

液液萃取-UPLC快速测定初榨橄榄油中 叶绿素铜钠的含量

张晓莉¹, 王波², 刘阿静², 王娟², 赵茹玉², 金凤³

(1. 甘肃省产品质量监督检验研究院, 兰州 730010; 2. 兰州海关技术中心, 兰州 730010;
3. 祥宇油橄榄产业研发及分析实验室, 甘肃陇南 746000)

摘要:建立了液液萃取-超高效液相色谱(UPLC)快速测定初榨橄榄油中叶绿素铜钠含量的方法。初榨橄榄油样品经80%的乙醇溶液提取后,在UPLC条件为采用SVEA C₁₈色谱柱(50 mm×1.0 mm, 1.7 μm),柱温30℃,乙腈-水(体积比95:5)为流动相,等度洗脱,流速0.3 mL/min,进样量2.0 μL,检测波长405 nm下,可实现初榨橄榄油中叶绿素铜钠的有效分离,整个分析过程仅需6 min。通过方法学考察,该方法的检出限及定量限分别为0.20 mg/L和0.50 mg/L,叶绿素铜钠加标回收率均在84.00%~97.90%之间,方法的重复性、精密度和稳定性较好。所建立的方法可用于初榨橄榄油中叶绿素铜钠含量的快速测定。

关键词:叶绿素铜钠;液液萃取;超高效液相色谱法;初榨橄榄油

中图分类号:TS225.1;TQ646 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2021)09-0149-04

Rapid determination of sodium copper chlorophyllin in virgin olive oil by liquid-liquid extraction and UPLC

ZHANG Xiaoli¹, WANG Bo², LIU Ajing², WANG Juan²,
ZHAO Ruyi², JIN Feng³

(1. Gansu Institute of Product Quality Supervision and Inspection, Lanzhou 730010, China; 2. Lanzhou Customs Technology Center, Lanzhou 730010, China; 3. Xiangyu Olive Industry R & D and Analysis Laboratory, Longnan 746000, Gansu, China)

Abstract: A method for rapid determination of sodium copper chlorophyllin in virgin olive oil by liquid-liquid extraction and ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) was established. Virgin olive oil was extracted by 80% ethanol, then injected to ultra-high performance liquid chromatography, and determined under the conditions of SVEA C₁₈ column (50 mm×1.0 mm, 1.7 μm) with isocratic elution at 30℃, acetonitrile-water (volume ratio 95:5) as mobile phase, flow rate 0.3 mL/min, injection volume 2.0 μL, and detection wavelength 405 nm, the sodium copper chlorophyllin could be effectively separated from virgin olive oil, and the entire analysis process took only 6 min. The results of the methodological examination showed that the detection limit and quantitative limit of the method were 0.20 mg/L and 0.5 mg/L respectively, the recovery rate of sodium copper chlorophyllin was between 84.00% and 97.90%, and the method had better reproducibility, precision and stability, and could be used for the determination of sodium copper chlorophyllin in virgin olive oil.

Key words: sodium copper chlorophyllin; liquid-liquid extraction; ultra-high performance liquid chromatography; virgin olive oil

收稿日期:2020-09-30;修回日期:2021-06-20

作者简介:张晓莉(1984),女,工程师,硕士,研究方向为化学检测(E-mail)18919317935@163.com。

通信作者:王波,高级工程师,博士(E-mail)wyy080214@163.com。

初榨橄榄油具有较高的品质和营养价值,其价格也较普通植物油高。叶绿素为镁卟啉化合物,新

鲜的初榨橄榄油含有微量的叶绿素而显草绿色,随着时间的延长,逐渐成为黄绿色至金黄色。叶绿素铜钠是叶绿素经过皂化、铜化等反应精制而成^[1-2], GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》中规定,其作为天然食用绿色素,可广泛应用于糖果、果蔬汁(浆)类饮料以及配制酒等 10 类食品中,但应用范围并未包含食用植物油。有文献指出,添加叶绿素铜钠的食用油,在高温烹调过程中因较高的温度而释出铜及氧化物,危害消费者的健康^[3]。此外,受经济利益驱使,部分商家通过在葵花籽油、大豆油等价格相对较低的植物油中添加叶绿素铜钠,使其呈黄绿色,冒充橄榄油,牟取暴利,极大地侵害了消费者的权益。因此,检测初榨橄榄油中的叶绿素铜钠显得尤为重要^[4-6]。

