

高效液相色谱法测定奶粉中玉米黄质含量

李欢鹏, 王 鸽, 马晓冲, 李兴佳*, 柴艳兵, 张耀广, 张洪鑫, 李 飞
(石家庄君乐宝乳业有限公司 农业农村部乳制品质量安全控制重点实验室, 石家庄 050021)

摘 要: **目的** 建立高效液相色谱法检测奶粉中玉米黄质含量的分析方法。**方法** 奶粉样品用蛋白酶在 45 °C 条件下振荡酶解 30 min, 正己烷:丙酮(9:1, V:V)重复提取 2 次, 旋转蒸发浓缩至近干, 正己烷:乙酸乙酯(65:35, V:V)复溶后, 用 Si 60 (100 mm×2.1 mm, 5 μm)色谱柱经高效液相色谱紫外检测器测定, 外标法定量。**结果** 玉米黄质在 14.018 min 附近出峰, 玉米黄质浓度在 0.0~4.0 μg/mL 范围内呈良好线性关系($r^2=0.99982$)。在添加玉米黄质含量为 63.3、126.7、316.7 μg/100 g 时, 加标回收率在 95.8%~96.7%之间, 相对标准偏差在 1.1%~3.9%之间, 检出限为 20 μg/100 g, 定量限为 50 μg/100 g。**结论** 该方法可以检测奶粉中玉米黄质的含量, 与其他前处理方法相比较简单, 且具有较高的准确度、稳定性和灵敏度, 对之后的检测应用具有重大意义。

关键词: 奶粉; 玉米黄质; 高效液相色谱法; 紫外检测器

Determination of zeaxanthin in milk powder by high performance liquid chromatography

LI Huan-Peng, WANG Ge, MA Xiao-Chong, LI Xing-Jia*, CHAI Yan-Bing,
ZHANG Yao-Guang, ZHANG Hong-Xin, LI Fei

(Key Laboratory of Dairy Quality and Safety Control, Ministry of Agriculture and Villages, Shijiazhuang Junlebao Dairy Group, Shijiazhuang 050021, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of zeaxanthin content in milk powder by high performance liquid chromatography. **Methods** The milk powder sample was enzymatically hydrolyzed with protease at 45 °C for 30 min, extracted 2 with *n*-hexane:acetone (9:1, V:V) repeatedly, concentrated by rotary evaporation, reconstituted with *n*-hexane:ethyl acetate (65:35, V:V), determined by high performance liquid chromatography ultraviolet detector using Si 60 (100 mm×2.1 mm, 5 μm) column, and quantitatively determined by external standard method. **Results** The zeaxanthin peaked around 14.018 min, and the zeaxanthin concentration had a good linear relationship in the range of 0.0–4.0 μg/mL ($r^2=0.99982$). When the content of zeaxanthin were 63.3, 126.7, 316.7 μg/100 g, the recoveries of standard addition were between 95.8% and 96.7%, and the relative standard deviations were between 1.1% and 3.9%. The limit of detection was 20 μg/100 g and the limit of quantification was 50 μg/100 g. **Conclusion** This method can detect the content of zeaxanthin in milk powder, is simpler than other pre-processing methods, and has higher accuracy, stability and sensitivity, and which is of great significance for subsequent detection applications.

KEY WORDS: milk powder; zeaxanthin; high performance liquid chromatography; ultraviolet detector

基金项目:“十三五”国家重点研发计划重点专项项目(2018YFC1604304)

Fund: Supported by the Key Projects of National Key Research and Development Projects in the 13th Five-Year Plan (2018YFC1604304)

*通信作者: 李兴佳, 硕士, 工程师, 主要研究方向为乳制品质量安全。E-mail: lixingjia@jlby.com

*Corresponding author: LI Xing-Jia, Master, Engineer, Junlebao Dairy Group, No.36, Shitong Road, Luquan District, Shijiazhuang 050021, China. E-mail: lixingjia@jlby.com

