

实验技术与方法

冷皂化-HPLC 测定强化食品中的维生素 A、E 的方法研究

赵海燕 赵 榕 杨永红 罗仁才

(北京市疾病预防控制中心,北京 100013)

摘要:目的 建立测定强化食品中的维生素 A、E 的冷皂化-HPLC 方法。方法 试样经过夜冷皂化后,醋酸调 pH 值至 6.0~7.5,定容离心后高效液相色谱法测定;色谱条件:色谱柱 SUPERIOREX ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相:甲醇+水=94+6。结果 方法的线性范围:维生素 A:0.25~3.00 μg/ml;γ-、δ-、α-维生素 E:10.0~150 μg/ml。相关系数(*r*)为0.9997~0.9999;方法的定性检出限维生素 A、γ-、δ-、α-维生素 E 分别为:0.40、5.0、5.0、8.0 μg/g;定量检出限:1.30、16.7、16.7、26.7 μg/g。高低两个浓度水平加标回收率 77.1%~105.0%;相对标准偏差(*RSD*)均 <5%。结论 本方法简便、快速、准确、重现性好,适用于强化食品中维生素 A、E 的测定。

关键词:维生素 A; 维生素 E; 高效液相色谱法; 冷皂化

中图分类号:O657.72; R977.21; R977.25 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)04-0344-04

Determination of Vitamin A and E in Fortified Foods by Cold Saponification-HPLC Method

ZHAO Hai-yan, ZHAO Rong, YANG Yong-hong, LUO Ren-cai

(Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China)

Abstract: Objective To establish a cold saponification-HPLC method for the determination of vitamin A and vitamin E in fortified foods. **Method** Samples were saponified over night, adjusted to pH 6.0-7.5 with acetic acid and determined by HPLC. Chromatographic conditions: using SUPERIOREX ODS column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mobile phase of methanol and water (94 + 6). **Results** The linearity ranges were 0.25-3.00 μg/ml for vitamin A and 10.0-150.0 μg/ml for vitamin γ-E, δ-E and α-E. The correlation coefficients were 0.9997-0.9999. The qualitative detection limit was 0.40 μg/g for vitamin A, 5.0 μg/g for vitamin γ-E and δ-E and 8.0 μg/g for vitamin α-E. The quantitative detection limits of the method were 1.30 μg/g for vitamin A, 16.7 μg/g for vitamin γ-E and δ-E, and 26.7 μg/g for vitamin α-E. The average recoveries of adding standards were 77.1%-105.0% and the relative standard deviation (*RSD*) of the method was less than 5%. **Conclusion** The method was simple, fast, accurate and reproducible and could be used to determine the contents of vitamin A and vitamin E in vitamin fortified foods.

Key words: Vitamin A; Vitamin E; HPLC; Cold Saponification

维生素 A (retinol) 和维生素 E (tocopherol) 是机体维持正常代谢和机能必需的脂溶性维生素。维生素 A 又称为视黄醇, 主要用来提高视力并且增强免疫系统功能, 过量摄入会引起食欲减退、过敏、疲劳、失眠、头痛及肌肉老化; 维生素 E 又称为生育酚, 生育酚结构复杂, 异构体种类多, 其生物活性也千差万别, 主要包括 α-、β-、γ-、δ-生育酚, 其中 α-生育酚的生物活性最高, 生育酚具有促进生育、延缓衰老、辅助抑制肿瘤的作用, 并对糖尿病并发症、动脉粥样硬化起到预防作用, 增补过量时会出现头痛、疲劳和视力异常现象。

文献报道测定维生素 A、E 的方法有分光光度法、荧光分析法、高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC)、双波电压法、示波极谱法等^[1]。由于反相高压液相色谱法^[2-4]灵敏度高、重现性较好, 是测定食品中维生素 A、E 最普遍的方法。食品中维生素 A、E 提取繁琐, 要经过高温皂化、液液萃取、高温浓缩等步骤, 由于维生素 A、E 对氧、紫外线、温度敏感, 操作过程中易被氧化破坏, 造成测定结果的重现性差。

本研究改善了常用的食品中维生素 A、E 前处理过程, 采用“冷皂化”法替代“高温回馏皂化”。冷皂化是用于制造 CP 皂 (手工冷皂) 的一种工艺, 即不需加热, 常温下让其自然皂化, Agarwal^[5] 曾将“冷皂化”用在维生素 D 的测定中, 结果与热皂相当。使用这种低温操作可以减少维生素 A、E 的损失; 皂

收稿日期: 2009-05-23

作者简介: 赵海燕 女 工程师 研究方向为食品污染物检测及保健食品功效成分 E-mail: zhaohy_yan@hotmail.com

化液经过中和,直接定容离心后 HPLC 测定^[6]。方法简便易行,避免了维生素 A、E 的损失,而且重现性很好。本文用建立的方法对几种强化食品中维生素 A、E 进行了测定,取得较好的结果。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪,配备有 Waters-Allains2695 泵控及自动进样系统,以及 Waters-2996 二极管阵列检测器;离心机(MIKRO-22, Hettich 公司)。

