

正相液相色谱法测定饲料添加剂天然维生素 E 中的生育酚和生育三烯酚的含量

王石¹ 王继彤² 王燕妮³ 肖志明¹ 贾铮¹ 李阳¹ 刘晓露¹ 樊霞^{1*}

(1. 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 北京 100081; 2. 北京市饲料监察所, 北京 100107;

3. 中国农业机械化科学研究院, 北京 100083)

摘要: 天然维生素 E 因具有促进动物生长、提高肉品质等功能, 已被逐步用于宠物及畜禽饲养, 但行业中尚无规范该类饲料及饲料添加剂产品的标准及检测方法。本研究旨在建立采用正相液相色谱-紫外检测器 (NPLC-UV) 测定饲料添加剂中 8 种天然维生素 E 含量的分析方法。样品经甲醇浸润后, 以乙酸乙酯/正己烷 (3:97, V/V) 为提取溶剂在室温下进行超声浸提。使用 Kromasil 60-5 diol (4.6 mm×150 mm) 色谱柱进行分离, 正庚烷/四氢呋喃 (100:4, V/V) 等度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 柱温 40 °C, 紫外检测波长为 292 nm。结果表明: 生育酚和生育三烯酚含量在 0.2~50.0 μg/mL 时线性关系良好 ($R^2 \geq 0.999 0$), 方法定量限为 0.01%, 加样平均回收率为 81.3%~109.8%, 相对标准偏差 (RSD) 小于 7.9%。通过对实际样品测定, 该方法操作简单, 结果准确可靠, 有助于规范天然维生素 E 饲料产品市场。

关键词: 饲料添加剂; 天然维生素 E; 生育酚; 生育三烯酚; 正相液相色谱

中图分类号: S816

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2019)12-5823-11

维生素 E 又称抗不育维生素, 是人体必需的脂溶性维生素, 天然存在于植物的秆、茎、叶和种子胚中, 尤以小麦胚芽中含量最高^[1]。天然维生素 E 有 8 种异构体, 皆具有类似 d - α -生育酚的生物活性, 能够促进性激素分泌, 提高生育能力, 并具有预防流产等作用^[2-3]。因维生素 E 具有促进生长、提高肉品质和增加抗氧化性等优点, 天然维生素 E 类饲料添加剂已逐步用于动物饲养。我国市场上销售多种天然维生素 E 类饲料及饲料添加剂产品, 但该类产品质量参差不齐, 行业中尚无规范该类产品的标准或检测方法。如何对市场上存在的天然维生素 E 类饲料产品进行质量监控, 成为研究关注的重点。

目前, 已报道的天然维生素 E 含量测定方法主要有气相色谱法^[4]、液相色谱法^[5]、合相色谱

法^[6]、气相色谱-串联质谱法^[7]、毛细管电泳法^[8]和电化学法^[9]等。其中, 电化学法和毛细管电泳法虽然操作简单, 分析时间短, 但只能测量生育酚的总量, 无法区分各生育酚单体。而气相色谱法及气相色谱-串联质谱法的结果准确, 稳定可靠, 但对于分子结构相似的 β 、 γ -生育酚却很难分离。合相色谱是一个新型色谱, 具有较高的分离效率, 但测定仪器价格昂贵, 在行业中尚未普及。目前天然维生素 E 的检测方法以液相色谱法应用最为广泛。Yang 等^[10]以正己烷为溶剂, 萃取血清样品中的视黄醇和 8 种维生素 E, 甲醇复溶后经反相色谱分离, α -生育酚乙酯作为内标定量检测, 方法定量准确, 但 β 、 γ -生育酚不能有效分离。Huang 等^[11]使用正己烷作为提取溶剂, 色谱柱 Inertsil® CN-3 (6 mm×250 mm) 作为固定相, 正己烷/异丙

收稿日期: 2019-05-24

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目课题 (2016YFF0201802); 国家标准制定项目 (20100303-T-469); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (Y2019PT01)

作者简介: 王石 (1987—), 男, 北京人, 助理研究员, 硕士, 从事饲料质量与安全检测技术研究。E-mail: wangshi01@caas.cn

* 通信作者: 樊霞, 研究员, E-mail: fanxia@caas.cn

醇/乙酸乙酯/乙酸(97.6:0.8:0.8:0.8)作为流动相,建立了大米中8种维生素E和谷维素的定量检测技术,8种维生素E的检测范围在0.05~10.00 g/mL,回收率在82.7%~119.4%。张东等^[12]使用正庚烷提取,二醇基硅胶柱作为固定相,四氢呋喃/正庚烷洗脱,通过荧光检测器分析测定了芝麻油中4种生育三烯酚含量,定量限为0.91~2.10 mg/kg,方法简单、灵敏度高。天然维生素E的检测方法虽已有诸多报道,但检测基质多为功能食品或食用油脂,对于饲料或饲料添加剂中天然维生素E的定量检测方法还未见报道。又因饲料及饲料添加剂产品具有批次差异明显、来源广泛、总量巨大、流通性强等特点,因此需要针对该类基质建立检测方法。

本文在前人研究的基础^[5,10-13]上,对液相色谱的分离条件进行了优化确认,同时探讨了饲料添加剂中天然维生素E的样品前处理条件,建立简单、快速、准确的饲料添加剂中天然维生素E含量的检测方法。该法可同时测定饲料添加剂中的多种生育酚和生育三烯酚的含量,有利于饲料行业更加合理、高效地使用天然维生素E类饲料产品。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

1.1.1 仪器

Waters 2695型高效液相色谱仪,配备紫外检测器(美国Waters公司);SK5200LHC型超声波清洗器(上海科导超声器有限公司);Himac CF 16RX型高速离心机(日本Hitachi公司);MS3 digital型涡旋混匀器(德国IKA公司);紫外可见分光光度计,配备10 mm光径比色皿(中国普析通用公司)。

