

甲醇超声提取法测定保健食品中维生素 A

侯俐南, 李 彬, 乔亚森, 刘慧锦, 张伟清*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: 目的 采用甲醇超声方法提取保健食品中的维生素 A。用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)法进行含量测定, 并与 GB/T 5009.82-2016 进行比较, 同时进行方法学验证。**方法** 样品前处理方法为甲醇超声提取法。采用 C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱, 甲醇为流动相, 检测波长为 325 nm, 流速为 1 mL/min, 柱温为 30 °C, 进样量为 20 μL。**结果** 超声时间为 5~15 min 提取效率最高, 工作曲线在 1.00~10.00 μg/mL 范围内线性关系良好, 相关系数为 0.9998, 相对标准偏差为 1.82% (n=6), 平均回收率为 101.09%, 方法检出限为 10 μg/100 g, 定量限为 31 μg/100 g。**结论** 和国标法相比, 本方法操作简单、准确度高, 适用于保健食品中维生素 A 含量的测定。

关键词: 甲醇; 超声提取; 保健食品; 维生素 A

Determination of vitamin A in health foods by ultrasonic extraction with methanol

HOU Li-Nan, LI Bin, QIAO Ya-Sen, LIU Hui-Jin, ZHANG Wei-Qing*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 10050, China)

ABSTRACT: Objective To extract vitamin A from health foods by ultrasonic extraction with methanol and determine its content by high performance liquid chromatography(HPLC) method and compare with GB/T 5009.82-2016. **Methods** The sample was pretreated with ultrasonic in methanol. The analysis was carried out on a C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with methanol at the flow rate of 1 mL/min. The detection wavelength was set at 325 nm, column temperature was 30 °C and sample size was 20 μL. **Results** The results showed that the extraction rate was highest when the ultrasonic time was 5–15 min, and the linear relationship was good in the range of 1.00–10.00 μg/mL ($r^2=0.9998$). The relative standard deviation was 1.82% (n=6), and the average recovery rate was 101.09%. The limit of detection was 10 μg/100 g and the limit of quantification was 31 μg/100 g. **Conclusion** Compared to the national standard method, this method is simple and accurate, and is suitable for the determination of vitamin A content in health foods.

KEY WORDS: methanol; ultrasonic extraction; health foods; vitamin A

1 引言

维生素 A(视黄醇), 是一种具有脂环的不饱和一元醇, 是一种人体不可缺少的脂溶性维生素^[1]。维生素 A 广泛存

在于菠菜、胡萝卜、动物肝脏和禽蛋奶中, 具有抗氧化、调节免疫、调节细胞分化, 抑制肿瘤生长、促进生长发育的作用, 对视觉发育及上皮组织的分化成熟起着至关重要的作用。维生素 A 缺乏问题在世界范围内广泛存在, 缺乏

*通讯作者: 张伟清, 副主任药师, 主要研究方向为食品化妆品的理化检测及质量标准提高。E-mail: zhangweiqing@nifdc.org.cn

*Corresponding author: ZHANG Wei-Qing, Deputy Chief Pharmacist, Institute for Food and Cosmetics, National Institutes for Food and Drug Control, No.2, Tiantan Xili, Beijing 10050, China. E-mail: zhangweiqing@nifdc.org.cn

维生素 A 会引起夜盲症、干眼病、生长停滞等各种疾病^[2,3]。人体自身不能合成维生素 A, 需要从食物中获取。随着生活水平的提高, 保健意识的加强, 人们越来越关注保健食品中维生素 A 的测定^[3-6]。

目前, 保健食品中维生素 A 的测定方法主要参考 GB/T 5009.82-2016《食品安全国家标准食品中维生素 A、D、E 的测定》^[7]。该标准适用于食品中维生素 A 含量的测定, 食品中由于基质较为复杂, 需通过皂化将不同构型的维生素 A 转化为视黄醇的形式, 再经过提取、洗涤、浓缩等步骤, 这样的操作繁琐, 耗时长, 回收率低^[8-11]。而保健食品基质比较简单, 维生素含量高, 多以醋酸酯等添加剂的形式存在^[12,13], 在前处理时并不需要经过复杂的除脂、提纯环节, 有简化的空间, 目前没有专门针对保健食品中维生素 A 的测定标准。本实验根据保健食品的投料和基质特点, 采用甲醇作为提取溶剂, 以维生素 A 醋酸酯为对照品, 探究其最佳提取方法, 采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)法进行含量测定, 并与国家标准 GB/T 5009.82-2016《食品安全国家标准食品中维生素 A、D、E 的测定》方法进行对比, 旨在建立一种操作简便、准确性好、回收率高的测定方法, 为快速提取和准确检测保健食品中维生素 A 的含量提供了参考

