

微囊化保健食品破壁技术的优化及水溶性维生素含量的测定

郭去非, 周华生*, 成恒嵩, 戴舒春

(无锡健特药业有限公司, 无锡 214091)

摘要: **目的** 优化微囊化保健食品的破壁技术并测定水溶性维生素含量。**方法** 采用正交设计分别优化超声波破壁法、匀浆搅拌破壁法、酶解破壁法和微波破壁法4种破壁技术的提取工艺, 破壁后用超高效液相色谱测定维生素 B₁、B₂、B₆、B₉、V_C 5种水溶性维生素的含量。**结果** 4种破壁技术的最佳条件分别为: 超声破壁法, 功率 90 W、温度 65 °C 和时间 20 min; 匀浆搅拌破壁法, 转速 550 r/min、温度 60 °C 和时间 30 min; 酶解破壁法, 加酶量(木瓜蛋白酶: 淀粉酶: 酸性脂肪酶=100:200:200 U/g 样品)、温度 45 °C, pH 6.80 和时间 6 h; 微波破壁法, 两个阶段程序升温分别为室温~50 °C, 50 °C~80 °C。4种破壁法处理后的水溶性维生素含量差异不显著。**结论** 4种破壁技术都可用于微囊化保健食品的水溶性维生素含量的测定。

关键词: 微囊化; 破壁技术; 保健食品; 水溶性维生素; 超高效液相色谱法

Optimization of wall-broken techniques of micro-encapsulation health foods and determination of water-soluble vitamins

GUO Qu-Fei, ZHOU Hua-Sheng*, CHENG Heng-Song, DAI Shu-Chun

(Wuxi Giant Pharmaceutical Co.Ltd., Wuxi 214091, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the wall-broken techniques of micro-encapsulation healthy foods and determine the content of water-soluble vitamins. **Methods** Four kinds of wall-broken techniques including ultrasound, homogenisation, enzymatic and microwave were optimized by orthogonal experiment, and 5 kinds of water-soluble vitamins such as B₁, B₂, B₆, B₉, V_C were detected by ultra performance liquid chromatography (UPLC). **Results** The optimum conditions of 4 wall-broken methods were as follow: ultrasound technology: the power of 90 W, temperature of 65 °C, time of 20 min; homogenisation: speed of 550 r/min, temperature of 60 °C, time of 30 min; enzymatic method: enzyme amount (papain:amylase:acid lipase = 100:200:200 U/each sample), temperature of 45 °C, pH 6.80, time of 6 h; microwave technology: 2 heating stages of room temperature~50 °C, 50 °C~80 °C. The statistical analysis showed the vitamin content of each technique was non-significant. **Conclusion** All of 4 kinds of wall-broken methods can be used to detect the water-soluble vitamins in micro-encapsulation healthy foods.

KEY WORDS: micro-encapsulation; wall-broken technology; health food; water-soluble vitamins; ultra-high performance liquid chromatography

*通讯作者: 周华生, 副主任药师, 主要研究方向为药品、保健食品研制与质量分析. E-mail: wjzhsh@126.com

*Corresponding author: ZHOU Hua-Sheng, Associate Chief Pharmacist, Wuxi Giant Pharmaceutical Co., Ltd., Wuxi 214091, China, E-mail: wjzhsh@126.com

1 引言

食品微囊化又称微胶囊技术, 是一种用成膜材料将食用的固体、液体和气体原料包裹(包埋)成 1~500 μm 的微小颗粒, 以提高其稳定性、减轻不良气味、缓解控释有效成分、提高生物利用度、便于加工、储存和运输^[1,2]。水溶性维生素主要包括 B 族维生素和维生素 C, 易受外界环境因素如光、热、氧、湿度、pH 等影响产生降解和变质, 故进行微囊化处理尤为必要^[3]。测定水溶性维生素含量时, 必须要进行破壁处理, 将包裹在囊壁内的维生素溶解于稳定的提取液中, 再选择合适的方法测定其含量。其目的是能够准确测定微囊化保健食品中的水溶性维生素, 并为微囊化脂溶性维生素的测定提供借鉴。

国内外对于微囊化保健食品破壁技术尚未形成系统研究, 本研究筛选了 4 种破壁技术, 之后采用超高效液相色谱测定破壁后的多种水溶性维生素含量, 旨在为相关产品的质量控制提供参考。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

2.1.1 供试保健食品

黄金搭档多种维生素片(中老年型)、黄金搭档多种维生素矿物质片(男士型)(无锡健特药业有限公司); 养生堂成人复合维生素片(海南养生堂药业有限公司); 善存多维元素片(惠氏制药有限公司)。