1.1.2 试剂与耗材

d- α -生育酚、*d*- β -生育酚、*d*- γ -生育酚、*d*- δ -生育酚(以下简称生育酚,T)和*d*- α -生育三烯酚、*d*- β -生育三烯酚、*d*- γ -生育三烯酚、*d*- δ -生育三烯酚(以下简称生育三烯酚,T₃)标准品,纯度 \geq 98%(美国ChromaDex公司);正庚烷、四氢呋喃为色谱级(Fisher Scientific公司);甲醇、乙酸乙酯、正己烷为分析纯(国药集团北化工厂);滤膜,0.45 μ m,希波氏尼龙有机系(天津富集科技有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 标准溶液的配制与校正系数的确定

1)标准储备溶液配制:分别称取约50.0 mg(精确至0.01 mg)生育酚和生育三烯酚标准品,置于8个100 mL容量瓶中,用样品提取溶液稀释并定容至刻度,制备标准储备溶液。0~4 $^{\circ}$ C避光储存。

2)生育酚和生育三烯酚的校正系数确定:准确吸取1.0 mL标准储备溶液置于10 mL玻璃刻度管中,在温度不超过40 $^{\circ}$ C的条件下,氮吹至干。加入甲醇振荡溶解残余物,并定容至10 mL。使用10 mm比色皿,在292~298 nm选择相应的波长测定吸光度A。用吸光度除以甲醇稀释液中生育酚和生育三烯酚含量 ρ (以 μ g/mL计),计算得到相应的校正系数K。

3)混合标准工作溶液:使用吸量管分别移取一定体积的生育酚和生育三烯酚的标准储备溶液置于50 mL棕色容量瓶中,使用5%甲醇-乙酸乙酯/正己烷定容至刻度,配制成浓度分别为0.2、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、50.0 μ g/mL的系列标准工作溶液,混合标准工作溶液应现用现配。其中,5%甲醇-乙酸乙酯/正己烷配制用量筒量取50 mL甲醇置于1 L容量瓶中,加入乙酸乙酯/正己烷溶液(3:97,V/V)定容至刻度。混匀,备用。

1.2.2 样品前处理

称取约1.0 g试样,将试样置于100 mL棕色容量瓶中。加入5 mL甲醇浸润样品,加约75 mL乙酸乙酯/正己烷溶液(3:97,V/V),振荡混匀后于超声波清洗机中超声提取20 min。冷却至室温,用乙酸乙酯/正己烷溶液(3:97,V/V)稀释至刻度,振摇混匀,用0.45 μ m有机滤膜过滤后上机检测。当浓度超出标准曲线范围时,用提取溶液稀释,使得溶液中生育酚和生育三烯酚含量在标准曲线范围之内。

1.2.3 色谱分离条件

采用相邻两峰的分离度和保留时间为指标,依次对固定相、流动相、柱温等色谱分离条件进行优化。最佳的色谱条件为:固定相,Kromasil 60-5 diol 二醇基硅胶柱,长150 mm,内径4.6 mm;柱温,40 $^{\circ}$ C;流动相,四氢呋喃-正庚烷溶液(100:4,V/V);流速,1.0 mL/min;进样量,10 μ L;检测器及检测波长,紫外检测器,292 nm。

1.2.4 定性定量分析

在仪器最佳工作条件下,取试样溶液和标准溶液分别进样,试样中待测物质的保留时间与混合标准溶液中对应的保留时间相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内,则可判定为样品中存在对应的待测物。以标准溶液中被测组分峰面积为纵坐标,被测组分含量为横坐标,绘制标准曲线,外标法计算样品中生育酚和生育三烯酚各组分的含量,单位以%表示。计算公式如下:

$$X_i = \frac{c_i \times V \times n}{m \times 10^4}$$

式中: c_i 为标准曲线中查得的生育酚或生育三烯酚的含量,单位为 $\mu\text{g}/\text{mL}$; V 为定容体积,单位为 mL ; m 为试样质量,单位为 g ; n 为稀释倍数。

计算结果以 3 次平行测定值的算术平均值表示。

2 结果与分析

2.1 生育酚和生育三烯酚的校正系数

根据 1.2.1 的试验方法,对甲醇稀释液中生育酚和生育三烯酚的最大吸收波长和吸光度进行测定,并由吸光度与溶液浓度计算得到 8 种天然维生素 E 单体的校正系数,测定方法参考文献 [5, 14-15]。由表 1 可知,各生育酚和生育三烯酚的紫外最大吸收波长和校正系数与文献 [5, 14] 报道的数值相吻合,可用于生育酚和生育三烯酚标准溶液浓度的定值计算。

表 1 生育酚和生育三烯酚的校正系数

Table 1 Correction coefficient of tocopherol and tocotrienol

天然维生素 E Natural vitamin E	标准储备溶液浓度 Standard stock solution Concentration (ρ)/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	稀释液浓度 Diluent concentration (ρ_1)/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	最大吸收波长 Maximum absorption wavelength (λ)/nm	吸光度 Absorbance (A)	校正系数 Correction coefficient (K)
α -生育酚 α -T	466.0	46.60	292	0.354 2	0.007 6
β -生育酚 β -T	485.8	48.58	296	0.432 4	0.008 9
γ -生育酚 γ -T	422.6	42.26	298	0.384 6	0.009 1
δ -生育酚 δ -T	531.7	53.17	298	0.462 6	0.008 7
α -生育三烯酚 α -T ₃	436.0	43.60	292	0.396 8	0.009 1
β -生育三烯酚 β -T ₃	541.1	54.11	294	0.465 3	0.008 6
γ -生育三烯酚 γ -T ₃	552.8	55.28	296	0.497 5	0.009 0
δ -生育三烯酚 δ -T ₃	497.3	49.73	297	0.437 6	0.008 8

吸光度为 6 次测量结果的平均值。

Absorbance was the average of the results of 6 measurements.

