

液相色谱电化学安培检测奶粉中的 脂溶性维生素 A、E 和 D₃

钱 疆, 余孔捷, 杨 方

(福建检验检疫局, 福建 福州 350001)

摘 要: 利用维生素 A、D₃、E 均有电化学活性的特点, 采用电化学安培检测, 建立了 HPLC 检测奶粉中的脂溶性维生素 A、D₃、E 的新方法。流动相为甲醇-水 = 95:5 (V/V), 含 0.05 mol/L 高氯酸钠。检测器采用玻碳电极, 直流安培模式(DC), 氧化电位 +1.3 V。方法检测限为: V_A、V_{D₃}、 α -VE、 γ -VE、 δ -VE 分别为 0.08、2.3、0.16、0.19、0.28 ng。回收率分别为: 90.2%~98.2%、91.2%~103%、92.7%~99.5%、92.6%~97.4%、90.7%~98.0%。同紫外检测比较, 方法具有灵敏度高、抗干扰强的特点。

关键词: 脂溶性维生素; 维生素 A、D₃、E; 乳制品; 电化学检测; 直流安培

中图分类号: O657.32

文献标识码: B

文章编号: 1006-3757(2006)03-0176-05

维生素 E 又叫生育酚, 有 α 、 β 、 γ 、 δ 4 种, 对人体有抗不育症的重要生物活性。其中主要起作用的是 α 型。维生素 A 又叫视黄醇, 起着维持视觉的正常功能, 缺乏维生素 A 容易导致夜盲症。维生素 D 在人体骨组织矿化代谢过程中起着十分重要的作用。它不仅促进钙与磷在肠道的吸收, 而且也作用于骨质组织, 促进钙磷最终形成骨质的基本结构。当维生素 D 缺乏时, 会导致人体患佝偻病和软骨病等。

由于 3 种脂溶性维生素在人体生理活动有非常重要的作用, 建立多种脂溶性维生素的同时检测方法十分必要, 目前检测方法主要有 HPLC-紫外^[1~4]或荧光检测^[5,6]。从结构上看, 维生素 A 是由聚异戊二烯组成的双萜类化合物。维生素 E 为取代氢醌与叶绿醇形成的氢醌衍生物, 维生素 D₃ 属于类固醇的衍生物, 三者均具有一定的电化学活性。目前国内采用电化学检测的报道主要有采用库仑法^[7]、微分脉冲伏安法^[8]、萃取溶出伏安法^[9], 采用色谱-安培法同时检测的报道还不多见。本文目的建立奶粉中多种脂溶性维生素的液相-电化学安培检测方法。

1 实验部分

1.1 仪器及设备

美国戴安公司的液相/离子色谱仪, DX500 型,

配 ED40 电化学检测器以及 AD20 紫外检测器。色谱柱: Waters Xterra C₁₈ 柱, 250 mm × 4.6 mm, 5 μ m。柱温 40 $^{\circ}$ C。

紫外检测: 波长 300 nm。电化学检测: 采用直流安培(DC)检测模式; 工作电极: 玻碳电极; 参比电极 AgCl/Ag。氧化电压: 1.3 V。

1.2 试剂和标准品

维生素 A、D₃、 α 、 γ 、 δ 维生素 E 来自美国 Supleco 公司; 甲醇, 色谱级; 高氯酸钠, 抗坏血酸, KOH, 无水乙醇, 无水乙醚, 二氯甲烷, 三氯甲烷, 石油醚, 正己烷, 分析纯。

流动相为甲醇-水 = 95:5 (V/V), 含 0.05 mol/L 高氯酸钠溶液, 流速 1.5 mL/min。

标准溶液的配制: 标准母液采用精密天平称取 10.0 mg V_{D₃}、V_A 用无水乙醇溶解定容 100 mL, 浓度为 100 μ g/mL。称取 α 、 γ 、 δ 3 种维生素 E 100.0 mg, 定容 100 mL, 浓度为 1 000 μ g/mL。A、D₃、 α 、 γ 、 δ 维生素 E 的混合标准使用液: 分别取上述标准母液流动相稀释至适当浓度 20 μ L 进样, 外标法定量。

2 前处理

奶粉样品称取 5 g 于皂化瓶中, 用 25 mL 热水溶解, 加入 30 mL 无水乙醇, 5 mL 100 g/L 的抗坏

尿酸溶液, KOH 溶液 (1 : 1, m/ m) 10 mL, 在 100 水浴锅内, 冷凝回流皂化 30 min .

