

食品中维生素检测技术研究进展

吴景, 邢书霞, 曹进*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: 维生素是机体维持其正常生活所必需的一类营养素, 摄入不足或过量均可导致机体功能障碍, 分析和评价食品中的维生素含量将对指导人群科学摄取维生素具有重要参考价值。本文对近年来国内外食品中维生素的前处理技术和常用检测技术进行了综述。检测技术主要包括微生物法、光谱分析法、高效液相色谱法、高效液相色谱-串联质谱法和电化学方法等, 介绍了各种检测技术的原理及特点, 着重介绍了高效液相色谱法在维生素测定中的应用。高效液相色谱法是目前使用最普遍的测定维生素的方法, 应用范围很广, 灵敏度也高, 具有样品前处理简单, 样品用量少, 分离速度快, 可一次性分析多种维生素等优点。本文对目前食品中维生素检测存在的问题和今后的发展方向提出建议, 为今后维生素的高通量快速分析提供文献参考。

关键词: 维生素; 检测技术; 高效液相色谱法

Research progress of the detection technology for vitamins in food

WU Jing, XING Shu-Xia, CAO Jin*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: Vitamins are kinds of organic compounds essential to health. Excessive and inadequate vitamins intake can both cause deviant metabolic function. The analysis and evaluation of the vitamins content in foods can provide necessary reference to the scientific intake of vitamins. This paper provided a comprehensive overview of various extract and analytical techniques for the detection technology of vitamins at home and abroad in recent years. Analytical techniques mainly included microbial method, spectrophotometry, high performance liquid chromatography method, high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method and electrochemical method. The principle and characteristics of a variety of detection technology were discussed. The application of high performance liquid chromatography in the determination of vitamin was emphatically introduced. High performance liquid chromatography was the most commonly used method in the determination of vitamin. It had the advantages of simple sample pretreatment, less sample consumption, rapid separation, and can be used for analyzing many kinds of vitamins. The existing problems and the future development direction were suggested in light of the potentiality of technical novelty, which would provide references for further rapid simultaneous determination of multi-vitamins in food.

KEY WORDS: vitamins; detection technology; high performance liquid chromatography

*通讯作者: 曹进, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品保健食品质量与安全。E-mail: cao1208@gmail.com

*Corresponding author: CAO Jin, Researcher, National Institutes of Food and Drug Control, No.2, Tiantan Xili, Dongcheng District, Beijing 100050, China. E-mail: cao1208@gmail.com

1 引言

食品营养强化剂是为了增加食品的营养成分(价值)而加入到食品中的天然或人工合成的营养素和其他营养成分。根据 GB14880-2012《食品安全国家标准食品营养强化剂使用标准》^[1], 营养强化剂主要分为维生素类、矿物质类以及氨基酸和脂肪酸等三大类。

维生素是机体维持其正常生活所必需的一类营养素, 其种类很多, 化学结构各异, 通常根据其溶解性分为脂溶性和水溶性两大类, 脂溶性维生素有维生素 A、D、K、E 等; 水溶性维生素有维生素 B 族(B₁、B₂、烟酸和烟酰胺、B₆、泛酸、生物素、叶酸、B₁₂ 等)和维生素 C 等。维生素大多不能在体内合成, 或合成量甚微, 在体内的储存量也很少, 因此必须经常由食物供给。如果从外界食物中维生素摄取不足, 人体就不能正常发育成长, 甚至会发生特异性疾病即维生素缺乏症, 因此, 食品中维生素的营养强化具有重要意义。

维生素是食品中应用最早的一种强化剂, 也是目前国际上应用最广最多的一大类。随着食品工业的发展和人们对营养保健食品需求程度的日渐提高, 市场上出现了添加维生素的婴儿配方食品、谷物产品、果蔬汁、运动饮料等维生素强化食品, 对于食品中添加的维生素, 尤其婴幼儿食品和孕妇及乳母食品, 必须通过检测, 严格控制维生素的添加量, 因此, 维生素的定量分析在食品营养分析中占有重要地位。

2 维生素检测的前处理技术

样品前处理在维生素分析过程中是一个既耗时又极易引入误差的步骤, 样品处理过程是否有效将直接影响分析结果的准确性和可靠性。食品中维生素检测的前处理技术针对水溶性维生素和脂溶性维生素也存在较大的差异。

2.1 水溶性维生素

水溶性维生素存在游离态或者结合态两种。游离态水溶性维生素通常用水提取, 而对于婴儿营养配方食品或维生素强化饮料等复杂样品, 通常先用醋酸锌或高氯酸等试剂沉淀样品中的蛋白质, 然后采用乙酸铵-甲醇或者乙酸-水溶液提取; 结合态水溶性维生素通常被基质中的蛋白质或糖等化合物偶联或包裹^[2], 因此在提取前常需采用硫酸、盐酸或蛋白酶、淀粉酶水解样品, 将结合态的水溶性维生素转化为游离态的水溶性维生素, 并结合固相萃取, 获得待测溶液。但不管是酸水解还是酶水解, 效率均较低, 且酸水解虽然能释放出部分维生素的游离形式, 但易损坏某些维生素的结构, 比如叶酸在酸性溶液中对热不稳定, 泛酸虽在 pH5~7 的水溶液中最稳定, 但遇酸或碱则水解, 因此酸水解并不适合于多种水溶性维生素的联合检测。

超声处理属于物理前处理方法, 在高频声波(> 20 kHz)作用下, 在液体中可产生强化传质、空化以及发热等多种效应, 不仅有助于样品分散, 更有助于样品中的水溶性维生素进入提取液。另外, 在前处理中, 为避免部分水溶性维生素发生氧化反应, 常在提取过程中使用抗氧化剂, 包括丁羟甲苯、硫代硫酸钠等^[3]。在操作过程中要尽量避免, 降低水溶性维生素的光解率。

