

高效液相色谱法测定巧克力中胭脂树橙的含量

宁啸骏*, 杨晋青, 俞所银

(上海市质量监督检验技术研究院, 上海 200233)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法测定巧克力中胭脂树橙含量的分析方法。**方法** 采用氨水乙醇提取样品中的色素, 石油醚除脂后, 在酸性条件下采用二氯甲烷反提取目标物, 选用 C₁₈ 色谱柱分离, 以乙腈:2%乙酸(75:25, V:V)作为流动相进行等度洗脱, 用紫外检测器在 458 nm 波长检测, 外标法定量。**结果** 降红木素的定量限为 1.0 mg/kg, 红木素的定量限为 2.0 mg/kg, 线性范围为 1 ~ 50 mg/kg。降红木素和红木素回收率分别为 87.8% ~ 92.0% 和 88.7% ~ 92.1%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)分别为 1.1% ~ 5.0% 和 1.7% ~ 5.2%。**结论** 本方法简单、便捷, 适用于巧克力中胭脂树橙含量的测定。

关键词: 巧克力; 胭脂树橙; 红木素; 降红木素; 高效液相色谱法

Determination of annatto in chocolate by high performance liquid chromatography

NING Xiao-Jun*, YANG Jin-Qing, YU Suo-Yin

(Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of annatto in chocolate by high performance liquid chromatography. **Methods** The pigment in the sample was extracted with ammonia water ethanol, and defatted by petroleum ether. Then, the target compound was back-extracted with dichloromethane under acidic conditions, and separated on a C₁₈ column and isocratic eluted with acetonitrile: 2% acetic acid (75:25, V:V) as mobile phase. The targets were detected by a ultraviolet detector at the wavelength of 458 nm, and quantified by external standard method. **Results** The limits of quantification of norbixin and bixin were 1.0 mg/kg and 2.0 mg/kg, respectively. The linearities of norbixin and bixin ranged from 1 to 50 mg/kg. The spiked recoveries of norbixin and bixin ranged from 87.8%–92.0% and 88.7%–92.1% with the standard deviations of 1.1%–5.0% and 1.7%–5.2%, respectively. **Conclusion** This method is simple and convenient, which is suitable for the detection of annatto in chocolate samples.

KEY WORDS: chocolate; annatto; bixin; norbixin; high performance liquid chromatography

1 引言

胭脂树橙是提取自胭脂树科植物胭脂树(*bixa orellana*)种子表皮的一种类胡萝卜素, 胭脂树橙的主要成分

根据提取方法的不同, 分为脂溶性的红木素(bixin)与水溶性的降红木素(norbixin)2种。在我国, GB 2760-2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》^[1]对胭脂树橙在不同种类食品中的添加限量有明确规定, 最大使用量在 0.01 ~

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目(18DZ2201400)

Fund: Scientific Research Project of Shanghai Science and Technology Commission(18DZ2201400)

*通讯作者: 宁啸骏, 高级工程师, 主要研究方向为食品化妆品质量检测技术。E-mail: ningxj@sqi.org.cn

*Corresponding author: NING Xiao-Jun, Senior Engineer, Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China. E-mail: ningxj@sqi.org.cn

0.6 g/kg。被允许添加胭脂树橙的食品有干酪、人造黄油(人造奶油)及其类似制品、冷冻饮品、果酱、代可可脂巧克力及使用可可脂代用品的巧克力类似产品、糖果和焙烤食品等。当前,国内外对胭脂树橙的研究并不多,国内更是缺少能够在检测中普遍应用的安全国家标准。因此,研究出可以标准化、简便准确测定食品中胭脂树橙含量的检测方法显得尤为重要。目前,可参考的标准方法有测定乳酪中胭脂树橙含量(德国标准化学会标准)^[2]和 2016 年 7 月 1 日开始实施的进出口行业标准 SN/T4394-2015《出口食品中红木素和降红木素的测定 液相色谱法》^[3]。由于胭脂树橙在食品中的添加量很高,具有较大的紫外吸收波长,液相色谱杂质干扰少,故目前食品中胭脂树橙的检测技术以高效液相色谱法为主^[4-6],可进行准确的定性定量。胭脂树橙的提取方法也多种多样,而且涉及到不同种类的基体,有奶酪^[7-9]、肉制品^[10]、饮料^[11]、方便食品^[12]等,也有报道采用液相质谱联用技术对这些样品中的胭脂树橙进行检测^[13,14]。但应用高效液相色谱法检测巧克力中胭脂树橙含量的研究相对较少。