2.2 色谱条件选择

2.2.1 液相色谱柱选择

试验考察不同型号的色谱柱对生育酚和生育三烯酚分离的影响。选择 6 种不同型号的色谱柱,其中柱温设定为 $30\text{ }^\circ\text{C}$,流动相、流速等条件参考了多篇相关文献^[5, 10-13],在较优色谱条件下进行测定。由表 2 可知,使用色谱柱 Kromasil 60-5 diol 的分离效果最佳,相邻两峰分离度高于 1.9,且分析时间最短。而色谱柱 Sinochrom Si 60 和 Perfect-Sil Target ODS-3 也可达到维生素 E 多种异构体的基本分离,相邻两峰分离度分别高于 1.4 和 1.2,但为了达到分离效果,色谱柱的长度增加,导致保留时间延长。因此,选择了 Kromasil 60-5 diol 色

柱作为固定相,进一步研究流动相对分离效果的影响。

2.2.2 流动相的确定

选择正庚烷-甲基叔丁基醚、正己烷-异丙醇、正庚烷-四氢呋喃 3 种溶剂系统作为流动相对生育酚和生育三烯酚进行分离。由表 3 可知,生育酚和生育三烯酚为弱极性化合物,在正庚烷/四氢呋喃 (100:4, V/V) 中有较好的保留,峰型较好,分离效果较佳,其中 γ -T₃ 和 δ -T 的分离度为 1.9,可实现完全分离。在此基础上,进一步优化正庚烷与四氢呋喃比例,溶剂中增加四氢呋喃可以使分析物的保留时间明显的提前,保留时间缩短,但同时会伴随 γ -T₃ 和 δ -T 色谱峰分离度的降低。而减

少四氢呋喃的用量时,色谱峰的峰型展宽,并未使得分离度出现显著增大,但保留时间延长。因此,综合考量保留时间与分离效果,试验最终选定正

庚烷/四氢呋喃(100:4, V/V)溶剂系统作为的流动相。

表 2 生育酚和生育三烯酚在不同色谱柱上的分离度

Table 2 Separation degree of tocopherol and tocotrienol with different chromatographic columns

序号 No.	色谱柱型号 Chromatographic column type	流动相和流速 Mobile phase and flow rate	分离度 R	保留时间 Retention time/min
1	NPLC :sinochrom Si60 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)	正庚烷+四氢呋喃(100 :4, V/V), 1.0 mL/min	1.4 (γ-T ₃ , δ-T)	39.4
2	NPLC :Hibar lichrosorb Si60 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)	正庚烷+四氢呋喃 (100 :4, V/V), 1.0 mL/min	多组分未分离	28.6
3	NPLC :Kromasil 60-5 diol (4.6 mm×150 mm, 5 μm)	正庚烷+四氢呋喃 (100 :4, V/V), 1.0 mL/min	1.9 (γ-T ₃ , δ-T)	24.1
4	RPLC :ZorBax-C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	甲醇, 0.6 mL/min	<1.0 (β-T, γ-T)	17.0
5	RPLC :PerfectSil Target ODS-3 (250 mm×4.6 mm, 3 μm)	异丙醇+水(75 :25, V/V), 0.25 mL/min	1.2 (β-T, γ-T)	87.6
6	RPLC :Gemini C18 colμmn (250 mm× 4.6 mm, 5 μm)	甲醇+水+乙腈(90.5 :4.5 :5.0, V/ V/V) 梯度洗脱 ^[10] , 1.0 mL/min	<1.0 (β-T, γ-T)	21.0

表 3 流动相对多种生育酚和生育三烯酚分离的影响

Table 3 Influence of mobile phase on separation of several tocopherols and tocotrienols

色谱柱型号 Chromatographic column type	流动相种类 Mobile phase type	分离度 R(γ-T ₃ , δ-T)	保留时间 Retention time/min
Kromasil 60-5 diol (4.6 mm×150 mm, 5 μm)	正庚烷+甲基叔丁醚(99 :1, V/V)	1.0	27.2
	正己烷+异丙醇(99.5 :0.5, V/V)	1.2	30.3
	正庚烷+四氢呋喃(100 :2, V/V)	1.9	28.6
	正庚烷+四氢呋喃(100 :4, V/V)	1.9	24.1
	正庚烷+四氢呋喃(100 :6, V/V)	1.5	21.3

2.2.3 柱温度确定

对于正相色谱而言,分离温度是一直被忽视而又非常重要的因素。升高柱温,不仅可以加快分析速度,而且还具有提高分离效率、改善峰型、调节选择性等优点。因此,试验优化了色谱柱柱温,研究了柱温对分离效果的影响。当使用 Kromasil 60-5 diol 色谱柱时,β-T₃、γ-T₃、δ-T 在色谱柱上的保留时间相近,3 组分不易分离,因此使用 β-T₃、γ-T₃、δ-T 3 组分的分离度作为指标探讨柱温对分离效率的影响。由表 4 可知,柱温为 20 ℃ 时,γ-T₃、δ-T 的分离度仅为 1.4,2 组分未得到基线分离。当温度升高时,γ-T₃、δ-T 的分离度增加,

而 β-T₃、γ-T₃ 分离度降低。柱温达到 25 ℃ 时,γ-T₃、δ-T 分离度提高至 1.6,已实现基线分离。当柱温升至 40 ℃ 时,γ-T₃、δ-T 分离度增大至 2.2。再进一步提高柱温至 45 ℃,γ-T₃、δ-T 分离度未出现明显升高,而 β-T₃、γ-T₃ 分离度已降低至 2.1,因此,最终确定色谱柱温度为 40 ℃。

2.3 前处理方法优化

2.3.1 提取溶剂的选择

适合的提取溶剂有助于 8 种天然维生素 E 的提取,为考察不同极性的提取溶剂的提取效果,选择以二氧化硅为基质进行添加回收试验,考察了正庚烷、甲醇、正己烷、20% 甲醇-乙酸乙酯/正己烷、5% 甲醇-乙酸乙酯/正己烷等 5 种提取溶剂对