将皂化好的溶液转移入 250 mL 分液漏斗中, 用 50 mL 水分数次洗涤皂化瓶, 转移到分液漏斗中, 用正己烷提取 2 次, 每次 80 mL, 合并提取液, 50 旋转蒸发至干, 立即用 2 mL 无水乙醇溶解残渣, 同时超声洗涤, 过 0.45 μm 滤膜, 取 20 μL 上机, 用外标法定量.

3 结果及讨论

3.1 氧化电位的选择

最佳氧化电位的选择, 采用 100 mV 为单位, 逐渐增大工作电极氧化电压, 做 3 种维生素标准峰面积对氧化电位的曲线, 如图 1, 可见在 1 300 mV 时峰面积达到极值. 氧化电位再增加, 峰面积趋于直线, 但基线噪音逐渐增大. 因此, 选择 1.3 V 作为安培检测的工作电压.

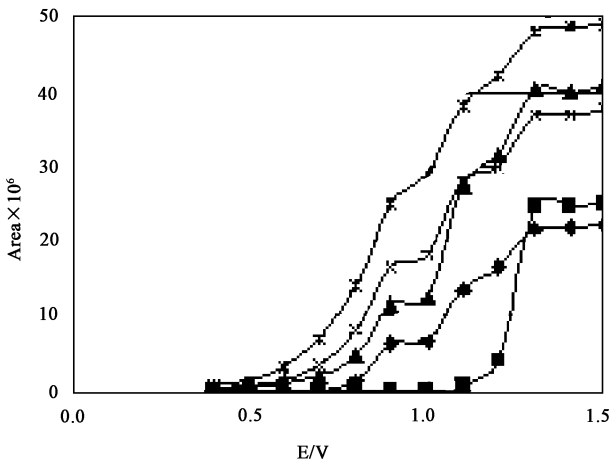


图 1 维生素 A、D₃、α、γ、δ-E 氧化电位对峰面积
 Fig. 1 Peak area versus
 potential for Vitamine A、D₃、α、γ、δ-E
 流动相为甲醇 水(95 : 5, V/ V)
 含有 0.05 mol/L 高氯酸钠, 流速 1.5 mL/ min, 20 μL.
 进样浓度维生素 A (5 μg/ mL);
 α-E * (50 μg/ mL); γ-E ▲(50 μg/ mL);
 δ-E ×(50 μg/ mL); 维生素 D₃ ■(52.8 μg/ mL)

3.2 流动相盐浓度的选择

安培检测器工作原理是在电极上发生待测物和电极之间的氧化还原反应, 由于电子的迁移需要流动相具有一定的导电性, 因此需要流动相中需含有一定浓度的无机盐作为支持电解质. 通

过流动相电阻的降低来保证电压降始终处于低水平. 常用的电解质有氯化物、硝酸盐、高氯酸盐、碳酸盐. 由于本试验采用高浓度的有机溶剂, 因此需要无机盐水溶解度要大, 以避免在高浓度的有机溶剂下, 盐析出. 本实验采用高氯酸钠作为支持电解质, 研究了高氯酸盐浓度对信号的影响, 试验表明盐浓度小于 0.05 mol/L 时, 峰面积随盐浓度的增大而增加, 当浓度大于 0.05 mol/L 时, 面积趋于直线. 因此选用 0.05 mol/L 高氯酸盐保证有足够浓度的支持电解质.

3.3 前处理中萃取剂的选择

通常的脂溶性维生素的测定都需要经过皂化, 一是避免带入大量脂肪, 污染柱子; 另一个原因是把乳粉中的维生素 A 脂, 维生素 E 脂转化为脱脂单体. 皂化完毕, 通常采用的萃取有机溶剂有: 石油醚、无水乙醚、二氯甲烷、三氯甲烷、正己烷. 本实验试验采用添加相同浓度的维生素标准, 分别采用上述有机溶剂按 2. 的前处理过程, 用比较回收率, 来检查皂化后的有机溶剂的萃取效率, 如表 1 (n = 5).