本研究选择了巧克力制品为研究对象,建立了巧克力中的红木素和降红木素的高效液相色谱检测方法,以期能为政府监管提供有力的技术支持。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

Waters2695 高效液相色谱仪(配有二极管阵列检测器,美国 Waters 公司); TB-114 型分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); 涡旋混合器(德国 IKA 公司); 氮气浓缩装置(英国 PEAK 公司)。顺式结构降红木素和顺式结构红木素标准品(纯度 $\geq 98.0\%$, 瑞士 CaroteNature 公司)。

降红木素和红木素标准储备液: 准确称取顺式结构降红木素和顺式结构红木素标准品 10.0 mg(精确至 0.1 mg)于 100 mL 棕色容量瓶中, 分别用含 0.1% BHT 甲醇溶液和乙醇溶液溶解并定容至刻度, 混匀。

降红木素和红木素混合标准系列工作液: 分别吸取降红木素和红木素标准储备液, 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mL 于 10.0 mL 容量瓶中, 加 70%乙腈水溶液定容至刻度, 混匀。降红木素和红木素混合标准系列工作液的浓度分别为 0.5、1.0、2.0、5.0、10、20、50 mg/L。现用现配。

无水乙醇、甲醇、乙腈、二氯甲烷[色谱纯, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; 冰乙酸、氨水、石油醚(化学纯, 国药集团化学试剂有限公司); 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol, BHT, 化学纯, 日本 TCI 公司); 水为超纯水, 电阻率为 18.2 M Ω ·cm。

巧克力样品均为市售样品。

2.2 色谱条件

Agilent ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱(150 mm \times 4.6 mm,

5 μ m); 柱温为 30 $^{\circ}$ C; 流速为 1.0 mL/min; 进样量为 10 μ L; 流动相为乙腈-2%乙酸水(70:30, V:V) 溶液; 检测波长: 458 nm。

2.3 实验方法

称取试样 5 g(精确至 0.0001 g)于 50 mL 具塞塑料离心管中, 加入 2~5 g 硅藻土, 搅拌混匀至疏松颗粒状, 加入 20 mL 5%氨水乙醇溶液(含 0.1% BHT), 漩涡振荡 2 min, 离心后转移上清液于另一支 50 mL 离心管内, 重复提取 1 次。采用氮气浓缩装置 40 $^{\circ}$ C 下浓缩至体积约 5 mL, 加入 2 mL 氨水, 5 mL 5%氨水乙醇溶液(含 0.1% BHT), 用水稀释至 20 mL, 加入石油醚(含 0.1% BHT)20 mL, 漩涡振荡 1 min, 离心弃去上层溶液, 重复除脂 1 次。下层溶液加入 2 mL 冰乙酸, 25 mL 二氯甲烷(含 0.1% BHT)反萃取, 离心后去除上清液, 加入 1 mL 乙醇(含 0.1% BHT), 采用氮气浓缩装置浓缩 35 $^{\circ}$ C 下浓缩至体积约 1~2 mL, 用乙醇(含 0.1% BHT)定容至 5.00 mL, 经 0.45 μ m 滤膜过滤至进样小瓶中, 供液相色谱仪测定。

3 结果与分析

3.1 提取溶剂的选择

红木素和降红木素其结构上均带有羧基, 二者的酸碱解离常数 pK_a 为 5.0 左右, 当 pH 调节到小于 pK_a-2 , 该物质完全呈现为酸式形态, 而当 $pH > pK_a+2$ 该物质完全成为碱式形态。当 $pH > 8$ 降红木素的 logD 为 2, 红木素的 logD 为 -1.53, 此时两者极性较强, 易溶于极性溶剂, 降红木素甚至可以溶于水, 而红木素可以溶于甲醇和乙醇等极性有机溶剂, 因此选择在碱性条件下极性较强的溶剂提取。比较了 10%氨水和 5%氨水下甲醇和乙醇的提取效率。结果发现乙醇的提取效较高, 并且甲醇容易提取出样品中更多的水分, 5%氨水 pH 为 9.5 条件较适宜, 最终选择了 5%氨水乙醇溶液作为提取溶液。

