

高效液相色谱法测定保健食品中叶黄素含量

史朝烨, 赵俊楠, 樊少娟, 贺 茜, 雷会宁, 马 月, 吕 卓, 李 涛*

(陕西省食品药品监督检验研究院, 西安 710065)

摘 要: **目的** 建立高效液相色谱法测定保健食品中叶黄素含量的分析方法。**方法** 使用 60℃水溶解后用 0.1% 丁基羟基甲苯(butylated hydroxytoluene, BHT)乙醇溶液作为提取液, 甲醇+水(95:5, *V:V*)作为流动相, 用 C₁₈ 柱在 445 nm 检测波长下等度分离。采用高效液相色谱法测定保健食品中叶黄素的含量。**结果** 叶黄素在 0.2597~2.597 μg/mL 浓度范围内线性关系良好($r=0.9990$), 精密度相对标准偏差低于 5%, 重复性相对标准偏差为 2.9%, 回收率为 96.57%~98.67%。**结论** 本检测方法操作简便、灵敏度好、准确性高, 适用于保健食品中叶黄素的测定。

关键词: 叶黄素; 保健食品; 高效液相色谱法

Determination of lutein in health food by high performance liquid chromatography

SHI Zhao-Ye, ZHAO Jun-Nan, FAN Shao-Juan, HE Qian, LEI Hui-Ning, MA Yue, LV Zhuo, LI Tao*

(Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710065, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of lutein in health food by high performance liquid chromatography. **Methods** The sample was dissolved in hot water (60 °C), then extracted by ethanol solution with 0.1% BHT. Methanol-water (95:5, *V:V*) was used as the mobile phase. The C₁₈ column was used for the separation at the detection wavelength of 445 nm. The lutein was determined by high performance liquid chromatography. **Results** The lutein had a good linear in the range of 0.2587–2.597 ng/mL with correlation of 0.9990. The RSD of the precision was less than 5% and the RSD of each spiked test was 2.9%. The average spiked recoveries were between 96.75% and 98.67%. **Conclusion** This method is simple, sensitivity, and accuracy, which is suitable for the determination of lutein in health food.

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

1 引 言

雀目在西方医学中叫做夜盲症^[1]。随着科学技术水平的日益进步, 人们发现眼球视网膜黄斑区域的主要色素-叶黄素的缺失是导致患夜盲症的主要原因^[2], 进而发现胡

萝卜、玉米、蛋黄和某些藻类中含有较多的叶黄素^[3], 近年来, 叶黄素在保健食品领域也受到广泛的关注^[4]。

叶黄素是一种含有 2 个不同紫罗酮环的天然黄体素^[5], 属于维生素 A 活性的类胡萝卜素类^[6], 其化学结构中含有多一个共轭双键, 极易被氧化失去生物活性^[7]。因此叶黄素常

基金项目: 2019 年陕西省重点产业链(群)项目(2019ZDLSF07-08)、食品安全检测质控样品制备关键技术研究与应用(2020SF-372)

Fund: Supported by 2019 Shaanxi Provincial Key Industrial Chain (Group) Projects (2019ZDLSF07-08), Research and Application of Key Techniques for Sample Preparation of Food Safety Testing Quality Control (2020SF-372)

*通讯作者: 李涛, 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, Chief Pharmacist, Shaanxi Institute for Food and Drug Control, No.21, Kejiwu Road, Gaoxin District, Xi'an 710065, China. E-mail: westyx@126.com

以叶黄素微囊粉或叶黄素酯的形式存在于食品及保健食品中^[8]。叶黄素微囊粉是通过微胶囊化技术对叶黄素单体进行包埋的微囊产品,可最大限度保持叶黄素的生物活性^[9]。叶黄素酯是叶黄素与脂肪酸(如棕榈酸、月桂酸等)作用生成的酯类衍生物,属于新资源食品^[10]。

