

气相色谱-质谱联用法快速检测乳制品中 维生素 E 含量

吴志成, 周朗君, 岑建斌, 李秀英*

(广州质量监督检测研究院, 广州 511447)

摘要: **目的** 建立正己烷涡旋辅助提取-气相色谱-质谱联用法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)快速检测乳制品中 α -生育酚和 α -醋酸生育酚的分析方法。**方法** 样品经甲醇沉淀蛋白后, 采用正己烷涡旋提取, 提取液以 HP-5MS 色谱柱分离, GC-MS 选择离子监测模式测定。**结果** α -生育酚和 α -醋酸生育酚在 0.05~10 mg/L 浓度范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.999; α -生育酚和 α -醋酸生育酚检出限($S/N=3$)分别为 0.51 mg/kg 和 0.25 mg/kg, 定量限($S/N=10$)分别为 1.70 mg/kg 和 0.83 mg/kg。质控样 NIST SRM 1849a 检测值与参考值偏差为 -3.75%, 日内相对标准偏差(RSD, $n=5$)为 1.38%~2.25%, 日间相对标准偏差为 1.83%。**结论** 该方法快速、准确、灵敏, 适用于乳制品中维生素 E 含量的快速测定。**关键词:** 乳制品; α -生育酚; α -醋酸生育酚; 气相色谱-质谱联用法

Rapid determination of vitamin E content in dairy products by gas chromatography-mass spectrometry

WU Zhi-Cheng, ZHOU Lang-Jun, CEN Jian-Bin, LI Xiu-Ying*

(Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 511447, China)

ABSTRACT: Objective To established a rapid determination method of alpha-tocopherol and alpha-tocopheryl acetate in dairy products using vortex-assisted extraction and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Methods** Samples were extracted with n-hexane after proteins were precipitated by methanol. Then the isoocane layer was separated by HP-5MS capillary chromatographic column and detected by selected ion monitoring (SIM) mode of GC-MS. **Results** Under the optimized conditions, the calibration curves of target analytes were linear in the range of 0.05~10 mg/L with correlation coefficients higher than 0.999. Limits of detection (LODs, $S/N=3$) of α -tocopherol and α -tocopheryl acetate were respectively 0.51 mg/kg and 0.25 mg/kg, and limits of quantification (LOQs, $S/N=10$) were respectively 1.70 mg/kg and 0.83 mg/kg. The method was validated by NIST SRM 1849a, with the deviation of result and certified value at -3.75%. Intra-day relative standard deviations (RSDs) were between 1.38% and 2.25%, and inter-day RSD was 1.83%. **Conclusion** The proposed method is rapid, accurate and sensitive, which is suitable for the detection of vitamin E content in dairy products.

KEY WORDS: dairy products; α -tocopherol; α -tocopheryl acetate; gas chromatography-mass spectrometry

*通讯作者: 李秀英, 高级工程师, 主要研究方向为食品及相关产品质量安全检测技术研究。E-mail: suiey-lee@163.com

*Corresponding author: LI Xiu-Ying, Senior Engineer, Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 511447, China. E-mail: suiey-lee@163.com

1 引言

维生素 E 是一系列苯并二氢吡喃衍生物的总称, 天然维生素 E 有多种存在形式, 根据甲基数目和位置及是否含有双键可将其分为 α -、 β -、 γ -、 δ -生育酚和生育三烯酚, 其中 α -生育酚生物效价最高^[1]。但是由于生育酚性质活泼不稳定, 因此在实际添加到食品中时一般采用更稳定的酯化形态, 目前广泛使用于乳制品中的人工合成的 dl- α -生育酚醋酸酯^[2]。

