	2.5	88.92	1.45
		5	85.67	1.82
		20	89.33	2.36
虾青素	ND	1.0	90.12	1.90
		10	92.23	2.32
		50	91.08	2.61
玉米黄素	3.92	2.5	87.80	1.67
		5	84.39	3.02
		20	89.88	2.35
叶黄素	8.27	2.5	85.76	2.21
		5	88.74	1.70
		20	86.56	1.78
角黄素	ND	1.0	87.92	1.07
		10	90.65	2.08
		20	94.76	2.43

注:“ND”为未检出。

表 4 样品中 5 种类胡萝卜素含量
Table 4 Contents of 5 carotenoids in in samples

样品编号	辣椒红素/(mg/kg)	虾青素/(mg/kg)	叶黄素/(mg/kg)	玉米黄素/(mg/kg)	角黄素/(mg/kg)
1	ND	ND	23.1	5.77	1.97
2	ND	ND	14.6	4.02	1.41
3	ND	ND	21.8	5.32	1.94
4	ND	ND	29.7	7.36	2.56
5	ND	ND	27.2	6.89	2.16

续表4

样品编号	辣椒红素/(mg/kg)	虾青素/(mg/kg)	叶黄素/(mg/kg)	玉米黄素/(mg/kg)	角黄素/(mg/kg)
6	ND	ND	23.1	5.79	2.12
7	ND	ND	22.3	6.23	2.61
8	ND	ND	25.5	6.52	2.64
9	ND	ND	30.5	9.22	3.13
10	ND	ND	24.2	6.05	2.55
11	ND	ND	11.2	31.6	13.9
12	ND	ND	14.4	18.9	6.9
13	ND	ND	11.7	14.6	4.05
14	ND	ND	11.8	32.9	15.2
15	ND	ND	7.44	17.9	5.17
16	ND	33.4	9.72	13.7	1.15
17	ND	63.2	9.38	14.5	1.18
18	ND	ND	1.78	8.64	10.52
19	ND	1.41	12.1	18.2	14.6
20	ND	ND	7.36	15.6	17.1
21	ND	ND	8.27	3.92	17.9

注: “ND”为未检出。

4 结论

本研究建立了红心鸭蛋中5种类胡萝卜素的高效液相色谱测定方法。样品用乙腈提取后, 经旋转蒸发浓缩, 正己烷脱脂后上机测定。结果表明本方法操作简单、分离度好、灵敏度高且准确性好, 为测定红心鸭蛋中的类胡萝卜素提供方法参考。

参考文献

- [1] 刘良忠, 张民, 彭光华, 等. 高效液相色谱-质谱法分离鉴定天然红心鸭蛋黄中的红色素[J]. 色谱, 2004, 22(3): 197-201.
Liu LZ, Zhang M, Peng GH, *et al.* Separation and identification of red pigments in natural red yolk of duck's eggs by HPLC-MS-MS [J]. *Chin J Chromatogr*, 2004, 22(3): 197-201.
- [2] 罗琼, 蒋渊海, 姜紫馨, 等. 两种类胡萝卜素提取物对胃癌 SGC-7901 细胞增殖与凋亡作用的比较研究[J]. 营养学报, 2011, 33(3): 278-281.
Luo Q, Jiang YH, Lou ZX, *et al.* Effect of 2 kinds of carotenoids on proliferation and apoptosis of human gastric carcinoma cell SGC-7901 [J]. *Acta Nutr Sinica*, 2011, 33(3): 278-281.
- [3] 王银东, 张欣欣, 黄胜平, 等. 红心蛋的正确认识与非法红心蛋的控制[J]. 养殖与饲料, 2007, 10: 24-25.
Wang YD, Zhang XX, Huang SP, *et al.* Correct understanding of red heart eggs and control of illegal red heart eggs [J]. *Anim Breeding Feed*, 2007, 10: 24-25.
- [4] 冒国祥, 李亮, 苏衍菁, 等. 不同色素添加剂对蛋黄着色效果的影响[J]. 中国家禽, 2006, 28(24): 140-142.
Mao GX, Li L, Su YJ, *et al.* Effect on the different pigment additions to the yolk pigmentation [J]. *China Poultry*, 2006, 28(24): 140-142.
- [5] 焦广睿, 王柯. 高效液相色谱-串联质谱法测定蛋黄中4类胡萝卜素着色剂的含量[J]. 上海预防医学, 2018, 30(6): 472-475.
Jiao GR, Wang K. Simultaneous determination of 4 carotenoid pigments in yolk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Shanghai J Prev Med*, 2018, 30(6): 472-475.
- [6] 魏红, 汪红. 色素添加剂在蛋黄着色上的应用[J]. 饲料博览, 2004, 2: 41-43.
Wei H, Wang H. Application of pigment additive in yolk coloring [J]. *Feed Rev*, 2004, 2: 41-43.
- [7] 王榆元, 王晓晴, 王志峥, 等. 小球藻中类胡萝卜素类化合物的高效液相色谱分离条件的优化[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(8): 1546-1549.
Wang YY, Wang XQ, Wang ZZ, *et al.* Separation of carotenoids in chlorella sp by HPLC [J]. *Progress Mod Biomed*, 2010, 10(8): 1546-1549.
- [8] 刘良忠, 张声华, 石嘉怿, 等. 采用反相 C₁₈-HPLC 分离天然红心鸭蛋中红色类胡萝卜素的异构体[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 473-478.

