

高效液相色谱法 对鹅肉中维生素E的含量的测定

曾艳兵, 李伟红, 严寒, 尹德凤, 魏爱花, 罗林广

(1. 江西省农业科学院农产品质量安全与标准研究所;

2. 农业部肉及肉制品质量监督检验测试中心, 江西 南昌 330200)

摘要: 目的: 建立反相高效液相色谱-二极管阵列检测法(HPLC-DAD)测定动物性食品中维生素E(α -生育酚)的含量。方法: 称取一定量鹅肉样品加入乙醇、氢氧化钾及抗坏血酸, 100℃水浴皂化30min, 乙醚提取后, 减压浓缩, 氮气吹致干, 用脱醛乙醇溶解, 进样10 μ L分析; 色谱条件为: SunFire TmC18柱C18柱(15cm $\times$ 4.6mm, 5 μ m), 流动相: 甲醇: 水(98:2), 柱温30℃, 检测波长300nm。结果: 维生素E在0.10-50.0 mg/L浓度范围内相关系数 $r=0.9985$ 。结论: 该方法能快速、灵敏、准确实现对动物性食品中脂溶性维生素E的含量分析。

关键词: 维生素E; 鹅肉; 高效液相色谱法; 二极管阵列检测器

Determination the Concentration of α -Tocopherol in Goose by HPLC with Diode Array Detector

ZENG Yanbing, LI Weihong, YAN Han, YIN Defeng, WEI Aihua, LUO Linguang

(1. Institute of Agricultural Product Quality Safety and Standards Jiangxi ;

2. Academy of Agricultural Sciences, The Centre of Inspection and Testing for Meat and Meat-products, Ministry of Agriculture, Nanchang Jiangxi , China)

Object: To determinate the concentration of α -tocopherol in the goose using HPLC with DAD. **Methods:** Goose was added in anhydrous alcohol, potassium hydroxide and vitamin C. The mixture was shaken and saponified at 100℃ for 30 minutes, following extracted by ether and dried by evaporation, dissolved in ethanol grain alcohol, and analyzed by HPLC-DAD, α -tocopherol was separated on SunFire TmC18, 15 cm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m column and detected at 300nm by using methanol:water (98:2) as mobile phase when the column temperature was 30℃. **Result:** The linear ranges of determination of α -tocopherol was 0.1~50.0mg/L($r=0.9985$). The α -tocopherol in goose is 0.264 μ g/mL **Conclusion:** The method is sensitive, simply and accurate. It can be used to determine the concentration of α -tocopherol in animal food.

Key words: α -Tocopherol; goose; HPLC-DAD

中图分类号: TS251.7 文献标识码: B 文章编号: 1001-8123(2009)08-0059-03

禽肉中含有丰富的蛋白质、脂肪、无机盐和维生素,然而禽肉中维生素E的含量比畜肉则丰富许多。维生素E具有抗氧化作用,所以一般禽肉可在-18℃冷藏一年而不酸败,因此,维生素E的含量也就成为判断禽肉营养品质的指标。维生素E又称为生育酚,其中以 α -生育酚的生物活性最高,具有促进生育、抗衰老的作用。维生素E在外界环境中不稳定,容易受光、氧等影响而被氧化破坏,由于影响因素较多,仍然是目前分析技术的难点。寻找快速、准确、重现性好的分析方法仍是分析工作者所追求的目标。目前,对于食品中维生素E含量的分析,报道主要集中在油类、乳制品、蔬菜和水果中的分析^[1-4],关于维生素E在动物源性食品中的分析报道还不多见。对维生素E的检测方法主要有荧光法、HPLC法等^[5-7]。正相HPLC因溶剂纯度要求高、价贵、且要接触较多对人体有害的有机溶剂,一般尽量避免使用;目前报道的反相HPLC测定法^[8-9]样品经提取后,涉及多次蒸发、溶解等步骤,样品处理较烦琐、费时,且易造成待测成份的破坏,导致测定结果偏低。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

