

反相高效液相色谱法测定油类保健食品中混合生育酚

苏昭仑*, 黄康惠, 张喜金, 陈彩云, 陈宏壁, 林贤邦
(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: **目的** 建立测定油类保健食品中混合生育酚的反相高效液相色谱法。**方法** 样品经氢氧化钾甲醇溶液皂化, 盐酸甲醇溶液中和; 用反相高效液相色谱: 色谱柱(SUPELCO, C₁₈, 4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 40 °C; 进样量: 20 μL; 波长: 294 nm; 流动相: 水和甲醇, 梯度洗脱; 将 α-、γ-及 δ-生育酚分离; 外标法定量。**结果** 本方法标准曲线在 0.01~0.20 mg/mL 范围内有良好的线性关系, $r>0.9990$, 回收率为 93.5%~103.8%, RSD<4.0%, 检出限为 0.02 μg/kg, 定量限为 0.1 μg/kg。**结论** 该方法结果准确可靠, 节省样品前处理时间及试剂, 有利于降低检验成本, 适用于油类保健食品中混合生育酚含量的测定。

关键词: 混合生育酚; 保健食品; 反相高效液相色谱法; 维生素 E

Determination of mixed tocopherols in oil health food by reversed-phase high performance liquid chromatography

SU Zhao-Lun*, HUANG Kang-Hui, ZHANG Xi-Jin, CHEN Cai-Yun,
CHEN Hong-Bi, LIN Xian-Bang

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of mixed tocopherols in oil health foods by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Methods** The samples were saponified by potassium hydroxide methanol, and neutralized by hydrochloric acid methanol. The extracts were separated by RP-HPLC with the column of SUPELCO, C₁₈ (4.6 mm×150 mm, 5 μm), flow rate of 1.0 mL/min, column temperature of 40 °C, injection volume of 20 μL, wavelength of 294 nm, mobile phase of water and methanol, and with gradient elution to separate α-, γ- and δ-tocopherol; then were determined by external standard method. **Results** Tocopherols standard curve had a good linear relationship within 0.01~0.20 mg/mL range ($r>0.9990$), the recovery was 93.5%~103.8%, RSD<4.0%, limit of determination was 0.02 μg/kg, and the limit of quantity was 0.1 μg/kg. **Conclusion** The method is accurate and reliable, saving pretreatment time and reagents, can reduce the test cost; it is suitable for the determination of mixed tocopherol in oil health food.

KEY WORDS: mixed tocopherols; health foods; reversed-phase high performance liquid chromatography; vitamin E

*通讯作者: 苏昭仑, 执业中药师, 主要研究方向为中药和保健食品安全检测。E-mail: suwheel@126.com

*Corresponding author: SU Zhao-Lun, Licensed Pharmacist, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: suwheel@126.com

1 引 言

维生素 E, 又名抗不育维生素, 是生育酚和生育三烯酚以及具有 *d-α*-生育酚活性的衍生物的总称。目前已有 8 种具有维生素 E 活性的化合物从生物资源中分离出来, 分别为 *α*-、*β*-、*γ*-及 *δ*-生育酚和 *α*-、*β*-、*γ*-及 *δ*-生育三烯酚。食品添加剂天然维生素 E 的 *d-α*-生育酚在食品工业中适用作营养强化剂、抗氧化剂; 混合生育酚适用作抗氧化剂; *d-α*-醋酸生育酚、*d-α*-琥珀酸生育酚适用作营养强化剂。因此, 在油类保健食品中一般添加了混合生育酚作抗氧化剂。

混合生育酚的测定方法较多, 目前常用的分析方法主要有比色法^[1-4]、气相色谱法^[5-6]、正相高效液相色谱法^[7-8]、反相高效液相色谱法^[9-15]。比色法操作简单, 但不能测定各生育酚的含量, 结果准确性不高; 气相色谱法, 不能对 *β*-、*γ*-生育酚分离, 而且需要衍生; 正相高效液相色谱法, 对生育酚各异构体均能分离, 但所使用的正相试剂接触毒性大, 对实验人员健康造成一定的危害; 反相高效液相色谱法, 虽然不能将 *β*-、*γ*-生育酚分离, 但综合精密度、回收率、分析时间和实验安全性等方面考虑, 优于气相色谱法和正相高效液相色谱法。本文优化国家标准^[15]的前处理方法, 建立了反相高效液相色谱法检测油类保健食品中的混合生育酚, 为该类产品制定质量标准提供参考依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

