



## 冷皂化-高效液相色谱法测定乳制品中 叶黄素的 5 种顺反式异构体

陈万勤 刘柱 郑国钢\* 茅佩卿 朱炳祺 丁宇琦 周赛静

(浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004)

**摘要** 建立了冷皂化-高效液相色谱法测定乳制品中叶黄素的 5 种顺反式异构体。将乳制品进行冷皂化处理后,经正己烷-石油醚-二氯甲烷(2:2:1, V/V)提取,使用 YMC C30 色谱柱分离,以甲醇和甲基叔丁基醚为流动相进行梯度洗脱,采用二极管阵列检测器于 445 nm 波长下检测,外标法定量;在 0.127 ~ 5.082 mg/L 范围内的线性关系良好,相关系数( $R^2$ )为 0.9999,回收率在 96.7% ~ 102.2% 之间,RSD 在 4.1% ~ 5.4% 之间( $n=6$ ),检出限为 0.010  $\mu\text{g/g}$ ( $S/N=3$ ),定量限为 0.030  $\mu\text{g/g}$ ( $S/N=10$ )。本方法简单、准确、灵敏度高,适用于乳制品中叶黄素 5 种异构体的检测。

**关键词** 高效液相色谱法; 叶黄素; 异构体; 乳制品

### 1 引言

叶黄素(Lutein),又名黄体素,是存在于蔬菜、花卉、水果与某些藻类生物中的天然类胡萝卜素。叶黄素具有良好的预防人体衰老、动脉硬化<sup>[1]</sup>、抗氧化、抗癌功效<sup>[2]</sup>以及独特的护眼功能<sup>[3,4]</sup>等,在保健品、化妆品和动禽类饲料等多个领域广泛应用。美国 FDA 于 1995 年批准了叶黄素作为食品补充剂用于食品中,我国 2007 年批准了叶黄素作为营养强化剂添加到婴幼儿或儿童配方食品中<sup>[5]</sup>。叶黄素分子结构中含多个共轭碳碳双键结构,由于烯键的存在,叶黄素可以存在多种几何异构体。叶黄素不同异构体在生物体内的生物活性也不同,其中全反式构象的生物活性较顺式构象要高很多<sup>[6,7]</sup>。目前市售的食品中很少有区分叶黄素不同异构体的含量。因此,建立高效的叶黄素顺反异构体的检测方法具有重要的意义。

目前叶黄素的检测方法主要以高效液相色谱法<sup>[8-10]</sup>和液质联用法<sup>[11,12]</sup>为主。由于叶黄素在光和热的作用下容易发生顺反异构化<sup>[13,14]</sup>,因此样品的所有处理过程需在较低温度和避光条件下进行,避免全反式叶黄素发生异构化。所以到目前为止,国际市场上也只有全反式叶黄素标准物质在售,尚未有叶黄素顺式异构体的标准物质,对顺式异构体进行定量仍然是一个难题。本研究采用全反式叶黄素作为标准物质,对 5 种叶黄素异构体进行定量分析,并且对样品的前处理方法进行了研究,采用冷皂化法进行样品的前处理,避免叶黄素在高温皂化时叶黄素发生异构化,采用液相色谱法结合 YMC C30 色谱柱对叶黄素异构体进行有效分离,准确定量。

### 2 实验部分

#### 2.1 仪器与试剂

Agilent1260 高效液相色谱仪,配二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司);紫外/可见分光光度计;乙腈、甲醇(色谱纯, Merck 公司);甲基叔丁基醚、石油醚、二氯甲烷、正己烷、乙醇、四氢呋喃(色谱纯, Tedia 公司);2,6-二叔丁基对甲苯酚(BHT,纯度 99.4%, Sigma-Aldrich 公司);KOH(纯度 >80%, Sigma-Aldrich 公司);实验用水为 Milli-Q 超纯水。全反式叶黄素标准品(纯度 99.8%, ChromaDex 公司)。