- Liu LZ, Zhang SH, Shi JY, *et al.* Separation of the isomers of red carotenoid in nature red yolk with reverse-phase C_{18} -HPLC [J]. Food Sci, 2006, 27(11): 473-478.
- [9] 张春秋, 刘杰, 谢开云, 等. 高效液相色谱法测定马铃薯薯肉中的类胡萝卜素[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 302-305.
- Zhang CQ, Liu J, Xie KY, *et al.* Determination of carotenoids in tuber flesh by HPLC in potato (*Solanumtuberosum* L.) [J]. Food Sci, 2008, 29(4): 302-305.
- [10] 李赫, 陈敏, 朱蕾, 等. 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, Zhu L, *et al.* 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] 李雪雁, 利慧然, 肖华, 等. 红心鸡蛋类胡萝卜素物质的提取及稳定性研究[J]. 食品研究与开发[J]. 2008, 29(5): 101-104.
- Li XY, Li HR, Xiao H, *et al.* Study on extraction and stability of carotenoids from eggs with red hearts [J]. 2008, 29(5): 101-104.
- [12] 赵艳, 杨发树, 张凤桢, 等. 反相高效液相色谱法测定巴沙鱼中的黄体素和玉米黄质[J]. 食品科学, 2012, 33(16): 225-228.
- Zhao Y, Yang FS, Zhang FP, *et al.* Determination of lutein and zeaxanthin in basa fish by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. Food Sci, 2012, 33(16): 225-228.
- [13] 胡玉琴, 郁继华, 王小龙, 等. 辣椒叶片中类胡萝卜素组分分离及测定方法的研究[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2015, 51(4): 75-80.
- Hu YQ, Yu JH, Wang XL, *et al.* Studies on separated and determined methods of the carotenoids composition in pepper leaves [J]. J Northwest Nor Univ (Nat Sci Ed), 2015, 51(4): 75-80.
- [14] 何康昊, 邹晓莉, 刘祥, 等. 反相高效液相色谱-二极管阵列检测蛋黄中的角黄素和虾青素[J]. 四川大学学报(医学版), 2012, 43(1): 113-117.
- He KH, Zou XL, Liu X, *et al.* Determination of canthaxanthin and astaxanthin in egg yolks by reverse [J]. J Sichuan Univ(Med Sci Ed), 2012, 43(1): 113-117.
- [15] 朱明明, 樊明涛, 何鸿举. 类胡萝卜素降解方式的研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(11): 308-317.
- Zhu MM, Fan MT, He HJ. Advances in methods for the degradation of carotenoids [J]. Food Sci, 2017, 38(11): 308-317.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



蔡翔宇, 中级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 116152205@qq.com