综上所述,根据叶黄素极易被氧化失去生物活性^[11]以及保健食品中叶黄素形态存在的特殊性^[12],采用常规的样品前处理制备方法,无法完全的将保健食品中叶黄素进行提取,因此需建立一个有效的样品检测方法,使用 60 °C 水溶解后用 0.1%BHT 乙醇溶液作为提取液,采用高效液相色谱法测定保健食品中叶黄素的含量,既可有效地提取出叶黄素进行准确的检测,又可准确快速地测定其含量,同时通过测定精密度、重复性等方式考察该方法的可行性,以其为保健品中的叶黄素检测提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 样 品

来益牌叶黄素咀嚼片(样品 1)(450 mg/片,浙江医药股份有限公司);盛蓝牌越橘叶黄素片(样品 2)(0.45 g/片,浙江新维士生物科技有限公司);越橘叶黄素 β -胡萝卜素软胶囊(样品 3)(0.5 g/粒,汤臣倍健股份有限公司)。

2.1.2 标准品

叶黄素(纯度: 97.6%, 批号: 00012453-002602C06, 美国 ChromaDex 公司)。

2.1.3 实验试剂

无水乙醇($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)、甲醇(CH_3OH)、甲基叔丁基醚($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$)、二氯甲烷(CH_2Cl_2)(色谱纯,美国 Sigma-Aldrich 公司);二丁基羟基甲苯($\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$)(butylated hydroxytoluene, BHT)、乙醚($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$)、正己烷(C_6H_{14})、环己烷(C_6H_{14})、异丙醇($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$)、氢氧化钠(NaOH)、无水硫酸钠(Na_2SO_4)(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

2.1.4 设备与仪器

e2695-2998 型高效液相色谱仪、带二极管阵列检测器或紫外检测器(美国 Waters Alliance 公司);UV-2550 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司);BT25S 型电子天平(十万分之一,德国赛多利斯 BT 系列电子天平);AE-240 型电子天平(万分之一,瑞士梅特勒天平);MS 3B S25 型旋涡振荡器(德国 IKA 公司);CF16RN 型离心机(日本日立公司);移液器: 1 mL、200 μL (德国 Brand 公司);色谱柱: C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)(美国 Agela 公司);Synergy 型超纯水仪(美国密理博公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 试剂配制

0.1% BHT 乙醇溶液配制: 称取 1 g BHT, 用 1000 mL

乙醇溶解,混匀。

萃取试剂: 称取 1 g BHT, 以 200 mL 环己烷溶解, 加入 400 mL 乙醚和 400 mL 正己烷, 混匀。

氢氧化钠溶液配制: 称取 16.0 g 氢氧化钠, 加水溶解并稀释至 100 mL。

2.2.2 标准品储备溶液配制

精密称取 10.24 mg(精确至 0.01 mg)叶黄素, 以 0.1%BHT 乙醇溶液溶解并稀释至 20 mL 棕色容量瓶中, 摇匀, 该标准储备液充氮避光置于 -20 °C 或以下的冰箱中可保存 6 个月。

2.2.3 标准曲线溶液的制备

分别精密吸取上述对照品储备液 0.1、0.2、0.3、0.5、0.8、1.0 mL 分别置于 6 个 20 mL 棕色容量瓶中, 用 0.1% BHT 乙醇溶液稀释并定容至刻度, 摇匀。

2.2.4 标准品储备溶液的校正

取 1 mL 叶黄素储备液, 以乙醇定容至 25 mL 棕色容量瓶中, 以乙醇为空白, 在 445 nm 波长下测定吸光值, 按下式计算标准溶液浓度^[13]。

$$C_1 = \frac{A \times 10^4 \times 25}{E}$$

式中: C_1 —叶黄素储备液浓度, $\mu\text{g/mL}$;

A —叶黄素的紫外吸光值;

E —乙醇中叶黄素 1%比吸光系数(2550 dL/g);

25—稀释倍数;

