

维生素的检测方案—HPLC 法

天美（中国）科学仪器有限公司 甄蕊

维生素是维持生物体正常机能的必不可少的一大类有机物质，虽然机体对这类物质的需求量很小，但却十分重要。维生素是个庞大的家族，目前所知的维生素就有几十种，大致可分为脂溶性和水溶性两大类。维生素常被作为营养强化食品的添加因子，广泛存在于谷类、果蔬、肉禽和蛋类等加工食品中，因此，维生素的检测对食品、饲料和医药领域都有非常重要的意义。

1、脂溶性维生素检测方案

脂溶性维生素包括维生素 A、维生素 D 和维生素 E，由于这几种维生素在外界环境中不稳定，很容易受光、氧等影响而维生素被氧化破坏，影响因素较多，因此维生素 A、D 和 E 的同时测定目前是检验技术的难点。

采用日立高效液相色谱仪配二极管阵列（DAD）检测器，根据 GB/T5009.82-2003 和 GB/T5413.9-1997 测定了食品中的维生素 A、维生素 D 以及 α 、 β 、 γ 、 δ 四种维生素 E 的衍生物。选择日立的 DAD 检测，7 种混标可以同时检测，根据标准要求提取不同波长下的色谱图，且日立的 DAD 检测器的灵敏度可以和 UV 检测器达到一个数量级别，保证了维生素的痕量检测。

1.1 色谱条件

柱：Hitachi LaChrom C18(5 μ m) 4.6mmI.D.x250mm

柱温：30℃

流速：1.5 mL/min

检测波长：200-350nm，300nm，265nm

进样量：20 μ L

流动相：CH₃OH:H₂O =98:2

1.2 样品前处理

➤ 皂化

准确称取 5g 样品于皂化瓶中，加入 30mL 无水乙醇，充分混匀后加 50mL 氢氧化

天美（中国）科学仪器有限公司
TECHCOMP (CHINA) LTD.

中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层
TEL:010-64010651
FAX:010-64060202
E-MAIL :techcomp@techcomp.cn

钾溶液，在蒸汽浴上连续回流 30min 后，立刻冷却到室温。

➤ 提取

将皂化液转入 500mL 分液漏斗中，用 100mL 水分几次冲洗皂化瓶，洗涤液并入分液漏斗中。加入 100mL 石油醚，盖好瓶塞，倒置分液漏斗并剧烈振摇 1min。在振摇过程中，注意释放瓶内压力。静置分层，弃去水层。

➤ 洗涤

重复上述萃取过程二次，合并醚液到第一个分液漏斗中。用蒸馏水洗该醚液至中性。

➤ 浓缩

通过无水硫酸钠过滤干燥，在 40℃和氮气流下，于旋转蒸发器上蒸至近干（绝不允许蒸干）后，除去石油醚，加入乙醇转移至 10mL 容量瓶中，用乙醇定容。

1.3 实验结果

VA=25μg/mL, VD₂=0.2785μg/mL, VD₃=0.2666μg/mL, α-VE=25μg/mL,
β-VE=25μg/mL, γ-VE=25μg/mL, δ-VE= 25μg/mL

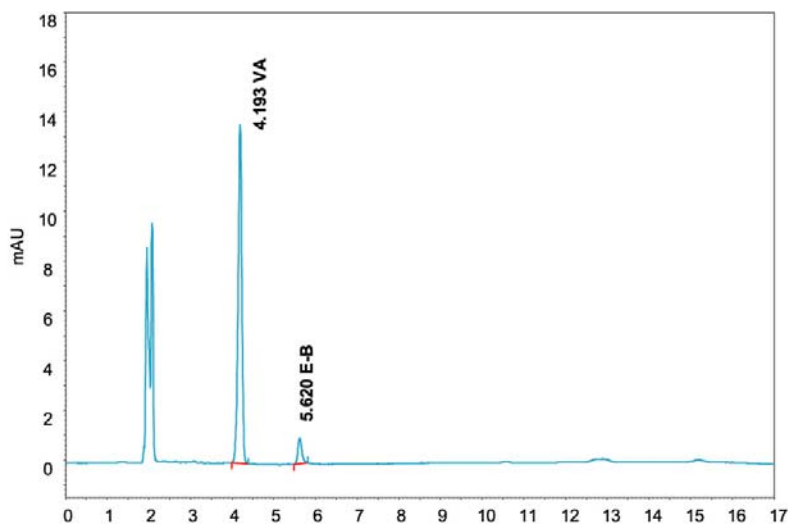


图 1 VA 标样色谱图 (DAD , 325nm)

天美（中国）科学仪器有限公司
TECHCOMP (CHINA) LTD.