3.2 提取次数的确定

采用阴性样品加标(样品中的降红木素、红木素的含量在 50 mg/kg 水平), 称取 5 g 样品, 采用每次 25 mL 的 5%氨水乙醇体积比提取 n 次, 每次提取漩涡振荡 2 min, 然后将 n 次提取溶液合并, 用乙酸调节到中性, 浓缩并定容至 5 mL, 采用液相色谱仪测定降红木素和红木素的色谱峰面积, 458 nm 波长下, 以提取次数(X)对最终样液的色谱峰面积(Y)作图, 如图 1。

可见目标物含量在 50 mg/kg 样品, 提取 2 次以后基本可以将样品中的色素提取出来, 实际操作对于更高浓度含量样品, 可以通过减少称样量或者进一步增加提取次数来充分提取样品中的色素。

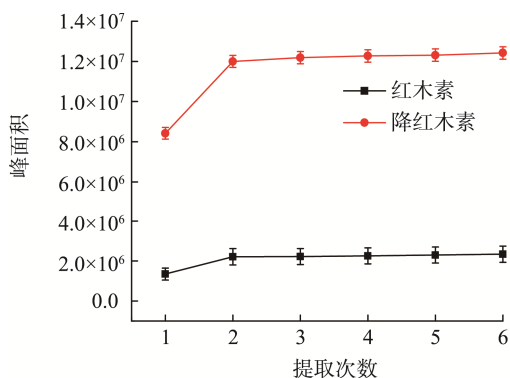


图 1 提取次数对提取效果的影响(n=6)
Fig.1 Effect of extraction times on extraction efficiency(n=6)

3.3 除脂效果的比较

由于胭脂树橙属于脂溶性色素, 样品常常富含油脂, 如何去除脂肪是前处理要面临的一个重要问题。本研究比较了石油醚、乙醚、正己烷的除脂效果。由图 2~4 可见正己烷和石油醚基本不会萃取下层红木素或降红木素, 而发现乙醚会造成部分目标物损失, 由于正己烷毒性相对较大, 并且石油醚除脂效果好于正己烷, 对于一些脂溶性的胡萝卜素类色素, 石油醚也可以通过萃取这些色素而避免对目标物检测造成干扰, 因此综合考虑采用石油醚作为提取脂肪的溶剂。

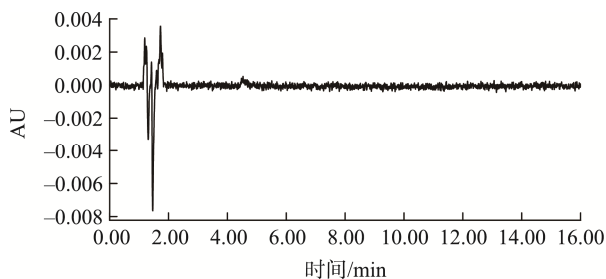


图 2 石油醚萃取层合并吹干定容后上机液红木素或降红木素色谱图

Fig.2 Chromatogram of bixin and norbixin extracted by the petroleum after drying and constant volume.

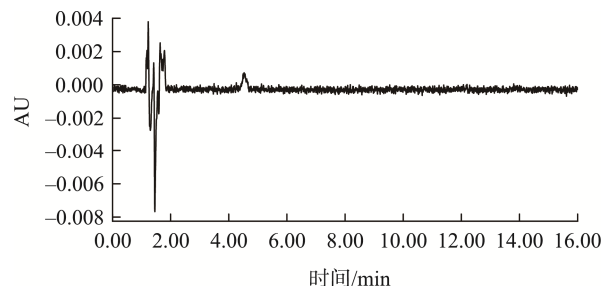


图 3 正己烷萃取层合并吹干定容后上机液红木素或降红木素色谱图

Fig.3 Chromatogram of bixin and norbixin extracted by the hexane after drying and constant volume.