10^4 —转换系数(g/dL 转化为 $\mu\text{g/mL}$)。

2.2.5 仪器条件的优化

(1)检测波长的优化

取叶黄素储备液通过紫外分光光度计进行全波长扫描, 确定最大吸收波长。

(2)流动相的优化

取 0.7791 $\mu\text{g/mL}$ 叶黄素标准溶液进样, 分别选用甲醇-甲基叔丁基醚、甲醇/水-甲基叔丁基醚、乙腈-水、甲醇-水作为流动相, 梯度和等度条件下对叶黄素进行分离。

(3)标准曲线绘制及检出限计算

在优化的仪器条件下, 根据样品含量需求配制的标准曲线进行检测, 计算线性回归方程及线性相关系数, 根据信噪比计算得出叶黄素检出限。

2.2.6 样品制备

按以下 4 种方法同时处理同批样品, 按照优化后的仪器条件测定叶黄素含量, 得出最优样品制备方法。

(1)方法 1

食品中叶黄素样品制备方法^[13]: 准确称取混合均匀的样品, 萃取, 避光提取, 浓缩混匀, 用中性氧化铝固相萃取小柱净化, 收集洗脱液, 减压浓缩至近干, 以 0.1% BHT 乙醇溶液溶解残渣并定容, 过 0.45 μm 滤膜, 供液相色谱测定^[13]。

(2)方法 2

食品添加剂叶黄素样品制备方法^[14]: 准确称取混合均匀的样品适量置于 50 mL 离心管中, 以流动相溶解, 离心, 取上清液, 按照适当的比例进行稀释, 过 0.45 μm 滤膜, 供液相色谱测定^[14]。

(3)方法 3

万寿菊及其制品中叶黄素样品制备方法^[15]: 准确称取混合均匀的样品, 加热回流水解。过滤, 萃取, 合并二氯甲烷相(下层), 加入无水硫酸钠干燥, 浓缩, 以二氯甲烷定容, 经 0.45 μm 滤膜(有机相)过滤, 待高效液相色谱测定^[15]。

(4)方法 4

水溶直提叶黄素样品制备方法: 取粉碎后混合均匀的试样, 准确称定, 加入 5 mL 60 ℃温水, 混匀, 在 60 ℃超声 5 min, 再加入 80 mL 0.1% BHT 乙醇溶液, 摇匀, 再超声 10 min, 放置室温后用 0.1% BHT 乙醇溶液稀释到相应倍数, 摇匀, 作为待测液。样品待测溶液过 0.45 μm 微孔滤膜, 待高效液相色谱测定^[16,17]。

2.2.7 精密度

取 0.7791μg/mL 叶黄素标准溶液, 按照优化后的仪器条件重复进样 6 次, 根据峰面积计算精密度。

2.2.8 重复性

按照优化后的制备方法及仪器条件, 同时制备 6 份来益牌叶黄素咀嚼片样品进行检测, 测定样品重复性。

2.2.9 回收率

取阴性样品加入标准储备液 0.5、2、5 mL, 按照最优制备方法制备样品及仪器条件, 测定, 计算回收率: 回收率(%) = (测得量 - 样品含量)÷对照品加入量×100%。

3 结果与分析

3.1 标准品储备溶液的校正结果

对照品标定方法的标准品储备液校正值见表 1。

表 1 标准品储备液校正值			
Table 1 Corrections of the reference storage solution			
名称	紫外吸光值	浓度/(μg/mL)	平均浓度/(μg/mL)
叶黄素	0.52988	51.949	51.94
	0.52975	51.936	

根据标准储备液校正结果对标准曲线的浓度进行计算, 得叶黄素标准曲线各点浓度分别为 0.2597、0.5194、0.7791、1.299、2.078、2.597 μg/mL。

3.2 仪器条件优化

通过叶黄素分离情况及保留时间可以看出, 甲醇-水作为流动相时能满足仪器检测条件。因甲基叔丁基醚易挥发, 有刺激性气味, 通常不被作为流动相的选择。根据实验结果, 确定仪器条件为: 色谱柱: C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm× 250 mm, 5 μm), 或性能相当者。流动相: 甲醇: 水(95:5, V/V)洗脱, 时间 18 min。流速: 1.0 mL/min。柱温: 30 ℃。检测波长: 445 nm; 进样量: 10 μL。叶黄素样品色谱图见图 1。