仪器: 高效液相色谱仪(厂家: 安捷伦, 型号: 1260, 配 VWD); 分析天平(厂家: Mettler Toledo, 型号: XP205)。

材料: 辅助降血脂软胶囊、共轭亚油酸软胶囊、鲑鱼油软胶囊、鱼油 3322TG。(以上材料均来源于汤臣倍健股份有限公司)。

试剂与对照品: 甲醇(色谱纯, 德国 CNW); 无水乙醇(色谱纯, 德国 CNW); 抗坏血酸(分析纯, 广州化学试剂厂); 氢氧化钾(分析纯, 广州化学试剂厂); 浓盐酸(分析纯, 广州化学试剂厂); 纯化水; *d-α*-生育酚(来源: Dr, 批号: D0050, 纯度: 99.8%); *d-γ*-生育酚(来源: SUPELCO, 批号: LB95755V, 纯度: 99%); *d-δ*-生育酚(来源: SUPELCO, 批号: LB94736V, 纯度:

99%)。

2.2 仪器条件

色谱柱: SUPELCO, C₁₈, 4.6×150 mm, 5 μm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 40 ℃; 进样量: 20 μL; 波长: 294 nm; 流动相: A 为水, B 为甲醇, 梯度洗脱见表 1。

表 1 梯度洗脱比例
Table 1 Gradient elution ratio

时间(min)	A(%)	B(%)
0.00	10	90
7.40	10	90
7.41	0	100
16.00	0	100
16.01	10	90
20.00	10	90

2.3 标准溶液的制备

2.3.1 标准储备液的配制

精密称取 *d-α*-生育酚, *d-γ*-生育酚, *d-δ*-生育酚对照品约 50 mg 分别置于 50 mL 棕色容量瓶, 加无水乙醇定容(浓度 1.0 mg/mL), 储备液于-18 ℃中储存备用。

2.3.2 标准储备液浓度校正

精密移取 *d-α*-生育酚, *d-γ*-生育酚, *d-δ*-生育酚储备液 1.00 mL, 分别用无水乙醇定容至 10 mL 容量瓶, 以无水乙醇为空白, 在 294 nm 波长处测定 *d-α*-生育酚吸光度、298 nm 波长处测定 *d-γ*-生育酚吸光度, 298 nm 波长处测定 *d-δ*-生育酚吸光度。

校正公式 $C=A/E\times100$

其中 *C* 是维生素浓度(单位为 mg/mL), *A* 是维生素的平均紫外吸光度, *E* 是某维生素 1% 的比吸光系数。(*d-α*-生育酚比吸光系数为 71, *d-γ*-生育酚比吸光系数为 92.8, *d-δ*-生育酚比吸光系数为 91.2)

2.3.3 标准工作溶液配制

分别精密移取 *d-α*-生育酚, *d-γ*-生育酚, *d-δ*-生育酚的储备液 0.50、1.00、2.00、5.00、10.00 mL 于 50 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 得到 0.01、0.02、0.04、0.10、0.20 mg/mL 的混合标准工作溶液。

2.4 样品前处理

精密称取试样 1.0 g 于 50 mL 离心管, 加入约 0.2 g 抗坏血酸, 加入 10.00 mL 氢氧化钾甲醇溶液(0.5

mol/L), 65 ℃水浴约 10 min, 震荡至油滴完全消失, 放冷至室温, 加入 10.00 mL 盐酸甲醇溶液(0.5 mol/L), 用无水甲醇定容至 25 mL, 过滤即得。