分析上述数据, 采用三氯甲烷、正己烷回收氯相对较高, 分析原因可能是采用石油醚、无水乙醚做萃取溶剂, 易与水互溶, 一部分目标物进入水相, 使得回收率下降, 对于 Va 影响较大, 且由于有机层溶入部分水份, 萃取后需要过无水硫酸钠层析柱, 去处水分. (否则浓缩挥干, 残留水分, 容易出现分层), 使回收有所降低. 考虑到三氯甲烷毒性较大, 最终选择正己烷作为萃取溶剂. 图 2 为标准图谱以及添加回收和实际样品图谱.

3.4 检测线性范围、检测限

在同一仪器上串联紫外、电化学检测器, 进标样检测. 紫外 (300 nm)、电化学 (1.3 V) 检测限以信噪比 (S/ N) 为 5 计, 线性方程、线性范围如表 2、表 3.

比较曲线方程效率 b 可知, 采用电化学安培检测脂溶性维生素 A、D₃、E, 检测灵敏度大于紫外检测, 二者差一个数量级.

3.5 方法的精密度验证

采用市售的进口奶粉, 检测其脂溶性奶粉, 结果与标称的含量比较如表 4.

3.6 方法的回收率试验

采用添加标准, 做回收实验 (N = 5), 数据见表 1. V_A、V_{D3}、α-V_E、γ-V_E、δ-V_E 回收率分别为: 90.2 % ~ 98.2 %, 91.2 % ~ 103 %, 92.7 % ~ 99.5 %, 92.6 % ~ 97.4 %, 90.7 % ~ 98.0 %.

表 1 不同有机溶剂的萃取回收率比较

	Table 1 Comparison for the recovery rate with different extracting solvents					%
	V_A	V_{D3}	$\alpha-V_E$	$\gamma-V_E$	$\delta-V_E$	
石油醚	74.2 ~ 81.2	82.9 ~ 87.2	84.2 ~ 90.2	86.2 ~ 91.7	89.0 ~ 94.1	
无水乙醚	70.2 ~ 88.9	74.2 ~ 80.0	88.2 ~ 93.7	82.4 ~ 94.1	83.2 ~ 94.4	
二氯甲烷	81.9 ~ 92.1	82.9 ~ 96.7	90.2 ~ 94.2	90.1 ~ 95.6	92.1 ~ 101.3	
三氯甲烷	83.6 ~ 97.0	88.4 ~ 98.1	91.9 ~ 99.1	90.8 ~ 101.0	93.9 ~ 103.0	
正己烷	90.2 ~ 98.2	91.2 ~ 103.0	90.7 ~ 99.5	92.6 ~ 97.4	90.7 ~ 98.0	