天然维生素 E 的提取效果, 所得结果见图 1 (误差线为 3 次测量结果的标准偏差)。当选取 5% 甲醇-乙酸乙酯/正己烷作为提取溶剂, 对以二氧化

硅为基质的样品具有很好的效果, 回收率在 94.5%~102.3%, 且重复性良好。

表 4 色谱柱柱温对多种生育酚和生育三烯酚分离的影响

Table 4 Influence of chromatographic column temperature on separation of several tocopherols and tocotrienols

色谱柱型号 Chromatographic column type	柱温 Column temperature/°C	分离度 R(β -T ₃ , γ -T ₃)	分离度 R(γ -T ₃ , δ -T)
Kromasil 60-5 diol (4.6 mm×150 mm, 5 μ m)	20	2.6	1.4
	25	2.4	1.6
	30	2.3	1.9
	35	2.3	2.1
	40	2.2	2.2
	45	2.1	2.2

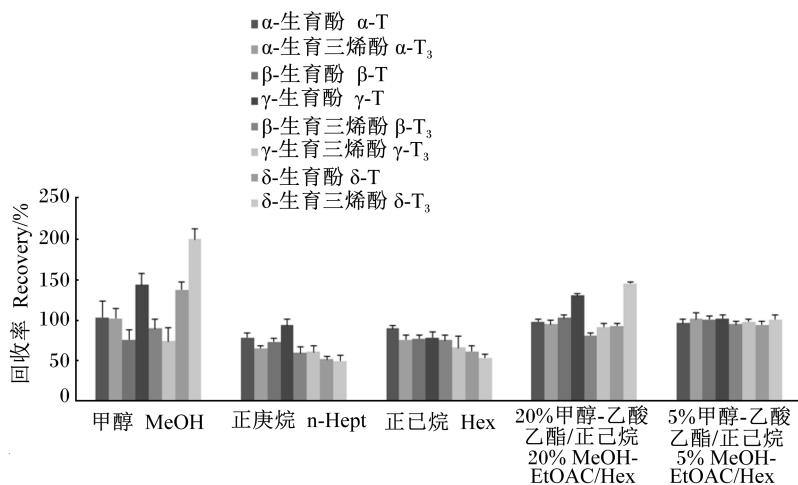


图 1 不同提取溶剂对生育酚和生育三烯酚提取效率的比较

Fig.1 Comparison of extraction efficiency with different extraction solutions

2.3.2 提取温度的影响

因生育酚和生育三烯酚为热敏性物质, 在加热条件下易发生氧化反应, 因此在高温处理时易造成损失。针对该特性, 试验以二氧化硅为基质进行标准添加, 设定提取时间为 50 min, 对提取温度进行优化, 考察温度对天然维生素 E 的影响。相对于其他维生素 E, α -T 和 α -T₃ 的热稳定性最差, 长时间加热处理会使得饲料添加剂样品中的 α -T 和 α -T₃ 含量显著下降。由图 2 可知, 以二氧化硅为基质进行添加回收试验, 在室温 (25 °C) 下超声提取 50 min, α -T 和 α -T₃ 的回收率分别为 81.3%、79.2%, 且 8 种维生素 E 的回收率在 79.2%~101.5%。而在 60 °C 下超声 50 min, α -T 含量降低至 72.7%, α -T₃ 含量则下降至 66.5%, 其

余 6 种维生素 E 受提取温度的影响较小, 回收率在 87.1%~105.1%。因此, 试验选取室温 25 °C 下对样品进行提取。

2.3.3 提取时间的影响

设定提取温度为 25 °C, 对提取时间进行优化, 研究考察提取时间对饲料添加剂样品中 8 种天然维生素 E 的影响。由图 3 可知, 超声时间越长, α -T 和 α -T₃ 的回收率越低。超声 20 min 时, 生育酚和生育三烯酚的回收率均在 94.5%~104.1%, 但超声提取 50 min 后, α -T 和 α -T₃ 的回收率分别降低至 81.3% 和 79.2%。因此, 选取超声时间为 20 min。

2.3.4 样品基质的影响

目前市场上的天然维生素 E 饲料添加剂产品

主要有液态和固态 2 种类型。因液态型添加剂主要是在食用植物油中,如菜籽油、亚麻籽油、大豆油、花生油、葵花籽油中添加天然维生素 E,制成饲料添加剂产品。而固态型添加剂产品的样品基质主要为二氧化硅、脱脂米糠等。由于不同样品基质对这 8 种天然维生素 E 的吸附影响存在差异,因此试验选择了二氧化硅、脱脂米糠、花生油、大豆油、混合植物油等 5 种样品基质进行添加回收试验,按照 1.2 所述方法进行样品处理和测定,考察 5 种基质对生育酚和生育三烯酚提取效率的影响。由图 4 可知,对于上述几种基质,该前处理方法均有较好的结果,回收率在 80%~110%,可以实现对上述基质种天然维生素 E 样品的检测。

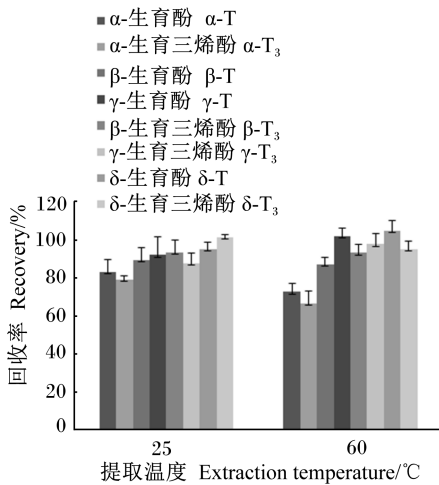


图 2 不同提取温度对生育酚和生育三烯酚提取效率的影响

Fig.2 Influence of extraction temperature on extraction efficiency of tocopherol and tocotrienol