甲醇、乙醇、四氢呋喃(色谱纯,迪马公司);维生素 A、E(α -E、 γ -E、 δ -E)标准品(纯度 99%,Sigma 公司);试验用水均为超纯水;1+1 氢氧化钾溶液;没食子酸、冰醋酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

标准储备液的配制:用乙醇分别溶解 4 种维生素的标准品。临用前用紫外分光光度计分别标定此 4 种标准品的准确浓度,标定方法参照 GB/T 5009.82—2003《食品中维生素 A 和维生素 E 的测定》。

1.2 液相色谱条件

色谱柱 SUPERIOREX ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m);流动相:甲醇 + 水 = 96 + 4;波长 300 nm;流

速 1.0 ml/min;柱温 40 $^{\circ}$ C;进样体积 20 μ l。

1.3 样品处理

准确称取 0.2 ~ 3 g 样品于 50 ml 塑料离心管中,加入 5 mg 没食子酸和 15 ml 乙醇,充分摇匀将没食子酸完全溶解,然后加入 5 ml 1+1 氢氧化钾溶液再充入氮气,盖好瓶盖上摇床摇 1 h 后放置避光处过夜;取出样品后加入 5 ml 无水乙酸,放入冰浴待其冷却后用乙醇 + 四氢呋喃(1+1)溶液定容至刻度,再放入冰箱冷藏室 1 ~ 2 h 后取出,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 20 μ l 液相色谱测定。

1.4 定性及定量

分别取标准和样品各 20 μ l 进样,HPLC 测定,外标法定量。

$$C = \frac{c \times 50}{W}$$

其中,C:样品中的含量, μ g/g;c:维生素 E 的测定浓度, μ g/ml;W:样品重量,g。

2 结果

2.1 回归方程及检出限结果

取标准储备液配制标准系列,维生素 A 和 3 种维生素 E 在浓度范围内与响应值呈良好的线性关系,其结果见表 1。

表 1 方法的线性范围、回归方程及检出限

组分	线性范围(μ g/ml)	回归方程	相关系数	定性检出限(μ g/g)	定量检出限(μ g/g)
维生素 A	0.25 ~ 3.00	$y = 118000x - 3110$	0.9997	0.4	1.3
δ -维生素 E	10.0 ~ 150	$y = 8350x - 8800$	0.9998	5.0	16.7
γ -维生素 E	10.0 ~ 150	$y = 8960x - 9800$	0.9999	5.0	16.7
α -维生素 E	10.0 ~ 150	$y = 5220x - 7310$	0.9998	8.0	26.7

2.2 回收率和精密度试验

用配方中只含有维生素 A 和只含有维生素 E 辅料的样品互为本底,加入高、低两个浓度按上述方法进行测定,方法的回收率和精密度见表 2。

表 2 方法的回收率($n=6$)

组分	本底(μ g/g)	加标量(μ g/g)	测定值(μ g/g)	平均回收率(%)
维生素 A	0	87.5	67.5	77.1
		625.0	564.0	90.2
δ -维生素 E	0	245.0	252.5	103.0
		1220.0	1282.5	105.0
γ -维生素 E	0	305.0	285.0	93.4
		1525.0	1480.0	97.0
α -维生素 E	0	242.5	220.0	90.7
		1210.0	1102.5	91.1

对同一样品取样 6 份按 1.3 方法处理后进样测定,结果分别为维生素 A:674、692、684、711、658、736 μ g/g; δ -维生素 E :0.63、0.61、0.65、0.62、

0.63、0.62 mg/g; γ -维生素 E:1.13、1.20、1.15、1.17、1.14、1.15 mg/g; α -维生素 E:54.5、54.3、53.5、53.1、52.9、54.1 mg/g。方法的相对标准偏差分别为 4.0%、2.2%、2.2%、1.2%。

2.3 传统方法和本文的比较结果

用高、中、低 3 个含量的样品分别用传统的方法和本文的方法进行了比较,试验结果见表 3。结果证明采用冷皂化法减少了维生素 A、E 被氧化破坏的量,调节 pH 值后直接定容减少了提取中液液萃取维生素 A、E 的损失,这对于高含量的样品尤其明显。

表 3 两种不同提取方法的比较

样品	维生素 A(μ g/g)		α -维生素 E ^a (mg/g)	
	传统方法	本方法	传统方法	本方法
1	4.74	4.96	0.336	0.344
2	661.0	720.4	13.8	14.7
3	1300	2000	316	344