3 结果与讨论

3.1 样品前处理方法的优化

本实验曾尝试国家标准^[15]的前处理方法, 使用氢氧化钾溶液(1+1)皂化、乙醚提取, 结果与本文前处理方法的结果基本一致。结果见表 2。但国家标准的前处理方法操作繁琐, 耗时长(约 3 h), 试剂用量大, 检验效率较低。本文采用氢氧化钾甲醇溶液(0.5 mol/L)皂化, 盐酸甲醇溶液(0.5 mol/L)中和, 甲醇定容, 过滤即得, 样品前处理变得简便(约 45 min)。

3.2 色谱条件的选择

3.2.1 色谱柱的选择

本实验选择了 150 mm 的 C₁₈ 柱分离 α -、 γ -及 δ -生育酚, 实验表明 150 mm 的短柱有良好的分离效果, 能很好的把 α -、 γ -及 δ -生育酚和杂质峰分离, 比 250 mm 的长柱能缩短分析时间。混合标准溶液的色谱图见图 1。

3.2.2 流动相的选择

本方法采用甲醇、水梯度洗脱, 让目标物得到有效的分离。本方法不能将 β -生育酚和 γ -生育酚分开, 故 γ -生育酚峰中包含有 β -生育酚峰。

3.3 方法的线性范围确认

在实验条件下, 对混合标准工作溶液进行测定, 结果表明, α -、 γ -及 δ -生育酚在 0.01~0.20 mg/mL 范围内有良好的线性关系, $r>0.9990$ 。

3.4 方法的回收率实验

称取 6 份样品, 分别添加 1.00 mL 各标准储备液进行加标回收实验, 结果见表 3。本方法回收率 93.5%~103.8%, 且 RSD<4.0%, 说明该方法准确度和精密度可以满足混合生育酚的检测要求。空白样品图谱见图 2。

3.5 检出限

以标准溶液的色谱响应值计算, 当信噪比(S/N)为 3 时, 检出限为 0.02 $\mu\text{g/kg}$, 当信噪比(S/N)为 10 时, 定量限为 0.1 $\mu\text{g/kg}$, 能满足样品的测定需求。

表 2 结果对比($n=10$)
Table 2 Results comparison ($n=10$)

样品	国标方法(mg/100 g)	RSD(%)	本文方法(mg/100 g)	RSD(%)
辅助降血脂软胶囊	94.3~111.7	9.4	102.4~110.7	3.9
共轭亚油酸软胶囊	548.0~605.3	5.1	568.0~617.0	4.2
鲑鱼油软胶囊	669.9~738.2	5.0	691.0~749.0	4.1
鱼油 3322TG	16.7~23.4	16.7	17.6~21.3	10.3

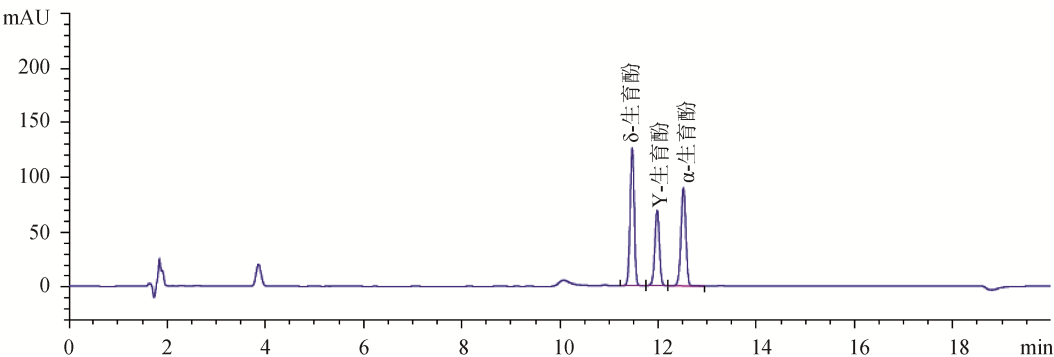


图 1 混合标准溶液色谱图
Fig. 1 The chart of mixed standard solution

表 3 加标回收率和相对标准偏差(n=6)
Table 3 The recovery and relative standard deviation (n=6)