0 引言

玉米黄质(zeaxanthin)是一种重要的油溶性天然胡萝卜素,也是目前已知唯一存在于人视网膜和晶状体中的类胡萝卜素^[1],但人体无法自身合成,需从食物中摄取,它广泛存在于绿色叶类蔬菜、花卉、水果、枸杞和黄玉米中。在人体内,主要在眼、肝脏、肾脏、脾脏和卵巢等组织器官中集中分布^[2]。玉米黄质在体内作为强抗氧化剂,通过抗氧化行为如淬灭单线态氧、清除氧自由基等来有效预防机体的氧化损伤,从而对眼睛起到保护作用^[3-4]。婴幼儿的视网膜发育不健全,能阻隔和吸收蓝光的黄斑还在发育健全中,因此比成年人更容易受到蓝光的伤害。因此玉米黄质对婴幼儿视网膜的发育和成熟具有重要作用^[5-6]。此外大量研究表明,玉米黄质在预防心血管疾病^[7-8]、癌症^[9-10]、黄斑变性^[11-12]预防、减轻糖尿病及相关症状,以及降低白内障发生的可能性^[13-15]等方面起着重要的作用。现已成为国内外研究的热点之一。

但由于玉米黄质和叶黄素在结构上互为同分异构体,在化学式上仅有一个双键位置差异,且具有相似的极性和吸收波长,导致分离测定玉米黄质时,经常会被叶黄素所干扰。现有的检测技术主要有分光光度法^[16-19]、薄层色谱法^[20]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[21]等,均存在着操作过程复杂、灵敏度和准确度差等问题。因此本研究通过优化色谱条件、酶解条件及提取溶剂比例建立了一种 HPLC 快速检测方法,以期满足实验室检测需求,为实现叶黄素与玉米黄质的分离提供技术保障。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

玉米黄质标准品(含量大于 98%)、蛋白酶、二丁基羟甲基苯(dibutyl hydroxytoluene, BHT, 质谱级)(美国 Sigma 公司);正己烷(色谱纯,中国迪马科技公司);无水乙醇(色谱纯,天津福晨化学试剂有限公司);乙酸乙酯、丙酮、三氯甲烷(色谱纯,德国 Merck 公司);超纯水(18.0 MΩ·cm,美国 Millipore 公司)。

1.2 主要仪器及设备

1260 高效液相色谱仪-荧光检测器(美国 Agilent 公司);LYNX4000 高速落地离心机(美国赛默公司);Milli-Q ZMQS50001 超纯水机(美国 Millipore 公司);RE311 旋转蒸发仪(重庆雅马拓有限公司);DKZ-ZB 恒温水浴振荡器(上海一恒科技有限公司);ME203E/02 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);MS 3 B S025 旋涡振荡仪(海门其林贝尔有限公司);Si 60 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 5 μm, 美国 Sigma 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理

在 50 mL 聚丙烯离心管中称取约 2 g 混合均匀的奶粉试样,加入 10 mL 水溶解。再加入约 0.5 g 蛋白酶,混匀,于 45 °C 振荡酶解 30 min。冷却至室温后分别加入 10 mL 无水乙醇和 10 mL 正己烷:丙酮(9:1, V:V)提取溶液,涡旋混匀 1 min,放置于-20 °C 冷冻 30 min,取出后以 4500 r/min 离心 5 min。再加入 10 mL 正己烷:丙酮提取溶液重复提取 2 次,合并提取液,以 20 mL 水洗涤,4500 r/min 离心 3 min 分层,将有机相于室温减压浓缩至近干,以正己烷:乙酸乙酯(65:35, V:V)溶液涡旋振荡溶解残渣并定容至 5 mL,取上清液,过 0.45 μm 滤膜,供高效液相色谱仪测定,流程如图 1 所示。

1.3.2 标准溶液配制

(1)标准储备液(0.2 mg/mL):准确称取 1 mg(精确至 0.01 mg)玉米黄质,以 1 mL 三氯甲烷溶液溶解,并用正己烷:乙酸乙酯(65:35, V:V)溶液定容至 5 mL 棕色容量瓶中。

(2)标准中间液(200 μg/mL):准确吸取 1 mL 玉米黄质标准储备液(0.2 mg/mL)于棕色容量瓶中,用正己烷:乙酸乙酯(65:35, V:V)溶液定容至 10 mL 棕色容量瓶中。

(3)标准工作液:从玉米黄质标准中间液准确吸取 0、5、25、50、100、200 μL 溶液于进样小瓶中,用正己烷:乙酸乙酯(65:35, V:V)溶液定容至 1 mL,得到质量浓度为 0.0、0.1、0.5、1.0、2.0、4.0 μg/mL 的溶剂标准工作液。