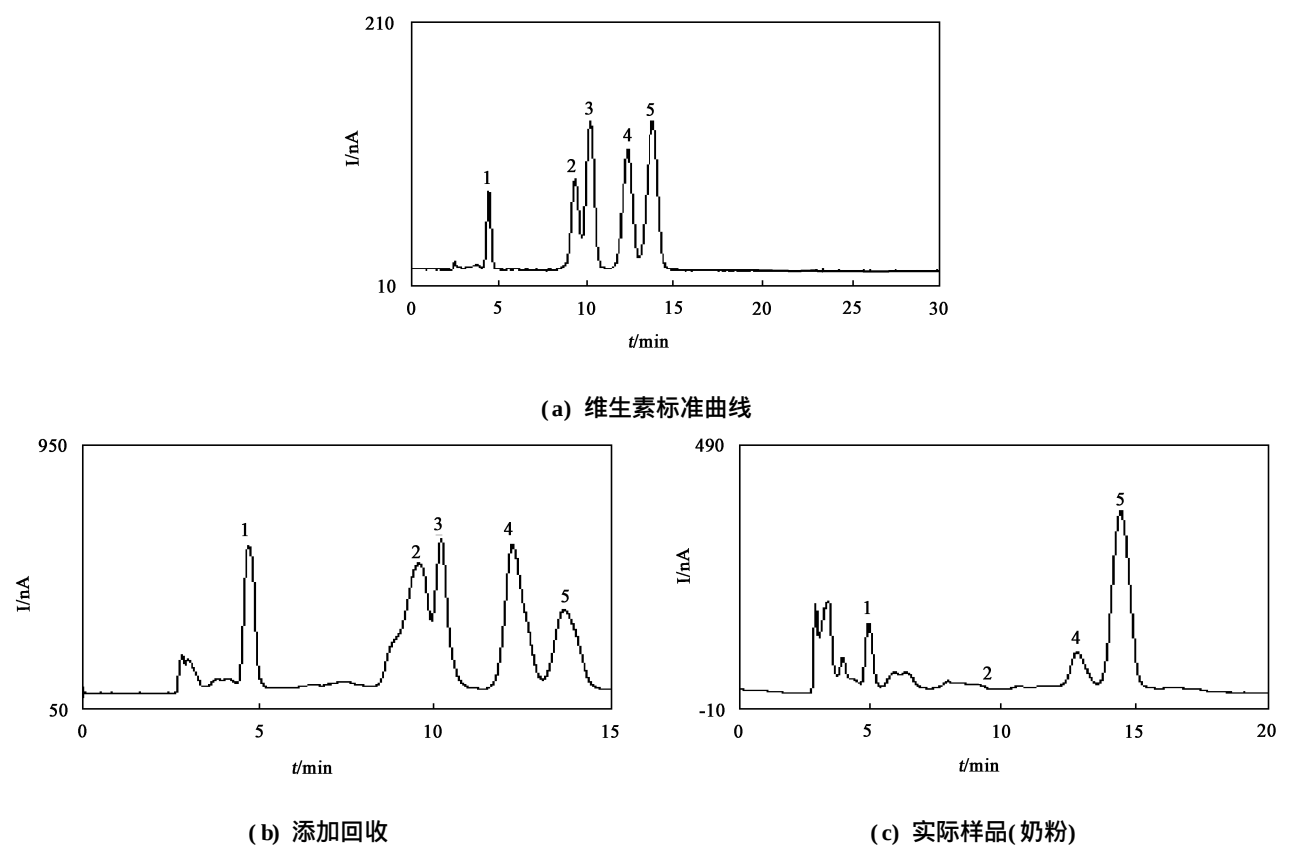


图 2 标准图谱(a)及添加回收(b)和实际样品图谱(c)

Fig. 2 The standard graph(a) , the add-recover graph(b) and the sample graph(c)

1. 图(a)中 V_A 5 $\mu\text{g/mL}$, 2. D_3 52.8 $\mu\text{g/mL}$, 3. $\gamma-V_E$ 50 $\mu\text{g/mL}$, 4. $\delta-V_E$ 50 $\mu\text{g/mL}$, 5. $\alpha-V_E$ 50 $\mu\text{g/mL}$.

表 2 安培检测检测限、线性方程系数($C = a + bx$, c : area, x : $m(\text{ng})$)、线性范围

Table 2 Detection limit、linear equation 、linear range of amperometric detection		线形方程		相关系数/ r	线形范围/ ($\mu\text{g/L}$)
检测限/ ng		b	a		
V_A	0.08	39 000	1 780	0.999 6	11.2 ~ 3030
V_{D3}	2.3	8 158	- 650	0.998 9	8.08 ~ 1 231. 1
$\alpha-V_E$	0.16	20 537	2 101	0.997 9	9.09 ~ 3232
$\gamma-V_E$	0.19	15 126	543	0.999 8	9.09 ~ 3232
$\delta-V_E$	0.28	14 982	289	0.999 9	9.09 ~ 3232

表 3 紫外检测检测限,线性方程(C=a + bx,c area,x :m(ng))