2014-10-20 收稿, 2014-12-17 接受  
\* E-mail: zgg0617@126.com

## 2.2 全反式叶黄素标准溶液的配制

准确称取 5.0 mg 全反式叶黄素标准品于 100.0 mL 容量瓶中,用含 0.003% BHT 的乙醇溶解并定容。该溶液可在 -40 °C 下完好保存 6 个月。准确吸取叶黄素标准储备液用含 0.003% BHT 乙醇配制标准系列溶液 I, II, III, IV 和 V。采用分光光度法<sup>[15]</sup>和高效液相色谱峰面积归一法校准标准系列溶液 I, II, III, IV, V 的浓度分别为 5.082, 2.033, 1.016, 0.254 和 0.127 mg/L。

## 2.3 色谱条件

液相色谱柱: YMC C30 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 3.5 μm, YMC 公司); 柱温: 25 °C; 进样量: 100 μL; 以甲醇(A)和甲基叔丁基醚(B)为流动相,梯度洗脱: 0.0~14.0 min, 85% A, 15% B; 14.0~15.0 min, 90% A, 10% B; 15.0~18.0 min, 10% A, 90% B; 18.0~22 min, 85% A, 15% B。流速 1.0 mL/min; 检测波长: 445 nm, 参考波长: 550 nm。

## 2.4 样品前处理

样品的前处理过程都要在避光或者在经对紫外光过滤的灯光下进行,以避免叶黄素发生异构化。称取粉末样品 2 g(精确到 0.001 g)或液态样品 10 g(精确到 0.001 g),置于 50.0 mL 离心管中,(粉末样品加入 10 mL 实验室用水,充分涡旋 2 min),加入四氢呋喃 5 mL,涡旋混匀,加入 5% KOH 甲醇溶液 10 mL,漩涡振荡 1 min,于摇床上室温振荡反应 30 min,反应结束后加入含 0.005% BHT 的石油醚-正己烷-二氯甲烷(2:2:1, V/V)提取液 10 mL,加盖漩涡混匀 60 s, 6000 r/min 离心 10 min,取上层有机相于玻璃试管中;再用 10 mL 提取液重复提取一次,合并有机相,有机相在 35 °C 下氮气吹干,用含 0.003% BHT 的乙醇溶液完全溶解,并定容至 5.0 mL,用 0.22 μm 有机滤膜过滤,供 HPLC 分析。

# 3 结果与讨论

## 3.1 方法定量原理

叶黄素属于类胡萝卜素,其分子式为  $C_{40}H_{56}O_2$ ,分子量为 568.9,热处理时,全反式叶黄素异构化成为顺式叶黄素异构体,其中最常见的是 13-顺式叶黄素、13'-顺式叶黄素和 9-顺式叶黄素、9'-顺式叶黄素,叶黄素也易被氧化及光诱导异构化,因此,实验过程必须与氧气和白光隔绝,并且所有操作在室温下进行,全反式叶黄素的结构如图 1 所示。

由于叶黄素容易发生异构化,难以获得顺式叶黄素标准物质。有报道采用全反式叶黄素制备顺式叶黄素标准物质的方法,方法虽然可行,但是不适用于检测机构日常检测工作。顺式叶黄素与反式叶黄素在 445 nm 的吸光系数存在着差异,在定量顺式叶黄素异构体,以反式叶黄素为标准,使用修正系数 0.7 以修正顺式和反式异构体吸收峰和消光系数之间的差异,因此本实验通过在 445 nm 下得到的顺式叶黄素峰面积与全反式叶黄素标准品的峰面积相比,从而实现全反式叶黄素的定量分析,也可以对 4 种顺式叶黄素和全反式叶黄素同时进行计算,最终计算总叶黄素含量。

