

HPLC 同时测定保健食品中 维生素 A、D₃、E 和 β -胡萝卜素

曾红燕*, 邹晓莉, 黎源倩, 许建勤

(四川大学华西公共卫生学院卫生检验教研室, 成都 610041)

摘 要: 建立了一种同时测定保健食品中维生素 A、D₃、E、 β -胡萝卜素的高效液相色谱法。样品皂化后乙醚提取, 旋转蒸干, 流动相溶解, HPLC 紫外检测。实验结果显示, VA、VD₃、VE 和 β -胡萝卜素的线性范围分别为 0.012 ~ 500、0.030 ~ 500、0.12 ~ 500 和 0.015 ~ 500 $\mu\text{g/mL}$, 且浓度范围内线性良好; 检出限分别为 0.24、0.60、2.40 和 0.30 $\mu\text{g/g}$; 相对标准偏差分别为 1.9%、3.4%、4.6% 和 2.9%; VA、VD、VE 和 β -胡萝卜素的加标回收率为 84.8% ~ 119.0%。分析周期在 20 min 以内, 方法适合保健食品样品的分析。

关键词: 维生素 A; 维生素 D₃; 维生素 E; β -胡萝卜素; 高效液相色谱法; 保健食品

中图分类号: O657.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-0720(2008)02-015-04

维生素 A (retinol)、维生素 D₃ (Vitamin D₃)、维生素 E (tocopherol) 和 β -胡萝卜素 (β -carotene) 是机体维持正常代谢和机能必需的脂溶性维生素, 缺乏会导致夜盲症、佝偻病等, 但是这些维生素在体内不能合成或合成量不能完全满足机体的需要, 因而常被用来强化食品, 特别是婴幼儿食品, 是评价食品营养价值的重要指标。但由于脂溶性维生素较易蓄积在人体里, 含量过高时会导致中毒, 因而需要对强化了这些营养成分的保健食品进行监测。HPLC 已广泛应用于脂溶性维生素的测定^[1~3]。但是目前国家食品理化检验标准方法仅限于维生素 A 与维生素 E 的同时测定 (GB/T5009.82 - 2003) 以及对 β -胡萝卜素的单独测定 (GB/T5009.83 - 2003)^[4], 测定时间较长、方法繁琐。而对于保健食品中维生素 A、D₃、E 和 β -胡萝卜素同时测定的方法, 在国内外文献检索中少见报道, 但在保健食品中往往同时添加这些脂溶性维生素。因此, 本研究拟建立一种快速、灵敏、准确的反相高效液相色谱法来同时测定食品中的维

生素 A、维生素 D₃、维生素 E 和 β -胡萝卜素, 使得样品处理简单易行, 分析总周期能够缩短。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪附紫外检测器 (Agilent Technologies Co. Ltd, USA); RE-52C 旋转蒸发器 (巩义市英峪予华仪器厂)。

维生素 A、D₃、E 和 β -胡萝卜素标准品 (购自 sigma 公司); 乙腈、CH₂Cl₂、甲醇 (色谱纯); 无水乙醇、乙醚 (分析纯)。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱: Supelco C₁₈ 柱 (25 cm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: V(乙腈): V(CH₂Cl₂): V(甲醇) = 70:20:10, 流动相程序: 0 ~ 9 min 流速 1.0 mL/min, 9 ~ 16 min 保持 1.5 mL/min; 检测波长 462 nm (β -carotene)、324 nm (Vitamin A)、263 nm (Vitamin D₃)、291 nm (α -tocopherol), 检测波长切换程序: 0 ~ 5 min 为 324 nm, 5