2.1.2 试剂及仪器

盐酸硫胺素(维生素 B₁ 含量 99.1%)、核黄素(维生素 B₂ 含量 99.5%)、吡哆醇(维生素 B₆ 含量 100%)、叶酸(维生素 B₉ 含量 92.3%)、抗坏血酸(维生素 C 含量 96.9%)(美国 Sigma 公司)。

木瓜蛋白酶 20 万 U/g、淀粉酶 40 万 U/g、酸性脂肪酶 20 万 U/g(丹麦 Novo Nordisk 公司)。

乙腈(色谱纯, 美国 Fish Scientific 公司); 醋酸铵(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 超纯水。

Acquity UPLC 超高效液相色谱仪(配备 UV-FLR 检测器, 美国 Waters 公司); Mars 密封微波仪(美国培安公司); D-2000 多功能匀浆搅拌机(上海硕光电子科技有限公司); Kq-2200DE 数控超声清洗器(昆山市超声有限公司); AE-240 分析天平(瑞士 Mettler 公司)。

2.2 实验方法

所有实验设计都在预备和单因素试验的基础上, 综合考虑正交试验影响因素和水平^[4,5]。超声波破壁法、匀浆搅拌机破壁法、酶解破壁法和微波破壁法这 4 种破壁技术选用黄金搭档多种维生素片(中老年型)为实验材料。为扩大和验证其破壁效果, 还选择同类型其他多种保健食品, 如

黄金搭档多种维生素片(男士型)、养生堂成人维生素片、善存多维元素片, 并分别用超高效液相色谱法测定的维生素 B₁、B₂、B₆、B₉ 及 V_C 含量作为考核指标。

2.2.1 超声波破壁试验

通过单因素试验, 分析影响超声波破壁的主要因素是: 功率、温度和时间 3 个因素, 进行 L₉(3³)正交试验, 见表 1。

表 1 超声波破壁试验正交表
Table 1 The orthogonal test of ultrasonic wall-broken

水平	因素		
	A 功率(W)	B 温度(°C)	C 时间(min)
1	70	60	10
2	80	65	15
3	90	70	20

2.2.2 匀浆搅拌机破壁试验

试验选用的匀浆搅拌机可控温、控速和控时, 通过单因素试验, 分析影响匀浆搅拌机破壁主要因素是: 转速、温度和时间 3 个因素, 进行 L₉(3³)正交试验, 见表 2。

表 2 匀浆搅拌机破壁试验正交表
Table 2 The orthogonal test of homogenisation wall-broken

水平	因素		
	A 转速(r/min)	B 温度(°C)	C 时间(min)
1	450	40	30
2	550	50	60
3	650	60	90

2.2.3 酶解破壁试验

通过预试验确定加入复合酶的配比如下, 木瓜蛋白酶: 淀粉酶: 酸性脂肪酶=100:200:200 U/g 样品。影响酶解破壁主要因素是: 温度、pH 和时间 3 个因素, L₉(3³)试验见表 3。

表 3 酶解破壁试验正交表
Table 3 The orthogonal test of enzymatic wall-broken

水平	因素		
	A 温度(°C)	B pH	C 时间(h)
1	40	5.8	4
2	45	6.8	5
3	50	7.8	6

2.2.4 微波破壁试验

选用具有自动程序控温、控时和控压的微波仪及配套的高强度耐温、耐压和耐酸聚四氟乙烯微波管。试验筛选 3 个有代表性的设计条件, 每个条件要求 2 个阶段的程序升温, 见表 4。

表4 微波破壁实验条件表
Table 4 The test conditions of microwave wall-broken

阶段	条件 1			条件 2			条件 3		
	温度 (°C)	程序升温时间 (min)	保持时间 (min)	温度 (°C)	程序升温时间 (min)	保持时间 (min)	温度 (°C)	程序升温时间 (min)	保持时间 (min)
1	室温~50	3	3	室温~50	5	5	室温~50	8	8
2	50~80	4	4	50~80	6	6	50~80	10	10

2.2.5 超高效液相色谱法测定水溶性维生素

超高效液相色谱测定水溶性维生素 B₁、B₂、B₆、B₉ 及 V_C 方法主要参照文献^[5]。但本研究选用 0.05 mol/L 的醋酸铵溶液作为标准品配置溶液及样品提取溶液, 并进行了流动相梯度洗脱优化。

