

固相萃取-高效液相色谱法测定植物油中的维生素 E

陈树东, 林晓佳, 吴钟玲, 郭茂章, 柯振华, 罗曼妮

(广州市质量监督检测研究院国家加工食品质量监督检验中心, 广东广州 510110)

摘要: 建立了植物油中 4 种维生素 E 的固相萃取-高效液相色谱荧光分析法。植物油中的维生素 E 用碱性氧化铝萃取小柱萃取和净化后用高效液相色谱法测定, 在 0.1~25 mg/L 的浓度范围内线性关系良好, 相关系数范围为 0.9991~0.9996, 方法检测限为 0.019~0.033 mg/kg; 用 3 种植物油作添加回收率和精密度实验, 回收率在 88.1~99.2% 之间, 变异系数为 1.39~3.95%。实验结果表明, 该方法操作简便, 结果准确可靠。

关键词: 维生素 E; 固相萃取; 植物油; 高效液相色谱

文章编号: 1673-9078(2011)6-710-712

Determination of Vitamin E in Vegetables Oils by Solid Phase

Extraction-high Performance Liquid Chromatography

CHEN Shu-dong, LIN Xiao-jia, WU Zhong-ling, GUO Mao-zhang, KE Zhen-hua, LUO Man-ni

(Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, National Centre for Quality Supervision and Testing of Processed Food (Guangzhou), Guangdong Guangzhou 510110)

Abstract: A solid phase extraction-high performance liquid chromatographic (SPE-HPLC) method was developed for the simultaneous analysis of four kinds of vitamin E in the vegetables oils. The vitamin E in the vegetables oils was extracted and purified by Alumina B SPE column. After the solid phase extraction, the purified extract was analyzed directly by high performance liquid chromatography with fluorescence detector. An excellent linearity was obtained in the range of 0.1~25 mg/L with the correlation coefficient (r) from 0.9991 to 0.9996; the limit of detection was in the range of 0.019~0.033 mg/kg; the mean extraction recoveries were in the range of 88.1-99.2% with the relative standard deviations (RSD) from 1.39 % to 3.95 % in three different vegetables oils matrixes. It was a simple and rapid method with satisfactory repeatability and recovery to determinate Vitamin E in vegetable Oils.

Key words: vitamin E; solid phase extraction (SPE); vegetables oils; high performance liquid chromatography (HPLC)

维生素 E 又称生育酚, 一种脂溶性维生素, 广泛存在于绿色植物中, 动物体内仅含微量, 在植物油中含量相对较高, 具有延缓衰老、抗不育、增加肌肉细胞营养、维护中枢神经和心血管等作用, 是人类必需的营养素。已知具有维生素 E 作用的物质有 8 种, 其中 4 种较为重要, 分别是 α 、 β 、 γ 、 δ -生育酚^[1], 其生物学效价 $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ ^[2]。维生素 E 又是天然的抗氧化剂, 油脂中含维生素 E 可以起到保护油脂, 延缓氧化酸败的作用^[3], 其抗氧化能力为 $\delta > \gamma > \beta > \alpha$ ^[2]。所以准确测定维生素 E 的含量对鉴定植物油的营养价值和品质有积极意义。国内外报道检测植物油中维生素 E 的方法有很多, 其中高效液相色谱法因其灵敏度高、重现性好、结果准确可靠等优点普遍被采用而成为目前测定该项目的首选方法^[4]。高效液相色谱法就其样品前处理技术而言, 最常用的是皂化法^[5]和溶剂稀释法^[6-7], 皂化法是传统的经典方法, 现行的农业

行业标准也采用此法^[8], 油样经皂化、溶剂萃取、水洗、脱水和浓缩后, 用液相色谱-紫外检测器检测, 样品中的油脂经皂化变为水溶性物质后作为杂质被除去, 样液得到较为充分的净化, 该法的缺点主要是操作繁琐和费时过长, 不利于快速检验和批量检验, 同时也可能因操作步骤过多而增加试验结果的可变性。溶剂稀释法即是油样直接用溶剂稀释后用液相色谱-荧光检测器检测, 该法操作非常简便快速且灵敏度高、重现性好, 但因油样未经净化处理, 会污染色谱柱缩短柱的使用寿命, 甚至会污染仪器的流路系统, 也可能因杂质的存在干扰检测结果。上述两种前处理方法虽然各有所长, 但总体而言都存在明显不足的地方。本文提出用固相萃取法作为测定植物油中维生素 E 的前处理手段, 旨在建立一种更为科学和准确的检验方法。

