

文章编号:1672-058X(2011)01-0075-05

季节和放牧地对天祝白牦牛乳中 维生素含量的影响研究*

常海军¹, 周文斌¹, 王强², 余群力³, 甘伯中^{3, **}

(1. 重庆工商大学 环境与生物工程学院, 重庆 400067; 2. 重庆教育学院 生命科学与化学系, 重庆 400067;

3. 甘肃农业大学 食品科学与工程学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:建立了乳中多种维生素 HPLC 法同时测定的相应色谱条件和样品前处理方法, 对天祝放牧白牦牛在不同季节和放牧地分泌乳中维生素含量的进行了研究分析, 结果表明: 白牦牛乳中维生素的含量受不同放牧季节的影响变化较大, 维生素 A 和维生素 E 的含量在夏季牧场含量最高, 分别为 46.10 单位和 104.22 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$, 维生素 B₁、B₆ 和 B₁₁ 的含量在白牦牛不同放牧季节无显著差异 ($P > 0.05$), 而放牧季节显著影响乳中维生素 B₃ 和 B₅ 的含量 ($P < 0.05$), 白牦牛不同放牧地对乳中维生素含量影响较小。

关键词: 白牦牛乳; 维生素; 含量; 季节; 放牧地

中图分类号: O65

文献标志码: A

白牦牛 (*Bos grunniens*) 主产于甘肃省天祝藏族自治县, 是在高寒、缺氧和较大日温差等严酷的自然生态环境条件下, 经过长期的人工和自然选择而形成的珍稀畜种资源^[1]。牦牛作为高寒牧区的主要经济畜种之一, 为牧民提供肉、乳、皮和毛等产品, 其中牦牛乳在当地牧民日常生活中占有极其重要的地位, 牦牛乳品质及产量是衡量牦牛生产性能的重要指标^[2]。牦牛乳营养丰富, 蛋白质含量和乳脂率较高, 还含有多种酶、矿物质元素以及维生素, 牦牛乳因其具有较高的营养价值, 成为人们青睐的乳品原料^[3,4]。关于白牦牛乳中维生素含量受不同季节和放牧地的影响尚未见报道。试验针对季节的变化和不同放牧地对天祝白牦牛乳中的维生素含量影响进行了研究, 以为白牦牛乳品质评定和产品加工提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验原料及采样

试验样品为天祝白牦牛乳, 分别于枯草期(10月~第2年2月)、枯草末期(3~4月)、返青期(5~6月)和青草期(7~9月中旬)4个不同时期取自甘肃天祝岱乾上南台、乌鞘岭和下南泥沟3个牧场, 选择健康的产犊为3胎(常见胎次)白牦牛3头, 每头牛平行采样5份。在清晨出牧前采样, 然后分装在250 mL经灭菌的试验取样瓶中, 加以标签标记, 并于-20℃贮藏待测, 分析前进行解冻。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器

Agilent 1100LC series 高效液相色谱仪(配有四元梯度泵、紫外检测器、进样器、数据记录仪和处理系统; 美国安捷伦公司); ODS-C₁₈ 色谱柱(5 μm , 4.6 mm \times 150 mm); HH-4 数显恒温水浴锅(江苏省金坛市荣华仪

收稿日期: 2010-09-14; 修回日期: 2010-10-02.

* 基金项目: 教育部优秀青年教师科研和奖励基金(0330872); 重庆工商大学博士科研启动基金项目(2010-56-12).

作者简介: 常海军(1980-), 男, 甘肃陇西人, 博士, 讲师, 从事畜产品加工理论与技术研究.

** 通讯作者: 甘伯中(1969-), 男, 博士, 教授, 从事乳品工艺、功能性食品研究. E-mail: ganbz@gsau.edu.cn.

器制造有限公司);YX280A 手提式不锈钢蒸汽消毒器(上海三申医疗器械有限公司);RE-5298 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);HG303-4 电热恒温培养箱(南京实验仪器厂制造);SK8200LH 超声波发生器(美国);Millipore 超纯水装置(美国产)等。

1.2.2 主要试剂

甲醇(色谱纯);焦性没食子酸;乙醇;乙醚;盐酸;氢氧化钠;乙酸钠;无水硫酸钠(均为分析纯 AR);维生素 A、E、B₁、B₂、B₃、B₅、B₆ 和 B₁₁ 标样; α -淀粉酶;木瓜蛋白酶(PS₃)(均为生化试剂 BR);庚烷磺酸钠(PIC-B₇, HPLC);试验用蒸馏水均为高纯水(Millipore 超纯水装置制备)。