3 结果与分析

3.1 超声波破壁技术

超声波破壁主要分析功率、温度和时间 3 个因素对破壁效果的影响, 结果见表 5。

表5 超声波破壁正交试验结果
Table 5 The orthogonal results of ultrasonic wall-broken

试验号	A 功率	B 温度	C 时间	维生素 B ₁ 含量
	(W)	(°C)	(min)	mg/100 g
1	1	1	1	49.44
2	1	2	2	53.77
3	1	3	3	55.73
4	2	1	2	58.81
5	2	2	3	61.89
6	2	3	1	55.34
7	3	1	3	65.16
8	3	2	1	61.03
9	3	3	2	63.85
K ₁	52.98	57.80	55.27	
K ₂	58.68	58.90	58.81	
K ₃	63.35	58.31	60.93	
R	10.37	1.10	5.66	

通过极差(R)分析表明, 各因素对维生素 B₁ 含量影响主次顺序是 A > C > B, 超声波破壁最佳条件为 A₃B₂C₃, 即超声波破壁功率 90 W, 温度 65 °C, 时间 20 min。在此条件下进行了验证试验, 维生素 B₁ 含量为 65.20 mg/100 g。

3.2 匀浆搅拌破壁技术

匀浆搅拌破壁主要分析转速、温度和时间 3 个因素对破壁效果的影响, 结果见表 6。

表6 匀浆搅拌破壁正交试验结果
Table 6 The orthogonal results of homogenisation wall-broken

试验号	A 转速	B 温度	C 时间	维生素 B ₂ 含量
	(r/min)	(°C)	(min)	mg/100 g
1	1	1	1	51.68
2	1	2	2	55.32
3	1	3	3	58.95
4	2	1	2	62.18
5	2	2	3	66.62
6	2	3	1	69.80
7	3	1	3	63.39
8	3	2	1	68.24
9	3	3	2	61.78
K ₁	55.32	59.08	63.24	
K ₂	66.22	63.39	59.76	
K ₃	64.47	63.53	62.99	
R	10.90	4.45	3.48	

通过极差(R)分析表明, 各因素对维生素 B₂ 含量影响主次顺序是 A > B > C。匀浆搅拌破壁最佳条件为 A₂B₃C₁, 即转速 550 r/min, 温度 60 °C, 时间 30 min。在此条件下进行了验证试验, 维生素 B₂ 含量为 69.71 mg/100 g。

3.3 酶解破壁技术

在加酶量确定的基础上, 酶解破壁主要分析温度、pH 和时间 3 个因素对破壁效果的影响, 结果见表 7。

表 7 酶解破壁正交试验结果

Table 7 The orthogonal results of enzymatic wall-broken

试验号	A 温度 (°C)	B pH	C 时间 (h)	维生素 B ₆ 含量 mg/100 g
1	1	1	1	32.93
2	1	2	2	41.24
3	1	3	3	45.78
4	2	1	2	38.25
5	2	2	3	61.42
6	2	3	1	52.44
7	3	1	3	42.57
8	3	2	1	43.90
9	3	3	2	47.45
K ₁	39.99	37.92	43.09	
K ₂	50.70	48.85	42.31	
K ₃	44.64	48.56	49.93	
R	10.71	10.93	7.62	

通过极差(R)分析表明, 各因素对维生素 B₆ 含量主次顺序是 B>A>C。最佳条件为 A₂B₂C₃, 即温度 45 °C, pH 6.80, 时间 6 h。在此条件下进行了验证试验, 维生素 B₆ 含量为 62.17 mg/100 g。

表 9 不同破壁技术测定保健食品中水溶性维生素的结果(n=4)

Table 9 Results of water-soluble vitamins in health foods by different wall-broken techniques (n=4)

样品	维生素含量(mg/100 g)	超声波	匀浆搅拌	酶解	微波	RSD/%
黄金搭档中老年型	B ₁	65.11	64.31	65.32	66.40	1.32
	B ₂	67.24	68.14	69.15	68.06	1.15
	B ₆	61.18	63.22	62.35	61.28	1.56
	B ₉	11.46	12.10	10.47	13.05	9.22
	V _C	7482.33	7569.02	7539.10	7619.14	0.76
黄金搭档男士型	B ₁	157.20	166.11	173.21	173.31	4.55
	B ₂	168.09	152.30	175.17	174.22	6.31
	B ₆	189.17	181.06	167.30	161.34	7.26
	B ₉	11.12	10.32	9.05	11.06	9.34
	V _C	14872.21	13251.14	15112.13	13999.24	5.95
养生堂维生素片	B ₁	68.07	72.21	66.05	71.29	4.11
	B ₂	73.14	67.19	61.31	66.38	7.23
	B ₆	64.40	66.36	71.20	61.25	6.34
	B ₉	12.02	11.42	12.08	13.04	5.52
	V _C	6124.16	6325.07	6411.32	6522.30	2.65
善存多维片	B ₁	66.23	62.34	68.22	67.20	3.89
	B ₂	76.31	69.42	67.10	71.04	5.51
	B ₆	74.03	71.19	69.26	66.50	4.52
	B ₉	12.14	11.20	13.17	11.13	8.04
	V _C	3525.31	3712.32	3616.21	3655.14	2.17