Table 3 Detection limit,linear equation of UV detection

	检测限/ ng	线形方程		相关系数/ r
		b	a	
V _A	0.9	4 816	430	0.999 7
V _{D3}	10.0	699.3	- 87.2	0.999 6
α-V _E	4.2	316.3	32	0.988 9
γ-V _E	5.5	435.4	52	0.999 7
δ-V _E	8.4	416.1	21	0.999 5

表 4 奶粉中维生素 A、D₃、E 的含量测定

Table 4 Determination of vitamine A、D₃、E in powder milk

	维生素 A/ (μg/ 100g)		维生素 D ₃ / (μg/ 100g)		维生素 E(以总量计)/ (mg/ 100g)	
	标签含量	检测含量	标签含量	检测含量	标签含量	检测含量
1	530	567	8.38	8.02	13.0	15.2
2	473	467	7.88	8.23	16.0	16.8
3	470	479	7.45	8.12	11.6	14.2

4 小结

利用脂溶性维生素具有的电化学活性特征,建立了奶粉中 V_A、V_{D3}、V_E 的液相色谱电化学安培检测方法,方法检测限为:V_A、V_{D3}、α-VE、γ-VE、δ-VE,分别为 0.08、2.3、0.16、0.19,0.28 ng. 回收率分别为:90.2 %~98.2 %、91.2 %~103 %、92.7 %~99.5 %、92.6 %~97.4 %,90.7 %~98.0 %. 检测限高于常用的紫外检测,特别是检测维生素 D₃,由于灵敏度高一个数量级,因此前处理避免了繁杂的柱净化、提纯步骤^[2],具有实用价值.

参考文献:

[1] 中华人民共和国国家标准 GB5009.82 - 2003. 食品中维生素 A 和维生素 E 的测定[S].
[2] 中华人民共和国国家标准 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].
[3] 张戈,张虹,马丽英. 乳粉维生素 A、D、E 的高效液相色谱测定[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2002, 2(36) :

171-172.

[4] 欧阳华学,胡谟彪. 高效液相色谱法同时测定食品中脂溶性维生素 A、D、E、K[J]. 分析化学,1998,9(26) : 1 158.
[5] 项光华,贾正全,肖金玉,等. 鸡血清蛋黄肝中维生素 A 和维生素 E 含量的荧光测定法探讨[J]. 中国兽医科技, 2000,6(30) :25-27.
[6] 郭健,李敏,孟妍. 测定食品中维生素 E 荧光分光光度法的探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 2003,3(13) : 348-349.
[7] 刘雪平,甘一如,张雪竹. 高效液相色谱-库仑电化学检测法对多种脂溶性维生素及营养物质的分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2003,5(13) :597-599.
[8] 刘迎红,郝海玲,刘快之. 维生素 A 的微分脉冲伏安法测定[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2002,2(30) :68-70.
[9] 徐惠,王春明,翟钧. 碳糊电极萃取溶出伏安行为及电化学测定维生素 E[J]. 理化检验-化学分册, 2004,5(40) :284-287.

Determination of the Vitamin A,E,D₃ in Powder Milk with HPLC-electrochemical Detector

QIAN Jiang, YU Kong-jie, YANG Fang

(Fujian Inspection and quarantine Bureau, Fuzhou 350001, China)

Abstract : A HPLC method with the electrochemical detector for the determination of the Vitamin A ,E ,D₃ in powder milk is studied. The mobile phase is CH₃OH - H₂O = 95 : 5 (V/ V) with 0.05 mol/L NaClO₄. The parameter of detector is : glassy carbon as working electrodes , 1.3 V DC . The detection limit of V_A , V_{D₃} , α -VE , γ -VE , δ -VE is 0.08 , 2.3 , 0.16 , 0.19 , 0.28 ng respectively and the recovery rate is 90.2 % ~ 98.2 % , 91.2 % ~ 103 % , 92.7 % ~ 99.5 % , 92.6 % ~ 97.4 % , 90.7 % ~ 98.0 % respectively. This method is characterized by high specificity and sensitivity , compared with the UV detection.

Key words : oil Vitamin ; Vitamin A , D₃ , E ; dairy products ; electrochemical detection ; DC amperometry

Classifying number : O657.32