样品	目标化合物	回收率(%)	RSD(%)
辅助降血脂软胶囊	α -生育酚	95.4~101.3	2.3
	γ -生育酚	94.2~99.3	1.9
	δ -生育酚	96.1~102.8	2.7
共轭亚油酸软胶囊	α -生育酚	95.1~99.5	2.1
	γ -生育酚	93.6~97.4	1.5
	δ -生育酚	94.4~103.8	3.8
鲑鱼油软胶囊	α -生育酚	96.9~99.2	0.9
	γ -生育酚	93.5~100.1	2.4
	δ -生育酚	96.4~97.8	1.4
鱼油 3322TG	α -生育酚	95.1~99.4	1.9
	γ -生育酚	94.5~100.4	2.3
	δ -生育酚	95.3~99.8	1.8

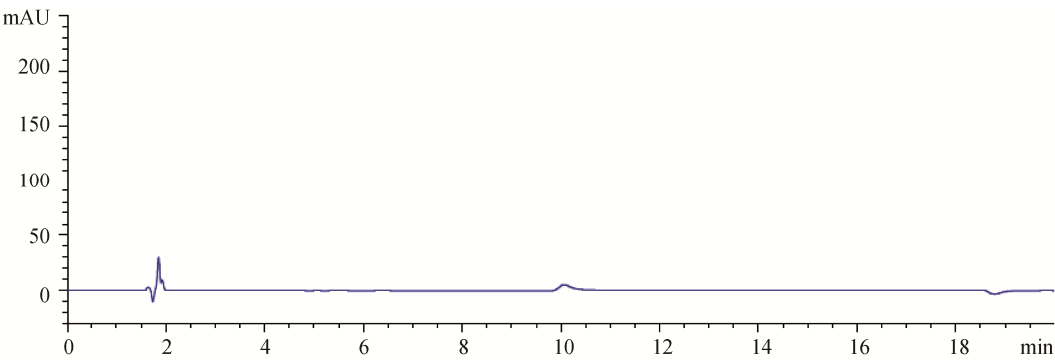


图 2 空白样品色谱图
Fig. 2 The chromatogram of blank samples

3.6 样品的测定

用本方法, 对辅助降血脂软胶囊、共轭亚油酸软胶囊、鲑鱼油软胶囊、鱼油 3322TG 进行总生育酚含量的测定, 共测定了 40 份样品, 结果均符合规定要求, 表明此方法能用于日常检验。样品的总生育酚的含量见表 4, 样品的图谱见图 3~6。

4 结 论

国家标准^[15]采用苯并[e]芘为内标, 氢氧化钾溶液皂化, 乙醚提取, 无水乙醇为溶剂, 测定样品的混合生育酚。但苯并[e]芘和乙醚接触毒性大, 对实验人员健康造成一定的危害; 而且试剂用量大, 样品前处理时间长(约 3 h), 检验成本较高。而本文

方法操作简捷, 结果准确可靠, 安全环保, 节省试剂, 节省样品前处理时间(约 45 min), 有利于降低检验成本, 特别适用于含有油类的保健食品检测混合生育酚。

表 4 总生育酚的含量(n=10)
Table 4 The content of tocopherols (n=10)

样品	结果(mg/100 g)	理论值(mg/100 g)
辅助降血脂软胶囊	102.4~110.7	105.0
共轭亚油酸软胶囊	568.0~617.0	600.0
鲑鱼油软胶囊	691.0~749.0	700.0
鱼油 3322TG	17.6~21.3	20.0