注:a 表示样品中只含 α -维生素 E。

2.4 实际样品的测定结果

对12种样品进行了测定,其中片剂、胶囊和油丸各4种。

表4 实际样品的测定结果(n=5)

样品	维生素 A (μg/g)	δ-维生素 E (mg/g)	γ-维生素 E (mg/g)	α-维生素 E (mg/g)
片剂				
1	746.00	/	/	14.50
2	472.00	/	/	10.20
3	247.00	/	/	/
4	338.00	/	/	33.90
胶囊				
5	/	/	/	5.06
6	/	/	/	65.50
7	/	/	/	1.50
8	/	/	/	92.60
油丸				
9	/	/	/	4.80
10	/	/	/	38.30
11	/	/	/	18.10
12	/	82.80	167.90	29.80

注:/表示未检出。

3 讨论

3.1 液相色谱条件的优化

本文通过实验选择了 SUPERIOREX ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱作为分析柱,分别以甲醇+水 98+2、95+5、94+6 为流动相配比进行实验,确定了最佳液相色谱条件。流动相:甲醇+水=94+6;在此条件下,3种维生素 E 和维生素 A、D 及杂质都能完全分离(见图1和图2)。

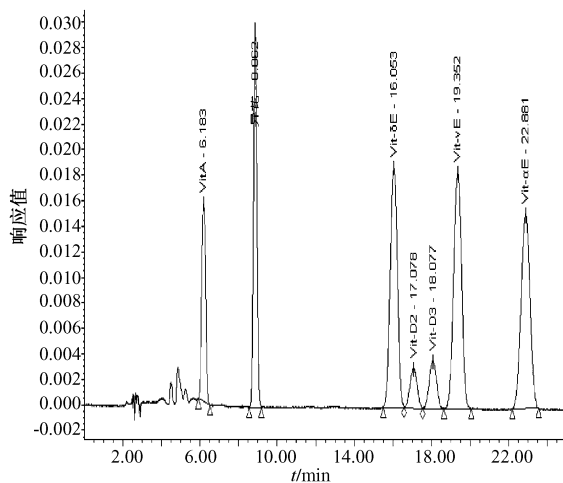


图1 标准色谱图

3.2 样品制备方法的优化

3.2.1 皂化时没食子酸量的确定 维生素 A、E 极易被氧化,没食子酸是一种抗氧化剂,加入皂化液中

可以防止维生素 A、E 被破坏。分别在皂化液中加入没食子酸 1、3 和 5 mg 进行试验,结果证明在 1 和 3 mg 时,维生素 A 都有部分损失,而在 5 mg 时基本没损失;维生素 E 变化不大。

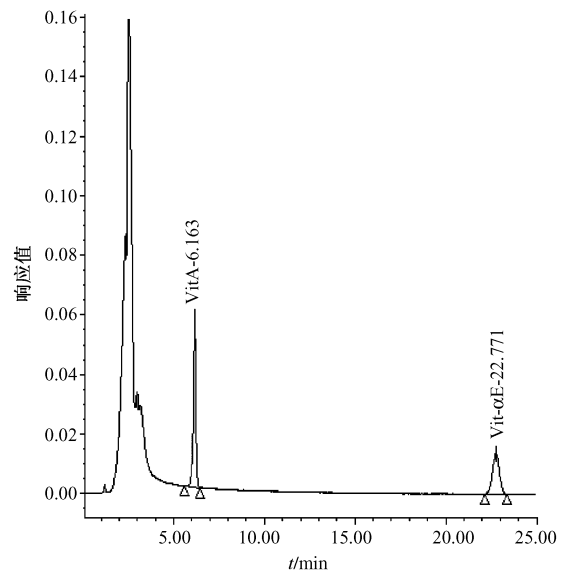


图2 样品色谱图(只含有 α-维生素 E)

3.2.2 皂化时氢氧化钾量的确定 根据 GB/T 5009.82—2003 方法,样品皂化时需加入 1+1 氢氧化钾 10 ml,而本文针对的样品主要是强化食品,含量较高,称样量比较小,通过试验当称样量在 3 g 以内(含 3 g)时加入 1+1 氢氧化钾 5 ml,放置过夜后样品可以皂化完全。

