

【论著】

高效液相色谱法测定奶酪和人造黄油中胭脂树橙残留

陈毓芳, 王岚, 林海丹, 李为鹏, 邹志飞

(广东检验检疫技术中心食品实验室, 广州 510623)

[摘要] 目的: 应用高效液相色谱法测定奶酪和人造黄油中胭脂树橙(降红木素和红木素)残留。方法: 试样经冰醋酸+乙腈(3+7)溶液提取, 低温冷冻后高速离心, 过滤, 用高效液相色谱仪, C18柱, 流动相为乙腈+0.1甲酸溶液(92+8), 流速为1.0 ml/min, 紫外检测波长为460 nm。结果: 溶剂、降红木素、红木素可达到基线分离, 降红木素和红木素在0.05 mg/L~2.00 mg/L浓度范围内线性良好, 相关系数 r 均大于0.99。对奶酪、人造黄油样品分别进行浓度0.5 mg/kg、1 mg/kg、5 mg/kg的添加回收实验, 结果表明, 胭脂树橙的平均回收率在92.0%~108%之间, 相对标准偏差0.8%~9.9% ($n=6$)。方法的定量限为0.5 mg/kg。结论: 本法准确、可靠、简便, 检测限低, 适用于奶酪和人造黄油中降红木素和红木素的同时分析测定。

[关键词] 奶酪; 人造黄油; 胭脂树橙; 降红木素; 红木素; 高效液相色谱

[中图分类号] O657.7+2

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-8685(2011)04-0778-03

High performance liquid chromatography determination of annatto residues in cheese and margarine

CHEN Yu-fang, WANG Lan, LIN Hai-dan, LI Wei-peng, ZOU Zhi-fei

(Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center Food Testing Lab, Guangzhou 510623, China)

[Abstract] **Objective** A high performance liquid chromatography method was developed for determination of annatto (norbixin and bixin) residues in cheese and margarine. **Methods** Cheese or margarine was extracted with glacial acetic acid+acetonitrile (3+7), low temperature freeze, centrifugation and filter. Analysis was performed using HPLC systems equipped with a C18 column and a UV detector at 460 nm with a mobile phase of acetonitrile+0.1% formic acid solution (92+8), at a flow rate of 1.0 ml/min. **Results** The solvent, norbixin and bixin were separated each other. Good linearities were observed in the range of 0.05 mg/L~2.00 mg/L with correlation coefficients above 0.99. The average recoveries in cheese and margarine were in the range of 92.0%~108% at three spiked levels of 0.5 mg/kg, 1 mg/kg and 5 mg/kg and the relative standard deviations were in the range of 0.8%~9.9% ($n=6$). The limits of quantitative were 0.5 mg/kg. **Conclusion** The method has the advantages of simplicity and repeatability and sensitivity, and can be used for simultaneous analysis of norbixin and bixin in cheese and margarine.

[Key words] Cheese; Margarine; Annatto; Bixin; Norbixin; High performance liquid chromatography

胭脂树橙是从原产于中南美洲的胭脂树的种籽假种皮中提取的一种食用天然黄橙色素, 主要由红木素(bixin)和降红木素(norbixin)组成^[1]。胭脂树橙对乳蛋白有良好的亲和性, 适用于奶酪和奶酪品的着色。在中国^[2]、欧盟^[3]、美国等多个国家和地区, 胭脂树橙是一种被批准使用的乳制品着色剂。我国《食品添加剂使用卫生标准》GB 2760-2007规定, 在再制干酪中, 最大使用量为600 mg/kg。在人造黄油及其类似制品中, 最大使用量为50 mg/kg。我国虽规定了胭脂树橙的使用限量, 但并没相应的检测标准。建立奶酪和人造黄油中胭脂树橙检测方法对于乳制品的卫生安全管理, 以及进出口乳制

品质量把关重大意义。

目前检测食品中胭脂树橙的方法有分光光度法^[4, 5]、高效液相色谱法^[5-8]、薄层层析法^[9]。相比之下, 高效液相色谱法具有灵敏度高、准确、重现性好等优点。而用高效液相色谱法检测奶酪或乳制品中胭脂树橙检测方法仅有国外文献报道^[5, 6], 该两文献中提到用丙酮提取奶酪中胭脂树橙, 氨基柱净化, 该法操作繁琐, 基质影响很大, 回收率不理想。本工作拟结合国外研究的成果, 利用冰醋酸+乙腈(3+7)溶液萃取的样品中胭脂树橙, 该提取液能更好沉淀样液中蛋白质, 对脂肪溶解度也不高。同时采用冷冻除脂, 高速离心、过滤净化等前处理技术, 该检测奶酪和人造黄油中胭脂树橙的方法简单、快速、准确, 填补了国内相关检测方法的空白。