1 材料与方法

1.1 方法原理

收稿日期: 2011-02-26

作者简介: 陈树东 (1985-), 男, 助理工程师

用碱性氧化铝作为固相萃取的柱填料, 维生素 E 分子中含有酸性基团酚羟基, 能和碱性氧化铝发生中和反应生成盐而产生化学吸附, 用淋洗液淋洗时, 吸附相对较弱的油脂和其他杂质被淋洗除去, 然后用含少量酸和水的异丙醇溶液进行洗脱, 在酸性条件下维生素 E 盐回复游离状态, 加上碱性氧化铝吸水后脱活, 使维生素 E 和柱填料之间的吸附大为减弱而被洗脱出来, 从而达到提取和净化的目的。样液用高效液相色谱仪进行分离, 荧光检测器检测, 外标法定量。

1.2 试剂和仪器

标准品 (α -生育酚、 γ -生育酚、 δ -生育酚) 美国 Sigma 公司, 使用前用紫外分光光度计分别标定, 具体操作按 NY/T 1598-2008 标准中的方法进行^[9]; 正己烷、二氯甲烷、异丙醇、冰乙酸为分析纯试剂; 水为蒸馏水; 碱性氧化铝 (100~200 目, 柱层析用); 淋洗液: 正己烷+二氯甲烷 (V/V)=9+1; 洗脱剂: 异丙醇+水+冰乙酸 (V/V)=100+2.5+1.5

美国 Waters 2695 高效液相色谱仪, 配有 2475 型荧光检测器; Waters 固相萃取装置。

1.3 色谱条件

色谱柱: Ultimate AQ-C₁₈ (4.6 mm×250 mm); 流动相: 甲醇+水 (V/V)=98+2; 流速: 1 mL/min; 进样量: 10 μ L; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 荧光检测器: 激发波长 295 nm, 发射波长 330 nm

1.4 样品的处理

固相萃取小柱的装填: 取 6 mL 已掏空和干燥的固相萃取小柱空管, 下端放少许脱脂棉, 加入 3.5 g 碱性氧化铝, 轻轻适度振实, 并装入固相萃取装置中。

准确称取 0.5 g 油样于 10 mL 具塞试管中, 加入约 10 mL 正己烷溶解, 加盖摇匀, 分次加入固相萃取小柱中, 调节 1 mL/min 的速度让其滴完, 再用 15 mL 淋洗液淋洗, 洗毕, 弃去全部透过液。淋洗后的固相萃取小柱用洗脱剂进行洗脱, 用 10 mL 比色管收集, 待滤过液略小于 10 mL 时, 取出用异丙醇定容到 10 mL 刻度处, 加盖摇匀, 待测。三种植物油的样品色谱图见图 1。

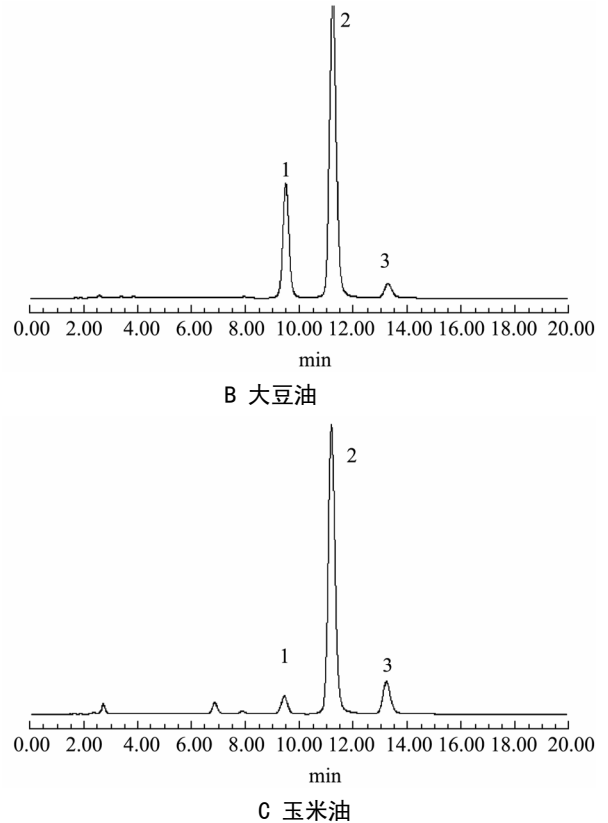
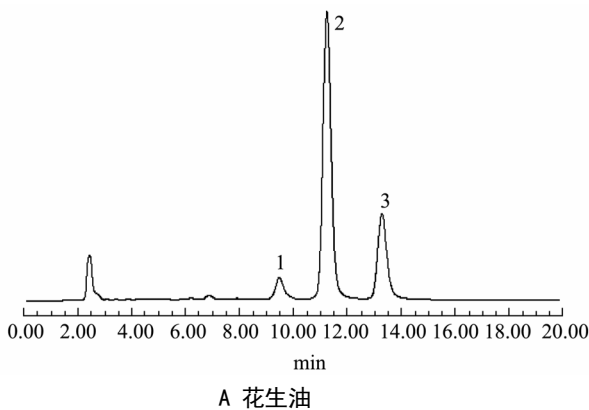