1.3.3 色谱条件

色谱柱:Si 60 (100 mm×2.1 mm, 5 μm),柱温:35 °C,进样量:50 μL,流速:1.5 mL/min,流动相正己烷:乙酸乙酯=65:35 (V:V)(等度洗脱)。

2 结果与分析

2.1 色谱柱的选择

玉米黄质与叶黄素互为同分异构体,在反相色谱柱 C₈、C₁₈ 上很难分离,对于成分复杂的奶粉样品中实现玉米黄质的检测相对困难,因此本研究选取 Si 60 色谱柱进行分析,如图 2 所示。叶黄素在 12.471 min 处出峰,玉米黄质在 14.018 min 处出峰,分离度良好,能够实现玉米黄质与叶黄素的分离。因此,本实验选取 Si 60 柱作为色谱柱。

2.2 酶解条件的选择

奶粉基质复杂,玉米黄质容易被包裹在蛋白质等小分子中,因此有必要在前处理时加入蛋白酶酶解试样中的蛋白质,释放玉米黄质。为进一步明确玉米黄质提取过程中蛋白酶添加量及振荡酶解时间的影响,本研究对蛋白酶添加量(0.0、0.5、1.0、1.5 g)与振荡酶解时间(10、30、60、120 min)分别进行考察,每个样品进行 6 次重复,计算加标回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD),结果如表 1~2 所示。