[基金项目] 广东省科技计划资助项目(2009B050700034); 中国检验检疫科学研究院资助项目(2009JK011)

[作者简介] 陈毓芳(1968-), 女, 学士, 高级工程师, 主要从事食品和化妆品检验工作。

1 材料与方法

1.1 仪器

Waters Acuity超高效液相色谱仪,配有 Waters Acuity二元溶剂管理器, Acuity样品管理器, Acuity PDA 检测器及 Empower 色谱工作站, (美国 waters 公司); Signa 3- 16PK 冷冻离心机, 德国 SIGMA; promax 2020 往复式振荡混匀器, 德国 Heidolph 公司; KA T25 均浆机, 德国 KA 公司; Mill-Q 超纯水器; 海尔 BCD- 539WT 冰箱。

1.2 试剂

美国 CHROMADE 公司标准品: 降红木素 (Norbixin CAS 号 542- 40- 5)、红木素 (Bixin CAS 号 6983- 79- 5); 以上标准品纯度均在 90% 以上。

1.2.1 胭脂树橙标准贮备液 (500 mg/L) 称 25 mg (精确到 0.1 mg) 红木素标准品于 50 ml 容量瓶中, 加氯仿溶解并定容至刻度。置于 4℃ 冰箱避光保存, 保存期三个月。称 25 mg (精确到 0.1 mg) 降红木素标准品于 50 ml 容量瓶中, 用 25 g/L KOH 溶液溶解并定容至刻度。置于 4℃ 冰箱避光保存, 保存期二周。

1.2.2 胭脂树橙混合标准溶液 (10 mg/L) 分别吸 250 μl 标准储备液至 25 ml 容量瓶中, 用冰醋酸 + 乙腈 (3+ 7) 溶液溶解并定容至刻度, 临用时现配。

1.2.3 冰醋酸 + 乙腈 (3+ 7) 溶液 将冰醋酸和乙腈以体积比 3: 7 混合。

1.2.4 甲醇、乙腈、氯仿 (色谱纯), 美国 TEDIA 公司; 冰醋酸 (优级纯), 甲酸、氢氧化钾 (分析纯), 均为广州分析试剂厂; Mill-Q 超纯水。

1.3 色谱条件

色谱柱: Agilent TC- C18 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 + 0.1% 甲酸水溶液 (92+ 8); 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 35℃; 进样量: 10 μl 检测波长: 460 nm。

1.4 样品处理

称取 2 g 样品, 于 50 ml 刻度离心管中, 加入冰醋酸 + 乙腈 (3+ 7) 溶液至约 9 ml 均质器上匀质提取 30 s 另取一离心管, 加入 10 ml 30% 冰醋酸乙腈溶液洗涤均质器刀头, 合并洗涤液至第一支离心管, 用冰醋酸 + 乙腈 (3+ 7) 溶液定容至 20 ml 在振水平荡器上振荡 20 min 放入 - 20℃ 冰箱中冷冻 90 min 取出, 在 0℃ 10000 r/min 离心 30 min 取出后上清液立即经 0.22 μm 滤膜过滤, 滤液供液相色谱测定。

2 结果与讨论

2.1 提取溶液的选择

食品中胭脂树橙残留量的检测, 国内外文献报道的提取溶剂有丙酮^[5, 6]和乙酸乙酯^[8]。实验比较了多种不同提取溶剂 (丙酮、乙酸乙酯、正己烷、冰醋酸 + 乙腈 (3+ 7) 溶液等) 的提取效率, 结果表明冰醋酸 + 乙腈 (3+ 7) 溶液提取效果最理想。最终采用冰醋酸 + 乙腈 (3+ 7) 溶液作为提取溶液。

2.2 净化条件的选择

文献^[5, 6]报导用丙酮提取, 减压浓缩的方法。实验表明由于丙酮提取出较多的脂肪及一些水分, 浓缩较难, 胭脂树橙稳定性较差, 浓缩时间长导致回收率下降, 文献报导采用氨基柱净化的方法, 回收率较不稳定, 特别是在加标含量较低时, 由于分离柱填料的吸附作用及样品基体不同的影响, 回收率很