3.4 微波破壁技术

3 组有代表性的微波破壁试验结果列于表 8。

表 8 微波破壁试验结果

Table 8 The results of microwave wall-broken

各维生素含量(mg/100 g)	条件 1	条件 2	条件 3
B ₁	43.91	65.34	32.15
B ₂	41.87	67.26	34.27
B ₆	44.12	68.61	36.65
B ₉	8.23	12.24	4.19
V _C	5218.13	7482.21	4261.34

结果表明, 采用两阶段程序升温使囊壁逐渐破碎, 既有利于囊壁降解, 又有利于维生素活性的保存。条件 1 程序升温时间及保温时间较短, 囊壁未完全破解, 维生素测定结果偏低, 未达到预期效果; 条件 2 程序升温及保温时间较合适, 囊壁全部破解, 其测定结果与上述正交试验 B₁、B₂、B₆ 最高值相当, 符合实际含量; 而条件 3 程序升温及保温时间较长, 维生素遭到破坏, 测定结果大为偏低。

3.5 不同破壁技术对不同微囊化保健食品中水溶性维生素的测定

试验选择目前市场上畅销的微囊化保健食品, 进行 4 种破壁处理, 分别用超高效液相色谱测定 5 种水溶性维生素含量, 结果见表 9。

由表9可知,4种破壁技术的RSD分别为: B_1 1.32%~4.55%, B_2 1.15%~7.32%, B_6 1.56%~7.26%, B_9 5.52%~9.34%, V_C 0.76%~5.95%, 结果都很接近, 误差都在允许范围内, 因此这4种破壁技术都可用于此类微囊化保健食品中水溶性维生素的测定。

4 讨论

要精确测定微囊化保健食品水溶性维生素, 所选择的提取液、破壁技术、测定方法必须符合待测水溶性维生素的理化性质, 这几者相互联系、缺一不可。

4.1 提取液的优化

水溶性维生素 B_1 、 B_2 、 B_6 、 B_9 、 V_C 都是在酸性条件下稳定, 遇光和高温条件容易降解和破坏^[6], 故一般选用稀盐酸(0.01~0.1 mol/L)作提取液, 超声波破壁^[7,8], 张连龙等^[9]选择(水:甲醇:0.25 mol/L 庚烷磺酸钠:乙酸:7%氨水=70:30:1.5:1.0:0.25, V:V:V:V:V)作提取液, 经超声波破壁, 高效液相色谱法测定保健品中 B_1 、 B_2 、 B_6 ; 也用同样的条件测定了保健食品中叶酸^[10]; 蒲明清等^[5]用 0.01 mol/L 盐酸做提取液, 超声波破壁, 超高效液相色谱测定保健食品多种水溶性维生素。本研究选用 0.05 mol/L pH 为 6.80 的中性偏酸醋酸铵溶液作为提取液, 因为醋酸铵是弱酸弱碱盐, 既考虑维生素 B_1 、 B_2 、 B_6 、 V_C 的酸性要求, 又兼顾到维生素 B_9 的溶解度。

4.2 提取温度的优化

除酸度符合水溶性维生素稳定条件外, 4种破壁技术最佳温度参数也都在最稳定范围内。其中超声波破壁温度为 65 °C, 匀浆破壁法最佳温度为 60 °C, 酶解破壁法最佳温度为 45 °C, 微波破壁法第一阶段的温度是室温~50 °C, 第二阶段的温度是 50~80 °C。同时操作均在避光条件下进行, 破壁后的样品均转移到棕色容量瓶中, 亦符合水溶性维生素避光稳定的要求。

4.3 测定方法的优化

目前水溶性维生素的测定方法方法虽然很多, 但无论是从发表的学术论文数量还是国家标准^[11], 主导的还是高效液相色谱法^[12,13], 本研究对流动相梯度洗脱条件优化, 未使用离子对试剂^[14], 可减少管道堵塞和柱体填料的腐蚀, 延长仪器及色谱柱的使用寿命。采用紫外-荧光串联检测器比单一使用的这两种检测器分离时间更短、峰型更窄、对称性更好, 6 min 内可使所有水溶性维生素达到基线分离, 最后出峰的 B_2 用荧光检测器不拖尾, 大大提高了分析准确度。