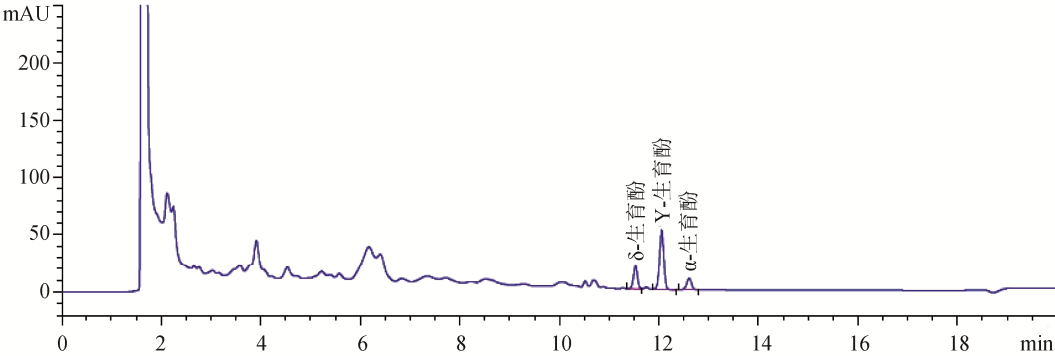


图 3 辅助降血脂软胶囊样品色谱图

Fig. 3 The chromatogram of auxiliary lowering soft capsule sample

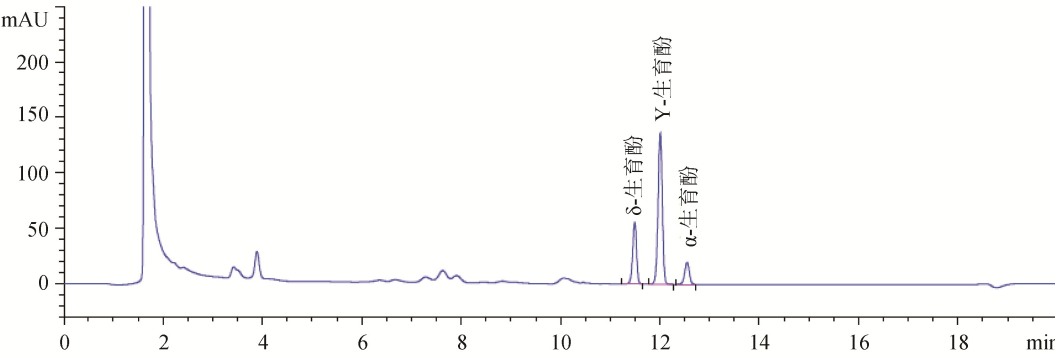


图 4 共轭亚油酸软胶囊样品色谱图

Fig. 4 The chromatogram of conjugated linoleic acid soft capsule sample

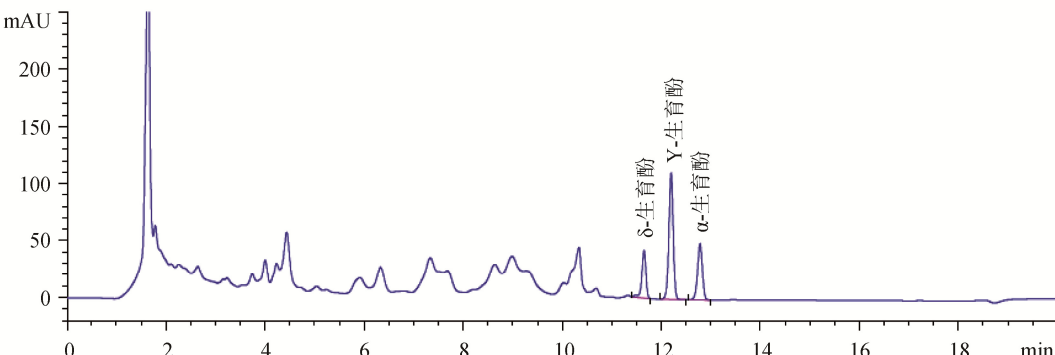


图 5 鲑鱼油软胶囊样品色谱图

Fig. 5 The chromatogram of salmon fish oil capsules sample

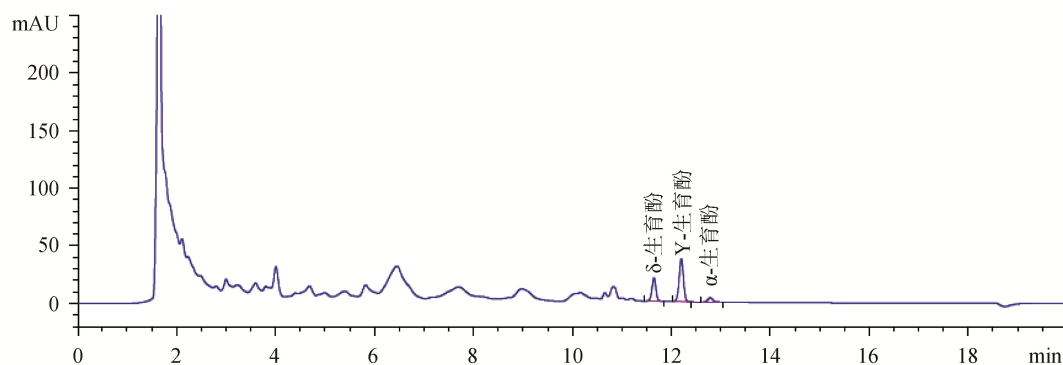


图 6 鱼油 3322TG 样品色谱图

Fig.6 The chromatogram of fish oil 3322TG sample

参考文献

- [1] Tütem E, Apak R, Günayd E, *et al.* Spectrophotometric determination of vitamin E (α -tocopherol) using copper (II) neocuproine reagent [J]. *Talanta*, 1997, 44: 249–255.
- [2] Proetp P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E [J]. *Anal Biochem*, 1999, 269: 337–341.
- [3] Amin AS. Colorimetric determination of tocopheryl acetate (Vitamin E) in pure form and in multi-vitamin capsules [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2001, 51: 267–272.
- [4] Jadoon S, Waseem A, Yaqoob M, *et al.* Flow injection spectrophotometric determination of vitamin E in pharmaceuticals milk powder and blood serum using potassium ferricyanide-Fe (III) detection system [J]. *Chin Chem Lett*, 2010, 21: 712–715.
- [5] 中华人民共和国药典第二部[M]. 中国医药科技出版社, 2010. “Pharmacopoeia of the People's Republic of China”2010 edition [M]. Chinese Medical Science and Technology Press, 2010.
- [6] GB 19191-2003 食品添加剂 天然维生素 E [S]. GB 19191-2003 Food additive-natural vitamin E [S].
- [7] Kamal A, Gorgen S, Pettersson J, *et al.* Normal-phase high performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols comparison of different chromatographic columns [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 881: 217–227.
