

高效液相色谱法测定食品中的栀子黄的研究

丁 艳¹, 孙益民^{1,2,*}, 马芝森¹, 王 玉¹, 袁顺香¹, 沈伟丽²

(1. 安徽师范大学化学与材料科学学院, 安徽 芜湖 241000

2. 安徽省功能性分子固体实验室, 安徽 芜湖 241000)

摘 要: 对国家标准(GB/T5009.149-2003)中的高效液相色谱测定食品中栀子黄进行了研究, 通过不同溶液中栀子黄色素含量的分析, 用吸光度法作对照。结果表明: 国标中以栀子苷为对照品, 用高效液相色谱法测定食品中的栀子黄色素不够合理。为建立成熟的定性、定量栀子黄色素的方法奠定了基础。

关键词: 高效液相色谱; 栀子黄色素; 分光光度; 检验方法

Study on Determination of Gardenia Yellow Pigment by High Performance Liquid Chromatography by GB Standard

DING Yan¹, SUN Yi-min^{1,2,*}, MA Zhi-sen¹, WANG Yu¹, YAN Shun-xiang¹, SHEN Wei-li²

(1. College of Chemistry and Materials Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China

2. Anhui Laboratory of Functional Molecular Solids, Wuhu 241000, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography was used for the determination of gardenia yellow pigment according to the standard (GB/T5009.149-2003) was studied. The contents of gardenia yellow pigment were analyzed and compared by spectrophotometry. The results showed that it was not reasonable to assay the gardenia yellow pigment with the standard control in food by high performance liquid chromatography. All these other works could establish a foundation for a better qualitative and quantitative analysis method of gardenia yellow pigment.

Key words high performance liquid chromatography (HPLC); gardenia yellow pigment; spectrophotometry; examination method

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0199-04

栀子黄色素属于自然界罕见的水溶性类胡萝卜素天然色素, 无毒、安全性好, 着色力强, 具有一定营养价值 and 保健作用, 广泛用于糕点、饮料、冰淇淋、酒等食品着色。在世界市场上, 尤其美、日等国家颇受欢迎^[1]。栀子黄是一个混合物, 主要成分是类胡萝卜素类的藏花素(Crocin)和藏花酸(Crocetin)^[2]。易溶于水, 难溶于无水乙醇、乙醚等有机溶剂。pH 值变化几乎对色调无影响, 在碱性和中性条件下, 对光、热、金属离子稳定性好, 但 pH 小于 4 时热稳定性较差^[3]。目前我国栀子黄色素存在杂质含量高, 色价低, 因常含有栀子苷而产生绿变现象。日本常把 OD 值比率(即栀子黄色素中栀子苷的最大吸光度与藏花素和藏花酸的最大吸光度的比值)控制在 0.4 以下, 可避免绿变的发生^[1]。

我国国家标准(GB/T5009.149-2003)中提到栀子苷是栀子黄的主要成分, 并以栀子苷作对照品, 用高效液相色谱法测定食品中的栀子黄含量^[4]。本文通过国标法, 对栀子黄加标前后的色素含量进行对照试验, 同时对栀子苷和去苷栀子黄的色素含量进行分析, 并以分光光度法作对比。结果表明国标中以栀子苷为对照品, 用高效液相色谱法测定食品中的栀子黄色素缺乏合理性, 与国际市场的要求不符。栀子苷为白色柱状结晶, 其水溶液为无色, 本身不赋予栀子黄素以任何颜色, 因此国标中所述栀子苷是栀子黄的主要成分有些不妥。藏红花素、藏红花酸为鲜艳的黄色, 它应是赋予栀子黄色素以黄色的有效成分。建议用藏红花素作对照来定性、定量栀子黄色素(为本研究的另一部分)。本文为建立成

收稿日期: 2005-04-11

*通讯作者

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金重点项目(2005KJ016ZD); 芜湖市生物药业产业科技创新基金项目

作者简介: 丁艳(1974-), 女, 硕士研究生, 主要从事天然产物开发与研究。

熟的定性、定量栀子黄素的方法奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器

Agilent1100高效液相色谱仪及色谱工作站 安捷伦公司; Agilent8453 紫外-可见分光光度计 安捷伦公司; AS3120A 超声波清洗器 Automatic Science Instrument Co., Ltd. RE52-2 旋转蒸发器 上海沪西分析仪器厂; 数显恒温水浴锅 HH-4 国华电器有限公司; SZ-2 自动双重纯水蒸馏器 上海沪西分析仪器厂。