国内报道关于乳制品中维生素 E 的检测方法主要有高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法、气相色谱法等, 而前处理技术则与现行国标方法(GB 5413.9-2010)类似, 采用碱液将生育酚醋酸酯皂化成生育酚后用石油醚、乙醚等溶剂提取^[3-5]。由于受皂化率、提取步骤繁琐等因素影响, 会导致所检测的维生素 E 含量与所添加含量有差异。而国际上的检测标准(如 ISO 20633:2015^[6]、AOAC 2012.10^[7])则是直接提取, 采用正相色谱法同时检测 α -生育酚和 α -醋酸生育酚, 更能反映样品中维生素 E 实际含量。我国 GB 14756-2010《食品安全国家标准 食品添加剂 维生素 E(dl- α -醋酸生育酚)》^[8]和 GB 29942-2013《食品安全国家标准 食品添加剂 维生素 E(dl- α -生育酚)》^[9]中采用气相色谱法检测醋酸生育酚和 α -生育酚, 这仅是针对含量在 96%~102%的维生素 E。由于乳制品样品基质复杂, 维生素含量较低, 因此采用气相色谱法检测时杂质干扰严重。由于质谱法具有较强的抗干扰能力、定性能力, 气相色谱-质谱联用法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)已广泛应用于食品的检测中^[10-12], 但应用于乳制品中维生素 E 的检测报道甚少。本研究采用甲醇沉淀蛋白, 正己烷快速提取的前处理方法, 将气相色谱法和质谱法联用, 应用于乳制品中 α -生育酚和 α -醋酸生育酚的检测。

2 材料与方 法

2.1 仪器、试剂与材料

7890A GC-5975C 气相色谱-质谱联用仪(GC-MS), 配 7683 自动进样器(美国 Agilent 公司); MS2 Minshaker 涡旋振荡器(德国 IKA 公司)。

α -生育酚和 α -醋酸生育酚标准品(纯度大于 98%, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 去离子水(18.2 M Ω ·cm, 美国 Millipore 公司纯水仪制备)。

2.2 标准溶液配制

标准储备溶液: 分别精确称取 α -生育酚、 α -醋酸生育酚标准品各 25 mg 至 25 mL 棕色容量瓶中, 以正己烷定容至刻度, 配制成 1000 mg/L 的单一标准储备液, 4 °C 冰箱中保存备用。

混合标准中间液: 量取适量 α -生育酚、 α -醋酸生育酚标准储备溶液, 用正己烷配制成浓度为 100 mg/L 的混合标准中间液。

混合标准工作液: 吸取适量体积混合标准中间液至 10 mL 容量瓶中, 用正己烷定容至刻度, 配制成浓度为 0.05、0.25、1.0、5.0 和 10 mg/L 的系列标准工作溶液。由于维生素标准品易受光照、温度等环境因素的影响, 因此配制过程中要保证避光、现配现用。

2.3 样品前处理

固体样品: 称取 10 g(精确至 0.001 g)样品于 100 mL 容量瓶中, 加入 40~50 mL 40 °C 温水溶解, 以超纯水定容至刻度。取 5 mL 复溶后的液体于 50 mL 具塞塑料离心管中, 加入 20 mL 甲醇并涡旋振荡 30 s, 静置 5 min 沉淀蛋白质; 然后准确加入 10 mL 正己烷涡旋 1 min; 最后加入 5 mL 超纯水涡旋 20 s; 4000 r/min 离心 2 min 后取上清液经 0.22 μ m 微孔膜过滤, 滤液供 GC-MS 分析。样品响应值应在 2.2 系列标准工作溶液响应范围内, 超出响应范围的应做适量稀释。

液体样品: 直接取 5 g 试样于 50 mL 具塞塑料离心管中, 提取步骤与固体样品一致。

2.4 气相色谱-质谱条件

2.4.1 气相色谱条件

色谱柱: HP-5 MS(30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m)石英毛细管气相色谱柱; 载气: 高纯氦气, 恒流, 1.5 mL/min; 升温程序: 初始温度 220 °C, 保持 5 min, 以 10 °C/min 升至 280 °C, 保持 15 min, 再以 20 °C/min 升至 300 °C, 保持 2 min; 进样口温度: 250 °C; 进样量: 1 μ L, 不分流进样; 溶剂延迟: 6 min。

2.4.2 质谱条件

离子源: 电子轰击(EI)离子源, 电离能量: 70 eV; 离子源温度: 230 °C; 四极杆温度: 150 °C; 传输线温度: 280 °C; 选择离子监测(SIM)模式; α -生育酚和 α -醋酸生育酚的保留时间和特征离子见表 1。