中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层
TEL:010-64010651
FAX:010-64060202
E-MAIL :techcomp@techcomp.cn

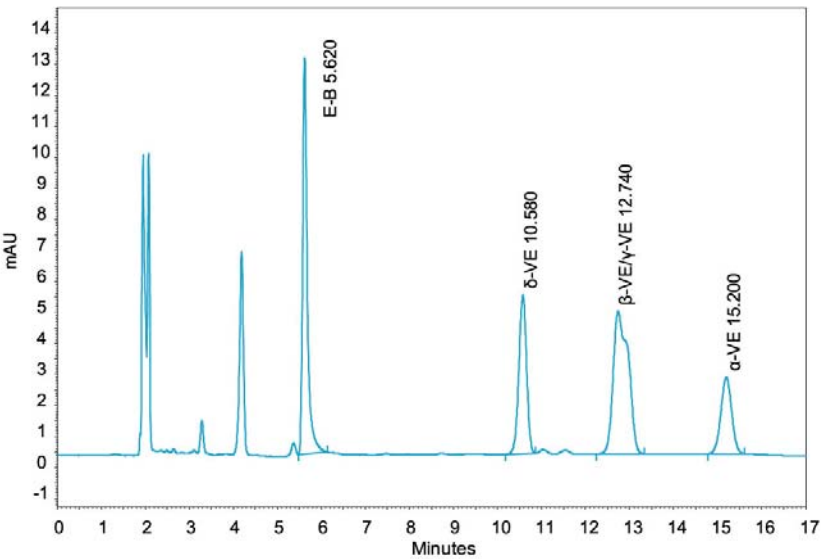


图 2 VE 标样色谱图 (DAD , 294nm)

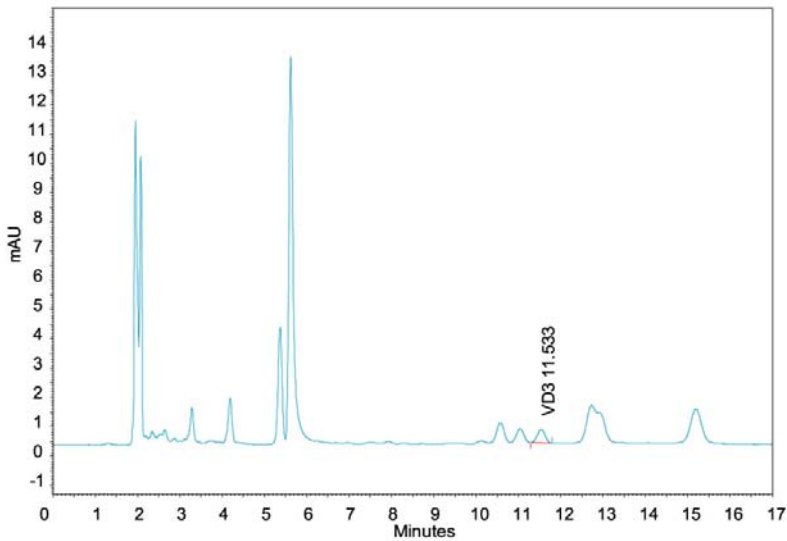


图 3 VD 标样色谱图 (DAD , 264nm)

2、水溶性维生素检测方案

水溶性维生素与人体的生长发育和健康密切相关，尤以维生素 C 和 B 族维生素为重，其测定方法主要包括微生物法、荧光法和高效液相色谱法等。其中微生物法实验周期长，荧光法也费时，且不能同时测定多种维生素。高效液相色谱法样品前处理简单，样品用量少，分离速度快，可同时测定多种水溶性维生素。

天美（中国）科学仪器有限公司
TECHCOMP (CHINA) LTD.