## 3.2 色谱条件的优化与叶黄素异构体的定性

$C_{18}$  色谱柱和  $C_{30}$  色谱柱都可以用来检测类胡萝卜素,但是  $C_{18}$  色谱一般用于分析类胡萝卜素的总量,而  $C_{30}$  色谱柱具有良好的峰形和较长的保留时间等优越的性能,通常用于类胡萝卜素的顺反异构体的分离。

本研究参考了文献[16]的方法对全反式叶黄素进行异构化反应。将 1 mg 反式叶黄素用少量甲苯溶解后,加入 2 mg/L 碘-正己烷溶液,使碘的含量为叶黄素质量的 2%,将混合液放在 40 W 日光灯下光照 1 h,然后用 1 mol/L 硫代硫酸钠溶液洗涤 2 次,除去多余的碘,有机相在 30 °C 下氮气吹干后,用

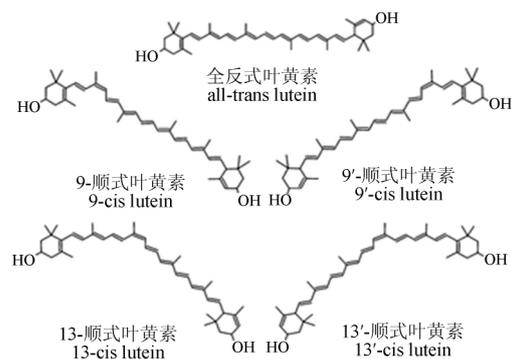


图1 叶黄素的构型异构体

Fig.1 Structures of 5 lutein stereoisomers

含 0.003% BHT 的乙醇溶液复溶,定容至 10.0 mL,得到顺式和反式叶黄素混合样品,用于叶黄素的定性分析。为了消除上一个色谱样品杂质对下一个色谱样品目标物的干扰,在目标物完全洗脱后,采用大比例的甲基叔丁基醚对色谱柱进行洗脱,保证可能存在杂质完全被洗脱出来后不干扰下一个样品的检测。在液相色谱系统中,对 5 种叶黄素异构体的紫外-可见光谱图进行全扫描,叶黄素 5 种异构体的紫外-可见光谱的吸收波长见表 1,9-顺式和 13-顺式结构与全反式结构的叶黄素的吸收波长相差约 4 nm,这是由于顺式结构叶黄素发生了紫移现象,与文献 [8] 报道一致。通过光谱对照并参照采用 YMC C30 色谱柱实现叶黄素 5 种顺反异构体完全分离的文献 [8,17,18],对叶黄素 5 种异构体进行定性分析。全反式叶黄素标准样品如图 2a 所示,经过异构化处理的叶黄素标准样品中叶黄素 5 种顺反异构体如图 2b 所示,各种叶黄素异构体的分离效果良好。由于叶黄素标准对照品在运输和转移过程中,不可避免会受光和热影响,全反式叶黄素会发生微量的异构化,因此采用面积归一化法得到全反式叶黄素的含量,从而消除了微量顺式叶黄素对计算结果的影响。

表 1 叶黄素 5 种异构体的紫外-可见光谱的吸收波长

Table 1 UV-Vis absorption wavelength of the 5 lutein stereoisomers

异构体 Stereoisomer	吸收波长 Absorption wavelength ( nm ) *
13-顺式叶黄素 13-cis lutein	330, 438, 463
13'-顺式叶黄素 13'-cis lutein	331, 439, 464
全反式叶黄素 All-trans lutein	332, 444, 472
9-顺式叶黄素 9-cis lutein	331, 439, 467
9'-顺式叶黄素 9'-cis lutein	328, 439, 468

\* : 采用液相色谱法(以甲基叔丁基醚/甲醇为流动相)二极管阵列检测器进行检测。

\* : Data was determined in the HPLC eluent ( methyl tert-butyl ether/methanol ) employing the photodiode array detector.