2 材料与方法

2.1 材料、试剂与仪器

2.1.1 试剂与材料

维生素 A 醋酸酯标准品(纯度为 98.5%, 德国 Dr.E 公司); 甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司); 无水乙醇、氢氧化钾、抗坏血酸、2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)、石油醚、无水硫酸钠(分析纯, 国药集团); 实验室用水为 Sartorius 超纯水。

多种维生素咀嚼片样品 1 批, 维生素 A 维生素 D 软胶囊样品 1 批, 均为市售;

2.1.3 仪器与设备

Waters2695-2998 高效液相色谱仪(配有二极管阵列检测器, 美国沃特世公司); VORTEX-5 涡旋混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); KQ-700DE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

对照品溶液的制备: 精密称取维生素 A 醋酸酯对照品 25 mg, 用乙醇溶解, 转移至 25 mL 棕色容量瓶中, 用乙醇稀释并定容至刻度线, 摇匀, 作为标准储备母液。取 5 mL 维生素 A 醋酸酯标准储备母液于 50 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释并定容至刻度线, 得到维生素 A 醋酸酯标准中间液。准确吸取维生素 A 醋酸酯标准溶液

中间液 0.1、0.3、0.5、0.7、1.0 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇定容至刻度线, 该标准系列中维生素 A 醋酸酯的浓度为 1.00、3.00、5.00、7.00、10.00 $\mu\text{g/mL}$ 。临用前配制。

2.2.2 样品前处理

(1) 样品预处理: 取适量维生素咀嚼片样品于研钵中, 充分研磨成粉末, 混合均匀后备用。

(2) 甲醇提取法: 准确称取均匀试样 2 g, 分别置于 7 个 50 mL 离心管中, 加入 40 mL 甲醇, 涡旋混合器振荡 2 min 后分别超声 5、10、15、30、45、60、120 min, 最后定容至 50 mL。过 0.45 μm 滤膜, 滤液备用。

(3) 国标检测法: 参照 GB/T 5009.82-2016《食品安全国家标准食品中维生素 A、D、E 的测定》第一法进行维生素 A 的测定。

2.2.3 液相色谱条件

色谱柱: C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 检测波长: 325 nm; 流动相: 甲醇; 流速: 1 mL/min; 进样体积: 20 μL ; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.4 标准曲线的测定

分别配制 1.00、3.00、5.00、7.00、10.00 $\mu\text{g/mL}$ 的维生素 A 醋酸酯标准溶液, 按照 2.2.3 液相色谱条件进样, 以维生素 A 醋酸酯浓度 X 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线。

2.2.5 样品测定

取样品溶液 20 μL 作高效液相色谱分析, 测定其峰面积, 从标准曲线查得样液中维生素 A 醋酸酯的含量。

2.2.6 维生素 A 醋酸酯含量的计算

$$X = \frac{\rho \times V}{m}$$

式中: X 为试样中维生素 A 醋酸酯的含量, $\mu\text{g/g}$; ρ 为标准曲线查得试样中维生素 A 醋酸酯的浓度, $\mu\text{g/mL}$; V 为定容体积, mL; m 为样品的称样量, g。

3 结果与分析

3.1 维生素 A 醋酸酯标准曲线、检出限、定量限

维生素 A 醋酸酯标准曲线如图 1 所示, 得到线性方程: $Y=183988X-24470$, 相关系数为 0.9998。线性范围为 1.00~10.00 $\mu\text{g/mL}$ 。以 3 倍信噪比($S/N=3$)计算该方法的检出限为 10 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 以 10 倍信噪比($S/N=10$)计算该方法的信噪比为 31 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 与 GB 5009.82-2016 基本一致。

3.2 色谱结果

按照 2.2.3 的色谱条件进行检测, 在此条件下, 维生素 A 醋酸酯对照品色谱图以及试样中维生素 A 醋酸酯的液相色谱图分别如图 2~3 所示。采用甲醇超声提取法能够很好地提取保健食品中的维生素 A 醋酸酯, 且高效

