

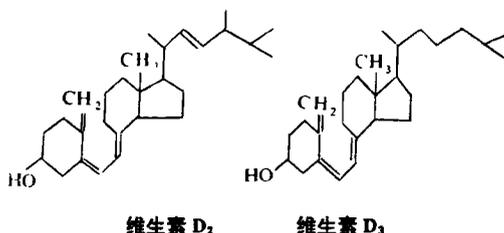
高效液相色谱法测定食品中的维生素 D

张燕婉 王津生

(中国肉类食品研究中心 北京 100075)

1 前言

维生素 D (Vit. D) 在人体骨骼组织矿化代谢过程中起着十分重要的作用,它不仅促进钙与磷在肠道的吸收,而且也作用于骨质组织,促进钙磷最终形成骨质的基本结构。当 Vit. D 缺乏时,会导致人体患佝偻病和软骨病等。Vit. D 是一群结构类似的类固醇的衍生物。目前的研究已经表明,化学上已有十多种类固醇具有 Vit. D 的生理活性,但其中最重要的是 Vit. D₃ (胆钙化醇) 和 Vit. D₂ (麦角钙化醇) 以及它们的代谢产物 (如 1,25-(OH)₂-D₃, 25-OH-D₃)。



目前测定维生素 D 的方法主要有高效液相色谱法 (HPLC), 薄层色谱法 (TLC) 和气相色谱法 (GC)。在过去的几年里,虽然曾用开管柱、TLC 法和 GC 法进行 Vit. D 的分析,但近五年里这几种方法没能得到进一步的发展。相反,HPLC 法分析 Vit. D 在近十年里经过持续不断的研究,得到了很大的发展,已成为目前测定机体中生物活性很小的 Vit. D 含量的最有效和最普遍的分析方法。Vries^[1,2] 等人经过大量验证实验,建立了两种完善的分析方法,已被美国 AOAC 组织采用,定为正式的方法,并被作为 1993 年出版的《美国营养标签分析方法》一书中维生素 D 的分析方法^[12]。

2 样品的预处理

HPLC 法测定 Vit. D 用于食品分析不同于药物分析。后者可以将药物的 Vit. D 提取液直接注入色谱柱,而食品分析需先进行皂化和纯化,并经过适当的色谱柱预先净化后才可进行。各种预处理方法见表 1。

最普遍使用的方法是先使用乙醇-氢氧化钾溶液将样品皂化,然后用有机溶剂萃取其中的非皂化物。在皂化过程中应控制条件,避免过热引起的组分异构化。又由于 Vit. D 在空气中易氧化分解,在食物样品中含量较低,皂化时可加入一些抗氧化剂以阻止氧化。为避免皂化带来的问题,有人曾采用过夜冷皂化^[7] 或萃取前不皂化的办法^[3]。

纯化是 Vit. D 预处理方法中关键的一步,处理不当会产生大量的聚合物。当然也有像 Agarwal 等^[7] 那样,不进行纯化,而是采用样品与三氯化锑 (SbCl₃) 反应,使强化牛奶中存在于非皂化物中的维生素,转变为等规聚合物 (isotachysteols), 这种衍生物能够在 301nm 波长处被检测到,且不受其它物质的干扰。纯化的方法随食品的原料和种类而有所不同。例如,对于强化的鲜牛奶和奶粉,在进行 HPLC 分析之前,可用半制备型的氰基键合相色谱柱进行提纯;而对于饲料样品需要采用两步提纯:即先用氧化铝 (Al₂O₃) 的色谱柱将 Vit. D 与 Vit. E、胡萝卜素分开,再用 RP-18 半制备柱进行 Vit. D 的纯化。Vilalobos 等^[4] 和 Romanov 等^[5] 也都用氧化铝色谱柱提纯玉米片、沙丁鱼和植物中的 Vit. D。Bekhof 等^[11] 采用两步梯度 HPLC 系统,在氰基键合相上进行纯化,将氰基柱直接连在分析柱的六通阀上。制备型 RP-18 液相色谱柱多用于婴儿食品和蘑菇中 Vit. D 的分离;Laffi^[10] 用 RP-8 柱提纯饲料中的 Vit. D。Takamura 等^[6] 则先用 TLC 粗分离蘑菇中的 Vit. D₂, 再用 HPLC 进一步提纯,最后用热喷雾 HPLC-MS 仪对 Vit. D₂ 进行分离、检定。Hung 等^[3] 为了省去皂化以减少 Vit. D 的异构化,把提纯增加到四步,即:(1) 二氧化硅柱的提纯,(2) 聚四氟膜过滤,(3) 凝胶色谱柱提纯,(4) NP-HPLC 半制备柱提纯。这些步骤被认为对于 D₂、D₃ 含量低的多复杂成分的样品尤为必要。