2.2 脂溶性维生素

脂溶性维生素会以各种形态分布在样品中, 要将脂肪和一些脂溶性物质去除, 一般都要先进行皂化处理, 再进行提取。

皂化法有室温过夜皂化法^[4]和加热回流皂化法^[5]。前者样品处理时间较长, 不适于快速分析检测, 但不会因为高温加热对维生素造成损失。后者相对用时较短, 但高温加热会对维生素造成一定的损失。检测者可根据实际情况来对选择不同的方法。

样品经过皂化后进行提取。应用于维生素的提取方法主要有液相萃取法、固相萃取法^[6]和超临界萃取法^[7]等。固相萃取法比液相萃取法使用溶剂更少, 操作过程相对简单, 提取和净化同步完成, 已被越来越多的采用。超临界萃取法是近年来新兴的一种萃取方法, 具有提取迅速、使用溶剂少等特点。

随着分析技术的发展, 多种维生素联合检测将成为维生素检测技术的发展趋势, 这就对样品前处理方法提出了新的挑战。探索快速、高效、简便、易自动化操作的样品前处理技术已成为许多国内外实验室研究的热点。

3 维生素的检测技术

GB 14880-2012《食品安全国家标准 食品营养强化剂使用标准》中规定可在特殊膳食和强化食品中使用的维生素多达 16 种。依据目前我国国家标准, 维生素分析方法有微生物法、荧光分光光度法、气相色谱法和高效液相色谱法等, 方法比较单一, 一种方法只能检测一种或几种维生素, 与多种维生素同时测定的实际需求有一定差距。随着分析化学新方法和新技术的不断发展, 维生素的检测技术也日益更新。本文就食品中维生素的常用检测技术进行总结, 为维生素检测技术的发展提供参考。

3.1 微生物法

3.1.1 传统微生物法

微生物分析法根据某种维生素是某种细菌生长所必需的原理, 利用比浊法或酸度滴定法测定细菌繁殖程度或代谢产物, 间接对该维生素进行定量测定。该方法以其经典性、准确性以及广泛适用性, 成为许多国际机构作为部分维生素分析的标准方法或第一方法。目前, 我国现行国家标准中用于测定维生素的微生物法见表 1。可见, 微生物

法应用较为广泛。微生物法反映的是基质中总维生素的含量,这是微生物法区别于其他方法的最大特点,也是仪器分析方法很难做到的。此外,微生物法成本低、可操作性强、灵敏度高,适合于长期稳定、大批量的试样测定分析;缺点是耗时长、准确度较低、重复性较差。

3.1.2 改良的微生物法

通常微生物法测定过程中使用试管进行培养,在大批量样品检测时,则需要使用大量的试管,工作量非常大,96孔酶标板的引用大大降低了工作强度。廖冰君等^[20]指出德国拜发公司研制的 VitaFast[®]维生素检测试剂盒,可用于维生素的测定。该试剂盒采用与国际标准完全相同的原理,引入96孔酶标板和实验室一般常规配备的酶标仪,以目前普遍接受的ELISA微孔板方法为形式和载体,进行维生素的测定,检测准确率高(偏差系数 < 10%),标准参考样品的回收率可达95%~105%,但是费用昂贵。徐文婕等^[21]将甘油冷冻保存的乳酸杆菌氯霉素耐药株与96孔酶标板相结合,建立了96孔板微生物法检测血浆中的叶酸,该法还可用于测定其他生物组织和食品中叶酸的含量。黄晓林等^[22]采用德国IFP维生素B₁₂试剂盒对食品中维生素B₁₂进行测定,测定结果同现行国标相比具有前处理简单,实验过程时间短,操作步骤简便,可以快速有效地测定食品中的维生素B₁₂质量分数。

改良的微生物法,与传统微生物检测法相比具有检测周期短、操作步骤简便、结果准确性与重现性高的优势。

3.2 光谱分析法

3.2.1 紫外分光光度法

分光光度法是维生素测定的一种基本方法,现行国标方法中,采用分光光度法测定维生素A、维生素D,采用荧光分光光度法测定维生素C、维生素B₁、维生素B₂,简便实用,不需要昂贵的仪器。但是用紫外分光光度法测定其含量所受影响因素较多,实际操作过程比较繁琐,耗时较长。

董进义等^[23]提出了连续小波变换-支持向量回归-紫外分光光度法(continuous wavelet transform-support vector regression-ultraviolet spectrometric method, CWT-SVR-UV)测定多组分B族维生素的含量,通过对维生素混合样品测定光谱进行CWT处理,能扣除光谱背景信号,降低光谱重叠与共线性的影响,用CWT-SVR-UV法同时测定维生素B₁、维生素B₂、维生素B₃、维生素B₆的混合组分,测定结果相对标准偏差分别为0.9%、1.8%、1.7%和0.5%。

3.2.2 荧光法

荧光法主要是利用氧化剂将维生素氧化,再与反应试剂发生缩合反应,生成杂氮环缩合产物,用荧光光度法来测定。对于维生素B₁、维生素B₂、维生素C和叶酸等都可以经过衍生化转化成能激发产生荧光的物质。

倪永年等^[24]采用同步荧光法对维生素B₁、B₂和B₆的混合物进行了分析,对维生素B₁、B₂和B₆混合物的三维荧光数据进行了测定和解析,并以高效液相色谱法作对照,获得了较好的结果。

表 1 现行国家标准中用于测定维生素的微生物法
Table 1 Microbiological methods for the determination of vitamins in current national standards