目前,国标法(GB 5009.260—2016《食品安全国家标准 食品中叶绿素铜钠的测定》)测定叶绿素铜钠的方法为分光光度法,该方法的检出限为 0.001 g/kg,应用范围仅为饮料、酒、罐头和糖果样品。因此,本研究建立了液液萃取-超高效液相色谱(UPLC)检测初榨橄榄油中叶绿素铜钠的方法,为初榨橄榄油中叶绿素铜钠的定性定量检测提供了一种高效可行的色谱检测方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

叶绿素铜钠(纯度 $\geq 98\%$),美国 Sigma 公司;甲醇、乙腈,均为色谱纯,德国 Merck 公司;其余试剂均为分析纯。

UPLC H-CLASS 超高效液相色谱仪(配有 Empower 3 数据处理系统及二极管阵列检测器),美国 Waters 公司;MS3 涡旋仪,德国 IKA 公司;3K30 冷冻离心机,美国 Sigma 公司;100 ~ 1 000 μL 、1.0 ~ 50.0 mL 移液枪,美国 Thermo Electron 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 叶绿素铜钠标准溶液的配制

称取叶绿素铜钠 10.0 mg,用乙腈-水(体积比 95:5)溶液溶解并定容至 100 mL,配制成质量浓度为 100 mg/L 的叶绿素铜钠标准溶液,冷藏待用。

1.2.2 叶绿素铜钠的液液萃取(样品前处理)

准确称取初榨橄榄油样品 2.00 g 于 15 mL 离心管中,加入体积分数为 80% 的乙醇溶液 10 mL,涡旋 1.0 min,超声提取 2 min 后,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻离心机中,10 000 r/min 冷冻离心 5 min,取上层溶液 5 mL,氮气吹至近干,再用乙腈-水(体积比 95:5)溶液定容至 1.0 mL,0.22 μm 微孔滤膜过滤后待 UPLC 分析。

1.2.3 UPLC 分析

分析条件:SVEA C_{18} 色谱柱(50 mm \times 1.0 mm, 1.7 μm);流动相为乙腈-水(体积比 95:5),流速 0.30 mL/min,等度洗脱;进样量 2.0 μL ;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长 405 nm。采用外标法定量。

2 结果与分析

2.1 叶绿素铜钠提取溶剂的选择

提取溶剂直接关系到目标物的提取效果。按 1.2.2 方法,在其他条件不变情况下,采用乙醇、甲醇和乙腈作为提取溶剂对叶绿素铜钠标准溶液中的叶绿素铜钠进行提取,按 1.2.3 条件进行测定。结果表明,当提取溶剂为甲醇和乙腈时,叶绿素铜钠的平均提取率均在 82.13% 以上,当提取溶剂为乙醇时,叶绿素铜钠的平均提取率达 91.05%,因此乙醇为最佳提取溶剂。但是,乙醇为提取溶剂时,会溶解部分油脂而导致后期 UPLC 分析时提取液分层,甚至堵塞进样针和/或色谱柱,故使用不同体积分数的乙醇溶液对叶绿素铜钠进行提取,考察乙醇体积分数对叶绿素铜钠提取率的影响,结果见图 1。

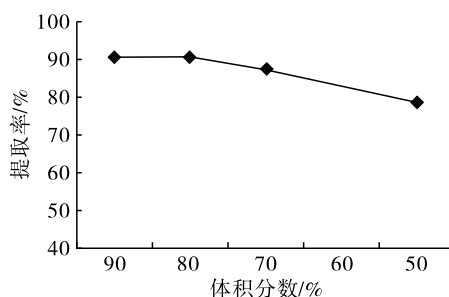


图 1 乙醇体积分数对提取效果的影响

由图 1 可知,随着乙醇体积分数的降低,叶绿素铜钠提取率降低,乙醇体积分数不低于 80% 时,叶绿素铜钠的提取率达到 90% 以上,且乙醇体积分数在 80% 和 90% 时叶绿素铜钠提取率变化不大,因此本实验采用 80% 乙醇作为提取溶剂。此外,需要注意的是,当使用涡旋和超声提取时,涡旋和超声提取时间控制在 2.0 min 以内,可有效避免提取溶液的乳化。