3 高效液相色谱分析

用 HPLC 法可以分离测定 Vit. D₂ 和 Vit. D₃ 的异构体、光异构体及其代谢产物,而且正相色谱 (NPC) 和反相色谱 (RPC) 都可用于总 Vit. D 的分

析,见表 2。AOAC 规定,正相色谱法获得的 Vit. D 结果,必须对其皂化中由于加热引起的异构化影响带来的测定误差加以校正(校正因子:1.25)。Vil-lalobos 等^[6]通过对八种代表性样品(食品、饲料和医药)的 Vit. D 分析,比较三种不同固定相,柱 A:SI-60 silica,柱 B:Vydac 201 TPB C₁₈,柱 C:ODS C₁₈对 Vit. D 的分离结果,发现:色谱分离柱 B 和柱 C 能将 D₂,D₃ 分离开,而柱 A 只能测定总 Vit. D 的量。这说明,反相色谱柱能较好的分别测定 D₂,D₃ 的含量,而正相硅胶柱只能用于总 Vit. D 的测定。Bekhof 等^[11]用胺基柱也可同时分离 D₂ 和 D₃。通常,HPLC 法测

定 Vit. D 多采用 UV 检测,可固定 254nm 波长,也可多通道选择,在 260nm 或 310nm 处测定。Delgado 等^[12]采用电化学检测器同时分析牛奶中的 Vit. D₃, Vit. A 和 Vit. E,样品皂化后,经萃取可直接注入色谱分析柱,省去了纯化这一步。Takamura^[6]采用热喷雾液相-质谱仪(TSP-MS)测定蘑菇中的 Vit. D₂。HPLC 法分析 Vit. D 时色谱条件的选择(NP 或 RP)取决于分析的对象和目的。对于总 Vit. D 的分析,选用正相色谱比较有效,而要分别测定 D₂,D₃ 的含量,则选择反相色谱更好一些。

表 1 HPLC 法测维生素 D 的样品预处理

提取	色谱提纯		适用范围	分析内容	文献
	色谱柱	流动相			
乙醇-KOH 皂化(Vit. C 钠盐,水浴 40min),用戊烷-BHT 提取,浓缩,用半制备 HPLC 柱流动相溶解	Si-600 10-CN HPLC 柱	含 0.35%戊醇的正己烷,收集,加 BHT,用含 5%甲苯的己烷稀释	牛奶	Vit. D	1
先用 KOH-乙醇皂化,乙醚提取。(1)色谱柱纯化,洗脱液浓缩(2)HPLC 半制备柱纯化,蒸干,用正己烷溶解,上 HPLC 分析	(1)Al ₂ O ₃ 柱 (2)LiChrosorb RP-18 半制备柱	乙醚-己烷(40:60) 乙腈-甲醇-水(50:50:5)流速 1mL/min	各种食品及饲料	Vit. D	2
用 CH ₂ Cl ₂ -BHT-Na ₃ PO ₄ 提取,振荡 1hr.,过滤,分四步纯化	(1)Sep-pak 硅胶 (2)过滤; F. H. O. 5μm (3)GPC Sephadex LH-20 (4)Partisil 10PAC	1%乙酸乙酯苯溶液,浓缩,溶解二氯甲烷中 浓缩,溶解三氯甲烷氯仿-异辛烷(98:2),收集,浓缩,溶解在二氯甲烷中 甲醇-水(90:10)	各种饲料	Vit. D ₂ , D ₃	3
乙醇-KOH 皂化(水浴 30min),用戊烷萃取脱色,浓缩,用正己烷溶解(柱 A),流动相(柱 B),甲醇(柱 C)	Al ₂ O ₃ 柱,中性	先用含 4%丙酮的正己烷洗,再用 15%丙酮的正己烷洗脱 Vit. D+A,色谱带用荧光进行监测	玉米片,沙丁鱼	Vit. D ₂ , D ₃	4
乙醇-KOH 皂化(加连苯三酚,80°C,30min),用苯提取,浓缩,用甲醇-乙腈(1:1)溶解	LiChrosorb RP-18	甲醇-乙腈(1:1)	蘑菇	Vit. D ₂ 定性	5
乙醇-KOH 皂化(加连苯三酚,80°C,30min),用苯提取 (1)TLC 纯化,氯仿提取 (2)HPLC 纯化	(1)TLC 硅胶 (2)LiChrosorb	苯-丙酮(95:5) 甲醇-乙腈(1:1)	蘑菇	Vit. D ₂	6
乙醇-KOH 皂化(加连苯三酚,室温过夜),用己烷提取,浓缩用氯仿溶解,用 SbCl ₃ 的氯仿溶液异构化	不纯化		乳制品	Vit. D	7
皂化,用苯提取,HPLC 纯化,收集	Nucleosil 5-C ₁₈	乙腈-甲醇(3:2)	婴儿食品	Vit. D ₂	8
乙醇-KOH 皂化,用正己烷提取	Al ₂ O ₃ 柱	异丙醇-正己烷	植物样品	Vit. D ₂	9
乙醇-KOH 皂化(N ₂ 水浴,加 BHT30min),用乙醚提取,浓缩,用甲醇溶解,收集蒸干,用正己烷溶解	LiChrosorb RP-8,7μm	甲醇-水(90:10)	饲料	Vit. D	10
乙醇-KOH 皂化(含 1%连苯三酚),用正己烷-二氯甲烷提取,浓缩。 (1)柱色谱,(2)HPLC 提纯	(1)Al ₂ O ₃ 柱 (2)Apex 3μm Silica	1%异丙醇 正己烷-环己烷(1:1)	肉食品	Vit. D ₂ , D ₃	14

