

超高效液相色谱法检测方便面中叶黄素

代弟*, 那晗, 方秋园, 杨璐, 董振霖

(大连海关, 大连 116001)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱检测方便面中叶黄素的方法。**方法** 方便面样品中的叶黄素用石油醚提取, 涡旋离心, 过膜, 供超高效液相色谱检测。紫外检测器检测波长为 445 nm, 采用外标法定量。**结果** 叶黄素在 0.5~10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内线性关系良好, 相关系数大于 0.9945, 方法检出限为 0.1 mg/kg, 平均回收率为 82.1%~105.3%, 相对标准偏差为 6.5%~12.2%。**结论** 本方法操作简便、经济实用、结果准确可靠, 可用于方便面中叶黄素的批量检测。

关键词: 方便面; 叶黄素; 超高效液相色谱法

Determination of the lutein in instant noodle by ultra performance liquid chromatography

DAI Di*, NA Han, FANG Qiu-Yuan, YANG Lu, DONG Zhen-Lin

(Dalian Customs, Dalian 116001, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of lutein in instant noodle by ultra performance liquid chromatography(UPLC). **Methods** The lutein in the instant noodle was extracted with petroleum ether, vortexed for centrifugation, and then passed through a membrane for ultra performance liquid chromatography. The detection wavelength of ultraviolet detector was 445 nm, and the external standard method was used for quantitative analysis. **Results** The linear relationship of lutein was good in the range of 0.5-10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with correlation coefficients above 0.9945. The detection limit of the method was 0.1 mg/kg and the recovery rate was 82.1%-105.3%, with the relative standard deviation(RSD) 6.5%-12.2%. **Conclusion** The method is simple, economical and practical, and the result is accurate and reliable, which is suitable for batch determination of lutein in instant noodle.

KEY WORDS: instant noodle; lutein; ultra performance liquid chromatography

1 引言

叶黄素是一种不对称的二羟基类胡萝卜素, 广泛存在于蔬菜, 花卉, 水果等植物中的天然物质, 是目前已经发现的多种天然类胡萝卜素中的一种, 属于光合色素, 分子式为 $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$, 一般存在于在绿叶的蔬菜中^[1-3]。叶黄素是构成眼睛视网膜黄斑色素的主要组成部分, 对人眼部极其重要, 但叶黄素不能由人体自身合成, 只能从食物中摄取^[4]。服用富含叶黄素的食物可以有效地降低老年性黄斑

退化, 叶黄素及其酯类物质还具有很强的抗氧化活性和自由基清除能力, 长期服用有益于人体的健康^[5]。此外, 叶黄素本身还是一种很好的天然着色剂, 在饲料中添加叶黄素不仅可以给动物补充营养, 还可以提高动物肉质和蛋的品质, 因此, 叶黄素被广泛应用于医药、保健品、化妆品、食品着色、烟草、水产品及动物饲料等领域^[6-8], 检测食品中叶黄素含量具有十分重要的意义。目前, 食品中叶黄素最常用的检测方法为 GB 5009.248-2016《食品安全国家标准 食品中叶黄素的测定》^[9]中的液相色谱法, 然而此方法

*通讯作者: 代弟, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: ddlgp2006@126.com

*Corresponding author: DAI Di, Engineer, Technology Centre of Dalian Customs District China, No.60, Changjiang East Road, Zhongshan District, Dalian 116000, China. E-mail: ddlgp2006@126.com

操作过于繁琐,消耗的试剂多,且样品处理步骤复杂,在实际样品批量检测时,消耗大量的人力物力。本研究以方便面制品为研究对象,采用了与GB 5009.248-2016不同的方法,并对前处理进行优化,采用石油醚对方便面样品中的叶黄素进行直接提取,利用超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)作为检测手段,使用紫外检测器进行定性定量分析,可以为批量检测方便面制品中叶黄素的含量提供参考依据。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

2.1.1 实验仪器

Acquity 超高效液相色谱仪,配有脱气机、四元泵、高效自动进样器、柱温箱、紫外检测器(美国 Waters 公司);K600 博朗料理机;PL602-L 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);R215 旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI 公司);MS3 数显涡旋混匀器(德国 IKA 公司);KH-500DV 数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);3-18K 离心机(美国 Sigma 公司);VF-T 超纯水仪(美国 Millipore 公司)