维生素	国标方法	菌株(ATCC)	适用范围
VB ₂	GB/T 5009.85-2003 ^[8]	干酪乳酸杆菌 <i>Lactobacillus casei</i> (7469)	食品
VB ₆	GB/T 5009.154-2003 ^[9]	卡尔斯伯酵母菌 <i>Saccharomyces Carlsbergensis</i> (9080)	食品、饲料
烟酸、烟酰胺	GB/T 5009.89-2003 ^[10]	植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i> (8014)	食品
	GB 5413.15-2010 ^[11] GB/T 9695.25-2008 ^[12]		婴幼儿食品和乳品 肉和肉制品
VB ₁₂	GB 5413.14-2010 ^[13]	莱士曼氏乳酸杆菌 <i>Lactobacillus leichmannii</i> (7830)	婴幼儿食品和乳品
叶酸	GB/T 5009.211-2008 ^[14]	干酪乳酸杆菌 <i>Lactobacillus casei</i> (7469)	食品
	GB 5413.16-2010 ^[15]		婴幼儿食品和乳品
泛酸	GB/T 5009.210-2008 ^[16]	植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i> (8014)	食品
	GB 5413.17-2010 ^[17]		婴幼儿食品和乳品
生物素	GB 5413.19-2010 ^[18]	植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i> (8014)	婴幼儿食品和乳品
肌醇	GB 5413.25-2010 ^[19]	葡萄汁酵母菌 <i>Saccharomyces uvarum</i> (9080)	婴幼儿食品和乳品

荧光法测定维生素的灵敏度高,但线性范围窄,适合较低含量维生素的测定。荧光法测定维生素比较繁琐,一般要经过提取、皂化、纯化等前处理且要根据不同的样品进行不同的前处理,前处理过程对测定结果影响很大。样品中多种维生素共存时,采用荧光法也无法实现不同维生素的分离。

3.3 气相色谱法

气相色谱法具有灵敏度高、分辨率高、分析时间短、定性分析可靠性强等优点,常被用于测定食品中维生素E^[25,26]的含量。

罗赟等^[27]建立了食品中4种维生素E异构体的气相色谱测定法。样品用石油醚-乙醚溶解,经KOH-甲醇皂化,用水洗涤除去干扰,经HP-5柱分离,火焰离子化检测器检测,内标法定量。该方法简便、快速、灵敏,30 min内可完成 α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚和 δ -生育酚4种维生素E异构体的分析。可用于保健食品、食用植物油和坚果等食品中维生素E异构体含量的测定。

气相色谱以气体为流动相,要求检测环境具有较高的温度,对于一些热不稳定的维生素无法检测,因此限制了其在维生素检测中的应用与发展。

3.4 高效液相色谱法

这是目前使用最普遍的测定维生素的方法,应用范围很广,灵敏度也高,大多采用反相色谱柱进行分析,其具有色谱柱稳定、保留时间短、重现性好及易于平衡的优点,但是反相色谱多以水和甲醇作为流动相,这易造成脂溶性大分子化合物在柱内的沉淀,要经常清洗色谱柱,也可能使色谱峰性不理想。应用这种检测方法对维生素进行检测最大的优势在于被检测样品的前期准备工作非常简单,对于待测物无硬性衍生化要求,且维生素特异性比较强,检测响应灵敏度比较高。高效液相色谱检测法对于检测仪器的需求也比较简单:电化学检测器、荧光检测器以及紫外吸收检测器均能够较为充分的满足维生素的检测需求。

田颖等^[28]建立了高效液相色谱法同时测定多维元素片中9种水溶性维生素的快速分析方法。以酸水解与离心的方法处理样品,用C₈柱分离,流动相A为0.1%三氟乙酸的水溶液,B为甲醇,梯度洗脱,二极管阵列检测器(diode array detector, DAD)检测。28 min内实现了9种水溶性维生素的同时分离测定。各维生素线性关系、精密度、回收率均良好。并使用美国国家标准技术研究院(national institute of standards and technology, NIST)的SRM 3280多维元素片标准物质对方法进行了确认,运用此法测定了市售多维元素片中的水溶性维生素含量。

李强等^[29]建立了一种功能性饮料中11种水溶性维生素的高效液相色谱法高通量检测方法。采用C₁₈反相色谱柱,以甲醇和磷酸二氢钾为流动相梯度洗脱,以DAD和荧

光检测器进行串联检测,方法检出限为0.015~0.4 mg/L,平均加标回收率为93%~107%,相对标准偏差为0.8%~3.7%。方法重现性好、灵敏度高,能同时测定维生素B₁、维生素B₂、吡哆胺、吡哆醛、吡哆醇、泛酸、烟酸、烟酰胺、生物素、叶酸、维生素B₁₂等11种水溶性维生素。

卢燕等^[30]采用双三元高效液相色谱多阀多柱技术,对同一样品中水溶性维生素和脂溶性维生素不同方法处理得到的样品进行双进样,可同时分析样品中21种维生素。该方法自动化程度高,各组分保留时间的RSD值均小于0.1%,各维生素的方法检出限可达0.002~0.223 μ g/mL范围,该方法可用于多种样品的维生素检测和分析工作。

高效液相色谱法因其样品前处理简单、样品用量少、分离速度快、可一次性分析多种维生素而逐渐成为检测维生素的常用分析方法,针对部分同分异构体或是多组份物质的维生素检测尤为适用,在当前维生素检测领域中有着极为深远的研究意义与价值。表2列举了高效液相色谱法在同时测定多种维生素中的应用。

从表2中可以看出,目前在液相色谱中采用的检测器主要包括:紫外检测器(ultraviolet detector, UV)、二极管阵列检测器(DAD)、荧光检测器(fluorescence detector, FLD)等。由于维生素中大多具有生色团(羧基、醛基、共轭双键等),因此紫外检测器适宜于几乎目前已知的全部水溶性维生素和大部分脂溶性维生素,而且分析成本低,操作简单,是目前使用最为广泛的检测器;而采用DAD检测器还可获得色谱峰的紫外-可见光谱,因此可以通过色谱峰保留时间和光谱图实现双参数定性,可以避免假阳性结果;而采用FLD检测器,则能提高检测的灵敏度。采用MS检测器(mass spectrometry, MS)分析维生素,是近几年报道的一类检测方法。质谱分析,特别是串联质谱可检测多种基质中的维生素含量,具有更高的特异性和灵敏度。