高效液相色谱仪Waters 2690型,配996紫外检测器、Millennium 32色谱工作站;色谱柱:SunFire TmC18柱,15cm×4.6mm,5 μ m,购自Waters公司;旋转蒸发仪购自上海申生科技有限公司;DL- α -生育酚标准品、甲醇、乙腈(色谱纯),购自Merck公司;其他试剂除注明外均为分析纯。无水乙醇经脱醛处理后使用,具体操作方法为:取2g AgNO₃用少量水溶解,倒入1L无水乙醇中,加4g NaOH,摇匀,避光放置2d,隔半天摇一次,滤纸过滤后,滤液用旋转蒸发仪蒸馏,弃去最初和最后各50 mL馏出液。

1.2 标准溶液的配制

储备液:精确称取标准品 α -生育酚,用脱醛异丙醇溶解使浓度为0.10 g/mL,储于-20℃冰箱中。工作液:测定前用脱醛异丙醇稀释维生素E储备液,使浓度为1mg/mL。应用液:用脱醛乙醇将工作液稀释成一定浓度的标准系列溶液。

1.3 样品处理及测定

准确称取10.0g 鹅肉均质样品,置于200 mL皂化瓶中,加入10%抗坏血酸溶液5mL,搅拌均匀后,加入KOH(1+1)溶液10mL,加入无水乙醇30mL,摇匀,避光,100℃水浴中回流30 min,不时摇匀,使皂化完全。皂化后立即置于冰水浴冷却,冷却后将样品转移到250 mL分液漏斗中,用水50mL分2次洗

皂化瓶,洗液并入分液漏斗,用乙醚约100mL两次洗皂化瓶,并入分液漏斗,轻摇振摇,萃取,静置分层,收集乙醚层于另一分液漏斗,再用乙醚30mL提取水层,合并乙醚层。用去离子水反复洗分液漏斗中乙醚,直至用pH试纸检查水层不显碱性。将乙醚提取液经无水硫酸钠滤入蒸馏瓶中,在50℃下减压蒸干,用脱醛乙醇溶解定容至2.0mL,过0.45 μ m微孔滤膜后,进样10 μ L进行测定。仪器条件如下:流动相甲醇:水=98:2,流速1.0mL/min,柱温30℃,波长扫描范围:200-370nm,检测波长为300 nm。

1.4 标准曲线的制备

用脱醛乙醇将工作液稀释成标准系列溶液,使浓度分别为 α -生育酚(ug/mL):2、4、6、8、10。将标准系列溶液进样10 μ L进行测定。用峰面积比浓度绘制标准曲线。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

通过比较几种流动相,分别为甲醇:异丙醇(95:5)、甲醇:水(95:5)、甲醇:水(98:2),发现在甲醇:水(98:2)条件下, α -生育酚和样品中干扰物能达到较好的基线分离;在0.2~1.0mL/min范围内改变流动相流速,在流速为0.6~1.0mL/min α -生育酚可实现出峰时间合适,峰形较好,干扰少(见图)。