2.1.2 试剂与样品

石油醚、甲醇、无水乙醇(色谱纯,德国 Merck 公司);叶黄素标准品(CAS 号:127-40-2,纯度:99.9%,德国 Sigma-Aldrich 公司);甲基叔丁基醚(含量>99.0%,国药集团化学试剂有限公司);二丁基羟基甲苯(butylated hydroxytoluene, BHT)(北京百灵威科技有限公司,纯度:99.0%);本研究用水均为高纯水。

实验所用方便面样品购自本地超市。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

甲醇-水(88-12, V/V)溶液:准确量取甲醇 88 mL,加水 12 mL,混匀。

0.1%(m/V)BHT 乙醇溶液:称取 0.1 g BHT,以 100 mL 无水乙醇溶解,混匀。

甲基叔丁基醚(含 0.1% BHT):称取 0.1g BHT,加入 100 mL 甲基叔丁基醚溶解,混匀。

叶黄素标准储备液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$):准确称取 5.0 mg(精确至 0.01 mg)叶黄素,以 0.1%BHT 乙醇溶液溶解,并定容至 100 mL。该标准储备液充氮避光,置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 或以下的冰箱中可保存 6 个月。

叶黄素标准工作液:从叶黄素标准储备液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)中准确移取 0.1、0.2、0.4、1.0、2.0 mL 于 5 个 10 mL 棕色容量瓶中,用 0.1%BHT 乙醇溶液定容至刻度线,得到浓度分别为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列标准工作液。标准工作液充氮避光置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 或以下的冰箱中可保存 1 个月。

2.2.2 样品提取与净化

准确称取研磨后的方便面制品约 5 g 于离心管中,加 20 mL 石油醚,超声提取 30 min, 8000 r/min 离

心 5 min 后,将上层石油醚转移到鸡心瓶中,再次倒入 10 mL 石油醚,涡旋洗涤残渣,合并 2 次石油醚,于旋转蒸发仪蒸干。用 0.1%BHT 乙醇溶液溶解,并定容至 1.0 mL,过 0.25 μm 的微孔滤膜,供高效液相色谱上机。

2.2.3 色谱条件

色谱柱: sunfire (2.1 mm \times 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(90-10, V/V)等度洗脱,流速 0.8 mL/min; 检测波长: 445 nm; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 10 μL ^[10-12]。

3 结果与讨论

3.1 样品的提取与净化的选择

GB 5009.248-2016 中测定方法的前处理采用环己烷+正己烷对样品中的叶黄素进行提取,而本方法采用了石油醚直接提取,步骤相对简单,消耗的试剂耗材少;此外,国标方法中采用甲基叔丁基醚作为流动相,它的醚样气味重,而本方法采用了甲醇-水(90-10)等度洗脱,不使用甲基叔丁基醚做流动相,能够节省大量的人力物力,更加环保。

3.2 检测仪器的选择

GB 5009.248-2016 食品中叶黄素的测定的检测仪器是普通的液相色谱仪,检测时间为 28 min,本方法采用超高效液相色谱法,检测时间为 10 min,当大批量进样时,可以有效的提高检测效率。高效液相色谱法,多采用梯度洗脱,且若有与叶黄素极性相近的杂质混入样品中会干扰测定,且每次检测的时间与梯度洗脱后的色谱柱平衡时间较长^[13-15]。本研究采用超高效液相色谱,可对样本中的叶黄素进行快速检测,回收率高,耐用性强。

3.3 方法的线性关系与检出限

叶黄素标准品及样品的色谱图见图 1~2。将系列混合标准工作液中分析物的峰面积 $Y(\text{mAU})$ 对其质量浓度 $X(\mu\text{g}/\text{mL})$ 进行线性回归,制作标准曲线。在线性范围 0.5~10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内,得到叶黄素标准曲线回归方程为 $Y=105000X-13100$,相关系数大于 0.9945,线性良好。以基线 3 倍信噪比计算方法检出限,得到此方法叶黄素的检出限为 0.1 mg/kg,方法灵敏度高。

3.4 回收率及精密度实验

选取阴性样品进行低、中、高 3 个浓度水平的加标回收实验,每个水平进行 6 次平行实验。叶黄素的平均回收率、相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)结果见表 1,平均回收率为 82.1%~105.3%,相对标准偏差为 6.5%~12.2%,方法准确度较高。