1.1.2 药品和试剂

栀子苷对照品 中国药品生物制品检定所; 甲醇 HPLC 专用试剂; 正丁醇、乙醇均为分析纯; AB-8 大孔树脂 南开大学化工厂; 栀子黄色素(440nm $E_{1\%}^{1cm} \geq 400$) 亳州亚强天然产物制品厂; 市售饮料(含栀子黄)。

1.2 方法

1.2.1 栀子苷标准溶液制备

准确称取 2.80mg 栀子苷标准品, 用甲醇溶解并用甲醇稀释至 100ml 混匀。即得 28.0 $\mu\text{g/ml}$ 栀子苷标准溶液。分别吸取栀子苷标准溶液 0、2.0、4.0、6.0、8.0ml 于 10ml 容量瓶中, 加甲醇定容至 10ml, 即得 0、5.6、11.2、16.8、22.4 $\mu\text{g/ml}$ 的栀子苷标准系列溶液。

1.2.2 供试品溶液制备

1.2.2.1 栀子黄溶液的制备

称取 8.00g 含栀子黄的饮料, 用水稀释至 100ml 容量瓶中, 温热, 超声脱气 30min, 摇匀后, 通过微孔滤膜 0.4 μm 过滤, 所得即为栀子黄溶液。

1.2.2.2 加标栀子黄溶液制备

向 1.2.2.1 中栀子黄溶液加入少许栀子苷标准品, 制得加标栀子黄溶液。

1.2.2.3 去除栀子苷的栀子黄溶液制备

将栀子黄粉末溶于水, 以正丁醇萃取三次, 合并正丁醇萃取液, 在水浴上减压浓缩至干, 得黄色物质, 再经大孔树脂柱层析, 用乙醇梯度洗脱^[5]。纯化后的栀子黄溶液经 HPLC 检测(检测波长 240nm), 无栀子苷成分。

1.2.3 色谱条件

HyperClone ODS C_{18} 色谱柱(250 \times 4.60mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(体积比为 35:65), 流速 0.8ml/min, 检测波长 240nm, 进样量 20 μl 。

1.2.4 样品测定

1.2.4.1 国标法对加标前后色素含量测定的对比实验

按照国标方法, 在实验条件下分别注入 20 μl 1.2.2.

1 和 1.2.2.2 供试品溶液, 进行 HPLC 分析, 取其峰与标准比较, 测得试样中栀子苷含量。结果按下式计算

$$X = \frac{A \times V}{m \times 1000}$$

式中 X — 试样中栀子黄色素的含量(g/kg);

A — 进样液中栀子苷的含量 ($\mu\text{g/ml}$);

V — 试样制备液体积(ml);

m — 试样质量 (g)。

1.2.4.2 分光光度法对加标前后色素含量测定的对比实验

由于天然色素存在大量非色素成分, 多数不能用一般测定物质含量的方法来表示其含量。国外大都用色价法, 我国食品添加剂标准化委员会规定使用吸光度来表示色素含量^[6]。本研究亦采用此方法来表示栀子黄色素的含量。具体做法是: 将 1.2.2.1 和 1.2.2.2 制得的溶液, 用 1cm 比色皿, 紫外可见分光光度计, 200~800nm 范围内进行扫描, 测其吸收光谱图, 确定最大吸收波长及其吸光度 A_{max} 。

1.2.4.3 国标法测定栀子苷标准溶液和去苷栀子黄溶液中色素含量

称取 2.0mg 栀子苷标准品, 按照 1.2.1 中方法制备栀子苷标准溶液。再用 1.2.4.1 中方法测定此栀子苷标准溶液和去苷栀子黄溶液中色素含量。

1.2.4.4 分光光度法测定栀子苷标准溶液和去苷栀子黄溶液中色素含量

按照 1.2.4.2 中方法测定栀子苷标准溶液和栀子黄对照液中色素含量。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线的考察

在本实验条件下, 分别注入栀子苷标准液 20 μl , 进行 HPLC 分析, 以栀子苷标液浓度为横坐标, 峰高为

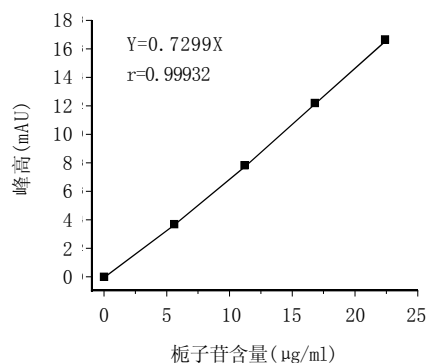


图1 栀子苷标准曲线

Fig.1 Geniposide standard curve

纵坐标, 绘制标准曲线。见图 1, 得回归方程为 $Y=0.7299X$, 相关系数 $r=0.99932$ 。

2.2 样品加苷前后栀子黄色素含量分析

按照国标方法经 HPLC 分析, 测定未加苷样品中栀子黄含量为 0.2889g/kg , 加苷后样品中栀子黄含量为 2.068g/kg 。见图 2, 由此可得样品加苷后测得栀子黄含量明显高于未添加的。

