

维生素 A 和维生素 E 的测定方法 (HPLC)

高效液相色谱法

最小检出量分别为 VA: 0.8ng; α -E: 91.8ng; γ -E: 36.6ng; δ -E: 20.6ng。

1. 原理

食物中的维生素 A 及维生素 E 经皂化提取以后,将其不可皂化的部分提取到有机溶剂中。用 HPLC 法测定维生素 A 及维生素 E 的含量。

2. 适用范围

GB12388-90 本法适用于各种食物和饲料的测定

3. 仪器

- (1) 高压液相色谱仪 (带紫外检测器)
- (2) 六孔恒温水浴锅
- (3) 旋转蒸发器
- (4) 高纯氮气
- (5) 高速离心机

4. 试剂

本实验所用试剂皆为分析纯,所用水皆为蒸馏水

4.1 无水乙醇: 重蒸, 不含有醛类物质

检查方法: 取 2ml 银氨溶液于试管中, 加入少量乙醇, 摇匀, 再加入 10%氢氧化钠溶液, 加热, 放置冷却后, 若有银镜反应则表示乙醇中有醛。

脱醛方法: 取 2g 硝酸银溶于少量水中。取 4g 氢氧化钠溶于温乙醇中。将两者倾入 1L 乙醇中, 振摇后, 放置暗处两天 (不时摇动, 促进反应), 经过滤, 置蒸馏瓶蒸馏, 弃去初蒸出的 50ml。当乙醇中:

4.2 10%抗坏血酸溶液 (Vc) W/V 临用前配制

4.3 50%氢氧化钾溶液 (KOH) W/V

4.4 无水乙醚 重蒸, 不含过氧化物

4.4.1 过氧化物检查方法: 用 5ml 乙醚加 1ml10%碘化钾溶液, 振摇 1min, 如有过氧化物则放出游离碘, 水层呈黄色或加 4 滴 0.5%淀粉液, 水层呈蓝色。该乙醚需处理后使用。

4.4.2 去除过氧化物的方法: 重蒸乙醚时, 瓶中放入铁丝或铁末少许。弃去 10%初馏液和 10%残留液。

4.5 pH 1-14 试纸

4.6 无水硫酸钠 Na₂SO₄

4.7 甲醇 色谱纯或分析纯重蒸后使用

4.8 重蒸水 蒸馏水中加入少量高锰酸钾重蒸后使用

4.9 苯并 (e) 苡标准液 称取苯并 (e) 苡 (纯度 98%), 用脱醛乙醇配制成 1ml 相当于 5 μ g 苯并 (e) 苡的内标溶液。

4.10 维生素 A 标准液 视黄醇 (纯度 85% Sigma 公司) 用脱醛乙醇溶解维生素 A 标准品, 使其浓度大约为 1ml 相当于 1mg 视黄醇。临用前用紫外分光光度法标定其准确浓度。维生素 E 标准液 α -生育酚 (纯度 95% Sigma 公司), δ -生育酚 (纯度 95% Sigma 公司), δ -生育酚 (纯度 95% Sigma 公司)。用脱醛乙醇分别溶解以上三种维生素 E 标准品, 使其浓度大约为 1ml 相当于 1mg。临用前用紫外分光光度法分别标定此三种维生素 E 的准确浓度。

上海洪纪仪器设备有限公司

5. 操作步骤

本实验需避光操作

样品皂化 称取样品于三角瓶中，加 30ml 无水乙醇，振摇三角瓶，使样品分散均匀。加入 5ml 10% 抗坏血酸和苯并(e) 苊标准液 2ml，混匀。最后加入 10ml 氢氧化钾边加边振摇。于沸水浴上回流 30min 使样品皂化完全。皂化后立即放入冰水中冷却。

样品萃取 将皂化后的样品移入分液漏斗中，用 50ml 水分 2 次洗皂化瓶，洗液并入分液漏斗中。用 100ml 无水乙醚分两次洗皂化瓶及残渣，乙醚液并入分液漏斗中。轻轻振摇分液漏斗 2min，静置分层，弃去水层。然后每次用约 100ml 水将乙醚液洗至中性，约 4-5 次。

浓缩 将乙醚提取液经无水硫酸钠(约 5g) 滤入 150ml 旋转蒸发瓶内，用约 15ml 乙醚冲洗分液漏斗及无水硫酸钠 2 次，并入蒸发瓶内，并将其接在旋转蒸发器上，于 55℃ 水浴中减压蒸馏并回收乙醚，待瓶中乙醚剩下约 2ml 时，取下蒸发瓶，立即用氮气将乙醚吹干。加入 2ml 乙醇溶液，充分混合，溶解提取物。将乙醇液移入塑料离心管中，于离心机上以 3000 转/min 离心 5 分钟。上清液供色谱分析。

标准曲线的制备 将维生素 A 和维生素 E 标准品配置成标准溶液(约 1mg/ml)，制备标准曲线前用紫外分光光度法标定其准确浓度。标准浓度的标定方法 取维生素 A 和维生素 E 标准液若干微升，分别稀释至 10.00ml 乙醇中，并分别按给定波长测定各维生素的吸光值。用比吸光系数计算该维生素的浓度。测定条件如下

标 准	比吸光系数 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$	波 长 λ , nm
视 黄 醇	1835	325
α —生育酚	71	294
γ —生育酚	92.8	298
δ —生育酚	91.2	298

浓度计算:

$$X1 = A/E \times 1/100 \times 10.00/S \times 10^{-3}$$

式中 X1: 某维生素浓度, mg/ml;

A: 维生素的平均紫外吸光值;

S: 加入标准的量, μl ;

E: 某种维生素 1% 比吸光系数;

$10.00/S \times 10^{-3}$: 标准液稀释倍数。

本法采用内标两点法进行定量。把一定量的维生素 A、维生素 E 及内标苯并(e) 苊液混合均匀，选择合适的灵敏度，使上述物质的各峰高约为满量程的 70%，作为高浓度点，高浓度的 1/2 为低浓度点(内标苯并(e) 苊的浓度值不变)，用此二种浓度的混合标准进行色谱分析。根据微处理机装置，按说明用二点内标法进行定量。

液相色谱分析

仪器所需条件

预柱: ODS 10 μm , 4mm \times 4.5cm。

分析柱: ODS 5 μm , 4.6mm \times 25cm。

流动相: 甲醇: 水=98: 2。混匀，临用前脱气。

紫外检测器波长: 300nm。量程 0.02。

进样量: 20 μl 进样定量环。

流速: 1.65-1.70ml/min。

6. 计算

$$X=C/m \times V \times 100/1000$$

X: 某种维生素的含量, mg/100g;

C: 由标准曲线上查到某种维生素含量, μ g/ml;

V: 样品浓缩定容体积, ml;

m: 样品质量, g;

用微处理机二点内标法进行计算时, 按计算公式计算或由微机直接给出结果。

7. 注意事项

- (1) 维生素 A 极易被破坏, 实验操作应在微弱光线下进行, 或用棕色玻璃仪器。
- (2) 在皂化过程中, 应每 5 分钟摇一下皂化瓶, 使样品皂化完全。
- (3) 提取过程中, 振摇不应太剧烈, 避免溶液乳化而不易分层。
- (4) 洗涤时, 最初水洗轻摇, 逐次振摇强度可增加。
- (5) 无水硫酸钠如有结块, 应烘干后使用。
- (6) 在旋转蒸发时, 乙醚溶液不应蒸干, 以免被测样品含量有损失。
- (7) 用高纯氮吹干时, 氮气不能开的太大, 避免样品吹出瓶外结果偏低。