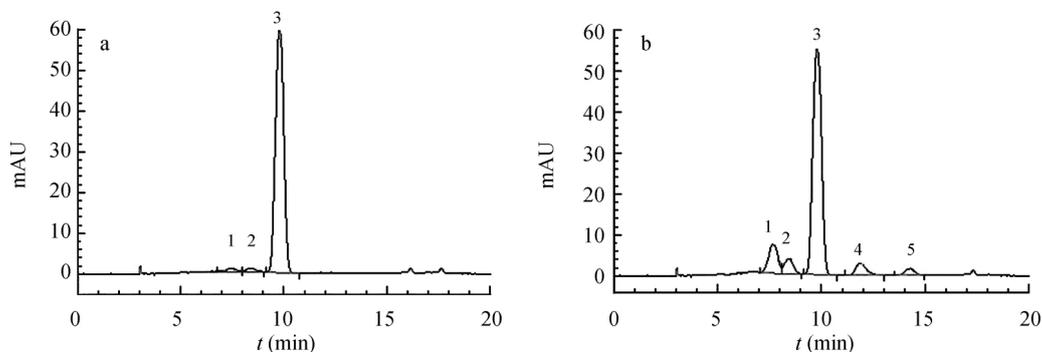


图 2 叶黄素 5 种顺反异构体的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of 5 lutein stereoisomers

(a) 全反式叶黄素标准品( All trans lutein standard ); (b) 异构化处理后的全反式叶黄素标准品( A after isomerization )。1. 13'-顺式叶黄素( 13'-cis lutein ); 2. 13-顺式叶黄素( 13-cis lutein ); 3. 全反式叶黄素( All-trans lutein ); 4. 9-顺式叶黄素( 9-cis lutein ); 5. 9'-顺式叶黄素( 9'-cis lutein )。

### 3.3 样品制备方法的优化

叶黄素对光和热都很敏感,操作过程要避免光且防止高温,因此实验在常温下对样品进行皂化,使用甲醇-KOH 溶液作为皂化液的皂化效果优于 KOH 水溶液,减少了水溶液的稀释作用,同时甲醇作为有机溶剂加入,有利于溶解叶黄素。为了防止提取过程中发生乳化,促进叶黄素的溶解,提高皂化效率,在皂化过程加入四氢呋喃。

使用石油醚、正己烷、二氯甲烷作为提取溶剂,发现 3 种试剂混合提取时效果较好;考察了不同比例的混合溶液的提取效率发现,当石油醚-正己烷-二氯甲烷( 2:2:1, V/V ) 时,提取效率高,并且提取溶剂在提取液上层,有利于提取操作,减少了样品基质的干扰作用。不同萃取溶剂的萃取效果见表 2。本研究采用石油醚-正己烷-二氯甲烷( 2:2:1, V/V ) 溶液作为提取液。

### 3.4 线性范围、检出限和定量限

对全反式叶黄素标准液进行检测,以仪器响应的峰面积  $A$  对全反式叶黄素的质量浓度  $C$  进行线性回归,在 0.127 ~ 5.082 mg/L 范围内的线性关系良好,回归方程为  $A = 1368.4C - 9.7$ ,相关系数(  $R^2$  ) 为

0.9999。在空白样品中添加叶黄素标准品,以  $S/N=3$  确定方法的检出限,以  $S/N=10$  确定方法的定量限,得到叶黄素的检出限为  $0.010 \mu\text{g/g}$ ,定量限为  $0.030 \mu\text{g/g}$ 。

### 3.5 回收率和精密度

对不含叶黄素乳粉样品进行全反式叶黄素回收率实验,添加水平分别为  $0.200$ ,  $0.500$  和  $1.000 \mu\text{g/g}$ ,采用优化后的前处理方法对样品进行处理,每个添加水平重复6次,平均回收率分别为  $97.5\%$ ,  $102.2\%$  和  $96.7\%$ ,RSD 分别为  $5.4\%$ ,  $4.3\%$  和  $4.1\%$ 。