表 1 目标化合物的质谱参数
Table 1 MS parameters of compounds

编号	目标物	CAS 编号	保留时间 (min)	定量离子(m/z)	定性离子(m/z)
1	α -生育酚	10191-41-0	12.6	165	430, 205
2	α -醋酸生育酚	7695-91-2	13.3	430	165, 472

3 结果与分析

3.1 沉淀剂的选择

比较了甲醇、乙腈、丙酮 3 种溶剂对蛋白质的沉淀效果及维生素 E 的回收情况, 结果表明, 3 种溶剂对蛋白质的沉淀效果依次是乙腈 > 丙酮 > 甲醇。由于丙酮和提取溶剂(正己烷或异辛烷等)互溶, 因此不选择丙酮作为沉淀剂。乙腈和甲醇作为沉淀剂时, α -生育酚和 α -醋酸生育酚的回收率相近, 考虑到乙腈的毒性较强, 因此选择甲醇作为沉淀剂。

进一步考察甲醇用量为 5、10、15、20 和 25 mL 时对 α -生育酚和 α -醋酸生育酚的回收率的影响。结果表明, 甲醇用量为 5 mL 时沉淀效果不明显, 提取时有一定的乳化现象, α -生育酚和 α -醋酸生育酚回收率较低, 甲醇用量在 20 mL 以上, 回收率较好, 选择甲醇用量为 20 mL。

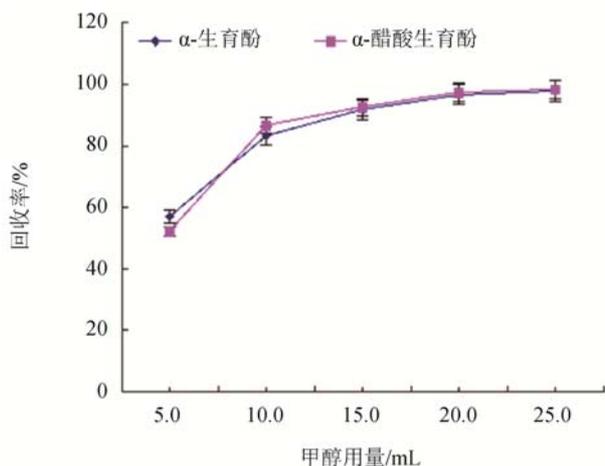


图 1 甲醇用量对目标分析物提取回收率的影响($n=2$)

Fig. 1 Effect of volume of methanol on extraction recovery of target analyte ($n=2$)

3.2 提取剂的选择

α -生育酚和 α -醋酸生育酚均为环链型结构, 极性较弱, 且亲脂性强, 因此选择常用的弱极性溶剂正己烷、环己烷、异辛烷和石油醚作为提取溶剂, 比较各溶剂对 2 种目标化合物的提取效率。结果表明, 环状结构的环己烷提取效率最低, 石油醚次之, 异辛烷较好, 正己烷最好。可能是由于目标物的链型结构较明显, 因此采用链型结构的正己烷作为提取剂, 回收率更好。

3.3 色谱条件的优化

α -生育酚和 α -醋酸生育酚均是环链型结构, 极性较弱, 因此选择极性较弱的色谱柱进行分离, 考察 DB-1 MS 和 HP-5 MS 毛细管气相色谱柱对目标物的保留和分离情况^[13,14], 结果表明 2 种色谱柱对 2 种目标物均有较好的保留,

分离情况良好, 而 DB-1 MS 的保留时间稍长, 且由于 HP-5 MS 的应用更为广泛, 因此选择 HP-5 MS 作为分离的色谱柱。在优化的条件下 α -生育酚和 α -醋酸生育酚混合标准工作液在 SIM 模式下获得选择离子图见图 3。