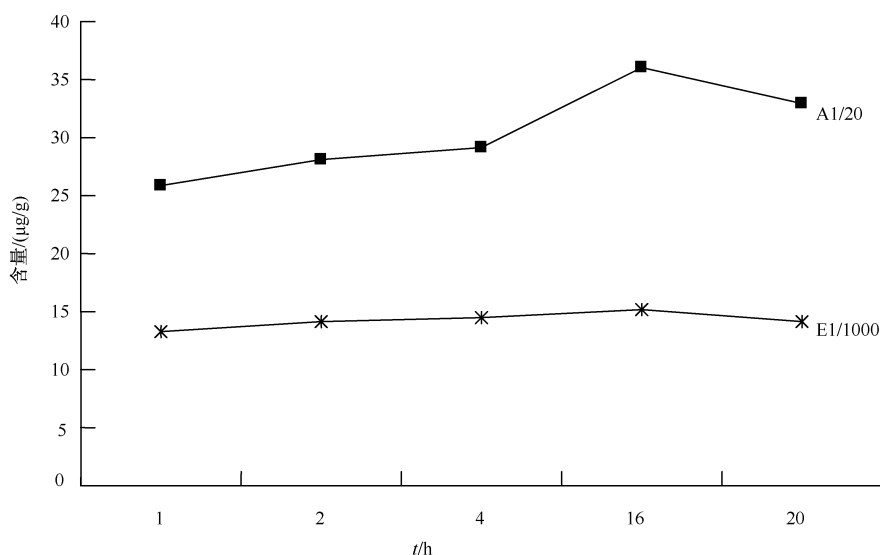
3.2.3 冷皂化时间的优化 本文通过试验确定了冷皂化的放置时间。选用放置时间 1、2、4、16 和 20 h 进行试验,用不同皂化时间下样品中待测组分的含量做了时间曲线,见图 3,发现冷皂化样品需要过夜放置才能够皂化完全,而在 20 h 时含量有所下降,尤其对维生素 A 的含量影响较大。

3.2.4 样品 pH 值调节 做了片剂、胶囊、蛋白粉/奶粉、油丸 4 种不同类型样品 50 件,在皂化液中都加入冰醋酸 5 ml 调节,其 pH 值都在 6~7.5 之间,这样直接进样对色谱柱不会造成影响。

3.2.5 定容溶剂的选择 定容时用乙醇和用 1:1 (乙醇/四氢呋喃) 对测定结果没有影响,加入四氢呋喃只是为了加快皂化液的沉淀,放置时间缩短;若用乙醇定容放置最好过夜,这样对色谱柱损伤比较小。

4 结论

方法简便易行、快速、准确,而且重现性很好。用建立的方法测定强化食品中维生素 A、E,取得较好的结果。



注:为了将维生素 A、E 一起作图,将维生素 A 的含量除以 20,维生素 E 的含量除以 1000 作图。

图3 皂化时间曲线

参考文献

- [1] 樊明涛,吴守一,马海乐,等. 维生素 E 测定方法的研究进展 [J]. 江苏理工大学学报:自然科学版,2002,23(1):24-27.
- [2] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.82—2003 食品中维生素 A 和维生素 E 的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [3] 国家技术监督局. GB/T 5413.9—1997 婴幼儿配方食品和乳粉 维生素 A、D、E 的测定[S]. 北京:中国标准出版社,1997.
- [4] 国际生命科学学会中国办事处,中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,中国营养学会保健食品分会. 食品营养成分检测技术学术研讨会—维生素专题[C]. 北京,2006.
- [5] AGARWAL V K. Determination of fat-soluble vitamins in yogurt by HPLC with electrochemical detection [J]. J Assoc Off Anal Chem,1988,71:19.
- [6] American Organization of Analytical Chemists. AOAC official method 2001.13; determination of vitamin A (retinol) in foods liquid chromatography [S/OL]. 2001. [2009-05-20]. <http://www.doc88.com/p-78448262960.html>.

实验技术与方法

电感耦合等离子体质谱法测定饮料、啤酒及果汁中的碘

吕超^{1,2} 刘丽萍¹ 谭玲^{1,3}

(1. 北京市疾病预防控制中心,北京 100013; 2. 北京化工大学,北京 100029;
3. 北京大学公共卫生学院,北京 100191)

摘要:目的 建立饮料、啤酒及果汁中碘的电感耦合等离子体质谱检测方法。方法 采用四甲基氢氧化铵和过氧化氢提取样品,通过电感耦合等离子体质谱法测定,以碲(¹²⁸Te)为内标;射频(RF)功率:1380 W;载气流速 1.08 L/min;碘 *m/z* 127。结果 方法的线性范围 0~400 µg/L,相关系数(*r*)优于 0.999 0,方法检出限为 0.25 µg/L,加标回收率为 88.8%~106.3%,相对标准偏差(*RSD*) < 5%。结论 所建方法灵敏度高、简便快速、准确,适用于饮料、啤酒及果汁中的碘测定,既适用于一般市售饮料,同时也可作为碘强化饮料中碘含量的测定方法。

关键词: 饮料; 啤酒; 果汁; 碘; 电感耦合等离子体质谱法

中图分类号:O657.63 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)04-0347-04

收稿日期:2009-12-15

作者简介:吕超 男 硕士生

通信作者:刘丽萍 女 主任技师 研究方向为理化检验,光谱、质谱研究 E-mail:LLp9312@yahoo.com.cn