2.2 UPLC 分析条件优化

2.2.1 色谱柱的优化

在色谱分离过程中,良好的色谱柱不仅能够提供较高的柱效,而且能够在较短时间内使目标物获得良好的峰形。取一定量叶绿素铜钠标准溶液,在 1.2.3 其他条件不变情况下,比较了 BEH C_{18} 、SVEA C_{18} 、BEH C_8 色谱柱对叶绿素铜钠分离的影响,结果见图 2。

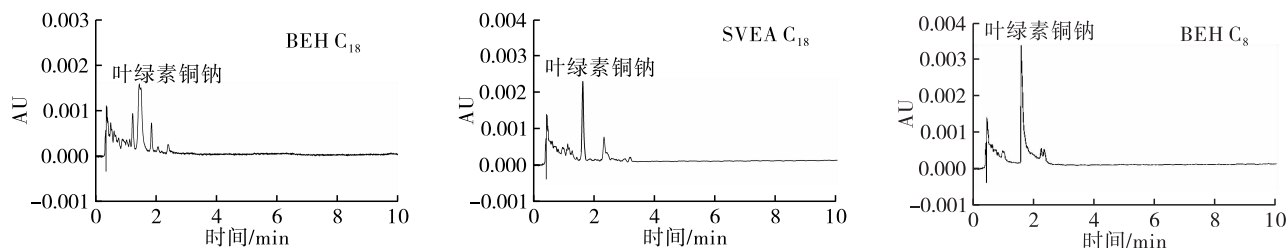


图2 不同色谱柱对叶绿素铜钠的分离色谱图

由图2可知:当色谱柱为BEH C₁₈时,叶绿素铜钠峰分叉,极大地影响叶绿素铜钠的准确定量;当色谱柱为BEH C₈时,叶绿素铜钠的保留时间太短,通过调整增加水相比比例,虽然叶绿素铜钠分析时间可适当延长,但是较高比例水相致使叶绿素铜钠拖尾现象严重,且在油脂样品的分析中,较高比例水相会使提取溶剂中微量油脂析出,损害色谱柱;当色谱柱为SVEA C₁₈时,叶绿素铜钠分离较好,且峰形尖锐,无分叉和拖尾现象,出峰时间为1.56 min。因此,本实验选用SVEA C₁₈柱为分析色谱柱。

2.2.2 流动相的优化

在样品的色谱分离过程中,流动相的选择直接影响目标物的峰形、灵敏度及分离度。当选用甲醇-水(体积比95:5)为流动相时,叶绿素铜钠的出峰时间较长,因峰展宽直接影响叶绿素铜钠的检测灵敏度;当使用乙醇-水(体积比95:5)作为流动相时,在初榨橄榄油提取液分析过程中,叶绿素铜钠与样品中某一组分重合,无法对其准确定量,且乙醇的使用会导致较高的系统压力;而乙腈-水(体积比95:5)作流动相时,叶绿素铜钠的色谱峰形尖锐,并且无拖尾现象,在初榨橄榄油提取液分析过程中,样品中的某一组分与叶绿素铜钠分离良好。因此,本实验选用乙腈-水(体积比95:5)作为流动相。

2.2.3 柱温的优化

柱温是影响色谱分离过程的重要因素之一,柱温的变化会影响叶绿素铜钠在色谱柱的吸附-解吸速度。柱温高,流动相的黏度降低,叶绿素铜钠在色谱柱的传质速率增加,有助于从固定相表面解吸进入流动相中,保留时间缩短;柱温低时则反之。样品经1.2.2方法处理后,在1.2.3其他条件不变情况下进行测定,考察柱温对叶绿素铜钠分离的影响,结果见图3。

由图3可知:叶绿素铜钠的出峰时间随着柱温升高而逐渐降低,即保留时间缩短;当柱温为30℃和35℃时,叶绿素铜钠与初榨橄榄油提取液中的未知组分分离良好;当柱温为40℃时,叶绿素铜钠与初榨橄榄油提取液中的未知组分无法进行有效分