图 1 三种植物油的样品色谱图
 Fig.1 HPLC chromatography of three vegetable oil samples
 注: 1. δ -生育酚; 2. β + γ -生育酚; 3. α -生育酚。

2 结果和讨论

2.1 关于色谱条件的选择

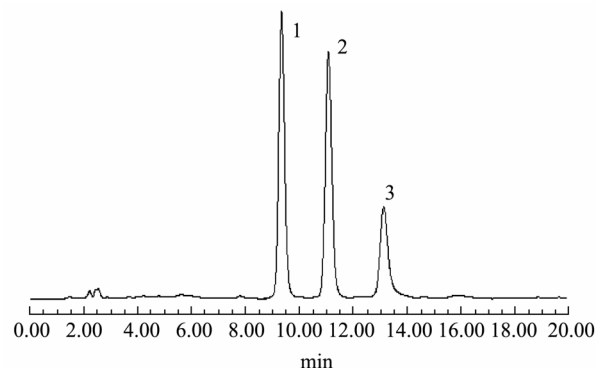


图 2. 标准色谱图
 Fig.2 HPLC chromatography of three vegetable standards
 注: 1. δ -生育酚; 2. γ -生育酚; 3. α -生育酚。

本实验的主要目的是研究和建立测定植物油中维生素 E 的前处理新方法, 为了实验和研究方便, 采用了反相液相色谱系统进行检验, 在上述色谱条件下, β 和 γ -生育酚出峰时间完全重叠, 用 γ -生育酚标准测定样品时, 得到的实验结果是 β 和 γ -生育酚两者含量之和(标准色谱图见图 2)。如果在实际检测工作中要使 β 和 γ -生育酚分离时, 可用硅胶色谱柱和选择正相液相色谱系统进行分

析。本实验选用高灵敏度的荧光检测器, 维生素 E 具有强吸收, 萃取后的样液不必经过繁琐费时的浓缩处理, 节省了大量时间。

2.2 关于样品的前处理

根据维生素 E 能和碱性氧化铝反应形成化学吸附这一原理, 提出固相萃取法应用于测定植物油中维生素 E 的前处理技术, 在国内外文献中未见报道, 具有一定创新性。用正己烷和二氯甲烷配成淋洗液, 二氯甲烷含量越高其洗脂能力越强, 但含量过高时, 维生素 E 也会被部分洗除, 影响结果的准确性。通过比较实验, 当正己烷:二氯甲烷=9:1 时, 其效果较为理想, 90% 以上的油脂被淋洗除去, 而维生素 E 能定量地保留下来。选用异丙醇作为洗脱剂的主要组分, 是因为异丙醇和维生素 E 相容性好且沸点相对较高, 使洗脱效果好又易于实验操作。本实验的前处理操作简便快速、待测目标化合物萃出率高, 同时样液又得到较为充分的净化, 较好地弥补了皂化法和溶剂稀释法的不足之处。

2.3 线性关系和方法检测限

标准品用异丙醇配成系列溶液, 在上述色谱条件下进行测定, 以标准溶液的浓度 x (mg/L) 为横坐标, 相应的峰面积 y 为纵坐标, 进行线性回归, 线性方程和相关系数见表 1。相关系数在 0.9991~0.9996 之间, 表明维生素 E 各单标浓度在 0.1~25 mg/L 的范围内浓度与峰面积线性关系良好。以仪器的 $S/N=3$ 计算, 分别测得 α 、 γ 、 δ -生育酚的仪器最低检测限, 再根据样品的稀释倍数来确定方法的检测限, 具体数值见表 1。