收稿日期: 2006-11-02; 修订日期: 2007-01-21

基金项目: 国家自然科学基金 (30571559) 项目资助

作者简介: 曾红燕 (1968 -), 女, 副教授; E-mail: zenghongyan@163.com

~8.6 min 为 263 nm, 8.6 ~ 12 min 为 291 nm, 12 ~ 20 min 为 462 nm。

1.2.2 标准贮备液的配制 分别称取维生素 A、D₃、E、β-胡萝卜素 0.025 g 于 25 mL 容量瓶中, 其中维生素 A、D₃、E 用甲醇, β-胡萝卜素用 CH₂Cl₂ 溶解并定容, 摇匀, 成为 1 mg/mL 维生素标准贮备液, 放置于 -4 °C 的冰箱中备用。

1.2.3 标准应用液的配制 用流动相稀释维生素 A、D₃、E 和 β-胡萝卜素标准贮备液, 配制成 10 μg/mL 的溶液。

1.2.4 样品处理 准确称取 0.1 g 均匀样品, 置于 125 mL 皂化瓶中, 加 100 g/L 维生素 C 5 mL 以及 30 mL 无水乙醇, 搅拌均匀后, 加入 500 g/L KOH 10 mL, 摇匀, 80 °C 水浴回流 30 min, 不时摇匀, 使皂化完全。皂化后立即置冰水浴中冷却, 再将皂化液转移至 250 mL 分液漏斗, 用 20 mL 乙醚分两次洗涤皂化瓶, 洗液一并倒入分液漏斗, 振摇 100 次后静置分层, 水层分入另一分液漏斗中, 再用 10 mL 乙醚提取一次, 合并醚层。然后用水洗涤醚层至中性后过无水硫酸钠, 并用少量乙醚洗涤分液漏斗和无水硫酸钠, 合并醚层, 40 °C 水浴下旋转蒸干后迅速用流动相定容至 2.0 mL, 进样 10 μL 测定。整个过程避光操作。混合标准和样品色谱图分别见图 1、图 2。