液相色谱峰峰形良好。

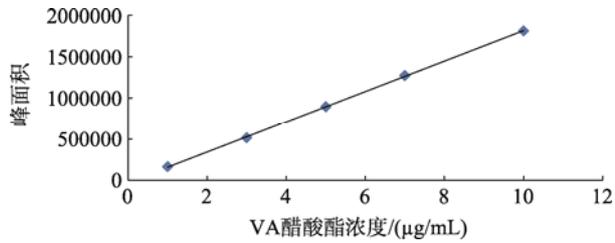


图 1 维生素 A 醋酸酯标准曲线
Fig.1 Vitamin A acetate standard curve

3.3 维生素 A 含量测定结果

甲醇提取法测定保健食品中的维生素 A, 没有经过皂化处理, 因而保健食品中添加的维生素 A 醋酸酯并没有转化成为维生素 A, 此方法测得的是保健食品中维生

素 A 醋酸酯的含量, 需通过其分子质量进行折算从而得到相应的维生素 A 的含量^[14]。不同超声时间条件下, 甲醇提取法中维生素 A 的含量测定结果与相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD)($n=3$)如表 1 所示。

如表 1 所示, 采用甲醇提取法, 随着超声时间的增大, 5~15min 即可将样品中维生素 A 醋酸酯充分提取出来, 而超声时间超过 15 min 后, 维生素 A 醋酸酯的含量呈现下降的趋势, 且其偏差变大, 本实验超声时间选用 15 min。超声时间的长短会直接影响样品提取率, 随着超声时间的增加, 分子机械作用增强, 温度升高, 维生素 A 的含量会随之降低^[15-17]。采用 GB/T 5009.82-2016 测得样品中维生素 A 的含量为 126.41 μg/g(RSD=3.49%, $n=3$), 与甲醇提取法比较, 甲醇提取法测得样品的维生素 A 的含量相对于 GB/T 5009.82-2016 测得的维生素 A 的含量更高, 测定结果都在规定范围之内。

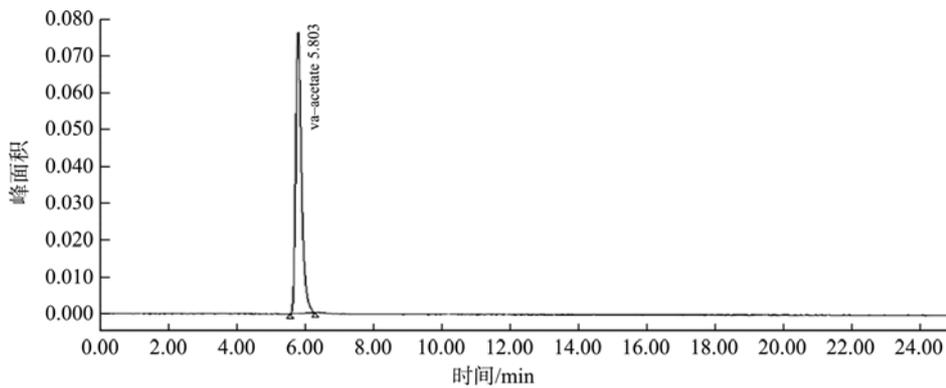


图 2 维生素 A 醋酸酯色谱对照品液相色谱图
Fig.2 Chromatogram of vitamin A acetate for reference

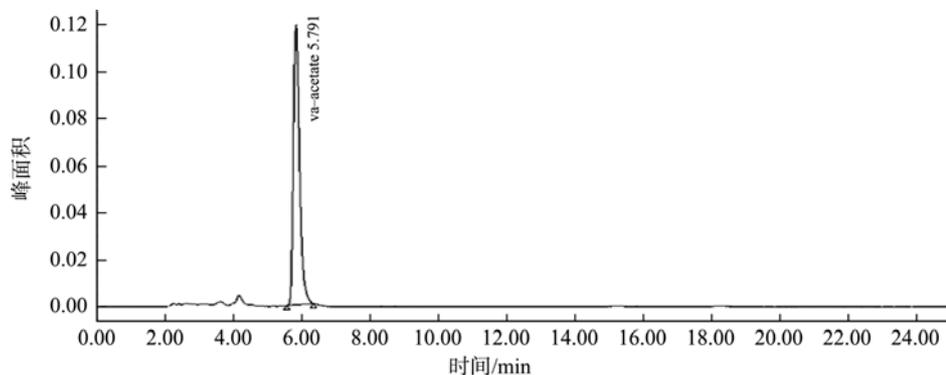


图 3 样品液相色谱图
Fig.3 Chromatogram of sample

3.4 精密度实验

取同一浓度的标准试样溶液,在上述色谱条件下,连续进样6次计算维生素A醋酸酯的峰面积及其RSD,其结果如表2所示。6次平行进样的RSD为1.82%,满足实验要求。

3.5 回收率实验

取3份空白基质样品,参照2.2.2(1)甲醇提取法,分低、中、高3个水平进行加标回收实验,超声时间为15min,并做平行实验。再取1份空白基质样品,参照GB/T 50009.82-2016,进行GB法加标回收实验,并做平行实验。2种方法加标回收实验结果如表3所示。