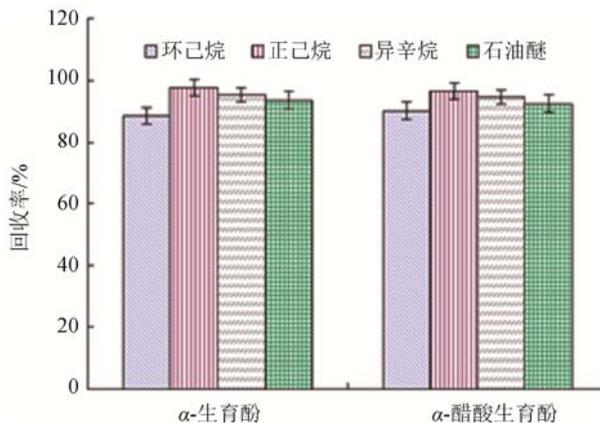
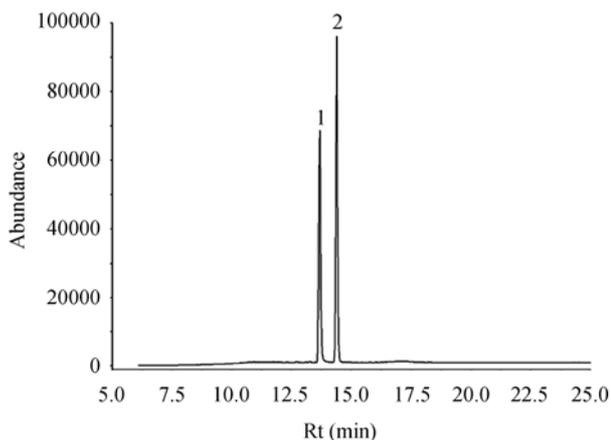


图 2 不同提取剂对目标分析物提取回收率的影响($n=2$)

Fig. 2 Effect of different solvents on extraction recovery of target analyte ($n=2$)



1: α -生育酚, 2: α -醋酸生育酚, 浓度均为 2.00 mg/L

1: 2.00 mg/L α -tocopherol, 2: 2.00 mg/L α -tocopheryl acetate

图 3 混合标准工作液的选择离子图($m/z=430$)

Fig. 3 Select ion chromatogram of mixed standard solution ($m/z=430$)

3.4 线性关系与检出限

在优化条件下, 对 2.2 节的系列标准工作溶液进行测定, 以目标物的质量浓度(X , mg/L)为横坐标, 定量离子的峰面积(Y)为纵坐标作图, 得到 α -生育酚和 α -醋酸生育酚的线性方程(表 2)。由表 2 可知, α -生育酚和 α -醋酸生育酚分别在 0.05~10 mg/L 和 0.04~10 mg/L 浓度范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.999。以 3 倍信噪比($S/N=3$)计算检出限, 以 10 倍信噪比($S/N=10$)计算定量限, 结合样品的前处理过程, 计算出 α -生育酚和 α -醋酸生育酚的检出限分别为 0.51 mg/kg 和 0.25 mg/kg, 定量限分别为 1.70 mg/kg 和 0.83 mg/kg。

表 2 2 种目标物的线性方程、相关系数、检出限和定量限
Table 2 Linear equations, correlation coefficients, detection limits and quantification limits of compounds

化合物	线性方程	相关系数(r^2)	检出限(mg/kg)	定量限(mg/kg)
α -生育酚	$Y=526423X-13207$	0.9996	0.51	1.70
α -醋酸生育酚	$Y=738155X-6015$	0.9991	0.25	0.83

表 3 准确性与精密度测试结果
Table 3 Determination results of accuracy and precisions

测定 天数	含量 ¹ (mg/kg)			日内相对标准 偏差(%)	日间相对标准 偏差(%)
	α -生育酚	α -醋酸生育酚	折算为 α -醋酸生育酚总量 ²		
1	38.4, 43.3, 39.1, 40.2, 40.8	114.6, 101.2, 106.8, 107.3, 110.2	156.8, 148.8, 149.8, 151.5, 155.0	2.25	
2	42.6, 39.2, 41.8, 40.5, 38.8	105.3, 107.1, 104.3, 105.9, 112.4	152.1, 150.2, 150.2, 150.4, 155.0	1.38	1.83
3	39.6, 38.8, 42.7, 40.6, 41.1	111.1, 106.4, 109.3, 104.7, 108.5	154.6, 149.0, 156.2, 149.3, 153.7	2.12	

注: ¹ α -醋酸生育酚证书值为(158±18) mg/kg; ² 1 mg dl- α -醋酸生育酚=0.91 mg dl- α -生育酚^[15]