表 1 维生素 E 的线性方程、相关系数和方法检测限

Table 1 Linear equation, correlation coefficient and determination limits for VE detection

组分名称	浓度范围/(mg/L)	线性方程	相关系数(r)	检测限/(mg/kg)
α -生育酚	0.1~25	$Y=7.41 \times 10^5 - 4.96 \times 10^4$	0.9992	0.033
γ -生育酚	0.1~25	$Y=7.51 \times 10^5 - 3.98 \times 10^4$	0.9991	0.020
δ -生育酚	0.1~25	$Y=7.84 \times 10^5 + 2.11 \times 10^4$	0.9996	0.019

2.4 方法的回收率和精密度

分别用花生油、大豆油、玉米油样品, 进行 3 个水平添加回收实验, 每个加标水平测定 5 次, 方法的回收率和变异系数 (RSD) 见表 2~表 4。

表 2 花生油样品中维生素 E 的回收率和变异系数 (RSD) %

Table 2 Recovery rate of V_E in peanut oil and RSD of the methods

添加水平/(10^{-2} mg/g)	α -生育酚		γ -生育酚		δ -生育酚	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
0.5	89.2	3.78	88.1	1.65	92.1	2.34
5	93.5	2.87	95.3	1.39	96.7	1.99
15	96.6	1.87	93.2	1.48	98.7	1.68

表 3 大豆油样品中维生素 E 的回收率和变异系数 (RSD) %

Table 3 Recovery rate of V_E in soybean oil and RSD of the methods

添加水平/(10^{-2} mg/g)	α -生育酚		γ -生育酚		δ -生育酚	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
0.5	93.1	2.34	89.1	3.74	90.2	2.68
5	95.5	1.66	95.3	1.54	96.3	1.74
15	97.8	1.78	93.7	2.41	98.5	1.57

表 4 玉米油样品中维生素 E 的回收率和变异系数 (RSD) %

Table 4 Recovery rate of V_E in corn oil and RSD of the methods

添加水平/(10^{-2} mg/g)	α -生育酚		γ -生育酚		δ -生育酚	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
0.5	91.1	3.43	88.3	3.95	92.3	2.55
5	96.6	2.41	93.5	2.32	97.5	2.01
15	98.2	1.92	91.4	2.66	99.2	1.42

从表中可以看出回收率在 88.1~99.2% 之间, 变异系数为 1.39~3.95%, 说明方法具有较好的可靠性和重现性。

3 结论

从上述的内容表明, 本方法实验原理清晰, 设计合理, 具有操作简便、灵敏度高、准确度和重现度好、对样液净化较为充分等优点, 既能满足检测要求, 又有利于快速检验和批量检验, 有利于色谱柱和仪器的维护。本法是测定植物油中维生素 E 的有效方法, 适用于实验室的日常检测。

参考文献

- [1] 赵玉娥, 荣瑞芬. 生物化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005
- [2] 凌关庭, 唐述潮, 陶民强. 食品添加剂手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003
- [3] 陈浩, 金华丽, 李建伟. 油脂化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004
- [4] 周芳梅, 蔡双福, 文灿舶, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定饮料中维生素 B12[J]. 现代食品科技, 2010, 20(7): 759-762
- [5] 李东, 顾鹏, 蒋淑梅. 高效液相色谱法测定食品中维生素 E 的研究进展[J]. 食品科学, 2000, 21(6): 57-59
- [6] 王洁, 张宁, 王淑静, 等. 高压液相色谱法测定 11 种食用植物油的维生素 E[J]. 宁夏医学院学报, 2000, 22(1): 11-12
- [7] 寇立娟, 李兰晓, 王明林, 等. 高效液相色谱-荧光检测法快速测定植物油中的 α -生育酚[J]. 中国油脂, 2007, 32(4): 76-78
- [8] 李桂华, 郭良玉, 付黎敏. 高效液相色谱法测定精制程度不同的植物油中各种生育酚的含量[J]. 郑州粮食学院学报, 1994, 15(2): 34-39
- [9] NY/T 1598-2008 食用植物油中维生素 E 组分和含量的测定-高效液相色谱法[S]