由表3可知,甲醇提取法的加标回收试验的回收率范围为98.74%~103.01%,平均回收率为101.09%,GB法的加标回收试验的平均回收率为87.29%。因而,甲醇超声提取实验方法的加标回收率结果优于GB法的加标回收率。

3.6 胶囊型样品测定

采用本实验方法对市售1批次维生素AD软胶囊含

量进行测定,重复测定3次。样品检测结果见表4,结果大于其标示量450.00 μg/g,说明该方法同样适用于胶囊型样品。

4 结论与讨论

本研究结果表明,针对保健食品基质及其投料特点,采用甲醇超声提取保健食品中的维生素A醋酸酯,并用高效液相色谱法能够准确地测定保健食品中的维生素A含量,且最佳超声提取时间为5~15 min。该方法前处理过程操作简便,且不需要进行皂化处理,测定的成分为维生素A醋酸酯,而维生素A醋酸酯相对于视黄醇更加稳定,更有利于实验的操作和应用。该实验方法线性关系良好,准确度高,精密度方面达到并高于现行标准。相对于GB 5009.82-2016《食品安全国家标准 食品中维生素A、D、E的测定》,本实验方法简化了样品处理过程,降低了分析成本,且回收率高,适用于保健食品中维生素A的测定,为保健食品维生素A的快速提取和检测提供了依据。

表1 不同超声时间甲醇法测得维生素A含量(n=3)
Table 1 Vitamin A content measured by methanol with different ultrasonic time (n=3)

超声时间/min	VA 醋酸酯含量/(μg/g)	VA 含量/(μg/g)	RSD/%
5	158.88	138.52	0.41
10	154.05	134.31	0.69
15	157.47	137.30	0.61
30	115.51	100.74	6.63
45	104.58	91.21	6.59
60	96.87	84.48	7.30
120	89.67	78.20	5.97

表2 精密度实验结果(n=6)
Table 2 Precision test results (n=6)

	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD/%
维生素A醋酸酯峰面积	841027	813796	802724	802746	802997	813341	812772	1.82

表 3 加样回收率实验结果($n=3$)
Table 3 Results of recovery tests ($n=3$)

	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
	100.00	99.71	99.71		
	100.00	106.33	106.33	103.01	3.22
	100.00	102.98	102.98		
	249.99	254.85	101.94		
甲醇提取法	249.99	253.23	101.30	101.51	0.37
	249.99	253.19	101.28		
	399.99	390.81	97.71		
	399.99	400.44	100.11	98.74	1.25
	399.99	393.61	98.41		
	450.45	392.53	87.14		
GB 法	450.45	395.44	87.79	87.29	0.50
	450.45	391.66	86.95		

表 4 胶囊样品测定结果($n=3$)
Table 4 Capsule sample measurement results ($n=3$)

	VA 含量/ $(\mu\text{g/g})$	平均 VA 含量/ $(\mu\text{g/g})$	RSD/%
	461.09		
胶囊样品	450.61	458.10	1.43
	462.59		