2.4 方法线性范围与定量限

配制浓度为 0.2~50.0 $\mu\text{g/mL}$ 的生育酚和生育三烯酚标准溶液,以 1.2.3 色谱分离条件进行检测,以色谱峰面积和标准溶液浓度作标准曲线。表 5 中生育酚和生育三烯酚在 0.2~50.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性相关系数均大于 0.999,线性关系良好。

选取不同来源的饲料添加剂空白基质(如二氧化硅、脱脂米糠、大豆油等),按照 1.2 所述方法进行样品处理和测定,代表性的空白及添加样品色谱图如图 5 所示。检测限(limits of detection, LOD)以空白样品中与标准品保留时间相同位置的基线噪声的 3 倍值为依据,定量限(limits of

quantification, LOQ)以空白样品在标准品保留时间的基线噪声的 10 倍值为依据,确定空白基质中生育酚和生育三烯酚的 LOD、LOQ 约为 20 和 100 mg/kg ,能够满足天然维生素 E 类饲料添加剂中生育酚和生育三烯酚的分析需要。

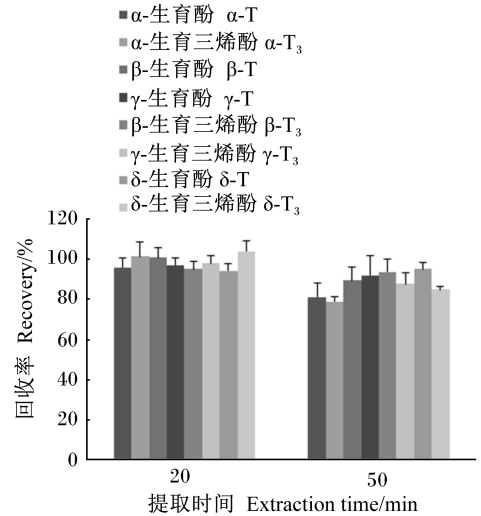


图 3 不同提取时间对生育酚和生育三烯酚提取效率的影响

Fig.3 Influence of extraction time on extraction efficiency of tocopherol and tocotrienol

2.5 准确度与精密性试验

选择具有代表性的饲料添加剂基质,包括大豆油、脱脂米糠、二氧化硅进行添加回收试验,以考察方法的准确度和重现性。在 0.01%、0.02% 和 0.05% 3 个添加水平下,按照 1.2 所述方法进行样品处理和测定,添加回收试验重复 6 次。由表 6 可知,不同基质中生育酚和生育三烯酚的回收率为 81.3%~109.8%;相对标准偏差(RSD) $\leq 7.9\%$ 。

2.6 实际样品检测

通过本试验建立的方法对市场收购的 7 种天然维生素 E 饲料添加剂样品进行检测,结果见表 7。由表 7 可知,样品中维生素 E 的测定值与饲料添加剂产品说明书中的标示值基本一致(如以标示量为约定值,则测定值与约定值的相对误差值皆小于 6.0%),证明该方法可以满足对实际样品的检测。

3 讨论

3.1 生育酚和生育三烯酚校正系数的确定

因生育酚和生育三烯酚化学性质不稳定,且

其标准品价格昂贵、包装量小、黏度大,准确配制标准溶液变得尤为困难。因此行业中常通过紫外比色法对生育酚和生育三烯酚标准溶液的浓度进行定值。目前生育酚和生育三烯酚的校正系数(K)虽有文献报道,但数据并不完整,且各文献数据间存在较大差异,这对生育酚和生育三烯酚含量检测结果的准确性有较大影响。本文对甲醇溶

液中生育酚和生育三烯酚的校正系数进行了测量确认,通过对测量数据进行分析,确定了甲醇溶液中生育酚和生育三烯酚的紫外最大吸收波长和校正系数。该数值准确、稳定,且与文献[5,14]报道的数值一致,可对生育酚和生育三烯酚标准溶液的浓度进行定值分析。

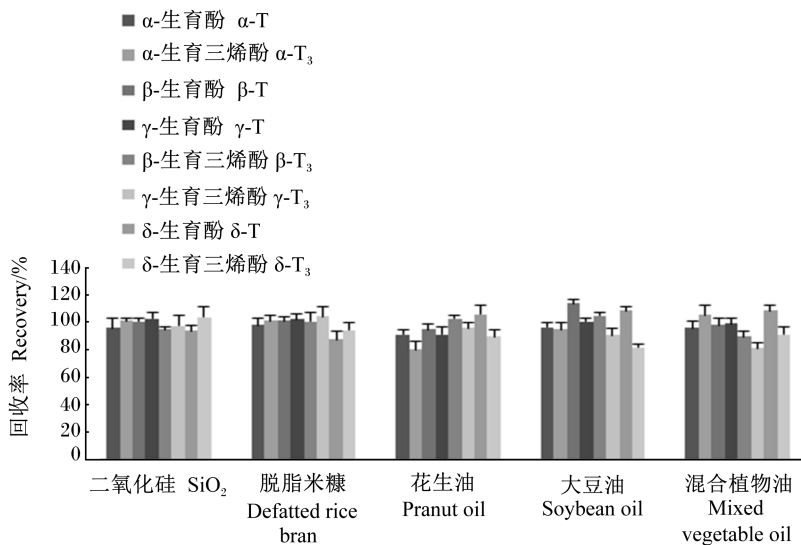


图 4 不同饲料基质对生育酚和生育三烯酚的提取效率的影响

Fig.4 Influence of different feed substrates on extraction efficiency of tocopherol and tocotrienol

表 5 生育酚和生育三烯酚对照溶液的线性回归曲线

Table 5 Linear regression curves of tocopherol and tocotrienol reference solution