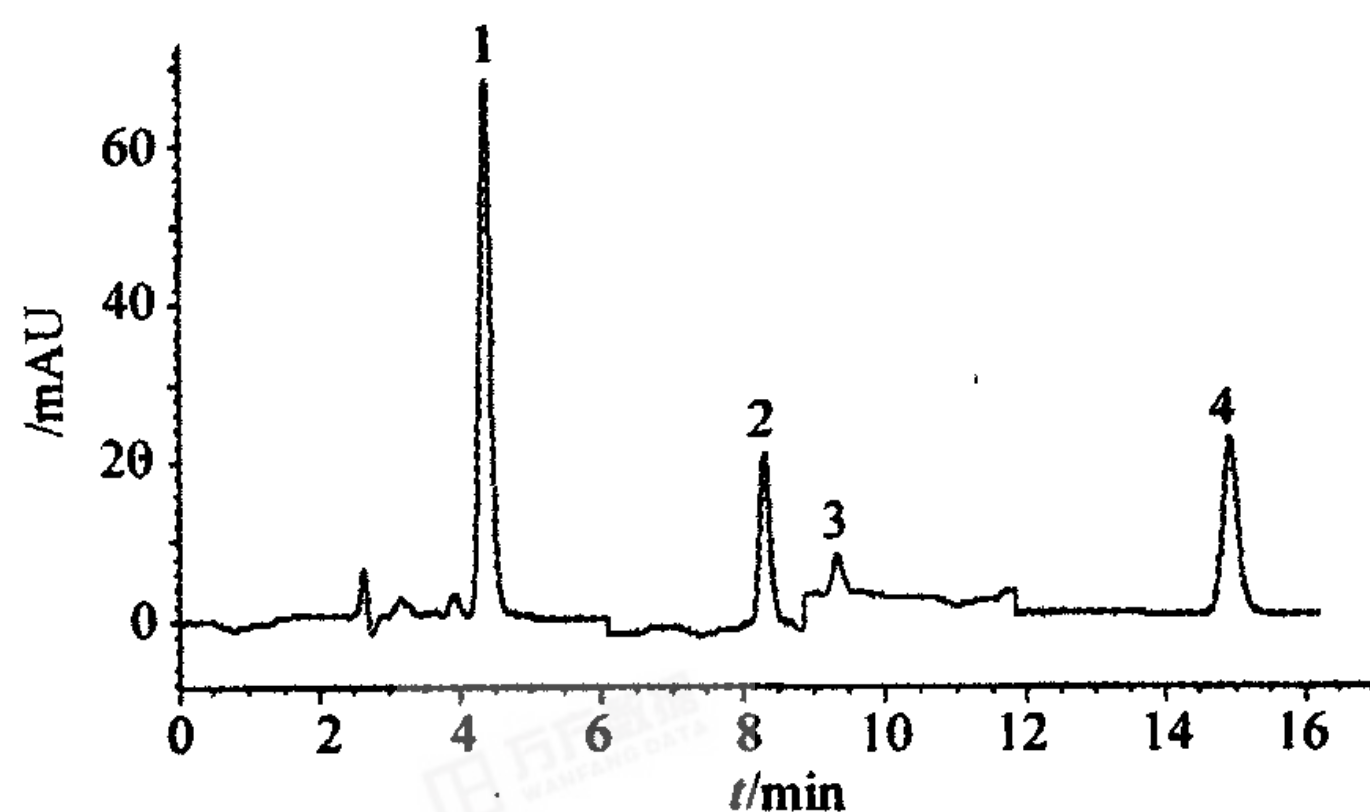


图 1 脂溶性维生素标准色谱图

Fig.1 Chromatogram of the standard solution

1 - VA; 2 - VD₃; 3 - VE; 4 - β-carotene

1.2.5 标准曲线的绘制 分别取适量 1.0 mg/mL 维生素标准贮备液, 用流动相稀释成不同浓度的混合标准系列, 进样 10 μL 进行 HPLC 测定, 以维生素标准溶液浓度为横坐标, 相应的峰面积为纵