参考文献

- [1] 吴基任, 余欢欢, 云批, 等. 保健食品中维生素A的含量测定[J]. 广州化工, 2016, 44(22): 87-90.
- Wu JR, Yu HH, Yun P, *et al.* Determination of vitamin A in health food [J]. Guangzhou Chem Ind, 2016, 44(22): 87-90.
- [2] 张斌, 贾昌平, 鲁辉, 等. HPLC法同时测定保健食品中维生素A和维生素E[J]. 中国食品添加剂, 2015, 140(10): 165-171.
- Zhang B, Jia CP, Lu H, *et al.* Simultaneous determination of vitamin A and E in health foods by HPLC [J]. China Food Addit, 2015, 140(10): 165-171.
- [3] 张英奎, 袁文兴, 李中秋, 等. 6岁以下儿童不同年龄间VA缺乏情况对比研究[J]. 中国妇幼保健, 2007, 22(32): 4549-4550.
- Zhang YK, Yuan WJ, Li ZQ, *et al.* Survey on VA deficiency in children under 6 years in Hebei province [J]. Chin Matern Child Health Care, 2007, 22(32): 4549-4550.
- [4] 肖潇, 王庆国, 李菁, 等. 高效液相色谱法对市售乳及乳制品中维生素A和维生素E的含量测定[J]. 疾病预防控制中心通报, 2018, 33(2): 73-75.
- Xiao X, Wang QG, Li J, *et al.* Determination of VA and VE in market milk and dairy through high performance liquid chromatography in Xinjiang [J]. Bull Dis Control Prev, 2018, 33(2): 73-75.
- [5] 李莉, 何盛江, 汪六英, 等. RP-HPLC法同时测定多种注射液(13)中3种脂溶性维生素的含量[J]. 中国药房, 2010, 21(45): 4298-4299.
- Li L, He SJ, Wang LY, *et al.* Content determination of 3 kinds of fat-soluble vitamin in multivitamin injection (13) by RP-HPLC [J]. China Pharm, 2010, 21(45): 4298-4299.
- [6] 周文华, 张波. 快速法同时检测植物油中VA、VE含量的方法研究[J]. 当代畜牧, 2013, 10: 84-85.
- Zhou WH, Zhang B. Study on rapid method for simultaneous determination of VA and VE in vegetable oil [J]. Mod Anim Husband, 2013, (10): 84-85.
- [7] GB 5009.82-2016 食品安全国家标准 食品中维生素A、D、E的测定[S].
- GB 5009.82-2016 National food safety standards-Determination of vitamin A, D and E in food [S].
- [8] 孙亚兰, 李帮锐, 黎冠, 等. 反相高效液相色谱法测定奶粉中维生素A和维生素E异构体[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(3): 612-615.
- Sun YL, Li BR, Li G, *et al.* Determination of vitamin A and the isomers of vitamin E in milk powder by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. Chin J Health Lab Technol, 2013, 23(3): 612-615.
- [9] 赵海燕, 赵榕, 杨永红, 等. 冷皂化—HPLC测定强化食品汇总维生素A、E的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(4): 344-347.
- Zhao HY, Zhao R, Yang YH, *et al.* Determination of vitamin A and E in fortified foods by cold saponification-HPLC method [J]. Chin J Food Hyg, 2010, 22(4): 344-347.
- [10] 颜琳琦, 戚绿叶, 张丽媛, 等. HPLC测定保健食品中微胶囊型维生素A[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(7): 860-863.
- Yan LQ, Qi LY, Zhang LY, *et al.* Determination of vitamin A in the form of microcapsule in functional food by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2014, 31(7): 860-863.
- [11] 吴春燕, 张金宝, 刘海艳, 等. HPLC测定维生素ADE注射液中三种维生素的含量[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(7): 52-58.
- Wu CY, Zhang JB, Liu HY, *et al.* Determination of 3 kinds of vitamins ADE Injection by HPLC [J]. Chin J Veter Drug, 2018, 52(7): 52-58.
- [12] GB 14880-2012 食品营养强化剂使用标准[S].
- GB 14880-2012 Standard for use of nutritional fortification substances in foods [S].
- [13] 杨大进, 方从容, 王竹天, 等. 进口保健食品中维生素检测方法现状及展望[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(1): 62-64.
- Yang DJ, Fang CR, Wang ZT, *et al.* Methods for determination of vitamins in import health foods-the current situation and prospect [J]. Chin J Food Hyg, 2004, 16(1): 62-64.
- [14] 范菲, 杨会鸽, 周娜, 等. HPLC法同时测定多维生素片中维生素A和维生素E的含量[J]. 西北药学杂志, 2016, 31(6): 590-592.
- Fan F, Yang HG, Zhou N, *et al.* Simultaneous determination of vitamin A and vitamin E in vitamins with minerals tablets by HPLC [J]. Northwest Pharm J, 2016, 31(6): 590-592.
- [15] 黄成安, 张喜金, 李斌. 测定维生素A含量的两种方法比较[J]. 中国医药科学, 2015, 5(1): 103-106.
- Huang CA, Zhang XJ, Li B. Comparison of two methods for the determination of vitamin A content [J]. China Med Pharm, 2016, 5(1): 103-106.

- [16] 宋凤燕, 詹嘉红, 董学忍. 温度及作用时间对食品中维生素 A 含量的影响[J]. 韩山师范学院学报, 2008, 29(3): 69-72.

Song FY, Zhan JH, Dong XR, *et al.* Effect of temperature an duration to vitamin A in foods [J]. J Hanshan Norm Univ, 2008, 29(3): 69-72.

- [17] 颜景超, 任国谱, 赖鸣宇, 等. 维生素 A 酯类的稳定性及热降解动力学研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(9): 73-79.

Yang JC, Ren GP, Lai MY, *et al.* Study on stabilities of retinol esters and their thermal degradation kinetics [J]. Food Ind Sci Technol, 2010, 31(9): 73-79.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



侯俐南, 硕士, 主要研究方向为食品化妆品安全检测。

E-mail: houlinan@nifdc.org.cn



张伟清, 副主任药师, 主要研究方向为食品化妆品的理化检测及质量标准提高。

E-mail: zhangweiqing@nifdc.org.cn