在选定色谱条件下, 以标准品的浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 以峰面积对浓度作线性回归, 得到线性回归方程 $Y=8.29\times10^4X-4.34\times10^3$, 线性相关系数(*r*)为 0.9990, 在 0.2597~2.597 μg/mL 范围内线性关系良好。以 3 倍信噪比除以标准曲线斜率的方法计算出叶黄素的检出限为 1.61 ng。

3.3 试样制备对叶黄素含量的影响

通过 4 种不同的样品前处理方法对所选 3 份实验样品进行检测, 各试样制备方法下各样品叶黄素含量测定如图 2 所示。

由图 2 可明显看出, 经过不同的试样制备方法所测得的叶黄素含量存在明显差异, 且趋势一致。

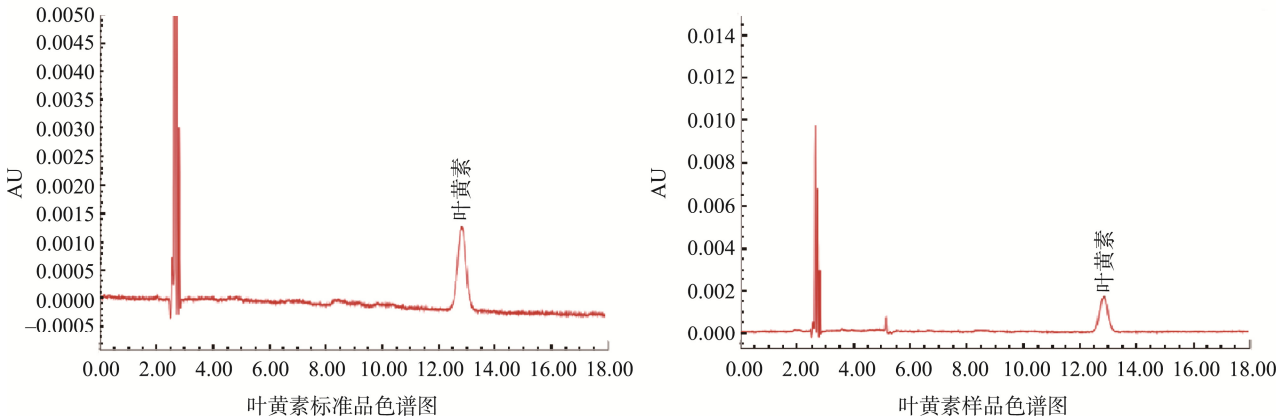


图 1 叶黄素样品色谱图

Fig.1 Chromatogram of reference resolution for lutein

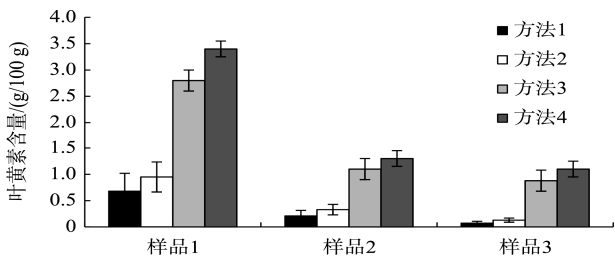


图2 不同方法处理样品中叶黄素含量测定值($n=3$)
Fig.2 Results of determination of lutein by different pre-treatment methods ($n=3$)