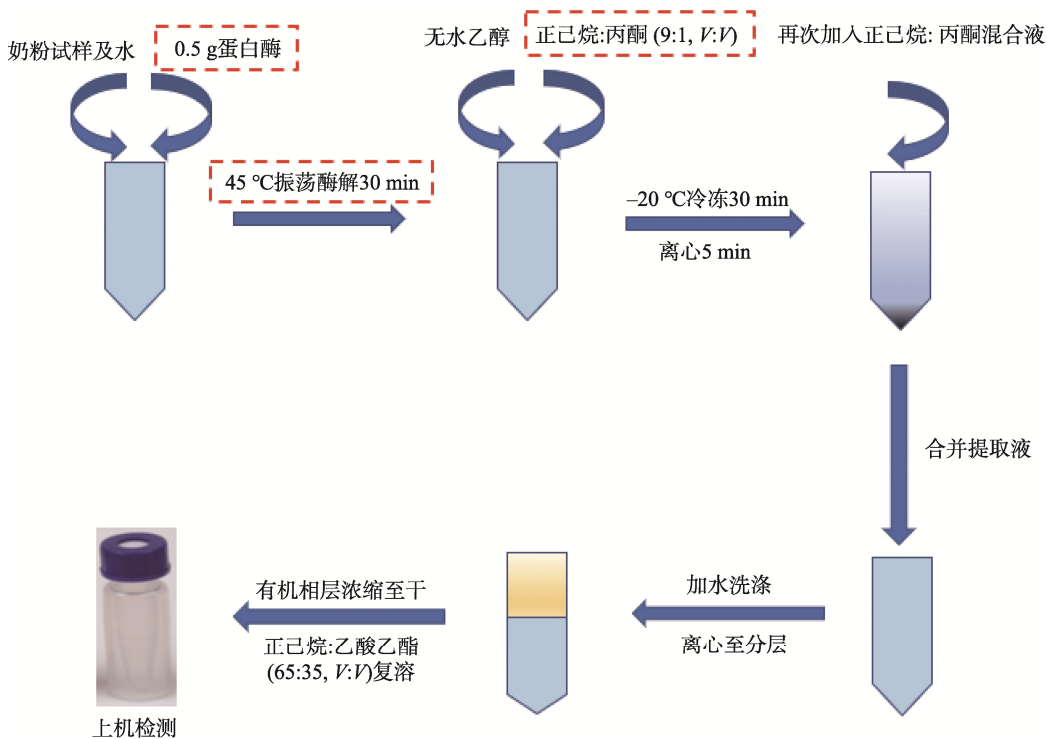


图 1 样品前处理过程
Fig.1 Samples preparation process

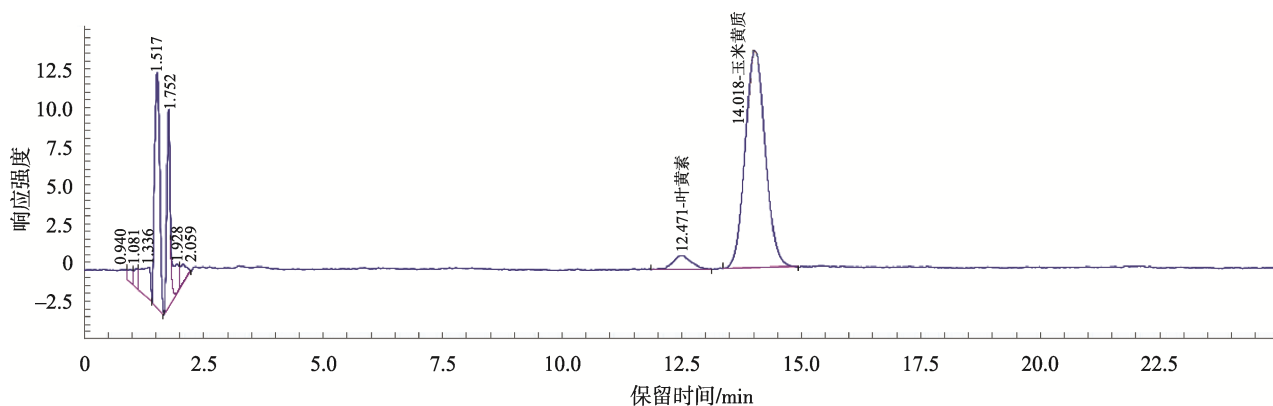


图 2 Si 60 色谱柱检测结果
Fig.2 Test results of Si 60 column

表 1 酶添加对提取效率的影响(n=6)
Table 1 Effects of enzyme addition on extraction efficiency (n=6)

酶添加/g	平均回收率/%	RSD/%
0.0	65.8	2.0
0.5	98.3	1.1
1.0	97.4	2.7
1.5	96.5	4.3

由表 1 可知, 前处理不添加蛋白酶时加标回收率较低, 为 65.8%, 而蛋白酶添加为 0.5 g 时加标回收率高达 98.3%, 因此前处理操作过程中应添加蛋白酶。蛋白酶添加为 0.5、

1.0 和 1.5 g 时加标回收率分别为 98.3%、97.4%、96.5%, 无明显差异, 因此本实验确定蛋白酶添加为 0.5 g。

表 2 酶解时间对提取效率的影响(n=6)
Table 2 Effects of enzymatic hydrolysis time on extraction efficiency (n=6)

酶解时间/min	平均回收率/%	RSD/%
10	78.2	2.7
30	98.3	2.2
60	85.7	4.8
120	45.3	4.4

由表2可知,随着酶解时间增长,玉米黄质的加标回收率逐渐增高,酶解30 min时加标回收率为98.3%达到最高。此后随着酶解时间增长,玉米黄质的加标回收率逐渐下降。因此,综合考虑选择酶解时间为30 min。

2.3 提取溶剂的选择

玉米黄质在丙酮和正己烷中可以被提取,因此本研究对2种提取溶剂的不同比例进行筛选,如表3所示。

从表3中可以看出不同比例的丙酮与正己烷作为提取溶剂时,玉米黄质的加标回收率不同。当丙酮与正己烷的比例为1:9(V:V)时,玉米黄质的平均回收率可达到97.5%,因此选择丙酮:正己烷=1:9(V:V)作为提取溶剂。

2.4 分离度

标准溶液(1.0 $\mu\text{g/mL}$)和奶粉加标样品经高效液相色谱

谱-荧光检测器分析得到的谱图见图3。从图3中可以看出玉米黄质物质峰与相邻峰有较好的分离度,容易辨识。

表3 提取溶剂比例的影响($n=6$)
Table 3 Effects of extraction solvent ratio ($n=6$)

丙酮:正己烷(V:V)	玉米黄质	
	平均回收率/%	RSD/%
1:9	97.5	3.4
3:7	94.3	1.6
5:5	77.4	4.7
7:3	67.2	4.3
9:1	72.3	2.6