不稳定; 文献^[8]报导, 采用碱性溶液提取的方法, 使油溶性红木素全部转化为水溶性降红木素后用高效液相色谱法测得的是降红木素总量, 不能分别测定降红木素、红木素的含量。经方法试验表明, 本方法操作简单, 回收率理想, 重现性好, 且能分别测定各组分的含量, 本研究最终采用方法为样品用冰醋酸 + 乙腈 (3+ 7) 溶液提取, 冰醋酸 + 乙腈 (3+ 7) 溶液对蛋白质和脂肪有较好的沉淀作用, 可大大减少提取液中的脂肪和蛋白质, 而溶出的少量脂溶性物质, 经冷冻后并在冷冻条件高速离心, 使溶于提取液的蛋白质和脂肪析出, 离心过滤除去。由于胭脂树橙的最大吸收波长是 460 nm, 样液在此吸收波长下的干扰物质少, 实验表明采用本方法沉淀蛋白质冷冻高速离心脱脂后样液已满足净化效果, 而且回收率理想, 重现性好。

2.3 色谱条件的优化

采用乙腈 + 0.1% 甲酸溶液。选用 Agilent TC- C18 色谱柱, 流速为 1.0 ml/min, 胭脂树橙在流动相比例为 92: 8 时, 两种组分在 6 min 内达到基线分离, 分离度 $R > 2.0$ 峰纯度好并且峰形对称。因此选用该系统为最佳流动相体系。胭脂树橙标准色谱图见图 1。

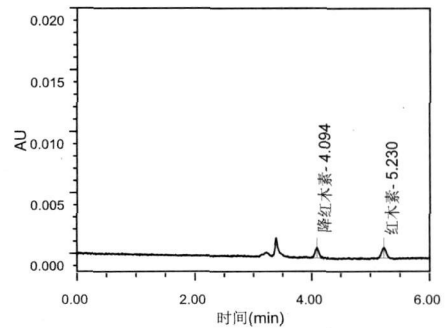


图 1 降红木素和红木素的标准品液相色谱图 (0.05 mg/L)

2.4 标准曲线

胭脂树橙混合标准溶液 (10 mg/L) 用冰醋酸 + 乙腈 (3+ 7) 溶液配制含 2 种胭脂树橙标准 0.05 mg/L、0.10 mg/L、0.20 mg/L、0.50 mg/L、1.00 mg/L、2.00 mg/L 浓度系列的混合标准工作溶液, 现配现用。在设定的色谱条件下, 分别取 10 μl 进行液相色谱测定, 根据保留时间以各色谱峰的峰面积与其对应的胭脂树橙浓度 (mg/L) 作图, 绘制标准标准曲线。标准曲线的线性范围, 回归方程, 相关系数见表 1。

表 1 回归方程和相关系数

名称	线性范围 (mg/L)	回归方程	相关系数
降红木素	0.05 ~ 2.00	$A = 8.24 \times 10^4 C - 1.52 \times 10^3$	0.9998
红木素	0.05 ~ 2.00	$A = 1.21 \times 10^5 C - 6.36 \times 10^3$	0.9993

2.5 回收率和精密度试验

分别用未检出过降红木素 (norbixin)、红木素 (bixin) 的奶酪、人造黄油为研究对象, 称取 2.0 g 样品, 分别加入 1.00 μg、2.00 μg、10.0 μg 降红木素和红木素, 按样品处理方法处理, 每个添加量做 6 个重复样品, 测定添加回收率。回收率和精密度结果见表 2。各样品空白和添加定量限水平的液相色谱图见图 2~ 图 5。

表 2 样品加标回收率和精密度试验结果 ($n=6$)

样品名称	添加浓度 (mg/kg)		平均回收率 (%)		RSD (%)	
	降红木素	红木素	降红木素	红木素	降红木素	红木素
奶酪	0.50	0.50	97.9	103	3.43	7.97
	1.00	1.00	92.0	99.7	4.54	5.15
	5.00	5.00	93.3	99.6	1.12	0.80
人造黄油	0.50	0.50	98.2	102	9.30	8.50
	1.00	1.00	102	108	9.91	7.23
	5.00	5.00	95.4	104	5.16	2.70