4.4 几种破壁方法的比较

4种破壁原理虽然不同, 但效果都很理想, 测定结果也很吻合, 超声波和匀浆搅拌破壁法较简单; 酶解破壁

法较温和安全, 设备仅需恒温培养箱; 微波破壁法可一次处理多个样品, 节约时间, 各实验室可根据实际情况灵活选用。

5 结论

研究水溶性维生素破壁技术和测定方法针对性强、实用价值大。本研究采用超声波破壁法、匀浆搅拌破壁法、酶解破壁法和微波破壁法对微囊化保健食品进行破壁处理, 并采用超高效液相色谱测定破壁后的多种水溶性维生素含量。结果表明4种破壁方法都可达到理想的破壁效果, 本研究也为相关产品的检测和质量控制提供了参考。

参考文献

- [1] 高慧生, 赵应征, 李校堃. 维生素微囊研究进展[J]. 医药导报, 2009, 28(7): 887-888.
Gao HS, Hao YZ, Li XK. The research of vitamin microcapsule [J]. Herald Med, 2009, 28(7): 887-888.
- [2] Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, *et al.* Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients [J]. Food Res Int, 2007, 40: 1107-1121.
- [3] 吴克刚, 柴向华. 食品微胶囊技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006.
Wu KG, Chai XH. Food microencapsulation technology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2006.
- [4] 杨虎, 钟波, 刘琼荪. 应用数理统计[M]. 北京: 清华大学出版社, 2012.
Yang H, Zhong B, Liu QS. Application of mathematical statistics [M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2012.
- [5] 蒲明清, 周华生, 成恒嵩, 等. 超高效液相色谱法测定保健食品中的多种水溶性维生素[J]. 现代食品科技, 2012, 28(7): 886-889.
Pu MQ, Zhou HS, Cheng HS, *et al.* Determination of water-soluble vitamins in health foods by UPLC [J]. Mord Food Sci Technol, 2012, 28(7): 886-889.
- [6] 王璋, 许时婴, 汤坚. 食品化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2012.
Wang Z, Xu SY, Tang J. Food Chemistry [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2012.
- [7] Chuney K, Tinger K, Analy L. Determination of water soluble vitamins [J]. Chromatogr, 1998, 31(15): 2207-2210.
- [8] Hou W, Wang E. Determination of water soluble vitamins by liquid chromatography with parallel dual-electrodechemical detector [J]. Talanta, 2002, 37: 841-844.
- [9] 张连龙, 周华生. 双通道 RP-HPLC 法测定黄金搭档组合维生素片中 V_{B1} 、 V_{B2} 和 V_{B6} 的含量[J]. 安徽医药, 2005, 9(10): 742-743.
Zhang LL, Zhou HS. Determination of V_{B1} , V_{B2} , V_{B6} in golden partner vitamins tablet by double channel RP-HPLC [J]. Anhui Med Pharm J, 2005, 9(10): 742-743.
- [10] 张连龙, 周华生, 叶科航. RP-HPLC 法测定黄金搭档组合维生素片中叶酸含量[J]. 安徽医药, 2006, 10(1): 24-25.
Zhang LL, Zhou HS, Ye KH. Determination of folic acid in golden partner vitamins tablet by RP-HPLC [J]. Anhui Med Pharm J, 2006, 10(1): 24-25.
- [11] GB/T 5009.197-2003 保健食品中盐酸硫胺素、盐酸吡哆醇、盐酸、烟

酰胺和咖啡因的测定[S].

GB/T 5009.197-2003 Determination of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride, niacin, niacinamide and caffeine in health foods [S].

[12] Chandra-Hioe MV, Bucknall MP, Arcot J. Folate analysis in foods by UPLC-MS/MS: development and validation of a novel ,high throughput quantitative assay; folate levels determined in Australian fortified breads [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 401(3): 1035–1042.

[13] 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 中水溶性维生素[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.

[14] 张连龙, 周华生, 成恒嵩. 反相离子对色谱测定食品中 B 族维生素的研究进展[J]. *现代食品科技*, 2009, 25(7): 830–833.

Zhang LL, Zhou HS, Cheng HS. Determination of vitamins B in foods by

reversed-phase ion-pair chromatography [J]. *Mord Food Sci Technol*, 2009, 25(7): 830–833.

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



郭去非, 助理工程师, 主要研究方向为药品、保健食品质量分析与研究。

E-mail: 13003378896@163.com



周华生, 副主任药师, 主要研究方向为药品、保健食品研制与质量分析。

E-mail: wjzhsh@126.com