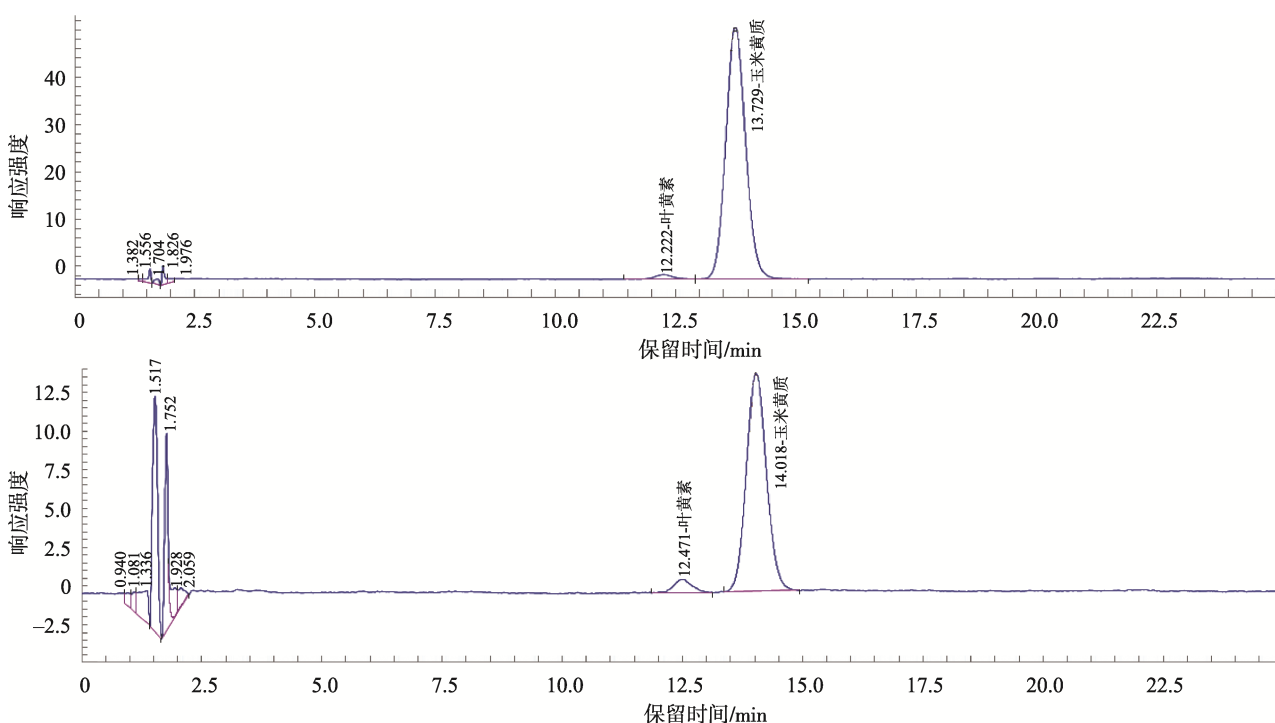


图3 标准溶液(1.0 $\mu\text{g/mL}$)和奶粉加标样品谱图

Fig.3 Chromatograms of standard solution (1.0 $\mu\text{g/mL}$) and milk powder spiked samples

2.5 线性关系

分别进样含玉米黄质0.0、0.1、0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列液各50 μL ,以峰值面积 Y 为纵坐标,玉米黄质浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标,绘制标准曲线。结果得到,玉米黄质的浓度在0.0~4.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内标准曲线线性关系良好,玉米黄质的标准曲线方程为 $Y=270.214X+7.8099$,相关系数为 $r^2=0.99982$,满足相关性均达到 $r^2 \geq 0.995$ 的要求。

2.6 检出限、定量限和回收率

在空白样品中加入玉米黄质标准溶液,观察色谱峰

信噪比(S/N)。 $S/N > 3$ 为方法检出限, $S/N > 10$ 为方法定量限。结果表明,当称样量为2.0 g,定容体积为5 mL时,玉米黄质的检出限为20 $\mu\text{g}/100\text{ g}$,定量限为50 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 。

选择不含玉米黄质的样品,分别添加63.3、126.7、316.7 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 3种不同浓度的加标量,每个浓度重复做6次,按照上述方法操作,计算加标回收率和RSD,考察该方法的精密度和准确度,结果如表4所示。

结果显示,样品中添加63.3、126.7、316.7 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 3个浓度时,玉米黄质加标回收率在95.8%~96.7%之间,相对标准偏差在1.1%~3.9%之间,满足GB/T 27417—2017