3.5 高效液相色谱-串联质谱法

色谱-质谱联用技术将色谱的高效分离能力和质谱的高灵敏度、强大的定性能力相结合,成为目前兽药残留分析领域中最强大的分析手段,最有力的定性定量工具。主要包括气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)和液相色谱-质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometer, LC-MS)。GC-MS因不适合分析沸点高、极性大、热不稳定的化合物,这使GC-MS在维生素分析中的应用大大受限,不及LC-MS应用广泛。目前LC-MS已被报道应用于食品中多种维生素的分析。

Gentili等^[42]建立了食品中14种水溶性维生素的高效液相色谱-串联质谱联用分析方法。样品经提取后,采用Alltima C₁₈柱分离,梯度洗脱,采用保留时间和多反应离子检测(multiple reaction monitoring, MRM)定性、定量,10 min内实现了维生素B₁、维生素B₂、烟酸、烟酰胺、维生素B₅、5种维生素B₆、维生素B₈、维生素B₉、维生素B₁₂和维生素C等14种水溶性维生素的同时分离测定。

表 2 高效液相色谱法同时测定多种维生素的应用
Table 2 Application of HPLC in Simultaneous determination of various vitamins

维生素	样品	提取方法	色谱柱	分离条件	分析方法	参考文献
烟酸、烟酰胺、泛酸、维生素 B ₂ 、吡哆醛、吡哆醇、吡哆胺	婴幼儿配方奶粉	热水溶解提取	ZORBAX SB-C ₈	流动相: A: 1 g/L 辛酸磺酸钠: 甲醇(V:V=95:5, 调 pH 值为 3.0); B: 乙腈, 梯度洗脱。	HPLC-DAD-FLD	[31]
维生素 B ₁ 、B ₂ 、B ₆ 、B ₁₂ 、维生素 C、烟酸、烟酰胺、叶酸	花菜	0.1mol/L HCl 酸解	Cosmosil C ₁₈	流动相: A: 甲醇; B: 缓冲液(0.1 mol/L NaAc-HAc, 0.02% 三乙胺, pH4.25); 梯度洗脱。	HPLC-DAD	[32]
维生素 B ₁ 、B ₂ 、B ₆ 、B ₁₂ 、烟酰胺	功能饮料	/	ZORBAX Eclipse XDB-C ₁₈	流动相: 甲醇:0.5%醋酸(V:V=30:70, 其中每升流动相含 5 mmol 的庚烷磺酸钠和 0.05% 三乙胺); 等度洗脱。	HPLC-UV	[33]
维生素 B ₁ 、B ₂ 、B ₃ 、B ₅ 、B ₆ 、B ₉ 、B ₁₂ 、维生素 C	婴儿配方奶粉	热水溶解提取	Inertsil-ODS-SP	流动相: A: 含 1 mmol/L 七氟丁酸的 KH ₂ PO ₄ 缓冲溶液; B: 乙腈, 梯度洗脱, 马尿酸为内标。	HPLC-UV	[34]
维生素 C、维生素 B ₁ 、B ₂ 、烟酰胺、泛酸钙、吡哆醇、生物素、叶酸、维生素 B ₁₂	功能饮料、复合维生素片剂、营养米	纯水提取	ZORBAX Eclipse Plus-C ₁₈	流动相: A: 25 mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液(用磷酸调至 pH 2.5); B: 乙腈, 梯度洗脱。	HPLC-DAD	[35]
维生素 A、D ₂ 、D ₃ 、 α -维生素 E、 γ -维生素 E、 δ -维生素 E、维生素 K ₁	营养强化食品	皂化提取	ODS C ₁₈	流动相为乙腈:甲醇(V:V=70:30); 等度洗脱。	HPLC-DAD	[36]
维生素 B ₁ 、B ₂ 、B ₃ 、烟酰胺、B ₆ 、B ₁₂ 、维生素 C、维生素 A 乙酯、D ₃ 、K ₁	复合维生素片剂	80%乙腈溶液提取	混合模式固定相色谱柱	流动相: A: 20 mmol/L 醋酸铵(pH4.2); B: 乙腈; 梯度洗脱	HPLC-DAD	[37]
维生素 B ₁ 、B ₂ 、B ₃ 、B ₅ 、B ₆ 、维生素 C	复合维生素糖浆	0.1%磷酸提取	ZORBAX SB-Aq(C ₁₈)	流动相: 以 0.0125 mol/L 正己烷磺酸钠为离子对试剂, A: 0.1% 磷酸(pH 2.4~2.5); B: 乙腈; 梯度洗脱。	HPLC-DAD	[38]
维生素 B ₁ 、B ₂ 、B ₆ 、维生素 C、叶酸、烟酸、烟酰胺	维生素饮料、维生素强化食品	酶解提取	Waters ACQUITY UPLC TM BEH C ₁₈	流动相: A: 辛酸磺酸钠 0.8 g/L 水溶液(冰乙酸调 pH=2.8); B: 甲醇, 梯度洗脱。	UHPLC-UV	[39]
维生素 A、D ₂ 、D ₃ 、E、K ₁ 、叶黄素、 β -胡萝卜素	配方乳粉	皂化提取	Poroshell 120 SB-C ₁₈	流动相: A: 甲醇; B: 乙腈; C: 氯仿; 梯度洗脱。	HPLC-DAD	[40]
维生素 A、D ₃ 、E、 β -胡萝卜素	保健食品	皂化提取	Supelco C ₁₈	流动相: 乙腈:CH ₂ Cl ₂ :甲醇(V:V=70:20:10); 等度洗脱	HPLC-UV	[41]

Hälvin 等^[43]建立了同位素稀释-高效液相色谱-串联质谱联用分析食品中多种维生素含量的方法。以酶解或酸水解的方法处理样品, 用 UPLC HSS C₁₈ 柱分离, 梯度洗脱, 采用保留时间和多反应离子检测(MRM)定性、定量, 同位素内标校正。10 min 内实现了维生素 B₁、维生素 B₂、烟