4 结论与讨论

本研究建立了方便面中叶黄素的高效液相色谱的检测方法,采用石油醚提取样品,利用 Waters 超高压液相色谱仪能快速有效的检测。实验表明,方法的线性关系、相关系数、回收率和精密度实验均符合方法的要求。本方法经济成本低、方法操作简便、快速,适用性较强,测定结果准确可靠,对方便面中叶黄素的检测有重要的意义。

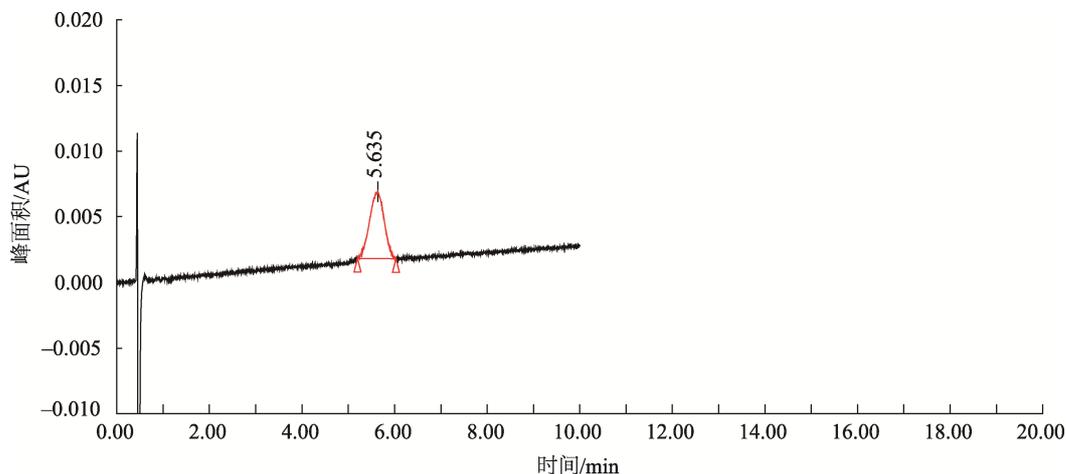


图 1 叶黄素标准样品(1.0 µg/mL)的标准曲线色谱图
Fig.1 Chromatogram of lutein standard sample (1.0 µg/mL)

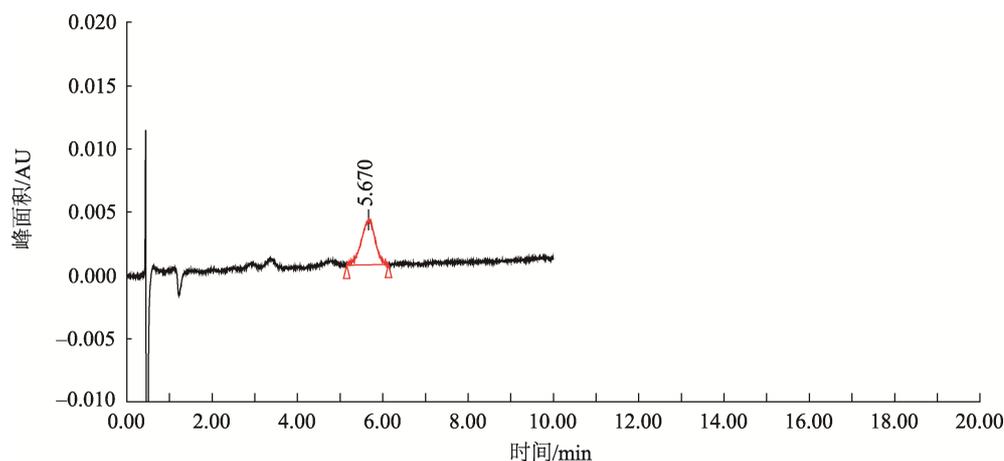


图 2 样品中叶黄素质谱图
Fig.2 Chromatogram of lutein in sample

表 1 添加水平及回收率($n=6$)

Table 1 The regression equation and correlation coefficient of the compounds ($n=6$)

分析物浓度/(mg/kg)	回收率范围	相对标准偏差范围
0.1	82.1%~105.3%	7.5%~12.2%
1.0	85.6%~103.8%	6.7%~10.5%
5.0	89.4%~102.3%	6.5%~9.8%