《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》中样品浓度在 1~100 mg/kg 时加标回收率在 90%~110%范围内要求。

表 4 奶粉样品中玉米黄质的平均回收率($n=6$)
Table 4 Average recoveries of zeaxanthin in milk powder samples ($n=6$)

添加浓度/($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	玉米黄质	
	平均回收率/%	RSD/%
63.3	96.7	1.1
126.7	96.1	1.6
316.7	95.8	3.9

3 结论与讨论

前期已有研究^[9]报道利用高效液相色谱法测定奶粉中玉米黄质含量, 样品经氢氧化钾溶液皂化, 以乙醚-正己烷-环己烷进行提取, C_{30} 色谱柱分离, 外标法定量, 方法检出限为 $30\ \mu\text{g}/100\text{ g}$, 定量限为 $100\ \mu\text{g}/100\text{ g}$ 。本研究是通过酶解的方法释放玉米黄质, 再利用丙酮:正己烷溶液提取, 紫外检测器进行测定, 外标法定量, 方法检出限为 $20\ \mu\text{g}/100\text{ g}$, 定量限为 $50\ \mu\text{g}/100\text{ g}$ 。与已报道的研究相比, 该方法前处理过程简单、易操作、灵敏度高、回收率好, 为奶粉中玉米黄质的检测提供了依据。

参考文献

- [1] KRINSKY NI, LANDRUM JT, BONE RA. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye [J]. *Annu Rev Nutr*, 2003, 23: 171–201.
- [2] 陈焱, 罗兰, 吴疆. 玉米黄质的生物学功能及其应用[J]. *食品研究与开发*, 2016, 37(16): 210–212.
CHEN Y, LUO L, WU J. The biological function and application of zeaxanthin [J]. *Food Res Dev*, 2016, 37(16): 210–212.
- [3] 杨程芳, 郑建仙. 玉米胚乳中玉米黄质的研究进展[J]. *粮食与饲料工业*, 2005, (7): 19–20.
YANG CF, ZHENG JX. Research progress of zeaxanthin in maize endosperm [J]. *Cere Feed Ind*, 2005, (7): 19–20.
- [4] DIETMAR EB, JÖRG S. Lutein and zeaxanthin in new dietary supplements analysis and quantification [J]. *Eur Food Res Technol*, 2005, 220(5-6): 648–652.
- [5] VISHWANATHAN R, KUCHAN MJ, SEN S, *et al*. Lutein and preterm infants with decreased concentrations of brain carotenoids [J]. *J Pediatr Gastr Nutr*, 2014, 59(5): 659–665.
- [6] VISHWANATHAN R, KUCHAN MJ, JOHNSON EJ. Lutein is the predominant carotenoid in infant brain [J]. *Pap Present*, 2011, (1): 29.
- [7] KARPPI J, LAUKKANEN JA, KUD S. Plasma lutein and zeaxanthin and the risk of age-related nuclear cataract among the elderly finnish