- [8] Nagy K, Courtet MC, Holst B, *et al.* Comprehensive analysis of vitamin e constituents in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2007, 79: 7087–7096.
- [9] GB/T 17812-2008 饲料中维生素 E 的测定高效液相色谱法 [S]. GB/T 17812-2008 Determination of vitamin E in feeds high-performance liquid chromatography [S].
- [10] 王晖, 刘红河, 尹江伟. HPLC 用于食品中维生素 A 和维生素 E 的测定 [J]. *中国热带医学*, 2006, 6(5): 856–857. Wang H, Liu HH, Yin JW. Determination of vitamin A and vitamin E by HPLC in foods [J]. *China Tropical Med*, 2006, 6(5): 856–857.
- [11] Paliakov EM, Crow BS, Bishop MJ, *et al.* Rapid quantitative determination of fat-soluble vitamins and coenzyme Q-10 in human serum by reversed phase ultra-high pressure liquid chromatography with UV detection [J]. *J Chromatogr B*, 2009, 877: 89–94.
- [12] Gliszczynska AS, Sikorska E. Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1048: 195–198.
- [13] Tasioula MM, Okogeri O. Simultaneous determination of phenolic compounds and tocopherols in virgin olive oil using HPLC and UV detection [J]. *Food Chem*, 2001, 74: 377–383.
- [14] Gimeno E, Calero E, Castellote AI, *et al.* Simultaneous determination of α -tocopherol and β -carotene in olive oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 881: 255–259.
- [15] GB/T 5009.82-2003 食品中维生素 A 和维生素 E 的测定 [S]. GB/T 5009.82-2003 Determination of retinol and tocopherol in foods [S].

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



苏昭仑, 执业中药师, 主要研究方向
为中药和保健食品安全检测。
E-mail: suwheel@126.com