酸、烟酰胺、泛酸、吡哆醛和吡哆醇等 7 种水溶性维生素的同时分离测定。各种维生素线性关系、精密度、回收率均良好。方法前处理简单、快速, 采用质谱检测器同位素内标校正定量, 检测结果准确、灵敏。

孙伟红等^[44]建立了一种同时测定 6 种脂溶性维生素

的高效液相色谱-串联质谱(high performance liquid chromatography-mass spectrometer/mass spectrometer, HPLC-MS/MS)测定方法。样品经皂化后,用正己烷提取,旋转蒸发浓缩,采用 LC-MS/MS 选择反应监测(selected reaction monitoring, SRM)正离子模式测定,可同时对大鲑鱼肝和鲑鱼肝中的脂溶性维生素进行定性和定量。

HPLC-MS 是新近发展起来的分析方法,主要用于有机化学、生物化学、医学、环境科学等领域,但目前尚未成为食品中维生素的常规分析方法。且因为操作复杂,费用昂贵,目前还不能在国内的大多数实验室中开展。但其具有高选择性、高准确性、高灵敏性、分析检测范围宽以及其定性、定量功能强大等特点,从发展趋势上看,它将成为维生素分析工作的主流方法。

3.6 其他分析方法

3.6.1 加压毛细管电色谱法

加压毛细管电色谱(pressure capillary electrochromatography, pCEC)是近年发展起来的一种新型微分离分析技术。它整合了毛细管电泳与液相色谱的优点,通过在填充有 HPLC 填料的毛细管电色谱柱两端施加高压直流电场,使样品在毛细管电色谱柱中的保留行为同时受到电渗流及其在流动相与固定相之间分配系数的影响,从而大大提高样品的分离能力,因此,在维生素的快速分析中得到了一定的应用。

郑署等^[45]建立了一种高效、简便、快速的脂溶性维生素分析方法,并用于复合维生素片中脂溶性维生素的反相加压毛细管电色谱-紫外检测方法。使用 C₁₈ 反相毛细管电色谱柱,以含 0.05% 三氟乙酸的 95% 甲醇溶液(pH3.3)为流动相进行等度洗脱,泵总流速为 0.2 mL/min,分离电压为 15 kV,并针对脂溶性维生素样品个体间紫外吸收波长差别较大的问题,采用波长时间程序进行检测。维生素 A、维生素 D₃、维生素 E、维生素 K₃ 4 种脂溶性维生素可在 5 min 内实现快速分离。该方法简单方便,准确可靠,灵敏度较高,借助加压毛细管电色谱(pCEC)电渗流和压力流的双重推动力,显著提高了分析速度和分离效能。且加压毛细管电色谱(pCEC)作为一种微分离技术,实际分析流速只在微升级甚至纳升级,大大节省了检测成本,具有实用推广价值。

3.6.2 超高效合相色谱

超高效合相色谱法(ultra performance convergence chromatography, UPC²)除了具有传统超高效液相色谱的优点外,还可与超临界流体色谱技术结合,以超临界流体 CO₂ 为流动相主体,依靠流动相的溶剂化能力进行分离、分析的色谱过程。加之超细填料技术,能够通过精确调节流动相强度、压力和温度,获得所需的系统分辨率和选择性,对待测物的保留和分离进行有效调控,具有操作温度低、有机溶剂使用量少、灵敏度高、重现性好、分析速度快等优点^[46-48],可应用于食品中多种维生素的同时测定。

王春天等^[49]建立了超高效合相色谱法同时测定 9 种

脂溶性维生素及胡萝卜素,在 4 min 内完成了视黄醇乙酸盐(维生素 A 乙酸盐)、视黄醇棕榈酸盐(维生素 A 棕榈酸盐)、 α -生育酚(维生素 E)、 α -生育酚乙酸盐(维生素 E 乙酸盐)、麦角骨化醇(维生素 D₂)、维生素 K₁、维生素 K₂、番茄红素及 β -胡萝卜素等 9 种维生素的分离。该方法可减少在对膳食补充剂和营养强化食品中的脂溶性维生素进行定性与定量分析时所需要进行的实验步骤,实现多种维生素的快速分离,从而显著提升样品通量以及减少实验花费。

3.6.3 微乳毛细管电动色谱

微乳毛细管电动色谱(microemulsion electrokinetic CHROMatography, MEEKC)是 20 世纪 90 年代在胶束毛细管电动色谱(micellar electrokinetic chromatography, MEKC)的基础上发展起来的一种电泳新技术。MEEKC 一般采用水包油型微乳液作为分离介质,对非极性物质具有好的分离效果。MEEKC 能同时分离脂溶性、水溶性、带电或不带电的物质。因此,在多种维生素的分析中具有较大的优势。

Svidritskii 等^[50]建立了一种新的微乳体系,成功应用于微乳毛细管电动色谱(MEEKC)快速分析水溶性和脂溶性维生素。该微乳液的组成为: 2.6%(m:m)十二烷基硫酸钠(SDS)-0.4%(m:m)十二烷基聚乙二醇醚-10%(V:V)异丙醇-6.6%(V:V)正丁醇-0.8%(V:V)正庚烷-25 mmol/L 四硼酸盐缓冲液(pH9.2)。该微乳体系中,助表面活性剂正丁醇和有机溶剂乙腈对脂溶性维生素的分离起到了重要的作用。当分离电压为 22 kV,4 种水溶性维生素和 6 种脂溶性维生素在 35 min 内达到基线分离。该方法是一个快速、简单的分离测定脂溶性维生素和水溶性维生素的有效方法。

3.6.4 电化学方法

电化学分析是根据溶液中物质的电化学性质与被测物质的化学或物理性质之间的关系,将被测定物质的浓度转化为一种电学参量进行定性和定量的仪器分析方法。电化学分析方法具有简便、快速、灵敏等优点,是维生素含量测定不可缺少的有力手段。