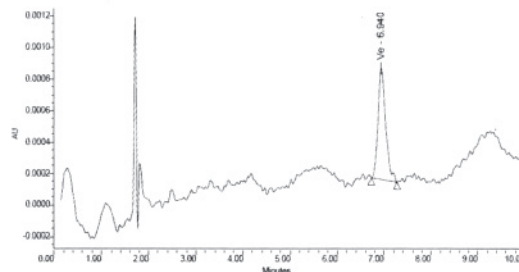


图1 2.5 μ g/mL α -生育酚标准品色谱图

Figure 1 The standard chromatogram of 2.5 μ g/mL α -tocopherol

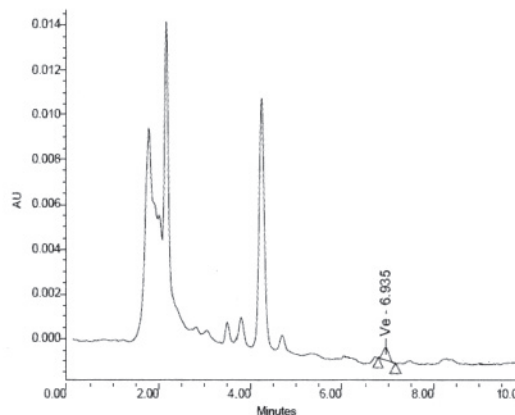


图2 鹅肉中 α -生育酚标准品色谱图

Figure 2 The chromatogram of α -tocopherol in goose

对 α -生育酚标准溶液用紫外光谱仪进行扫描,为保证二极管阵列检测器检测波长范围包含所需波长,我们确定波长扫描范围在200~370nm之间;进样量大可提高测定的灵敏度。发现 α -生育酚在298nm处有最大吸收峰,从二极管阵列检测器的紫外吸收光谱图也证实了这个结果,实际测定时采用波长300nm。

2.2 样品处理条件的选择

动物源性食品中脂溶性维生素多是以酯类形式存在,因此,在对样品进行处理时,首先必须将其进行皂化,使维生素E变成游离态的形式,然后进行提取和净化。选择合适的皂化条件如皂化剂浓度、皂化温度和时间对于维生素E的解离具有十分重要的影响。通过比较几种不同的皂化剂及不同浓度,最后我们选择10mL KOH溶液(1+1);同时也发现温度越高皂化效果越好,因此我们选择的皂化温度为100℃。皂化直至完全成溶液状。游离的维生素E易被氧化,通过比较抗坏血酸、BHA、对苯二酚等几种抗氧化剂,我们选择了在皂化液中加入10%抗坏血酸,实践证明可有效地保护维生素E不被氧化。

2.3 标准曲线的线性范围和最低检测量

将标准系列溶液进样10 μ L进行测定,鹅肉中 α -生育酚的含量为0.264 μ g/mg, α -生育酚在0.10~50.0mg/L浓度范围内相关系数 $r=0.9985$ 。以基线噪声三倍峰面积对应的 α -生育酚含量作为最低检测限, α -生育酚的最低检测量为0.1 μ g。

参考文献

[1] 郑明慈. 高效液相色谱法同时测定维生素A/E及

胡萝卜素[J]. 华夏医学, 1999, 12 (2): 123.

- [2] 文小青, 杨月欣. 食物中维生素A、叶酸和维生素E分析方法研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16 (1): 65~70.
- [3] 乔坤云. HPLC分析测定葡萄籽油中的维生素A和维生素E[J]. 仪器仪表与分析监测, 2002, 3: 22~23.
- [4] 刘红河, 尹江伟, 仲岳桐, 等. HPLC-DAD同时测定食品中维生素A、D、E研究. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(9): 1047~1049.
- [5] 刘旭辉, 玉秀芬, 莫书幸. 维生素E的荧光谱特征及天然芦荟汁中维生素E的荧光定性分析方法的实验研究[J]. 河池师专学报(自然科学版), 2002, (4): 57~59.
- [6] 邵裕坤, 徐军, 王珏. 反相高效液相色谱法同时测定血清中维生素A, D3, E. [J]. 中国现代应用药学杂志, 2005, 22(6): 503~505.
- [7] 李伟红, 戴廷灿, 曾艳兵, 等. 提高畜禽肉中金霉素残留量检测灵敏度的高效液相色谱测定法[J]. 江西农业学报, 2005, 17 (4): 56~59.
- [8] F. Javier Rupérez, Coral Barbas, Mario Castro, et al. Determination of α -tocopherol and α -tocopheryl acetate in diets of experimental animals[J]. Journal of Chromatography A, 1999, 839(1-2): 93~99.
- [9] H. Qian, M. Sheng. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro-vitamin D2 in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis. Journal of Chromatography A[J]. 1998, 825(2): 127~133.