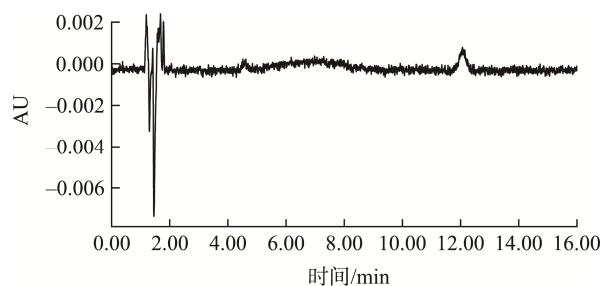


图 4 乙醚萃取层合并吹干定容后溶液中红木素或降红木素色谱图
Fig.4 Chromatogram of bixin and norbixin extracted by the ether after drying and constant volume.

3.4 净化方法的确定

净化措施采用液液萃取, 利用红木素和降红木素在酸性下转化为非极性形态易溶于非极性溶剂的性质, 故将除脂后的样液经过乙酸调酸性后, 再采用有机溶剂反提取, 进一步消除一些极性色素的干扰。选择二氯甲烷、三氯甲烷作为反提溶剂, 由于在酸性下三氯甲烷和二氯甲烷萃取效果基本相同, 考虑到三氯甲烷的毒性大, 最终选择二氯甲烷作为净化溶剂。

3.5 检测波长的选择

将红木素和降红木素的标准溶液在 200~800 nm 的范围内进行二极管阵列全扫描, 得到其特征吸收光谱图, 见图 5。红木素和降红木素在 458 nm 左右吸收峰较强。因此, 确定 458 nm 为检测波长。

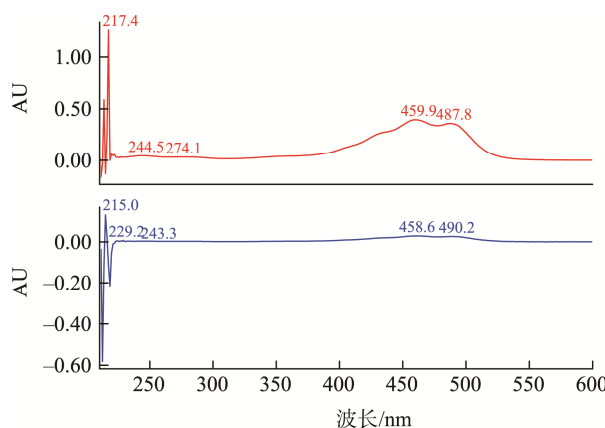


图 5 红木素和降红木素的紫外-可见光吸收光谱图
Fig.5 Ultraviolet-visible absorption spectra of bixin and norbixin

3.6 色谱分离条件的选择

实验选取 Agilent ZORBAX SB C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 考察了不同流动相组成, 乙腈+水(75:25, V:V)、乙腈+2%乙酸水溶液(75:25, V:V)、乙腈+水(73:30, V:V)、乙腈+2%乙酸水溶液(73:30, V:V)作为流动相时红木素和降红木素的色谱出峰情况。结果表明, 当选择乙腈+

乙酸水溶液作为流动相时, 红木素和降红木素的分离度好, 红木素和降红木素出峰较快, 分离度好且响应值较高, 便于样品分析。因此本实验选用乙腈:2%乙酸水溶液溶液(70:30, V:V)作为流动相(图 6)。

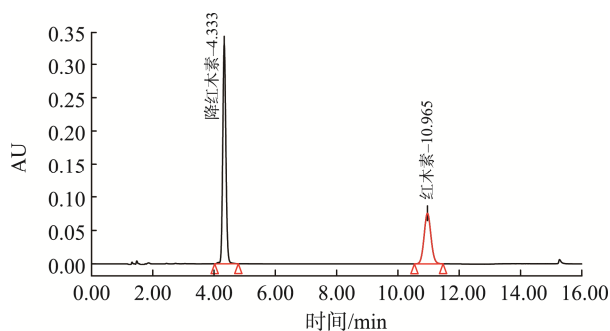


图 6 流动相为乙腈+2%乙酸水溶液(70:30,V:V)时的红木素和降红木素色谱图

Fig.6 Chromatogram of bixin and norbixin by the mobile phase of acetonitrile + 2% aqueous acetic acid (70:30,V:V)