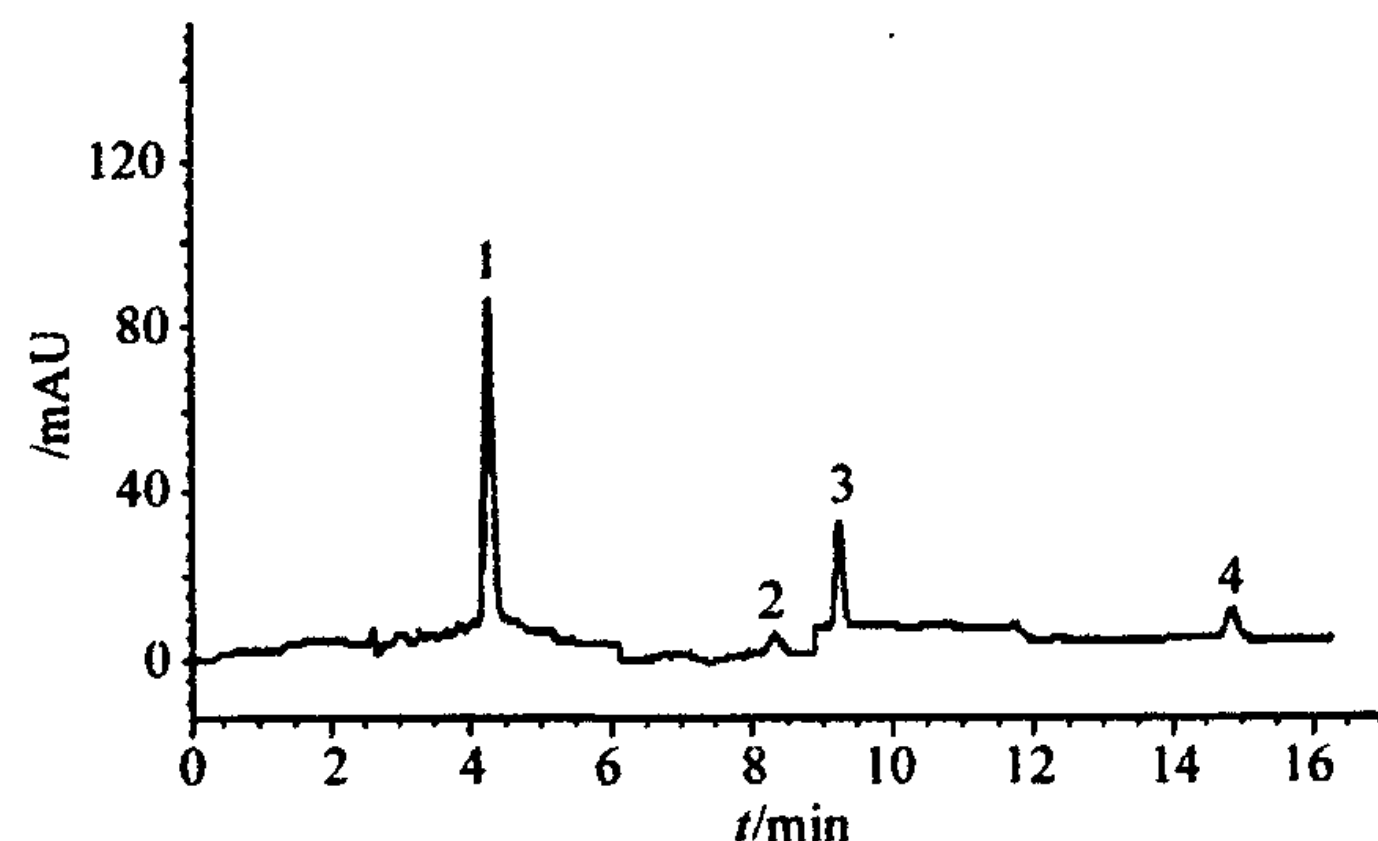


图 2 样品色谱

Fig.2 Chromatogram of the sample solution

1 - VA; 2 - VD₃; 3 - VE; 4 - β-carotene

坐标绘制标准曲线或进行线性回归。

1.2.6 样品测定及计算 根据样品测定的色谱峰面积, 在相应的标准曲线查出对应的待测组分的量, 结合所取的样品质量和定容体积计算各组分的质量分数。

2 结果与讨论

2.1 样品处理条件的选择

2.1.1 提取溶剂的选择 分别用乙醚与石油醚提取同一样品中的脂溶性维生素后测定, 以各维生素测得值作为指标评价两试剂的提取效果。实验结果表明, 两种溶剂对 VA、VD₃ 和 VE 提取效果差别不大; β-胡萝卜素在乙醚中提取效果比石油醚高。且蒸干浓缩中, 乙醚比石油醚易挥发, 操作时间短, 故选择乙醚提取样品中的脂溶性维生素。

2.1.2 提取体积的选择 选择脂溶性维生素含量较高的样本 1, 每次用 10 mL 乙醚提取, 按前述方法处理后进行测定, 考察提取溶剂的体积对提取的影响。实验结果表明, VA、VD₃、VE 用 20 mL 乙醚提取, β-胡萝卜素用 30 mL 乙醚提取可以将其提取完全, 故选择 30 mL 乙醚分 3 次提取待测维生素。

2.2 色谱条件选择

2.2.1 测定波长的选择 在岛津 UV260 紫外分光光度计上对 VA、VD₃、VE 和 β-胡萝卜素标准溶液进行波长扫描, 最大吸收波长分别在 324、263、291 和 462 nm 处, 实验选择用波长切换使各维生素在其最大波长下进行测定。

2.2.2 流动相的选择 首先采用了恒定流速 (1.0 mL/min) 的纯甲醇作为流动相进行实验, VA、VD₃、VE 在 12 min 内出峰, 但 β-胡萝卜素 40 min 后仍未