分析物 Analytes	线性范围 Linearity range/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	校准曲线 Calibration curves	相关系数 R^2
<i>d</i> - α -生育酚 <i>d</i> - α -T	0.2~50.0	$Y=4\ 569X-1\ 782$	0.999 2
<i>d</i> - β -生育酚 <i>d</i> - β -T	0.2~50.0	$Y=5\ 163X+1\ 916$	0.999 8
<i>d</i> - γ 生育酚 <i>d</i> - γ -T	0.2~50.0	$Y=4\ 592X+960$	0.999 6
<i>d</i> - δ 生育酚 <i>d</i> - δ -T	0.2~50.0	$Y=4\ 660X-2\ 346$	0.999 2
<i>d</i> - α 生育三烯酚 <i>d</i> - α -T ₃	0.2~50.0	$Y=5\ 738X-1\ 356$	0.999 8
<i>d</i> - β 生育三烯酚 <i>d</i> - β -T ₃	0.2~50.0	$Y=3\ 975X-1\ 498$	0.999 0
<i>d</i> - γ 生育三烯酚 <i>d</i> - γ -T ₃	0.2~50.0	$Y=5\ 109X-1\ 945$	0.999 6
<i>d</i> - δ 生育三烯酚 <i>d</i> - δ -T ₃	0.2~50.0	$Y=5\ 691X-2\ 005$	0.999 0

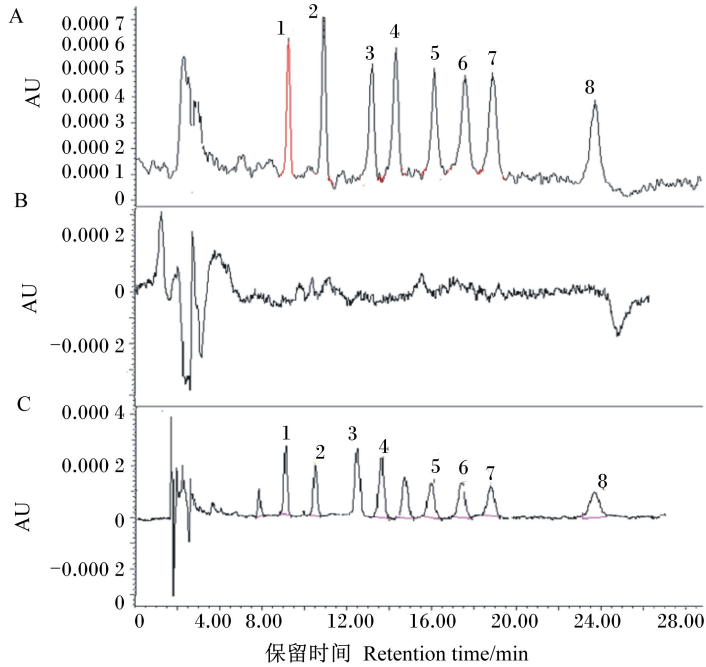
3.2 色谱分离条件的选择

生育酚和生育三烯酚化学结构极为相似,皆是由长脂肪链和色满环组成,只是色满环上的取代基不同,这导致生育酚和生育三烯酚各异构体不易分离。反相色谱分离时(如 C18 为填料),亲脂长链更易吸附于固定相,洗脱溶剂对脂肪长链

相同的 4 种生育酚(生育三烯酚)的影响不大,因此使用反相色谱不易分离。而正相色谱时,色满环上的亲水基团更易吸附在固定相上,色满环上因甲基取代而产生的结构差异将使生育酚(生育三烯酚)在正相色谱柱上较易得到分离^[16]。本试验研究发现,使用正相色谱柱 sinochrom Si60

(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 和 Kromasil 60-5 diol (4.6 mm×150 mm, 5 μm) 对生育酚和生育三烯酚有较好的分离效果, 相邻两峰间的最小分离度分别为 1.4 和 1.9, 而反相色谱柱中 Perfectsil Target

ODS-3 (250 mm×4.6 mm, 3 μm) 的分离效果最优, 但分离度仅为 1.2。由此可以得出结论, 正相色谱更适合分离生育酚和生育三烯酚各异构体, 这与其化学结构分析得出的结论相一致。



1:α-生育酚 α-T;2:α-生育三烯酚 α-T₃;3:β-生育酚 β-T;4:γ-生育酚 γ-T;5:β-生育三烯酚 β-T₃;6:γ-生育三烯酚 γ-T₃;7:δ-生育酚 δ-T;8:δ-生育三烯酚 δ-T₃。

图5 生育酚和生育三烯酚标准溶液(A, 5.0 μg/mL)、代表性空白样品(B, 脱脂米糠)、添加样品(C, 200 mg/kg) 色谱图

Fig.5 Chromatograms of tocopherol and tocotrienol standard solution (A, 5.0 μg/mL), representative blank sample (B, defatted rice bran) and fortified sample (C, 200 mg/kg)

表6 不同基质中添加维生素E标品的回收率

Table 6 Recovery of vitamin E standards in different matrixes (n=6)

%

天然维生素E Natural vitamin E	添加浓度 Fortified concentration/%						
	0.01(100 mg/kg)		0.02(200 mg/kg)		0.05(500 mg/kg)		
	回收率 Recovery	相对标准偏差 RSD	回收率 Recovery	相对标准偏差 RSD	回收率 Recovery	相对标准偏差 RSD	
大豆油 Soybean oil	α-生育酚 α-T	101.8	6.0	98.1	6.2	105.3	6.0
	α-生育三烯酚 α-T ₃	93.5	2.0	91.3	2.4	98.0	2.4
	β-生育酚 β-T	109.1	3.9	92.8	7.2	105.7	6.9
	γ-生育酚 γ-T	92.5	7.7	110.0	6.7	97.8	6.7
	β-生育三烯酚 β-T ₃	99.1	4.2	88.6	1.2	109.8	1.2
	γ-生育三烯酚 γ-T ₃	95.9	7.9	95.9	4.4	99.6	4.4
	δ-生育酚 δ-T	103.8	6.7	103.5	5.8	106.0	5.8
	δ-生育三烯酚 δ-T ₃	83.2	4.3	81.5	4.1	105.3	4.1