离。综上所述,本研究选择最佳柱温为30℃。

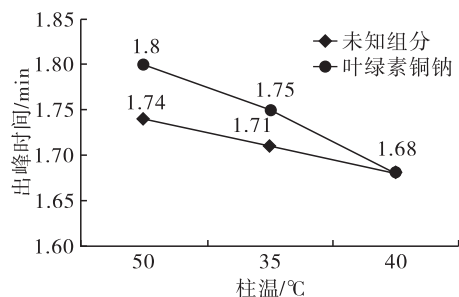


图3 柱温对叶绿素铜钠分离的影响

2.3 方法学考察

2.3.1 稳定性实验

取添加有叶绿素铜钠标准溶液的初榨橄榄油样品,按照1.2.2处理后,室温条件下分别放置0、4、12、24、48 h,按照1.2.3条件进行测定。结果发现,在室温条件下放置不同时间的初榨橄榄油样品中叶绿素铜钠含量的相对标准偏差(RSD)在2.35%~3.69%范围之内,说明叶绿素铜钠具有较高的稳定性,可在样品处理完成后48 h内进行分析。

2.3.2 专属性实验

取添加有叶绿素铜钠标准溶液的初榨橄榄油样品提取液、叶绿素铜钠标准溶液、初榨橄榄油样品提取液,按照1.2.3条件进行测定,并将其色谱图进行比较。结果表明,初榨橄榄油样品提取液在叶绿素铜钠出峰位置无干扰,说明该方法专属性好。

2.3.3 线性范围及定量限

分别精密量取叶绿素铜钠标准溶液0.20、0.50、1.0、5.0、10.0、50.0 mL,置于100 mL棕色容量瓶中,用乙腈-水(体积比95:5)定容,得到质量浓度范围在0.20~50.0 mg/L的系列标准溶液。按照1.2.3条件进行测定,以质量浓度(x)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归,得到线性方程为 $y = 2547.8x - 69.751$,相关系数(r)为0.9993,说明叶绿素铜钠在0.20~50.0 mg/L的系列质量浓度范围内线性关系良好。以信噪比分别为3和10计算叶绿素铜钠的检出限和定量限,结果分别为0.2 mg/L和0.5 mg/L。可以看出该方法具有较宽的线性范围,检出限和定量限能够满足实验要求。

2.3.4 精密度实验

按照 1.2.3 条件,对叶绿素铜钠标准溶液重复进样 6 次,日内精密度的 RSD 范围在 0.97% ~ 1.03% 之间;经连续 3 d 的重复进样计算日间精密度,其 RSD 在 1.02% ~ 1.31% 范围内。可以看出本方法具有较好的日间和日内精密度。

2.3.5 重复性实验

向初榨橄榄油空白样中添加一定量的叶绿素铜钠标准溶液后,准确称取样品 6 份,按照 1.2.2 进行样品前处理,按照 1.2.3 条件进行测定,计算叶绿素铜钠的含量及 RSD,结果见表 1。由表 1 可以看出,6 份添加叶绿素铜钠(5.0 mg/L)的初榨橄榄油样品中叶绿素铜钠的平均含量为 4.32 mg/L,RSD 为 2.79%。表明方法重复性较好。

表 1 初榨橄榄油样品中叶绿素铜钠的重复性实验结果

本底值/ (mg/L)	添加量/ (mg/L)	检测值/(mg/L)						RSD/ %
		1	2	3	4	5	6	
0.0	5.0	4.56	4.34	4.31	4.25	4.27	4.23	2.79