出峰;加入不同比例的乙腈,β-胡萝卜素出峰时间仍未见改善。考虑到β-胡萝卜素在CH₂Cl₂中溶解度较高,因此在流动相中添加CH₂Cl₂。结果显示,随着CH₂Cl₂比例增大,VA、VD₃、VE保留时间变化不大,但β-胡萝卜素保留时间逐渐缩短。当CH₂Cl₂比例达到30%时,β-胡萝卜素仍在30min左右才能出峰。由于CH₂Cl₂容易挥发,比例达30%时,流动相容易产生气泡,因此,降低CH₂Cl₂比例为20%,并提高流速,以加快β-胡萝卜素出峰。当流速增至1.5 mL/min时,β-胡萝卜素在20 min内可出峰,但VA保留时间仅2 min左右,不能与样品杂质分离。故采用流速线性梯度洗脱,流

动相定为V(乙腈):V(CH₂Cl₂):V(甲醇)=70:20:10,在0~9 min内,先保持1.0 mL/min的流速,VE出峰后,将流速迅速提到1.5 mL/min,使β-胡萝卜素尽快出峰,在此实验条件下,各种维生素与样品杂质能够得到良好分离,且20 min内即可完成一个分析周期。

2.3 标准曲线线性范围和检出限

配制不同浓度维生素标准溶液,按标准曲线步骤进行实验,考察方法的线性范围;以3倍基线噪声所对应的维生素浓度计算方法的检出限,结果见表1。

表 1 标准曲线线性范围和检出限

Tab.1 The linear range and detection limit

组分	线性范围 $\rho/(\mu\text{g/mL})$	线性回归方程	相关系数	检出限/ $(\mu\text{g/g})$
VA	0.012 ~ 500	$y = 17.11\rho - 130.91$	0.9993	0.24
VD ₃	0.030 ~ 500	$y = 15.97\rho - 137.92$	0.9992	0.60
VE	0.12 ~ 500	$y = 3.08\rho - 26.52$	0.9991	2.40
β-胡萝卜素	0.015 ~ 500	$y = 31.17\rho + 1.59$	0.9985	0.30

2.4 标准溶液的稳定性

配制各维生素10 μg/mL的标准应用液,连续7天进行测定,以峰面积的RSD考察维生素标准溶液的稳定性,结果显示,VD₃、VE的标准溶液在4℃至少可稳定一周,VA标准溶液配制4天后峰面积略有下降,而β-胡萝卜素的标准液稳定性差,必须临用新配。

2.5 精密度实验

同一天内对同一标准溶液连续测定8次,以峰面积的相对标准偏差(RSD)考察精密度,相对标准偏差分别为VA 1.9%、VD₃ 3.4%、VE 4.6%和β-胡萝卜素 2.9%。

2.6 加标回收实验

分别称取9份平行样品,加入不同水平的标准溶液,进行加标回收实验($n=3$),平均回收率在84.8%~119.0%之间,结果见表2。

2.7 与国家食品理化检验标准方法的比较

因国家食品理化检验标准方法中仅有维生素A、E同时测定和β-胡萝卜素测定的方法,本次实验仅比较了维生素A、E以及β-胡萝卜素的测定结

果。测定了两个保健食品样品,本方法与国家食品理化检验标准方法的相对误差在-7.89%~4.94%范围内,结果基本一致。

表 2 样品加标回收实验

Tab.2 The results of spiked recovery tests ($n=3$)

组分	本底值 $w/(\mu\text{g/g})$	加入量 $w/(\mu\text{g/g})$	测得值 $w/(\mu\text{g/g})$	平均回收率 /%
VA	161.1	300.6	416.1	84.8
	161.1	80.5	250.6	111.2
VD ₃	22.3	45.2	63.2	90.5
	22.3	11.5	35.4	113.9
VE	567.7	1210.7	2007.9	119.0
	567.7	265.2	823.1	96.3
β-胡萝卜素	18.2	35.6	58.5	113.2
	18.2	10.5	27.8	91.4

参考文献

- [1] Carsten K. Anal Bio-chem, 2003, 315: 36
- [2] J M Quesada, J M Mata-Granados, M D Luque de Castro. Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 2004, 89(9):