由于叶黄素本身化学性质不稳定,见光易分解,极易被氧化从而失去生物活性,因此为了提高产品质量,不同基质下的叶黄素生产加工工艺存在不同^[16],由此可得出结论:同一批样品在不同试样制备方法下叶黄素的提取率存在较大差异。其中样品经过方法1和方法2处理后所测得叶黄素含量极低,且存在较大的不稳定性,说明试样制备方法无法将保健食品中叶黄素完全提取出来,其原因在于常见的保健食品中的叶黄素通常是以微囊粉的形式进行生产加工^[9],大部分微囊粉是不易溶于有机相的,因此所测得的叶黄素含量极低且不平行。同时通过比较方法1与方法2可以看出,净化过程的有无,对叶黄素测得含量无明显影响,其原因在于常见的保健食品中的叶黄素大部分是以原料添加的形式进行生产加工,因此可省略净化相关步骤。数据显示方法3和方法4叶黄素检测值较高,可证明通过水解能将保健食品中的叶黄素有效的提取出来,但方法3试样制备方法过于复杂,系统性误差较大,同时考虑

到叶黄素极易被氧化失去生物活性^[11,12],用方法3处理保健食品可能会对叶黄素检测产生一定影响。综上所述,运用方法4可有效地将保健食品中叶黄素提取出来,处理方法简单易操作,损失率较低,提高了检测的准确性及效率,特别适用于常见保健食品中叶黄素含量的测定。

3.4 重复性实验

选择样品1平行称取6份,采用所选方法4进行样品前处理,测得叶黄素含量结果见表2。从表2中可以看出叶黄素的含量的RSD值为2.9%。表明,所选方法的重复性良好,满足方法要求。

表2 重复性实验结果
Table 2 Results of the repetitive testing

化合物	称样量	叶黄素测定值 (g/100 g)	均值	RSD/%
叶黄素	0.50617	3.390	3.40	2.9
	0.50265	3.485		
	0.50260	3.307		
	0.50412	3.309		
	0.50326	3.338		
	0.50214	3.541		

3.5 回收率实验

根据加入标准储备液含量进行计算,样品加标测定回收率结果见表3。可以看出所选方法回收率在96.57%~98.67%之间,回收率较好,符合检测标准要求。

表3 阴性样加标回收的测定
Table 3 Results of spiked recoveries for the negative samples

编号	称样量/g	测得量/(μg/mL)	稀释倍数	加入浓度/(μg/mL)	加入体积/mL	回收率/%
1	0.5011	0.1264	200	51.94	0.5	97.34
2	0.4998	0.1266				97.50
3	0.5012	0.1259				96.96
4	0.4999	0.1261				97.11
5	0.5031	0.1257				96.80
6	0.5022	0.1271				97.88
7	0.50123	0.5113	200	51.94	2.0	98.44
8	0.50145	0.5125				98.67
9	0.50214	0.5016				96.57
10	0.50350	0.5090				98.00
11	0.50149	0.5052				97.27
12	0.50143	0.5099				98.17
13	0.5023	1.259	200	51.94	5.0	96.96
14	0.5014	1.264				97.34
15	0.5033	1.266				97.50
16	0.5011	1.271				97.88
17	0.5025	1.254				96.57
18	0.5019	1.277				98.34

4 结 论

本研究建立了一种快速测定保健食品中叶黄素的高效液相色谱法,同时对样品前处理的提取溶剂和流动相进行优化,选用含 0.1% BHT 的甲醇溶液作为提取液,甲醇:水(95:5, *V/V*)作为流动相,用 C_{18} 柱在 445 nm 检测波长下等度分离。通过精密度、重复性、回收率等方法学进行考察。结果表明,该方法的精密度实验的相对标准偏差低于 5%,重复性实验的相对标准偏差为 2.9%,加标回收率为 96.57%~98.67%,说明该方法灵敏度好、准确性高,适用于常见保健食品中叶黄素的测定。