表 4 本方法与国标法检测结果的比较
Table 4 Comparison of the proposed method and the GB method

样品	本法检测结果(mg/kg)	国标法检测结果(mg/kg)	偏差(%)
婴儿配方乳粉	91.4	88.7	3.00
较大婴儿配方乳粉	103.2	96.4	6.81
幼儿配方乳粉	101.5	95.5	6.09
儿童配方乳粉	80.6	76.7	4.96
中老年配方粉	54.5	49.8	9.01
早产儿低体重配方粉	119.7	107.9	10.4
液体乳 1	34.6	31.1	10.7
液体乳 2	31.0	28.7	7.71
液体乳 3	43.1	40.6	5.97

注: 检测结果均以 α -生育酚计, 1 mg dl- α -醋酸生育酚=0.91 mg dl- α -生育酚^[15]

3.5 方法的准确度与精密度

采用乳粉质控样品 NIST SRM 1849a 验证方法的可靠性, 由于质控样品均匀性良好, 且数量较少, 因此直接称取 0.5 g 质控样品加温水溶解至 5 mL 后按方法进行提取、测定。连续测量 3 d, 每天平行测定 5 次, 结果见表 3。可见, 质控样测定值均值为 152.2 mg/kg(以 α -醋酸生育酚总量计), 与参考值 158 mg/kg 偏差-3.75%, 表明方法准确性良好, 日内相对标准偏差在 1.38%~2.25%, 日间相对标准偏差为 1.83%, 表明方法稳定性良好。

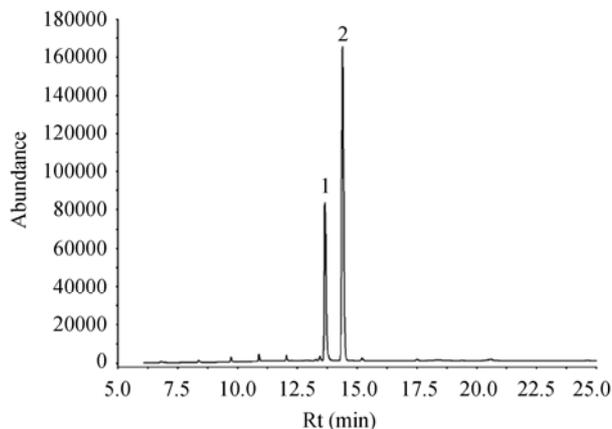
3.6 与国标方法的对比

分别使用本方法与现行国家标准方法 GB5413.9-2010《食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中维生素 A、D、E 的测定》测定 9 个样品(6 个乳粉、3 个液体乳)中维生素 E

含量, 结果见表 4, 显示本方法比国标方法的检测结果高 3.0%~10.7%。可能是由于国标方法将试样用氢氧化钾溶液将 α -生育酚醋酸酯皂化为 α -生育酚后经提取、浓缩再进行色谱检测, 受皂化率的影响, 且 α -生育酚稳定性差, 经过繁琐的提取浓缩步骤可能带来误差。而本方法前处理简单快速, 结合质谱的强抗干扰能力, 可以实现乳制品样品中维生素 E 的快速准确定量分析。

4 结 论

本研究采用甲醇沉淀蛋白质、正己烷涡旋提取的简单快速前处理方法, 结合 GC-MS 仪器方法, 通过优选沉淀剂和提取剂等前处理条件和仪器测试条件, 建立了快速准确定量测定乳制品中 α -生育酚和 α -醋酸生育酚的分析方法。



1: α -生育酚; 2: α -醋酸生育酚

1: α -tocopherol; 2: α -tocopheryl acetate

图 4 幼儿配方乳粉提取液的选择离子图($m/z=430$)

Fig. 4 Select ion chromatogram of infant formula milk powder ($m/z=430$)

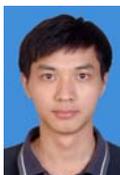
方法学指标和实际样品检测结果表明, 方法操作简便、分析时间短、灵敏度高, 为乳制品中维生素 E 的快速准确测定提供了有效依据。