中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层
TEL:010-64010651
FAX:010-64060202
E-MAIL:techcomp@techcomp.cn

2.1 色谱条件

色谱柱：ZORBAX SB-Aq 柱(5 μ m,250 \times 4.6mm)；

流速：1.4mL/min；

柱温：40 $^{\circ}$ C；

进样量：20 μ L；

流动相：A：乙腈，B：1%的三氟乙酸溶液

Time (min)	A (%)	B (%)
0	0	100
6	3	97
8	15	85
15	20	80
15.1	0	100
30	0	100

2.2 实验结果与讨论

➤ 检测波长的选择

根据维生素标准在 200 ~ 400nm 吸收光谱的扫描结果，选择 VC 的测定波长为 242nm，VB₁、VB₂为 267nm,VB₆为 290nm，烟酰胺为 261nm。

➤ 流动相的选择

本研究采用乙腈/三氟乙酸溶液体系，在此基础上，试验了辛烷磺酸钠等离子对试剂的分离效果，但不理想，离子对试剂价格较高，对色谱柱的柱效和泵损害较大，且平衡时间和冲洗时间较长。故综合考虑采用流动相梯度洗脱。

天美（中国）科学仪器有限公司
TECHCOMP (CHINA) LTD.

中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层
TEL:010-64010651
FAX:010-64060202
E-MAIL:techcomp@techcomp.cn

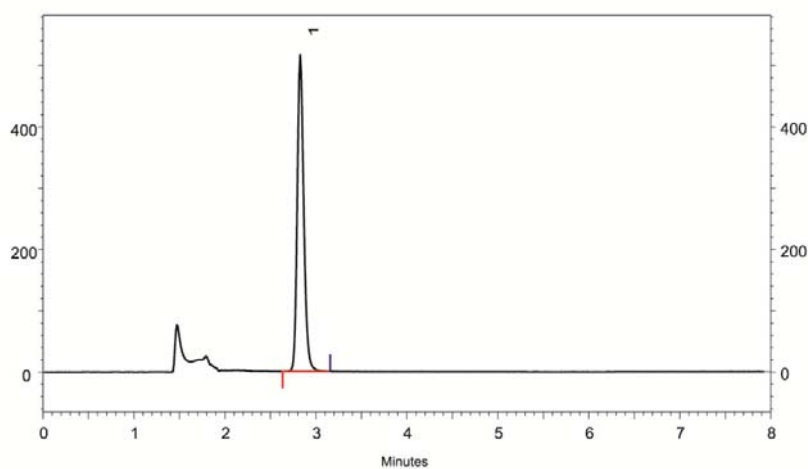


图 4 维生素标准品的色谱图 (242nm)

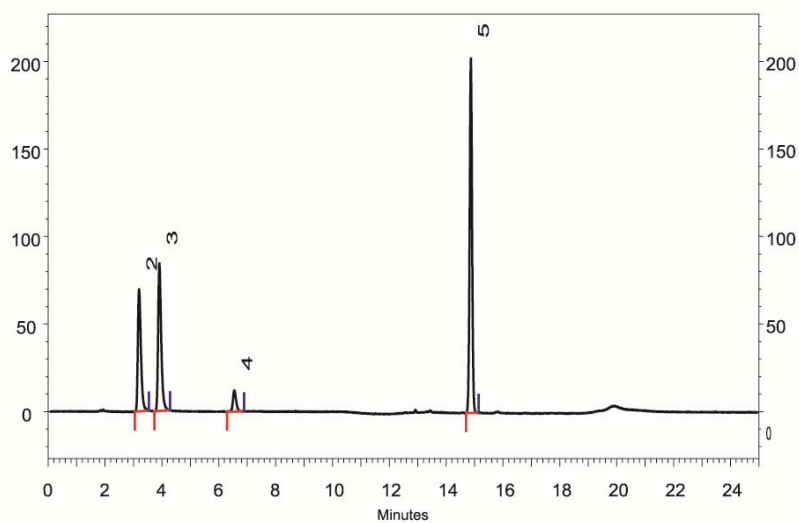


图 5 维生素标准品的色谱图 (267nm)

1—VC , 2—VB₁ , 3—烟酰胺 , 4—VB₆ , 5—VB₂