参考文献

- [1] 李经纬. 中医大词典—2 版[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
- Li JJ. Chinese medicine dictionary—version 2 [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004.
- [2] 余召辉, 赵宗仁, 李贺, 等. 叶黄素的药理作用[J]. 吉林医药学院学报, 2017, 38(1): 58–60.
- Yu ZH, Zhao ZR, Li H, *et al.* The pharmacological effects of lutein [J]. J Jilin Med Coll, 2017, 38(1): 58–60.
- [3] 王彦博, 石燕, 唐慧安. 叶黄素的提取、功效和应用研究进展[J]. 中国酿造, 2011, (7): 1–5.
- Wang YB, Shi Y, Tang HA. Research progress on extraction, efficacy and application of lutein [J]. Chin Brew, 2011, (7): 1–5.
- [4] 许秀兰, 赵国华, 阙建全, 等. 叶黄素研究进展[J]. 粮食与油脂, 2004, (10): 3–7.
- Xu XL, Zhao GH, Kan JQ, *et al.* Research progress of lutein [J]. Grain Fat, 2004, (10): 3–7.
- [5] Mora-Gutierrez A, Attai R, Nunez DE, *et al.* Complexes of lutein with bovine and caprine caseins and their impact on lutein chemical stability in emulsion systems: Effect of arabinogalactan [J]. J Dairy Sci, 2018, 101: 18–27.
- [6] Kijlstra A, Tian Y, Kelly ER, *et al.* Lutein: more than just a filter for blue light [J]. Prog Retin Eye Res, 2012, 31(4): 303–315.
- [7] Druessne-Pecollo N, Latino-Martel P, Norat T, *et al.* Beta-carotene supplementation and cancer risk: A systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials [J]. Int J Cancer, 2010, 127(1): 172–184.
- [8] 张莉华, 许新德, 陈少军, 等. 微胶囊叶黄素理化性质及其稳定性研究[J]. 中国食品添加剂, 2007, (1): 92–95.
- Zhang LH, Xu XD, Chen SJ, *et al.* Study on the physical and chemical properties and stability of microcapsule lutein [J]. Chin Food Addit, 2007, (1): 92–95.
- [9] 曾治平. 叶黄素的微胶囊制备及其稳定性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.
- Zeng ZP. Study on the preparation and stability of lutein microcapsules [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010.
- [10] 张慧, 张美荣, 朱宏达. 天然高纯度叶黄素酯的功能和应用[J]. 中国食品添加剂, 2008, (1): 246–248.
- Zhang H, Zhang MR, Zhu HD. Function and application of natural high-purity lutein ester [J]. Chin Food Addit, 2008, (1): 246–248.
- [11] Chen CY, Lu IC, Nagarajan D, *et al.* A highly efficient two-stage cultivation strategy for lutein production using heterotrophic culture of *Chlorella sorokiniana* MB-1–M12 [J]. Bioresource Technol, 2018, 253: 141–147.
- [12] Giordano E, Quadro L. Lutein, zeaxanthin and mammalian development: Metabolism, functions and implications for health [J]. Arch Biochem Biophys, 2018, 647: 33–40.
- [13] GB 5009.248—2016 食品中叶黄素的测定[S].
- GB 5009.248—2016 Determination of lutein in food [S].
- [14] GB 26405—2011 食品安全国家标准 食品添加剂 叶黄素[S].
- GB 26405—2011 National food safety standard—Food additive lutein [S].
- [15] NY/T 2008—2011 万寿菊及其制品中叶黄素的测定 高效液相色谱法[S].
- NY/T 2008—2011 Determination of lutein in marigold and its products by high performance liquid chromatography [S].
- [16] 张志军, 张飞, 付强, 等. 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, 169(3): 869–875.
- Zhang ZJ, Zhang F, Fu Q, *et al.* Determination of lutein in different types of food by high performance liquid chromatography [J]. J Guangxi Univ (Nat Sci Ed), 2019, 169(3): 869–875.
- [17] 石菲, 刘叶. 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, 276(9): 252–254.
- Shi F, Liu Y. Determination of lutein in infant milk powder by high performance liquid chromatography [J]. Food Ind, 2019, 276(9): 252–254.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



史朝烨, 硕士, 主要研究方向为食品及保健食品检测技术研究。
E-mail: 352319873@qq.com



李 涛, 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