续表 6

天然维生素 E Natural vitamin E		添加浓度 Fortified concentration/%					
		0.01 (100 mg/kg)		0.02 (200 mg/kg)		0.05 (500 mg/kg)	
		回收率 Recovery	相对标准偏差 RSD	回收率 Recovery	相对标准偏差 RSD	回收率 Recovery	相对标准偏差 RSD
脱脂米糠 Defatted rice bran	α -生育酚 α -T	98.6	2.4	92.0	0.8	104.9	3.8
	α -生育三烯酚 α -T ₃	90.3	4.1	92.9	0.7	97.3	2.8
	β -生育酚 β -T	96.9	5.1	100.6	0.6	105.4	2.6
	γ -生育酚 γ -T	91.2	4.1	95.4	1.0	104.4	3.7
	β -生育三烯酚 β -T ₃	85.5	3.9	87.9	1.0	100.7	4.8
	γ -生育三烯酚 γ -T ₃	83.0	4.4	85.3	2.2	95.5	1.5
	δ -生育酚 δ -T	96.8	4.1	85.8	1.8	104.9	2.7
	δ -生育三烯酚 δ -T ₃	89.0	7.9	85.2	2.2	97.1	3.0
	α -生育酚 α -T	97.6	5.8	88.2	0.8	92.0	0.8
	α -生育三烯酚 α -T ₃	91.7	4.2	91.7	1.0	87.9	1.0
二氧化硅 SiO ₂	β -生育酚 β -T	98.7	6.6	89.1	0.7	92.9	0.7
	γ -生育酚 γ -T	91.8	6.1	95.2	0.6	100.6	0.6
	β -生育三烯酚 β -T ₃	86.6	6.0	84.8	2.2	85.3	2.2
	γ -生育三烯酚 γ -T ₃	85.0	2.2	96.9	1.8	85.8	1.8
	δ -生育酚 δ -T	98.2	4.4	83.1	1.0	95.4	1.0
	δ -生育三烯酚 δ -T ₃	90.8	6.8	81.3	2.2	85.2	2.2

表 7 实际样品检测结果

Table 7 Determination results of practical samples ($n=3$)

样品名称 Sample name	异构体 Isomer	测定值 Measured value/%	相对标准偏差 RSD/%	维生素 E 含量 Vitamin E content/%	标示值 Labeled amount/%	相对误差 Relative error/%
饲料添加剂天然 维生素 E 粉 Feed additive natural vitamin E powder	α -生育酚 α -T	1.3	4.7	20.3	20	1.5
	β -生育酚 β -T	0.1	6.2			
	γ -生育酚 γ -T	10.7	1.2			
	δ -生育酚 δ -T	8.2	1.0			
饲料添加剂天然 维生素 E 油 Feed additive natural vitamin E oil	α -生育酚 α -T	1.4	5.2	21.2	20	6.0
	β -生育酚 β -T	0.1	4.5			
	γ -生育酚 γ -T	11.3	1.0			
	δ -生育酚 δ -T	8.4	2.1			
50%天然维生素 E 油 50% natural vitamin E oil	α -生育酚 α -T	6.2	4.7	52.0	50	4.0
	β -生育酚 β -T	0.6	7.3			
	γ -生育酚 γ -T	36.2	1.9			
天然维生素 E 油 Natural vitamin E oil	δ -生育酚 δ -T	9.0	2.7	96.2	95	1.3
	α -生育酚 α -T	12.8	1.2			
	β -生育酚 β -T	1.0	3.3			
	γ -生育酚 γ -T	60.8	0.7			
	δ -生育酚 δ -T	21.6	2.7			

续表 7

样品名称 Sample name	异构体 Isomer	测定值 Measured value/%	相对标准偏差 RSD/%	维生素 E 含量 Vitamin E content/%	标示值 Labeled amount/%	相对误差 Relative error/%
30%天然维生素 E 粉 30% natural vitamin E powder	α -生育酚 α -T	2.3	2.2	30.9	30	3.0
	β -生育酚 β -T	0.3	0.7			
	γ -生育酚 γ -T	21.2	4.3			
	δ -生育酚 δ -T	7.1	3.1			
混合生育酚 70IP Mixed Tocopherols 70IP	α -生育酚 α -T	1.3	2.1	70.6	70	0.9
	β -生育酚 β -T	0.1	5.2			
	γ -生育酚 γ -T	67.2	1.6			
	δ -生育酚 δ -T	2.0	2.2			
天然维生素 E+柠檬酸 Natural vitamin E+citric acid	α -生育酚 α -T	1.9	3.1	20.0	20	0
	β -生育酚 β -T	0.2	6.7			
	γ -生育酚 γ -T	10.3	1.6			
	δ -生育酚 δ -T	7.6	1.9			

本研究同样考察了流动相及柱温等色谱条件,发现其对生育酚和生育三烯酚的峰型、保留时间、分离度皆能产生影响。通过研究可知,固定相对分离影响最为显著,色谱条件对生育酚和生育三烯酚分离的影响应为:固定相>流动相>柱温。

3.3 前处理条件对检测的影响

对于固体基质(如二氧化硅)为载体的饲料添加剂样品,使用非极性溶剂正庚烷作为提取溶剂时,因其对样品的表面渗透能力弱, δ -T 和 δ -T₃ 不能完全提取出来,回收率较低,仅为 60%~70%。而当使用极性溶剂甲醇为提取溶剂时,甲醇与流动相极性差异较大,因此产生明显的溶剂效应,此时 γ -T、 δ -T 和 δ -T₃ 等 3 组分的特征峰出现异常性增强。因此,本研究首先使用少量甲醇润湿样品,然后加入乙酸乙酯-正己烷溶剂(3:97, V/V) 改变提取溶液极性,通过此方法获取了较佳的回收率,可满足不同基质中天然维生素 E 含量的检测。