Baghizadeh 等^[51]制备了二氧化锆纳米颗粒/离子液体修饰碳糊电极(ZrO₂ Nanoparticle/ionic liquids carbon paste electrode, ZrO₂/NPs/IL/CPE)。采用循环伏安法(cyclic voltammetry, CV)研究了维生素 C 和维生素 B₆ 的电化学行为,并建立了食品中维生素 C 和维生素 B₆ 在此修饰电极上的电化学测量方法。该方法具有成本低,检测灵敏度高、重现性好等优点。

4 总结与展望

各国对于食品中尤其是特殊膳食中营养成分的管理不断加强,对数据的准确性要求越来越高,监测范围及样本量也越来越大,这都要求食品中维生素检测技术进一步发展以满足其需要。本文重点讨论了食品中维生素的检测

方法。

微生物法是检测维生素的经典有效方法,但随着新技术的不断开发,它们已不再是维生素检测的黄金标准,色谱法已逐渐成为维生素检测的首选参考技术。光谱法、电化学分析方法等也在维生素的检测中得到了初步的应用,但存在一定的局限性。

目前,现行国标方法主要是针对某一种或少数几种维生素的检测,缺少一种可对食品中多种维生素同时进行分析的方法。建立一套准确可靠的多种维生素同时分析的方法,拓宽方法的应用范围,是维生素分析领域研究的重点,高通量、多组分同时测定是维生素分析领域的发展趋势。前处理技术的简化,分析仪器的自动化、微型化,联用技术的发展也应引起分析工作者的关注。同时,应该多途径、多渠道地加快多种维生素同时检测的国家标准的制订,切实加强对食品中营养强化剂的质量监管,为市场的稳定发展以及人类的安全健康做出贡献。

参考文献

- [1] GB 14880-2012 食品安全国家标准 食品营养强化剂使用标准[S].
GB 14880-2012 Food safety national standards standard for food nutrition fortifier uses [S].
- [2] Konings EJ. Committee on food nutrition. Water soluble vitamins [J]. J AOAC Int, 2006, 89(1): 285-288 .
- [3] Santos J, Mendiola JA, Oliveira MB, *et al* . Sequential determination of fat- and water-soluble vitamins in green leafy vegetables during storage [J]. J Chromatogr A, 2012, 1261(26): 179-188 .
- [4] 董爱军, 杨鑫, 李海梅, 等. 高效液相色谱法测定牦牛乳曲拉中的脂溶性维生素[J]. 中国乳品工业, 2009, (7): 50-52.
Dong AJ, Yang X, Li HM, *et al* . HPLC method for simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D3 and E in kurut, naturally fermented yak milk [J]. China Dairy Ind, 2009, (7): 50-52.
- [5] 常海军, 甘伯中, 刘长英, 等. 高效液相色谱法测定牦牛乳中 V_A 和 V_E 的含量[J]. 甘肃农业大学学报, 2007, (2): 108-111.
Chang HJ, Gan BZ, Liu CY, *et al* . Study on content determination of vitamin A and E in white yaks milk by HPLC [J]. J Gansu Agric Univ, 2007, (2): 108-111.
- [6] 赵榕, 薛颖, 吴国华, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定钙强化食品中的维生素 D[J]. 色谱, 2008, (1): 113-115.
Zhao R, Xue Y, Wu GH, *et al* . Determination of vitamin D in calcium fortified foods using solid-phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr, 2008, (1): 113-115.
- [7] Giuseppe P, Ombretta M, Luigi M, *et al* . Fat-soluble vitamin extraction by analytical supercritical carbon dioxide [J]. J Am Oil Chem Soc, 2003, 80(7): 629-633.
- [8] GB/T 5009.85-2003 食品中核黄素的测定[S].
GB/T 5009.85-2003 Determination of riboflavin in foods [S].
- [9] GB/T 5009.154-2003 食品中维生素 B₆ 的测定[S].
GB/T 5009.154-2003 Determination of vitamin B₆ in foods [S].
- [10] GB/T 5009.89-2003 食品中烟酸的测定[S].
GB/T 5009.89-2003 Determination of niacin in foods [S].
- [11] GB5413.15-2010 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中烟酸和烟酰胺的测定[S].
GB5413.15-2010 Food safety national standard-Determination of vitamin niacin and niacinamide in foods for infants and young children, milk and milk products [S].
- [12] GB/T 9695.25-2008 肉与肉制品 维生素 PP 含量测定[S].
GB/T 9695.25-2008 Meat and meat products-Determination of vitamin PP content [S].
- [13] GB5413.14-2010 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中维生素 B₁₂ 的测定[S].
GB5413.14-2010 Food safety national standard-Determination of vitamin B₁₂ in foods for infants and young children, milk and milk products [S].
- [14] GB/T 5009.211-2008 食品中叶酸的测定[S].
GB/T 5009.211-2008 Determination of folates in foods [S].
- [15] GB5413.16-2010 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中叶酸(叶酸盐活性)的测定[S].
GB5413.16-2010 Food safety national standard-Determination of folic acid (folate activity) in foods for infants and young children, milk and milk products [S].
- [16] GB/T 5009.210-2008 食品中泛酸的测定[S].
GB/T 5009.210-2008 Determination of pantothenic acid in foods [S].
- [17] GB5413.17-2010 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中泛酸的测定[S].
GB5413.17-2010 Food safety national standard-Determination of pantothenic acid in foods for infants and young children, milk and milk products [S].
- [18] GB5413.19-2010 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中游离生物素的测定[S].
GB5413.19-2010 Food safety national standard-Determination of free biotin in foods for infants and young children, milk and milk products [S].
- [19] GB5413.25-2010 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中肌醇的测定[S].
GB5413.25-2010 Food safety national standard-Determination of inositol in foods for infants and young children, milk and milk products [S].
- [20] 廖冰君, 左程丽. B 族维生素检测方法及其使用[J]. 食品安全导刊, 2009, (8): 40-41.
Liao BJ, Zuo CL. Detection methods and application of vitamin B [J]. China Food Saf, 2009, (8): 40-41.
- [21] 徐文婕, 曲全冈, 刘建蒙. 微生物法检测血浆叶酸实验方法评价及应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(7): 1722-1724.
Xu WJ, Qu QG, Liu JM. Methodological evaluation of microbiological assay in detection of plasma folate [J]. Chin J Health Lab Technol, 2011, 21(7): 1722-1724.
- [22] 黄晓林, 王淼, 张丽宏, 等. IFP 微孔板试剂盒检测配方乳粉中维生素 B₁₂ 方法探讨[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(7): 48-49.
Huang XL, Wang M, Zhang LH, *et al* . Probe into assay of vitamin B₁₂ in formula milk powder by IFP micro plate kit [J]. China Dairy Ind, 2010, 38(7): 48-49 .
- [23] 董进义, 孟晓玲, 王国庆. 连续小波变换-支持向量回归-紫外分光光度法测定多组分 B 族维生素含量[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2006, 34(1): 82-86.
Dong JY, Meng XL, Wang GQ. Determination multicomponent vitamin B using continuous wavelet transform-support vector regression-ultraviolet spectrometric method [J]. J Henan Normal Univ (Nat Sci) , 2006, 34(1):