参考文献

- [1] 刘宏程. 万寿菊中叶黄素的化学性质、定量分析及其制品安全性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
Liu HC. Study on the chemical properties, quantitative analysis and product safety of lutein in marigold [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012.
- [2] 许秀兰, 赵国华. 叶黄素研究进展[J]. 粮食与油脂, 2004, (10): 3-7.
Xu XL, Zhao GH. Research advances of lutein [J]. J Cere Oils, 2004, (10): 3-7.
- [3] 李大婧, 刘春泉. 万寿菊叶黄素的提取及分析方法研究进展[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 582-586.
Li DJ, Liu CQ. Advances on extraction and analysis methods of lutein from marigold (*Tagetes erecta*) [J]. Food Sci, 2005, 26(9): 582-586.
- [4] Kijlstra A, Tian Y, Kelly ER, et al. Lutein: more than just a filter for blue light [J]. Prog Retin Eye Res, 2012, (31): 303-315
- [5] 官咏仪, 林海丹, 邱志超, 等. 高效液相色谱法测定保健品中的叶黄素含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(10): 347-351.
Guan YY, Lin HD, Qiu ZC, et al. Determination of lutein in health products by high performance chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(10): 347-351.
- [6] 张志军. 高效液相色谱法测定不同类别食品中的叶黄素[J]. 广西大学学报(自然科学版), 2019, 44(3): 869-875.
Zhang ZJ. Determination of lutein in different kinds of food by HPLC [J]. J Guangxi Univ (Nat Sci Ed), 2019, 44(3): 869-875.
- [7] 杨方, 张盼盼, 钱疆, 等. 高效液相色谱法同时检测淀粉类食品中添加的姜黄素与类胡萝卜素化合物[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(6):

- 558–562.
- Yang F, Zhang PP, Qian J, *et al.* Simultaneous determination of curcuminoids and carotenoids in starchy foods by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Food Hyg*, 2014, 26(6): 558–562.
- [8] 黄百芬, 郑凯, 谭莹, 等. 高效液相色谱法同时测定婴幼儿食品和乳品中的叶黄素、 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素[J]. *中国卫生检验杂志*, 2012, 22(9): 2043–2045.
- Huang BF, Zheng K, Tan Y, *et al.* Simultaneous determination of lutein, α -caroten and β -carotene levels in foods for infants and young children and milk products by HPLC [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2012, 22(9): 2043–2045.
- [9] GB 5009.248-2016 食品安全国家标准 食品中叶黄素的测定[S].
GB 5009.248-2016 National food safety standard-Determination of lutein in foods [S].
- [10] 杨文文, 邱静, 高贵, 等. HPLC 法测定加工食品中叶黄素的含量[J]. *安徽农业科学*, 2013, (24): 244–245, 350.
- Yang WW, Qiu J, Gao G, *et al.* Determination of lutein content in processed food by HPLC [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2013, (24): 244–245, 350.
- [11] 赵志红, 张逢秋. 反相高效液相色谱法测定食品中的叶黄素食品安全与检测[J]. *食品科技*, 2009, 34(1): 261–263.
- Zhao ZH, Zhang FQ. Determination of lutein in food by reversed phase high performance liquid chromatography(RP-HPLC) [J]. *Food Sci Technol*, 2009, 34(1): 261–263.
- [12] 陈洁丽, 李凤, 楼禹阳. 高效液相色谱法测定叶黄素的含量[J]. *广东化工*, 2015, 42(15): 210–211.
- Chen JL, Li F, Lou YY. High performance liquid chromatography(HPLC) method for determining the content of lutein [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2015, 42(15): 210–211.
- [13] 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 standard-Use of food additives [S].
- [14] 石菲, 刘叶. 分析检测高效液相色谱法测定婴幼儿奶粉中的叶黄素[J]. *食品工业*, 2019, 40(9): 252–254.
- Shi F, Liu Y. Determination of lutein in infant milk powder by high performance liquid chromatography [J]. *Food Ind*, 2019, 40(9): 252–254.
- [15] 陈城, 程曦. 叶黄素的提取方法和功能研究进展[J]. *河北林业科技*, 2016, (3): 71–72.
- Chen C, Cheng X. Research progress in extraction methods and functions of lutein [J]. *J Hebei Forest Sci Technol*, 2016, (3): 71–72.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



代弟, 研究生, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: ddlg2006@126.com