### 3.6 实际样品测定

采用本方法对5批次标识含有叶黄素的乳粉进行检测,结果见表3。如1号样品的一个平行样品质量  $m$  为  $1.661 \text{ g}$ ,样品处理后定容体积  $V$  为  $5.0 \text{ mL}$ ,测得13-顺式、13'-顺式、9-顺式、9'-顺式和全反式叶黄素的峰面积,分别代入回归方程  $A=1368.4C-9.7$ ,得到5种叶黄素异构体的浓度为  $C_{13}$ ,  $C_{13'}$ ,  $C_9$ ,  $C_9'$  和  $C_{\text{trans}}$ 。将上述计算所得浓度代入以下公式计算:

$$C_{\text{Total}} = \frac{\left( C_{\text{trans}} + \frac{C_{13} + C_{13'} + C_9 + C_9'}{0.7} \right) \times V}{m} \quad (1)$$

式中,  $C_{\text{Total}}$  为产品中总叶黄素浓度 ( $\mu\text{g/g}$ ),  $0.7$  为采用全反式叶黄素校正顺式叶黄素时吸光系数修正值,  $m$  为样品质量,  $V$  为样品定容体积。

## 4 结 论

建立了乳制品中叶黄素5种顺反异构体的高效液相色谱法。采用冷皂化前处理,保证样品在皂化过程中叶黄素能保持原有的构型,使用 YMC C30 色谱柱对叶黄素5种顺反异构体进行了有效分离。4种顺式异构体依据反式叶黄素标准物质进行准确定量分析。方法简单快速,准确度和精密度高,适用于乳制品中叶黄素5种顺反异构体的定量检测。

## References

- Rao A V, Rao L G. *Pharmacol. Res.*, **2007**, *55*: 207-216
- Druesne-Pecollo N, Latino-Martel P, Norat T, Barrandon E, Bertrais S, Galan P, Hercberg S. *Int. J. Cancer*, **2010**, *127* (1): 172-184
- Beatty S, Boulton M, Henson D, Kob H H, Murray I J. *Br. J. Ophthalmol.*, **1999**, *83*: 867-877
- Berendschot T T, Goldbohm R A, Klöpping W A, van de-Kraats J, van Norel-J, van Norren-D. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2000**, *41*(11): 3322-3326
- Ministry of Health 2007 No. 8 Bulletin of the Ministry of Health of The People's Republic of China. [www.moh.gov.cn/business/htmlfiles/mohwsjdj/pggtg/200804/17170.htm](http://www.moh.gov.cn/business/htmlfiles/mohwsjdj/pggtg/200804/17170.htm)  
中华人民共和国卫生部公告 2007 年第 8 号公告
- Bohm V, Puspitasari-Nienaber N L, Ferruzzi M G, Schwartz S J. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*(1): 221-226
- Khachik F, Bernstein P S, Garland D L. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **1997**, *38*(9): 1802-1811

表2 不同比例提取溶剂对全反式叶黄素提取回收率的影响 ( $n=3$ )  
Table 2 Influence of solvent compositions on the recovery of all-trans lutein ( $n=3$ )

石油醚/正己烷/二氯甲烷 Petroleum ether/n-hexane/ dichloromethane( V/V)	添加量 Spiked ( $\mu\text{g/g}$ )	测得量 Found ( $\mu\text{g/g}$ )	回收率 Recovery (%)
1:0:0	0.500	0.421	84.2
0:1:0	0.500	0.405	81.0
0:0:1	0.500	0.487	97.4
1:1:1	0.500	0.438	87.6
2:1:1	0.500	0.468	93.6
1:2:1	0.500	0.455	91.0
1:1:2	0.500	0.488	97.6
2:2:1	0.500	0.497	99.4
2:1:2	0.500	0.493	98.6
1:2:2	0.500	0.499	99.8

表3 乳制品中叶黄素的含量 ( $n=3$ )

Table 3 Contents of all-trans lutein in dairy products ( $n=3$ )