- 82-86.
- [24] 倪永年, 蔡英俊. 平行因子-同步荧光法测定食品中维生素 B₁, B₂ 和 B₆[J]. 光谱学与光谱分析, 2005, 25(10):1641-1644.
Ni YN, Cai YJ. Simultaneous synchronous spectro-fluorimetric determination of vitamin B₁, B₂ and B₆ by PARAFAC [J]. Spectro Spectral Anal, 2005, 25(10):1641-1644.
- [25] 黄艳雯, 李国颖, 莫子琳, 等. 气相色谱法测定维生素 E 粉的含量[J]. 现代食品与药品杂志, 2007, 1(4): 66-68.
Huang YW, Li GY, Mo ZL, *et al.* Determination of vitamin E powder by gas chromatography [J]. J Mod Food Phar, 2007, 1(4): 66-68.
- [26] 罗赞, 孙成均. 气相色谱法测定保健食品中的维生素 E [J]. 现代预防医学, 2009, 36(5): 931-933.
Luo Y, Sun CJ. Determination of vitamin E in health food by gas chromatography [J]. Mod Prev Med, 2009, 36(5): 931-933.
- [27] 罗赞, 孙成均. 气相色谱法同时测定食品中四种维生素 E 异构体[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(4): 824-826.
Luo Y, Sun CJ. Simultaneous determination of 4 isomers of vitamin E in foods by capillary gas chromatography [J]. Chin J Health Lab Tech, 2013, 23(4): 824-826.
- [28] 田颖, 黄挺, 刘军, 等. 高效液相色谱法同时测定多维元素片中 9 种水溶性维生素[J]. 分析实验室, 2010, 29(11): 52-56.
Tian Y, Huang T, Liu J, *et al.* Simultaneous determination of water-soluble vitamins in multivitamin tablets by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Lab, 2010, 29(11): 52-56.
- [29] 李强, 李挥, 庞坤, 等. 功能性饮料中 11 种水溶性维生素的高通量检测技术研究[J]. 河北省科学院学报, 2012, 29(3): 44-48.
Li Q, Li H, Pang K, *et al.* Simultaneous determination of eleven water-soluble vitamins in functional beverage by high performance liquid chromatography [J]. J Hebei Acad Sci, 2012, 29(3): 44-48.
- [30] 卢燕, 许群, 陈静, 等. 高效液相色谱多阀多柱技术同时分析水溶性和脂溶性维生素[J]. 环境化学, 2012, 21(9): 1442-1447.
Lu Y, Xu Q, Chen J, *et al.* Determination of water-and fat-soluble vitamins by HPLC multi-valve/column technology [J]. Environ Chem, 2012, 21(9): 1442-1447.
- [31] 王浩, 刘艳琴, 杨红梅, 等. HPLC 法同时测定婴幼儿配方奶粉中 5 种水溶性维生素[J]. 中国乳品工业, 2009, 37(10): 56-58.
Wang H, Liu YQ, Yang HM, *et al.* Study on simultaneous detection of 5 water-soluble vitamins in infant milk powder by HPLC [J]. China Dairy Ind, 2009, 37(10): 56-58.
- [32] 陈卫伟, 潘葳, 雷锦桂, 等. HPLC 梯度洗脱法同时测定花菜中 8 种水溶性维生素[J]. 现代科学仪器, 2008, (3): 16-18
Chen WW, Pan W, Lei JG, *et al.* Simultaneous determination of eight water soluble vitamins in cauliflower by HPLC gradient elution method [J]. Mod Sci Instrum, 2008, (3): 16-18.
- [33] 杨玲娟, 谢天柱, 赵素瑞. 离子对反相高效液相色谱法同时测定功能性饮料中的 B 族维生素[J]. 中国酿造, 2009, (8): 140-142.
Yang LJ, Xie TZ, Zhao SR. Simultaneous determination of vitamins B in functional drinks by Ion-Pair reversed-phase HPLC [J]. China Brew, 2009, (8): 140-142.
- [34] 刘娜, 陈大舟, 汤桦, 等. 婴儿配方奶粉中 8 种水溶性维生素的高效液相色谱同时测定[J]. 分析测试学报, 2008, 27(4): 408-411.
Liu Na, Chen DZ, Tang H, *et al.* Simultaneous determination of eight water-soluble vitamins in baby milk powder by high performance liquid chromatography [J]. J Instrum Anal, 2008, 27(4): 408-411.
- [35] 任丹丹, 谢云峰, 刘佳佳, 等. 高效液相色谱法同时测定食品中 9 种水溶性维生素[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(3): 899-904.
Ren DD, Xie YF, LIU JJ, *et al.* Simultaneous determination of nine water-soluble vitamins in foods by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(3): 899-904.
- [36] 牛之瑞, 冯雷, 珠娜, 等. 反高效液相法多波长同时测定营养强化食品中 7 脂溶性维生素[J]. 农业机械, 2013, (3): 62-64.
Niu ZR, Feng L, Zhu N, *et al.* Simultaneous determination of seven fat-soluble vitamins in fortified foods by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. Farm Mach, 2013, (3): 62-64.
- [37] Peng XT, Li Z, Zhang Y, *et al.* Study of retention mechanism of a mixed-mode stationary phase and its application for the simultaneous determination of ten water- and fat-soluble vitamins by HPLC-UV [J]. Chromatographia, 2013, 76(13-14): 735-745.
- [38] Vidović S, Stojanović B, Veljković J, *et al.* Simultaneous determination of some water-soluble vitamins and preservatives in multivitamin syrup by validated stability-indicating high-performance liquid chromatography method [J]. J Chromatogr A, 2008, 1202(2): 155-162
- [39] 张榕杰, 苏永恒, 王爱月. 超高效液相色谱法同时测定维生素强化食品中多种水溶性维生素[J]. 中国卫生工程学, 2008, 7(1): 34-35, 38.
Zhang RJ, Su YH, Wang AY. The simultaneous determination of water-soluble vitamins in fortified foods by ultra performance liquid chromatography [J]. Chin J Pub Health Eng, 2008, 7(1): 34-35, 38.
- [40] 陈万勤, 王瑾, 黄丽英, 等. 高效液相色谱法同时测定配方乳粉中 7 种脂溶性维生素[J]. 分析科学学报, 2003, 29(1):109-112.
Chen WQ, Wang J, Huang LY, *et al.* Simultaneous determination of seven fat-soluble vitamins in infant formula using high performance liquid chromatography [J]. J Anal Sci, 2003, 29(1): 109-112.
- [41] 曾红燕, 邹晓莉, 黎源倩, 等. HPLC 同时测定保健食品中维生素 A、D₃、E 和 β-胡萝卜素[J]. 分析实验室, 2008, 27(2): 15-18.
Zeng HY, Zou XL, Li YQ, *et al.* Simultaneous determination of retinol, vitamin D₃, tocopherol and β-carotene in health food by HPLC [J]. Chin J Anal Lab, 2008, 27(2): 15-18.
- [42] Gentili A, Caretti F, D'Ascenzo G, *et al.* Simultaneous determination of water-soluble vitamins in selected food matrices by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008, 22: 2029-2043.
- [43] Hälvin K, Paalme T, Nisamedtinov I. Comparison of different extraction methods for simultaneous determination of B complex vitamins in nutritional yeast using LC/MS-TOF and stable isotope dilution assay [J]. Anal Bioanal Chem, 2013, (405): 1213-1222.
- [44] 孙伟红, 冷凯良, 邢丽红, 等. 高效液相色谱串联质谱法同时测定大黄花鱼肝和鲟鱼肝中的脂溶性维生素[J]. 分析实验室, 2010, 29 增刊:313-315.
Sun WH, Leng KL, Xing LH, *et al.* Simultaneous determination of fat-soluble vitamins in liver of pseudosciaena crocea and sturgeon by LC-MS/MS [J]. Chin J Anal Lab, 2010, 29suppl.: 313-315.
- [45] 郑署, 施文君, 王晓曦, 等. 加压毛细管电色谱-紫外法检测复方维生素片中 4 种脂溶性维生素[J]. 食品科学, 2014, 35(20): 105-109.
Zheng S, Shi WJ, Wang XX, *et al.* Determination of four fat-soluble vitamins in vitamin tablets by pressurized capillary electrochromatography with UV detection [J]. Food Sci, 2014, 35(20): 105-109.