4 结论

本研究首次建立了基于正相液相色谱-紫外检测器对天然维生素 E 饲料添加剂产品中生育酚和生育三烯酚的定量检测方法,可对饲料添加剂中含量高于 0.01% 的 8 种维生素 E 单体实现定量测定,满足了现有天然维生素 E 产品标准中规定的质量要求。在不同基质中生育酚和生育三烯酚的回收率为 81.3%~109.8%,符合在一定浓度水平上的回收率范围;方法相对标准偏差 \leq 7.9%。该方法样品前处理简单、分析时间短、结果可靠,适用于对饲料添加剂产品

中天然维生素 E 的质量控制。

参考文献:

- [1] 张彩丽,贺学礼.天然生育酚的结构、生物合成和功能[J].生物学杂志,2005,22(4):38-40.
- [2] 吴金龙.解密不同形式天然维生素 E 的生理活性[J].中国畜牧杂志,2009,45(18):54-57.
- [3] 王石,王峻,肖志明,等.天然维生素 E 的检测技术研究进展[J].中国饲料,2017(15):28-33,38.
- [4] 罗赞,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.
- [5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.GB/T 26635—2011 动植物油脂 生育酚及生育三烯酚含量测定 高效液相色谱法[S].北京:中国标准出版社,2011.
- [6] QI N L, GONG X, FENG C P, et al. Simultaneous analysis of eight vitamin E isomers in *Moringa oleifera* Lam. leaves by ultra performance convergence chromatography[J]. Food Chemistry, 2016, 207:157-161.
- [7] 吴志成,周朗君,岑建斌,等.气相色谱-质谱联用法快速检测乳制品中维生素 E 含量[J].食品安全质量检测学报,2017,8(5):1842-1846.
- [8] VIÑAS P, PASTOR-BELDA M, CAMPILLO N, et al. Capillary liquid chromatography combined with pressurized liquid extraction and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of vitamin E in cosmetic products[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, 94:173-179.
- [9] ROBLEDO S N, ZACHETTI V G L, ZON M A, et al. Quantitative determination of tocopherols in edible vegetable oils using electrochemical ultra-microsensors

- combined with chemometric tools [J]. *Talanta*, 2013, 116: 964–971.
- [10] YANG Y, LU D, ZHANG J, et al. Simultaneous HPLC-DAD determination of retinol and eight Vitamin E isomers in human serum [J]. *Chromatographia*, 2015, 78(21/22): 1359–1366.
- [11] HUANG S H, NG L T. An improved high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of tocopherols, tocotrienols and γ -oryzanol in rice [J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(29): 4709–4713.
- [12] 张东, 段章群, 李秀娟, 等. 正相高效液相色谱法同时测定芝麻油中生育酚、芝麻素及芝麻林素含量 [J]. *中国油脂*, 2018, 43(5): 131–134.
- [13] IRAKLI M N, SAMANIDOU V F, PAPADOYANNIS I N. Optimization and validation of the reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection method for the separation of tocopherol and tocotrienol isomers in cereals, employing a novel sorbent material [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(9): 2076–2082.
- [14] SHIN T S, GODBER J S. Isolation of four tocopherols and four tocotrienols from a variety of natural sources by semi-preparative high-performance liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 1994, 678(1): 49–58.
- [15] PINHEIRO-SANT'ANA H M, GUINAZI M, OLIVEIRA D D S, et al. Method for simultaneous analysis of eight vitamin E isomers in various foods by high performance liquid chromatography and fluorescence detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(47): 8496–8502.
- [16] 王燕妮. 预混料中维生素的快速检测与天然维生素 E 中 8 种异构体的测定方法研究 [D]. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2017: 33–40.

Determination of Tocopherol and Tocotrienol Contents in Natural Vitamin E of Feed Additive by Normal Phase Liquid Chromatography

WANG Shi¹ WANG Jitong² WANG Yanni³ XIAO Zhiming¹ JIA Zheng¹
LI Yang¹ LIU Xiaolu¹ FAN Xia^{1*}

(1. *Institute of Quality Standards & Testing Technology for Agro-Products, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China*; 2. *Beijing Feed Testing Institute, Beijing 100107, China*; 3. *Chinese Academy of Agricultural Mechanization Sciences, Beijing 100083, China*)

Abstract: The natural vitamin E has been gradually used in pets and livestock breeding because of it can promote the growth of animals and improve the meat quality. Nowadays, there are many kinds of feed additives containing natural vitamin E sold in the markets. However, the standard analytical methods have not yet been developed to monitor these products. In this work, an analytical method using normal phase liquid chromatography-ultraviolet and visible spectrophotometry (NPLC-UV) had been developed for the simultaneous determination of eight natural vitamin E contents. The samples were wetted with methanol and ultrasonic extracted using ethyl acetate/hexane (3:97, V/V). The target analytes were successfully separated on a Kromasil 60-5-diol column (4.6 mm×150 mm) with the mobile phase consisting of N-heptane/Tetrahydrofuran (100:4, V/V) at a flow rate of 1.0 mL/min. The column was thermostated at 40 °C and UV detection was performed at 292 nm. Good linearity was obtained in the ranges of 0.2 to 50 $\mu\text{g/mL}$, with linear coefficients (R^2) higher than 0.999 0. The limit of detection (LOD) was 0.01%. Average recoveries from the fortification samples ranged between 81.3% and 109.8%, with relative standard deviations (RSD) lower than 7.9%. By analyzing the actual sample, the proposed method is reliable, sensitive and easy to perform, making it applicable for routine analysis to provide technical support for market regulation. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(12): 5823–5833]

Key words: feed additive; natural vitamin E; tocopherol; tocotrienol; normal phase liquid chromatography