3.7 标准曲线及检出限

分别准确吸取降红木素和红木素标准储备液(100 mg/L), 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mL 于 10.0 mL 容量瓶中, 加 70%乙腈水溶液定容至刻度, 混匀。降红木素和红木素混合标准系列工作液的浓度分别为 0.5、

1.0、2.0、5.0、10、20、50 mg/L。各取 10 μ L 分别按上述色谱条件进行分析。以相应的色谱峰面积(Y)为纵坐标、待测组分的质量浓度 X(mg/L)为横坐标, 绘制标准工作曲线。降红木素线性方程为 $Y=255866X+4977$, 红木素线性方程为 $Y=46742X+7144$, 线性系数均 >0.999 , 说明方法在 1~50 mg/kg 可以满足线性要求。

根据检出限定义为响应信号为噪音的 3 倍($S=3M$)时所需的样品量。定量限定义为响应信号为噪音的 10 倍($S=10M$)时所需的样品量。标样添加在空白基质样品中按步骤测定, 分析数据如表 1 所示。在相同的检测条件下, 取样量为 5.0 g, 定容体积为 5.0 mL, 制定本标准的方法检出限: 降红木素为 0.5 mg/kg, 红木素为 1.0 mg/kg; 定量限: 降红木素为 1.0 mg/kg, 红木素为 2.0 mg/kg。

3.8 回收率实验

在巧克力空白基质样品中按 1.0、2.0、10.0、25.0 mg/kg 进行标样添加, 各浓度水平的试验均独立重复操作测定 6 次, 各水平的回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)见表 2。

3.9 样品溶液中红木素和降红木素的稳定性

取红木素和降红木素阳性样品前处理后, 立即上机测定确定初始值, 然后在常温 20 $^{\circ}$ C 每间隔一段时间(2、6、12、24 h)进样, 每次进样重复 3 次, 由表 3 可见放置一段时间目标物会发生一定程度的降解, 应在 24 h 内尽快上机。

表 1 红木素和降红木素的检出限数据
Table 1 Detection limit data of bixin and norbixin

项目名称		巧克力						平均值
进样次数 n		1	2	3	4	5	6	
降红木素	检出限/(mg/kg)	0.293	0.293	0.293	0.271	0.303	0.271	0.287
	定量限/(mg/kg)	0.975	0.976	0.976	0.904	1.011	0.904	0.958
红木素	检出限/(mg/kg)	0.276	0.296	0.282	0.271	0.294	0.294	0.286
	定量限/(mg/kg)	0.921	0.987	0.940	0.904	0.981	0.981	0.952

表 2 红木素和降红木素的回收率和相对标准偏差($n=6$)
Table 2 Standard recovery rates and relative standard deviation of bixin and norbixin ($n=6$)

样品	加入量/(mg/kg)	回收率/%		RSD/%	
		降红木素	红木素	降红木素	红木素
巧克力	1.0	92.0	89.3	1.1	2.9
	2.0	90.3	92.1	3.3	4.0
	10.0	89.7	88.7	2.6	1.7
	25.0	87.8	91.3	5.0	5.2

表3 样品溶液中红木素和降红木素的稳定性($n=3$)
Table 3 Stability of bixin and norbixin in sample solutions($n=3$)

放置时间/h	0	2	6	12	24
红木素浓度/(mg/L)	31.2	31.4	30.9	30.6	30.2
RSD/%	0.19	0.21	0.18	0.20	0.21
降红木素浓度/(mg/L)	4.68	4.61	4.66	4.58	4.52
RSD/%	0.13	0.11	0.089	0.089	0.098