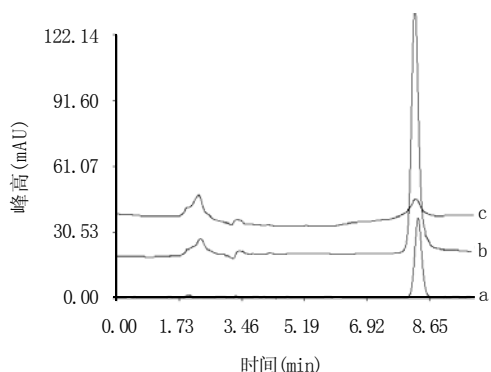


图 2 栀子苷标准品(a)、加苷后栀子黄(b)和未加苷栀子黄(c)的 HPLC 色谱图

Fig.2 Chromatogram of geniposide standard (a), add geniposide to pigment (b) and pigment (c)

分光光度法测得栀子黄样品在可见光范围内最大吸收波长为 443nm , 且加苷前后的 A_{\max} 都为 0.6536 , 见图 3, 由图可知加苷后, 只是在波长为 238nm 处, 紫外部分吸收明显增强, 对可见光部分无影响。即加苷前后样品中栀子黄色素含量不变。

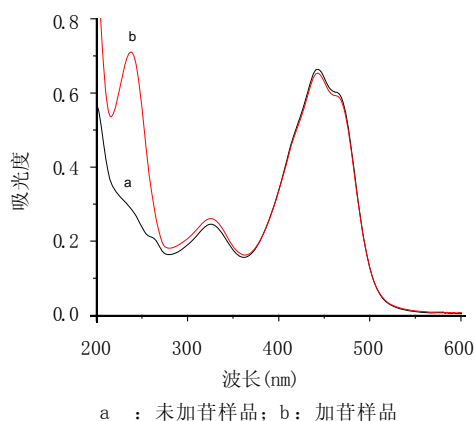


图 3 栀子黄溶液紫外-可见吸收光谱

Fig.3 Ultraviolet-visible spectrum of gardenia yellow pigment solution

经高效液相色谱法和分光光度法作对照, 结果前后矛盾。由于栀子苷在可见光部分无吸收, 水溶液为无色, 添加后不能赋予栀子黄颜色, 而 HPLC 测定加苷后样品中色素含量明显升高, 与事实不符。

2.3 栀子苷标准溶液色素含量分析

采用国标法经 HPLC 分析, 计算可得栀子苷标液中栀子黄含量为 20.08mg/kg , 这显然与事实不符。吸光度法测定此溶液在可见光范围内吸光度为 0, 溶液为无色, 即栀子苷标液不含色素, 见图 4。经比较分析说明国标法结论不正确。

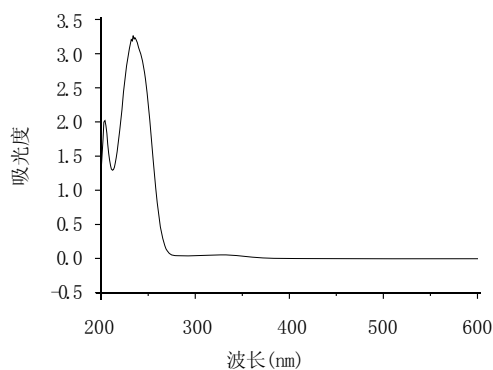


图 4 栀子苷标准溶液紫外-可见吸收光谱

Fig.4 Ultraviolet-visible spectrum of geniposide standard solution

2.4 去苷栀子黄溶液色素含量分析

去苷栀子黄溶液为黄色, 最大吸收波长为 438nm , A_{\max} 为 0.535 见图 5, 而国标法测定色素含量为 0, 由此可知国标法不够合理。

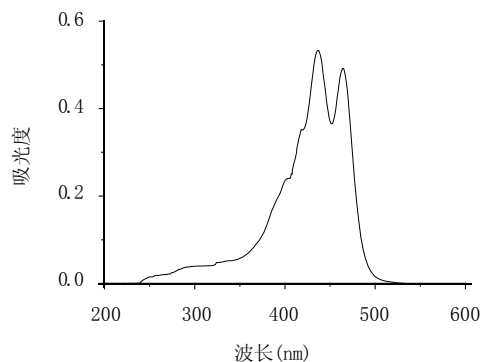


图 5 去苷栀子黄溶液紫外-可见吸收光谱

Fig.5 Ultraviolet-visible spectrum of gardenia yellow pigment solution removed geniposide