- [46] Gourmel C, Grand-Guillaume Perrenoud A, Waller L, *et al.* Evaluation and comparison of various separation techniques for the analysis of closely-related compounds of pharmaceutical interest [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1282: 172–177.
- [47] Grand-Guillaume Perrenoud A, Veuthey JL, Guillaume D. Comparison of ultra-high performance supercritical fluid chromatography and ultra-high performance liquid chromatography for the analysis of pharmaceutical compounds [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1266: 158–167.
- [48] Grand-Guillaume Perrenoud A, Boccard J, Veuthey JL. Analysis of basic compounds by supercritical fluid chromatography: Attempts to improve peak shape and maintain mass spectrometry compatibility [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1262: 205–213.
- [49] 王春天, 闫磊, 张延超, 等. 同时分离九种脂溶性维生素的 UPC² 方法 [J]. *甘肃农业*, 2013, (24): 87–89.
Wang CT, Yan L, Zhang YC, *et al.* Simultaneous determination of nine fat-soluble vitamins by ultra performance convergence chromatography [J]. *Gansu Agric*, 2013, (24): 87–89.
- [50] Svidritskii EP, Pashkova EB, Pirogov AV, *et al.* Simultaneous determination of fat- and water-soluble vitamins by microemulsion electrokinetic chromatography [J]. *J Anal Chem*, 2010, 65(3): 287–292.
- [51] Baghizadeh A, Karimi-Maleh H, Khoshnama Z, *et al.* A voltammetric sensor for simultaneous determination of vitamin C and vitamin B6 in food samples using ZrO₂ Nanoparticle/ionic liquids carbon paste electrode [J]. *Food Anal Methods*, 2015, (8): 549–557.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介

吴 景, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为食品保健食品检验检测及风险评估。
E-mail: bluewujing@163.com

曹 进, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品保健食品质量与安全。
E-mail: cao1208@gmail.com