参考文献

- [1] 周筱丹, 董晓芳, 佟建明. 维生素 E 的生物学功能和安全性评价研究进展[J]. 动物营养学报, 2010, 22(4): 817-822.
Zhou XD, Dong XF, Tong JM. Research advances in biological functions and safety evaluation of vitamin E [J]. Chin J Anim Nutr, 2010, 22(4): 817-822.
- [2] 李军生, 黄位明, 秦国梅, 等. 维生素 E 酯衍生物稳定性及其在食品中的应用研究[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 29-32.
Li JS, Huang WM, Qin GM, *et al.* Study on vitamin E ester derivative's chemical stability and application in food products [J]. Food Sci, 2005, 26(8): 29-32.
- [3] GB 5413.9-2010 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中维生素 A、D、E 的测定[S].
GB 5413.9-2010 National food safety standard-Determination of vitamin A,D,E in foods for infants and young children, milk and milk products [S].
- [4] 朱姜, 张鹏, 杨嘉, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定奶粉中的维生素 A、维生素 D、维生素 E[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(11): 1733-1736, 1739.
Zhu J, Zhang P, Yang J, *et al.* Determination of vitamin A, D, E in milk powder by HPLC-MS/MS [J]. Chin J Health Lab Technol, 2015, 25(11): 1733-1736, 1739.
- [5] 罗赟, 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 Technol, 2013, 23(4): 824-826.
- [6] ISO 20633:2015 Infant formula and adult nutritionals-Determination of vitamin E and vitamin A by normal phase high performance liquid chromatography [S].
- [7] AOAC Official Method 2012.10 Simultaneous determination of 13-cis and all-trans Vitamin A palmitate (retinyl palmitate), vitamin A acetate (retinyl acetate), and total vitamin E (dl- α -tocopherol and dl- α -tocopherol acetate) in infant formula and adult nutritionals by normal-phase HPLC [S].
- [8] GB 14756-2010 食品安全国家标准 食品添加剂 维生素 E(dl- α -醋酸生育酚)[S].
GB 14756-2010 National food safety standard-Food additive vitamin E (dl- α -tocopheryl acetate) [S].
- [9] GB 29942-2013 食品安全国家标准 食品添加剂 维生素 E(dl- α -生育酚)[S].
GB 29942-2013 National food safety standard-Food additive Vitamin E (dl- α -tocopherol) [S].
- [10] 钱冲, 勾新磊, 周明强, 等. 气相色谱-质谱法在食品药品安全检测中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(11): 4307-4311.
Qian C, Gou XL, Zhou MQ, *et al.* Applications of gas chromatography-mass spectrometry in the safety detection of food and drug [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(11): 4307-4311.
- [11] 陈树东, 蔡玮红, 林晓佳, 等. 顶空-气相色谱-质谱法测定婴幼儿米粉中的脂类降解产物[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(7): 2887-2894.
Chen SD, Cai WH, Lin XJ, *et al.* Determination degradation products of lipids in formula rice cereal by headspace-gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(7): 2887-2894.
- [12] Xun ZQ, Huang JF, Li XY, *et al.* Simultaneous determination of seven acrylates in food contact paper products by GC/MS and modified QuEChERS [J]. Anal Methods, 2016, 8: 3953-3958.
- [13] 李鹏, 陈琴华, 张卓, 等. 气相-质谱联用法测定维生素 E 胶丸中维生素 E 的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(7): 899-901.
Li P, Chen QH, Zhang Z, *et al.* Determination the content of vitamin E in vitamin E soft capsules by GC-MS [J]. Chin Hosp Pharm J, 2007, 27(7): 899-901.
- [14] 金米聪, 王立, 符展明. 毛细管气相色谱法同时测定鸡蛋中的胆固醇和 α -维生素 E[J]. 色谱, 2001, 19(5): 478-480.
Jin MC, Wang L, Fu ZM. Determination of cholesterol and α -tocopherol in eggs by capillary gas chromatography [J]. Chin J Chromatogr, 2001, 19(5): 478-480.
- [15] 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 National food safety standard-Standard for the use of nutritional fortification substances in food [S].

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



吴志成, 助理工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: daxuecheng1989@163.com



李秀英, 高级工程师, 主要研究方向为食品及相关产品质量安全检测技术研究。

E-mail: suiye-lee@163.com