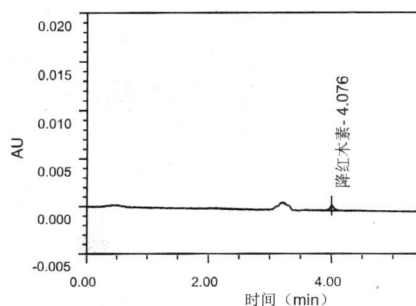


图 6 阳性奶酪样品图

2.6 测定下限

以 10 倍以上信噪比估算测定奶酪、人造黄油中降红木素、红木素含量的测定下限,均为 0.5 mg/kg

2.7 实际样品检测

在本实验设定的检测步骤和仪器条件下,对当前日常送检的奶酪及人造黄油样品 (23 例) 进行降红木素、红木素的残留量检测,测出两例切达干酪含有降红木素残留,分别为 0.62 mg/kg 和 1.50 mg/kg。1 例再制切达干酪含有红木素残留,为 6.64 mg/kg。其中一例样品的色谱图如图 6 所示。结果表明,本方法适用于奶酪、人造黄油中降红木素、红木素残留的检测。

[参考文献]

- [1] 陈建白,何美莹,李国华,等.胭脂树橙与降胭脂树橙理化性质比较[J].热带农业科技,2007,30(4):26-28
- [2] GB 2760-2007. 食品添加剂使用卫生标准[S]. 中国:中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会,2007:95-98
- [3] Commission directive 95/45/EC laying down specific purity criteria concerning colours used in food-stuffs[S]. The European Communities, 1995, 226-1
- [4] DIN 10482-1-2005 Determination of annatto content in cheese-part 1: Photometric method[S].
- [5] Bareth A, Strohmar W, Kitzemann E. HPLC and spectrophotometric determination of annatto in cheese[J]. Eur Food Res Technol 2002; 215(4): 359-364
- [6] DIN 10482-2-2006 Determination of the annatto content of cheese-part 2: High performance liquid chromatography method[S].
- [7] Noppe H, Abuin-Martinez S, Verheyden K, et al. Determination of bixin and norbixin in meat using liquid chromatography and photodiode array detection[J]. Food Additives & Contaminants 2009; 26(1): 17-24
- [8] A de Oliveira Rios AZ Mercadante. Novel method for the determination of added annatto colour in extruded corn snack products[J]. Food Additives & Contaminants Part A, 2004, 21(2): 125-133
- [9] Wegdan M, Lotfi Rasmia A, Hassan Wafaa A, Tawfik. Determination of natural colours by thin layer chromatography[J]. Journal of Applied Science Research, 2008; 4(12): 2013-2017

(收稿日期: 2011-01-12)

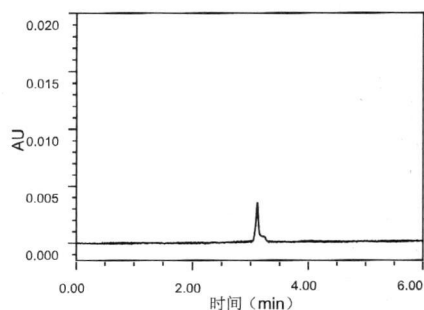


图 2 奶酪空白液相色谱图

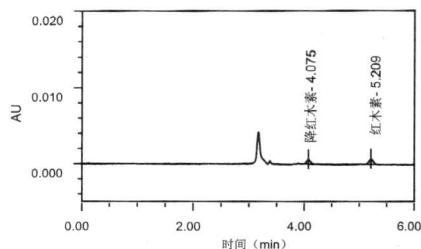


图 3 奶酪加标液相色谱图 (0.50 mg/kg)

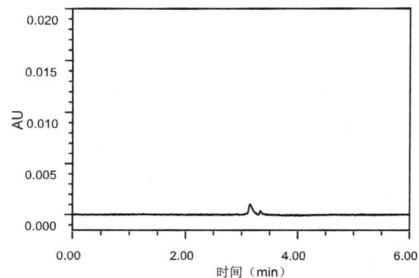


图 4 人造黄油空白液相色谱图

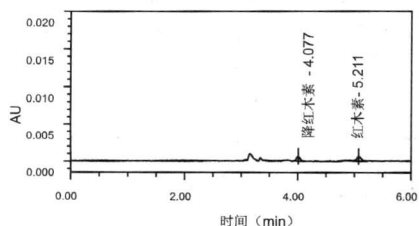


图 5 人造黄油加标液相色谱图 (0.50 mg/kg)