2.3.6 加标回收率实验

准确称取 6 份同一初榨橄榄油空白样品 2.00

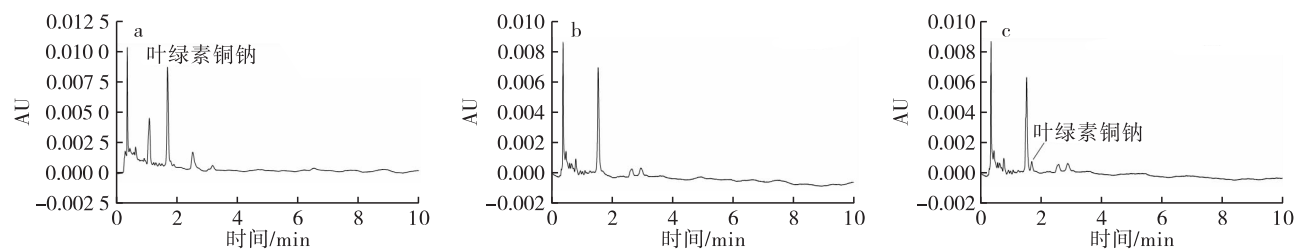


图 4 叶绿素铜钠标准溶液(a)、初榨橄榄油样品(b)及样品加标(c)色谱图

由图 4 可以看出,初榨橄榄油样品中有一组分与叶绿素铜钠保留时间比较接近,很容易造成假阳性。本研究通过色谱分离条件优化,经检测添加了叶绿素铜钠标准溶液的初榨橄榄油,叶绿素铜钠与某一组分能够较好地分离,避免了假阳性的出现,且分离时间保证在 2.0 min 以内,能够对初榨橄榄油中的叶绿素铜钠进行快速检测。

本研究经现场采样、超市购买等手段获得不同产地及不同生产日期的初榨橄榄油,均未检出叶绿素铜钠。

3 结论

本实验采用液液萃取-超高效液相色谱快速测定了初榨橄榄油中的叶绿素铜钠。通过对样品前处理提取溶剂,色谱分离条件如色谱柱、流动相以及柱温的选择和优化,得到优化的条件为样品经 80% 乙醇溶液涡旋 1 min、超声 2 min 提取后,以 SVEA C₁₈ 色谱柱在流动相为乙腈-水(体积比 95:5)、柱温 30 °C 条件下进行色谱分离,可实现初榨橄榄油中叶绿

素铜钠的有效分离。建立的方法检出限为 0.2 mg/L,定量限为 0.5 mg/L;方法学考察表明,该方法灵敏度高,重现性、稳定性较好,完成一次 UPLC 分析仪 2.0 min,整个分析过程仅需 6 min。该方法适用于初榨橄榄油中叶绿素铜钠的快速分析。

表 2 初榨橄榄油样品中叶绿素铜钠的回收率

添加量/(mg/L)	检出量/(mg/L)	回收率/%
0.50	0.42	84.00
10.00	9.79	97.90
50.00	46.19	92.38

2.4 实际样品的测定

取所收集的 20 批次初榨橄榄油样品,准确称取 2.00 g,按 1.2.2 进行样品前处理,按 1.2.3 条件进行测定,处理进行 3 个平行,计算叶绿素铜钠的含量。叶绿素铜钠标准溶液(10 mg/L)、初榨橄榄油样品(选择样品中的 1 个,样品 3)及样品加标(加标量 1.0 mg/L,样品 3 + 标准溶液)色谱图见图 4。

素铜钠的有效分离。建立的方法检出限为 0.2 mg/L,定量限为 0.5 mg/L;方法学考察表明,该方法灵敏度高,重现性、稳定性较好,完成一次 UPLC 分析仪 2.0 min,整个分析过程仅需 6 min。该方法适用于初榨橄榄油中叶绿素铜钠的快速分析。

参考文献:

- [1] 吴君艳, 吴存兵. 响应面法优化藜蒿叶绿素铜钠的制备工艺[J]. 南方农业学报, 2015, 46(9):1673-1678.
- [2] 杨继生, 何学志. 叶绿素铜钠盐的性质、制备工艺及其应用[J]. 现代食品科技, 2002, 18(2):33-35.
- [3] 陈桐, 周洪斌, 王现平, 等. 高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定橄榄油中叶绿素铜钠[J]. 分析试验室, 2019(8):921-924.
- [4] 张欣, 于瑞祥, 方晓明, 等. 橄榄油掺假检测技术的研究进展[J]. 中国油脂, 2013, 38(3):67-71.
- [5] 方晓明, 张欣, 冯春野, 等. 油脂同步荧光光谱检测及橄榄油掺假鉴别[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(9):112-118.
- [6] 林远辉, 高蓓, 李玉玉, 等. 橄榄油掺假鉴别技术研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(5):279-283.