473

[3] Pavlos F. Chatzimichalakis, Victoria F. Samanidou, Ioannis N. Papadoyannis. J Chromatogr B, 2004, 80(5): 289

[4] GB/T 5009.82-2003, GB/T 5009.83-2003, 食品卫生检验方法

Simultaneous determination of retinol, vitamin D₃, tocopherol and β -carotene in health food by HPLC

ZENG Hong-yan*, ZOU Xiao-li, LI Yuan-qian and XU Jian-qin (West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041), Fenxi Shiyanshi, 2008, 27(2): 15 ~ 18

Abstract: A method for simultaneous determination of retinol (vitamin A), vitamin D₃, tocopherol (vitamin E) and β -carotene in health food by HPLC was developed. The samples were saponified. The liposoluble vitamins were extracted by aether. The organic layer was dried by rotation evaporation, dissolved by mobile phase, and analyzed by HPLC. The linear ranges were 0.012 ~ 500 $\mu\text{g/mL}$, 0.030 ~ 500 $\mu\text{g/mL}$, 0.12 ~ 500 $\mu\text{g/mL}$, 0.015 ~ 500 $\mu\text{g/mL}$ and the detection limits were 0.24, 0.60, 2.40 and 0.30 $\mu\text{g/g}$ for retinol, VD₃, tocopherol and β -carotene respectively. The relative standard deviations (RSDs) for retinol, VD₃, α -tocopherol and β -carotene were 1.9%、3.4%、4.6% and 2.9% respectively. The recoveries were 84.8% ~ 111.2%, 90.5% ~ 113.9%, 96.3% ~ 119.0% and 91.4% ~ 113.2% for retinol, VD₃, tocopherol and β -carotene respectively. The separation was completed within 20 min. The method was simple, rapid, sensitive and accurate. It can be used to simultaneously determine liposoluble vitamins in health food.

Keywords: Retinol (vitamin A); Vitamin D₃; Tocopherol (vitamin E); β -carotene; High performance liquid chromatography; Health food

国际冶金及材料分析测试学术报告会征稿通知

为促进全球范围内冶金及材料分析测试技术的交流和发展,国际钢铁工业分析委员会(ICASI)拟举办首次国际学术年会(ICASI' 2008),本次年会将与中国金属学会第十四届冶金及材料分析测试学术报告会(CCATM' 2008)协同举办。热忱欢迎冶金、材料、矿山、化工、机械、地质、环保、外贸、国防、商检等单位、部门或院校从事冶金分析、无损检测、物理检验及力学测试等的技术人员及管理者踊跃投稿,积极参加。

时间/地点: 2008 年 11 月 4 ~ 7 日, 北京, 中苑宾馆

主办者: 国际钢铁工业分析委员会、中国金属学会、中国机械工程学会

征稿范围: 征稿范围将涵盖材料及冶金分析测试相关的综述、研究报告、技术应用报告以及实践工作交流等。包括(不限于): 试样前处理及湿法分析、等离子光谱、等离子质谱、原子吸收光谱、原子荧光光谱、火花光谱、激光光谱、辉光光谱/辉光质谱、X-荧光光谱、材料气体分析、状态分析、原位统计分布分析、材料表面/界面分析、冶金过程在线及环境分析、微束分析、材料微观解析、失效分析及动态断裂、力学试验、物性分析、无损检测、实验室管理与质量控制等。

论文提交: 可分时段提交摘要及全文。摘要的提交期限为 2008 年 4 月 30 日, 论文及会议交流 PPT 文件的提交期限为 2008 年 6 月 30 日。论文格式请参考《冶金分析》期刊论文。来稿请注明详细通讯地址、邮编、电话、E-mail。

联系方式: E-mail: society@icasi-society.org; yejinfenxi@163.com

电话: 010-62188310/62182398 传真: 010-62181163

地址: 北京海淀区学院南路 76 号 14 信箱, ICASI 秘书处

邮编: 100081