3 结 论

由于栀子黄为橙黄色, 而栀子苷为白色柱状结晶, 其水溶液为无色, 本身不赋予栀子黄色素以任何颜色, 因此国标中所述栀子苷是栀子黄的主要成分有些不妥。藏红花素、藏红花酸为鲜艳的黄色, 它应是赋予栀子黄色素以黄色的有效成分。通过实验分析, 结果表明, 国标(GB/T5009.149-2003)中采用栀子苷为对照品, 用高效液相色谱法测定食品中的栀子黄含量不太合理, 应加以修改。由于栀子黄的检验标准存在缺陷, 对色素产品的质量产生了很大的影响, 与国际市场要求不符。为

螺旋藻脂肪酸 2-氨基-2-甲基丙醇化学修饰 气相色谱-质谱分析

邹耀洪

(常熟理工学院化学系, 江苏 常熟 215500)

摘 要: 采用 2-氨基-2-甲基丙醇为脂肪酸的化学修饰试剂, 将羧基修改为含氮杂环, 使在 EI 源中避免链烯基中碳碳双键的移动。以气相色谱/EI 质谱分析螺旋藻脂肪酸, 解析了螺旋藻脂肪酸-2-氨基-2-甲基丙醇化学修饰产物的 EI 质谱图, 讨论了烯酸中碳碳双键的定位规则, 确定了螺旋藻脂肪酸中碳碳双键的位置, 鉴定出螺旋藻中 11 种脂肪酸, 由 C₁₄~C₂₂ 脂肪酸组成, 饱和脂肪酸相对含量为 68.34%, 多不饱和脂肪酸相对含量为 54.48%, 其中 9, 12, 15-十八碳三烯酸相对含量达 36.22%, 还首次检出了 9-十四碳烯酸, 6-十八碳烯酸, 11-二十碳烯酸及 4, 7, 10, 13, 16, 19-二十二碳六烯酸。本方法为不饱和脂肪酸中碳碳双键的定位提供了新的技术手段。

关键词: 2-氨基-2-甲基丙醇; 化学修饰; 螺旋藻; 脂肪酸; 气相色谱-EI 质谱

Analysis of Fatty Acids in Spirulina by Gas Chromatography-Mass Spectrometry with Chemical Modifying Reagent 2-Amino-2-Methylpropanol

ZOU Yao-hong

(Department of Chemistry, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China)

Abstract: 2-Amino-2-methylpropanol was developed as chemical modifying reagent of fatty acids so as to modify carboxyl group into nitrogen-containing heterocycle which effectively suppressed the migration of double bonds of the alkenyl under the electron impact source. The empirical rule in which the position of double bonds of olefinic acids was located was referred to electron impact analyzing spectra of the chemical products modified by 2-amino-2-methylpropanol of the fatty acids in spirulina. 11 fatty acids were identified according to the analysis of GC-EIMS and the position of double bonds of the fatty acids from spirulina was located. Spirulina consists of the fatty acids of C₁₄~C₂₂. The contents of the unsaturated fatty acids and the polyunsaturated fatty acids are 68.34% and 54.48% respectively, and the main component of the polyunsaturated fatty acids is 9, 12, 15-linolenic acid whose relative content is 36.22%. Besides, 9-tetradecenoic acid, 6-octadecenoic acid, 11-eicosenoic acid and 4, 7, 10, 13, 16, 19-

收稿日期: 2005-04-13

作者简介: 邹耀洪 (1948-), 男, 教授, 研究方向为天然产物活性因子分析。

了保证食品中的栀子黄含量测定的准确性, 建议用藏红花素为对照品来定性、定量栀子黄素 (为研究的另一部分), 与国际市场接轨。

参考文献:

- [1] 阎少辉, 张德权. 栀子色素研究与开发[J]. 食品研究与开发, 2000, 21(6): 28-31.
- [2] Lee J y, Hahn T R, Paik Y S. Physicochemical characteristics for the

transformation of blue pigments from amino acids[J]. Agric Chem Blotechnol, 1998, 41: 399-404.

- [3] 车双辉, 杜琪珍, 钟立人. 栀子成分的开发研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(5): 57-58.
- [4] GB/T5009.149-2003, 食品中栀子黄的测定[S].
- [5] 王建新, 徐静钰. 栀子黄色素纯化研究[J]. 中国食品添加剂, 2002, (6): 16-18
- [6] 王海棠, 王忠东, 陈海涛, 等. 丹参红色素的研究(I)—化学成分及提取工艺[J]. 食品科学, 2004, 25(5): 86-91.