序号 No.	叶黄素 Lutein ( $\mu\text{g/g}$ )					总量 Total
	13-顺式 13-cis	13'-顺式 13'-cis	9-顺式 9-cis	9'-顺式 9'-cis	全反式 All-trans	
1	0.287	0.248	0.170	0.193	1.868	2.765
2	0.268	0.183	0.310	0.268	1.806	2.834
3	0.301	0.202	0.123	0.127	1.555	2.309
4	0.315	0.212	-	-	1.828	2.355
5	0.194	0.124	-	-	1.362	1.680

- 8 Aman R , Biehl J , Carle R , Conrad J , Beifuss U , Schieber A. *Food Chem.* , **2005** , 92: 753–763
- 9 WANG Li-Na , HUANG Jun-Rong , ZHANG Li , FENG Feng , LING Yun , CHU Xiao-Gang , LI Hong-Liang. *Chinese Journal of Chromatography* , **2013** , 31: 1228–1231  
王丽娜,黄峻榕,张立,冯峰,凌云,储晓刚,李宏梁. 色谱, **2013** , 31( 12) : 1228–1231
- 10 Hsu B Y , Pu Y S , Stephen Inbaraj B , Chen B H. *J. Chromatogr. B* , **2012** , 899: 36–45
- 11 Dachtler M , Glaser T , Kohler K , Albert K. *Anal. Chem.* , **2001** , 73: 667–674
- 12 Elena M O , Dámaso H M. *Food Chem.* , **2012** , 135( 3) : 1344–1352
- 13 Marx M , Stuparic M , Schieber A , Carle R. *Food Chem.* , **2003** , 83: 609–617
- 14 Castenmiller J J M , West C E. *Annu. Rev. Nutr.* , **1998** , 18: 19–38
- 15 Craft N E. *J. Agric. Food Chem.* , **1992** , 40: 431–434
- 16 Emenhiser C , Englert G , Sander L C , Ludwig B , Schwartz S J. *J. Chromatogr. A* , **1996** , 719: 333–343
- 17 Emenhiser C , Sander L C , Schwartz S J. *J. Chromatogr. A* , **1995** , 707( 2) : 205–216
- 18 Hadden W L , Watkins R H , Levy L W , Regalado E , Rivadeneira D M , van Breemen R B , Schwartz S J. *J. Agric. Food Chem.* , **1999** , 47: 4189–4194

## Cold Saponification Method for Determination of 5 Lutein Stereoisomers in Dairy Products by High Performance Liquid Chromatography

CHEN Wan-Qin , LIU Zhu , ZHENG Guo-Gang\* , MAO Pei-Qing , ZHU Bing-Qi , DING Yu-Qi , ZHOU Sai-Jing  
( Zhejiang Institute for Food and Drug Control , Hangzhou 310004 , China)

**Abstract** A cold saponification method for determination of 5 lutein stereoisomers in dairy products by high performance liquid chromatography ( HPLC ) was developed. Samples were cold-saponified at room temperature and extracted by n-hexane/petroleum/dichloromethane ( 2 : 2 : 1 , V/V/V ). Then 5 lutein stereoisomers were separated on a YMC C30 column with gradient elution using methanol/methyl tert-butyl ether as the mobile phase , and data were acquired by a photodiode array detector at wavelength of 445 nm. The calibration curve was linear in the range of 0.127–5.082 mg/L with correlation coefficient of 0.9999 , and the recoveries were from 96.7% to 102.2% with the RSDs in the range of 4.1%–5.4% ( n=6 ). The limit of detection was 0.010 μg/g ( S/N=3 ) , and the limit of quantification was 0.030 μg/g ( S/N=10 ) . By presenting results of good accuracy , precision and sensitivity , this method validates its suitability for routine analysis of 5 lutein stereoisomers in dairy products.

**Keywords** High performance liquid chromatography; Lutein; Stereoisomers; Dairy products

( Received 20 October 2014; accepted 17 December 2014)