- population [J]. *Brit J Nutr*, 2012, 108(1): 148–154.
- [8] BEATTY S, NOLAN J, KAVANAGH H, *et al*. Macular pigment optical density and its relationship with serum and dietary levels of lutein and zeaxanthin [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 430(1): 70–76.
 - [9] 胡雪, 段国霞, 宫慧丽, 等. 高效液相色谱法测定奶粉中玉米黄质含量[J]. *乳业科学与技术*, 2020, 43(5): 22–25.
HU X, DUAN GX, GONG HL, *et al*. Determination of zeaxanthin in milk powder by HPLC [J]. *J Dairy Sci Technol*, 2020, 43(5): 22–25.
 - [10] 张嘉颖, 林鑫, 樊威, 等. 复合凝聚法制备枸杞玉米黄质纳米胶囊及其性质研究[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(24): 69–74, 86.
ZHANG JY, LIN X, FAN W, *et al*. Study on preparation and properties of lycium barbarum zeaxanthin nanocapsules by complex coagulation [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2020, 41(24): 69–74, 86.
 - [11] 冯贺, 苗馨心, 郑大浩, 等. 玉米黄质的保健机制与生物合成研究进展[J]. *延边大学农学报*, 2019, 41(4): 90–98.
FENG H, MIAO XX, ZHENG DH, *et al*. Research progress of zeaxanthin's health mechanism and biosynthesis [J]. *J Agric Sci Yanbian Univ*, 2019, 41(4): 90–98.
 - [12] 贾宏信, 王凤仙, 叶黄素, 玉米黄质与婴幼儿健康的研究进展[J]. *食品工业*, 2019, 40(9): 325–330.
JIA HX, WANG FX. Research progress of lutein, zeaxanthin and infant health [J]. *Food Ind*, 2019, 40(9): 325–330.
 - [13] 薄秀梅, 宋远见, 郝艳玲, 等. 玉米黄质预先灌胃对脂多糖诱导小鼠抑郁行为的改善作用及其机制[J]. *山东医药*, 2019, 59(9): 41–43.
BO XM, SONG YJ, HAO YL, *et al*. Effect of pre-gavage of zeaxanthin on the depressive behavior of mice induced by lipopolysaccharide and its mechanism [J]. *Shandong Med J*, 2019, 59(9): 41–43.
 - [14] 王慧, 赵江, 杨胜楠, 等. 玉米黄质延缓果蝇衰老作用的研究[J]. *营养学报*, 2018, 40(5): 506–508.
WANG H, ZHAO J, YANG SN, *et al*. Study on the effect of zeaxanthin on delaying senescence of drosophila [J]. *Acta Nutr Sin*, 2018, 40(5): 506–508.
 - [15] 任丹丹, 张海丽, 王惜童, 等. 叶黄素与玉米黄质协同抗氧化活性的研究[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(17): 296–299, 304.
REN DD, ZHANG HL, WANG XT, *et al*. Study on the synergistic antioxidant activity of lutein and zeaxanthin [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2017, 38(17): 296–299, 304.
 - [16] 刘云, 王保健, 林亲雄, 等. 油菜籽中天然类胡萝卜素的提取工艺研究[J]. *食品工业科技*, 2009, (2): 234–236.
LIU Y, WANG BJ, LIN QX, *et al*. Study on the extraction technology of natural carotenoids from rapeseed [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2009, (2): 234–236.
 - [17] 杨万政, 曹秀君, 李金淑, 等. 紫外分光光度法测定沙棘油中总类胡萝卜素方法改进[J]. *中央民族大学学报(自然科学版)*, 2009, 18(3): 5–8.
YANG WZ, CAO XJ, LI JS, *et al*. Improved method for determination of total carotenoids in seabuckthorn oil by ultraviolet spectrophotometry [J]. *J Minzu Univ Chin (Nat Sci Ed)*, 2009, 18(3): 5–8.
 - [18] 贺小贤, 刘昌蒙. 杏皮渣中类胡萝卜素的提取工艺研究[J]. *现代食品科技*, 2013, 29(3): 587–590.

- HE XX, LIU CM. Study on the extraction technology of carotenoids from apricot peel residue [J]. Mod Food Sci Technol, 2013, 29(3): 587-590.
- [19] 吴晓娟, 刘海燕, 顾继锐, 等. 小球藻优良藻种的选育与特性研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(3): 576-578.
- WU XJ, LIU HY, GU JR, *et al.* Study on the selection and characteristics of excellent algae species of *Chlorella* [J]. Mod Food Sci Technol, 2013, 29(3): 576-578.
- [20] 徐仲溪, 王坤波, 简伯华. 沱茶中叶绿素和类胡萝卜素组分的高效薄层色谱分析[J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(3): 384-387.
- XU ZX, WANG KB, JIAN BH. Analysis of chlorophyll and carotenoids in Tuocha by high performance thin layer chromatography [J]. J Yunnan Agric Univ, 2005, 20(3): 384-387.
- [21] 王喆, 郝瑞丽, 陈利青, 等. 2种高效液相色谱法测定小米中黄色素的比较[J]. 山西农业科学, 2019, 47(5): 761-765.
- WANG J, HAO RL, CHEN LQ, *et al.* Comparison of two high performance liquid chromatography methods for the determination of

yellow pigment in millet [J]. J Shanxi Agric Sci, 2019, 47(5): 761-765.

(责任编辑: 于梦娇 张晓寒)

作者简介



李欢鹏, 硕士, 工程师, 主要研究方向为乳品质量安全。

E-mail: 809763271@qq.com



李兴佳, 硕士, 工程师, 主要研究方向为乳品质量安全。

E-mail: lixingjia@jlby.com