3.10 市售样品检测

在上述实验条件下, 对市售巧克力样品(共20例)进行了胭脂树橙的检测, 结果有1例巧克力检出红木素, 含量为3.02 mg/kg。

4 结论

本研究建立了巧克力中胭脂树橙的高效液相色谱检测方法, 采用5%氨水乙醇溶液提取, 液液萃取法进行净化分离除去色素和脂肪等干扰杂质, 经高效液相色谱-二极管阵列检测器进行检测定量。该方法处理高效、经济, 灵敏度高, 适用于巧克力中胭脂树橙的快速分析, 可为胭脂树橙检测方法标准的建立提供有力的技术支持。

参考文献

- [1] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2014 National food safety standards-Standards for the use of food additives [S].
- [2] DIN 10482-2-2006 乳酪中胭脂树橙含量的测定. 第2部分: 高效液相色谱法[S].
DIN 10482-2-2006 Determination of the annatto content of cheese-Part 2: High performance liquid chromatography method [S].
- [3] SN/T 4394-2015 出口食品中红木素和降红木素的测定 液相色谱法[S].
SN/T 4394-2015 Determination of bixin and norbixin in exported foods-Liquid chromatography [S].
- [4] 顾艳, 杨军丽, 宗凌丽. 固相萃取法测定食品中胭脂树橙的含量[J]. 现代食品, 2017, 2(24): 103-106.
Gu Y, Yang JL, Zong LL. Determination of annatto in food by solid phase extraction [J]. Mod Food, 2017, 2(24): 103-106.
- [5] 钱疆, 陈健, 黄杰, 等. 液相色谱法测定加工食品中红木素和降红木素[J]. 分析实验室, 2014, 33(10): 1206-1210.
Qian J, Chen J, Huang J, *et al.* Determination of bixin and norbixin in processed foods with HPLC [J]. Anal Lab, 2014, 33(10): 1206-1210.

- [6] 林钦. 超高效液相色谱法快速检测食品中胭脂树橙的含量[J]. 福建分析测试, 2011, 20(3): 36-39.
Lin Q. Ultra high performance liquid chromatography for rapid determination of annatto in food [J]. Fujian Anal Test, 2011, 20(3): 36-39.
- [7] 陈毓芳, 王岚, 林海丹, 等. 高效液相色谱法测定奶酪和人造黄油中胭脂树橙残留[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, (4): 778-780.
Chen YF, Wang L, Lin HD, *et al.* Determination of annatto residues in cheese and margarine by high performance liquid chromatography [J]. China J Hyg Inspect, 2011, (4): 778-780.
- [8] DIN 10482-1-2005 乳酪中胭脂树橙含量的测定. 第1部分: 光度测量法[S].
DIN 10482-1-2005 Determination of annatto content in cheese-Part 1: Photometric method [S].
- [9] Bareth A, Strohm W, Kitzelmann E. HPLC and spectrophotometric determination of annatto in cheese [J]. Eur. Food Res Technol, 2002, 215(4): 359-364.
- [10] Noppe H, Abuin MS, Verheyden K, *et al.* Determination of bixin and norbixin in meat using liquid chromatography and photodiode array detection [J]. Food Add Contain, 2009, 26(1): 17-24.
- [11] 郑玲, 李丽华, 李湧, 等. 高效液相色谱法测定饮料中的胭脂树橙[J]. 食品研究与开发, 2011, (4): 129-131.
Zheng L, Li LH, Li Y, *et al.* Determination of annatto in drinks by high performance liquid chromatography [J]. Food Res Dev, 2011, (4): 129-131.
- [12] Rios AO, Mercadante AZ. Novel method for the determination of added annatto colour in extruded corn snack products [J]. Food Add Contamin: Part A, 2004, 21(2): 125-133.
- [13] Cardenosa V, Lunar ML, Rubio S. Generalized and rapid supramolecular solvent-based sample treatment for the determination of annatto in food [J]. J Chromatogr A, 2011, 1218(50): 8996-9002.
- [14] Chiste RC, Yamashita F, Gozzo FC, *et al.* Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds [J]. J Chromatogr A, 2011, 1218(1): 57-63.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



宁啸骏, 高级工程师, 主要研究方向为食品化妆品质量检测技术。
E-mail: ningxj@sqi.org.cn