表 2 HPLC 法分析维生素 D 的色谱条件

固定相	流动相	检测波长 (nm)	分析对象	分析内容	文献
Silica gel 5 μ m Partisil	含 0.35% 戊醇的正己烷	UV254	牛奶	Vit. D	1
5- μ m Partisil 5	含 0.35% 戊醇的正己烷溶液	UV254	食品 饲料	Vit. D	2
3M C ₁₈ Rainin Accupack Microsorb		UV254	饲料	Vit. D ₂ , D ₃	3
(A)LiChrosorb Si 60 5 μ m (B)Vydac 201 TPB C ₁₈ ,10 μ m (C)Baker ODS,5 μ m	正己烷-异丙醇(98.3:1.7),5mL/min 甲醇-氯仿-乙酸乙酯(88:4.8) 甲醇-水(98:2),1mL/min	UV254	玉米片 沙丁鱼	Vit. D ₂ , D ₃	4
Nucleosil 100~5,5 μ m	正己烷-戊醇-异戊醇(99.5:0.1:0.4), 1mL/min	UV254	蘑菇	Vit. D ₂	5
Silica Spherisorb 3 μ m	正己烷-乙酸乙酯-甲醇(97:2.5:0.5), 0.7mL/min	UV301	牛奶	Vit. D	7
Zorbox Sil	异戊醇-正己烷(0.8:99.8)	UV	婴儿食品	Vit. D ₂	8
LiChrosorb Si 60 5 μ m	含 7% 二噁烷的正己烷,1mL/min	UV264	饲料	Vit. D	10
RP-18 OD-224 RP-18 5 μ m	0.1mol/L LiClO ₄ 的甲醇-水(99:1)	电化学+1050mV (Ag/AgCl)	牛奶	Vit. D ₃	13
Resolve 8 C ₁₈	纯甲醇	UV254	肉食品	Vit. D ₂ ,D ₃	14
5 μ m Particle C ₁₈	乙腈-甲醇-乙酸乙酯	UV265	牛奶、大豆	Vit. D ₂ ,D ₃	15

上述报道介绍了近几年来 HPLC 法测食品中 Vit. D 的各种方法。实验结果证明,高效液相色谱法测定食品中的维生素 D 具有较高的回收率和精密度。

关键词 高效液相色谱,食品中的维生素 D

Key words high performance liquid chromatography, vitamin D in food

参 考 文 献

- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, AOAC, 15th ed. Arlington, VA, Method 981.17, 1990:1068
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, AOAC, 15th ed. Arlington, VA, Method 982.29,1990:1069
- Hung G W C. J Liq Chromatogr, 1988;11:953
- Villalobos M C, Gregory N R, Bueno M P. J Micronutr Anal, 1990;8:79
- Takamura K, Hoshino H, Sugahara T *et al.* J Chromatogr, 1990;545:210
- Takamura K, Hoshino H, Harima N *et al.* J Chromatogr, 1991;543:241
- Agarwal V K. J Assoc Off Anal Chem, 1988;71:19
- 杨素芳, 银燕. 营养学报, 1988;10:173; C. A., 1989;110:73790r
- Romanov N A, Osipova Y L, Zh Anal Khim, 1988;43:1704; C. A., 1988;109:228874t
- Laffi R. Lab 2000, 1991;5:74
- Bekhof J J, Van den Bedem J W. Neth Milk Dairy J, 1988;42:423
- Darryl M, Sullivan, Donald E. Carpenter. Methods of analysis for nutrition labeling. Virginia USA: AOAC International, 1993:569
- Delgado Zamarrero M M, Sanchez Perez A *et al.* J Chromatogr, 1992;623:69
- Thompson J N, Louise Plouffe. Food Chem, 1993;46:313
- Matthew G Sliva, Astor E Green *et al.* J AOAC International, 1992;75:566