1.3 样品处理

1.3.1 脂溶性维生素测定样品前处理

参考文献[5-7]并作部分改动。准确吸取白牦牛乳样 10 mL,加 1 g 焦性没食子酸,再加入 70 mL 乙醇,充分搅拌使样品均匀溶解后,加入 30 mL 50% 的 KOH 溶液。在 50 ± 2 °C 下搅拌回流 40 min,之后分别用 50、30 和 20 mL 乙醚萃取 3 次,每次萃取静置 1.5 ~ 2 h,合并乙醚层,并用高纯水分数次将其洗至中性后(用 pH 试纸检验或用酚酞检验流出物为中性),用无水硫酸钠脱水。在温度 50 °C 下浓缩至约 5 mL 后用甲醇定容至 10 mL,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后进行 HPLC 分析。

1.3.2 B 族维生素测定样品前处理

参考文献[8-10],并作部分改动。准确吸取乳样 10 mL,转移至 150 mL 三角瓶中,加入 0.1 mol/L 的 HCl 溶液 50 mL,用牛皮纸或棉塞将三角瓶口扎紧,于 121 °C 的高压锅中水解 30 min,冷却至温度低于 40 °C 后,加入 2.5 mL 的混合酶液(30 g/L)(α -淀粉酶和木瓜蛋白酶各 3.0 g,溶于 100 mL 2.0 mol/L 的乙酸钠溶液中,搅拌使之溶解),摇匀置于 37 °C 的恒温培养箱中过夜(12 ~ 18 h)。之后用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液将样液 pH 值调节至 6.0 左右,用蒸馏水定容至 100 mL,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后进行 HPLC 分析。

1.4 高效液相色谱法(HPLC)测定色谱条件

1.4.1 脂溶性维生素测定色谱条件

色谱柱:ODS-C₁₈(5 μm,4.6 mm × 150 mm);流动相:甲醇(100%);流速:0.8 mL/min;柱温:25 °C;紫外检测器波长:290 nm;进样量:20 μL。

1.4.2 B 族维生素测定色谱条件

色谱柱:ODS-C₁₈(5 μm,4.6 mm × 150 mm);柱温:30 °C;紫外检测器波长:275 nm;进样量:20 μL。流动相:庚烷磺酸钠离子对试剂(PIC-B₇)和甲醇(色谱纯)并采用梯度洗脱,方法如表 1 所示。

表 1 B 族维生素 HPLC 测定流动相梯度洗脱方法

洗脱时间/min	甲醇/%	离子对试剂/%	流速/(mL/min)
0	0	100	1.0
5	0	100	1.0
8	35.0	65.0	1.0
18	0	100	1.0

1.5 定量测定^[11,12]

按 1.4 中的色谱条件,依次进混合标准工作液和试验溶液得到色谱峰高,根据标准品的保留时间(T_R)定性分析测试样品中维生素的出峰时间,根据标准峰高与样品峰高的比较而进行定量分析,按下列公式计算:

$$\text{维生素含量} \left(\frac{\mu\text{g}}{100 \text{ mL}} \right) = \frac{\text{样品峰高}(\text{mm}) \times \text{试验溶液终体积}(\text{mL}) \times \text{标样浓度}(\frac{\mu\text{g}}{100 \text{ mL}}) \times \text{标样进样体积}(\mu\text{L})}{\text{标样峰高}(\text{mm}) \times \text{样品量}(\text{mL}) \times \text{从试验溶液中分取的进样体积}(\mu\text{L})}$$

1.6 数据分析

结果采用 SPSS 13.0 统计软件中 Compare Means 法和析因法对数据进行方差分析以及用 LSD 进行多重比较,分析不同季节和牧场白牦牛乳中维生素含量的差异性。

2 结果与分析

2.1 不同放牧季节白牦牛乳中维生素含量

4个不同放牧时期即枯草期、枯草末期、返青期和青草期天祝白牦牛乳中维生素含量见表2。

表2 不同放牧季节白牦牛乳中维生素的含量 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$

维生素种类	维生素含量($\bar{x} \pm s$)			
	枯草期	枯草末期	返青期	青草期
A	29.857 3 \pm 1.75 ^c	41.960 8 \pm 0.47 ^b	42.029 5 \pm 2.56 ^b	46.099 2 \pm 1.89 ^a
E	92.684 7 \pm 1.46 ^c	98.779 5 \pm 1.23 ^{bc}	100.958 5 \pm 2.41 ^{ac}	104.224 1 \pm 2.27 ^a
B ₁	34.646 1 \pm 1.24	33.153 8 \pm 1.67	34.307 6 \pm 1.02	35.410 2 \pm 2.71
B ₂	172.246 9 \pm 4.57 ^b	181.688 7 \pm 2.08 ^{ac}	176.985 7 \pm 5.82 ^{bc}	181.042 3 \pm 4.05 ^{ac}
B ₃	339.213 9 \pm 2.84 ^b	349.513 0 \pm 1.9 ^a	345.039 5 \pm 5.65 ^{ac}	341.972 1 \pm 2.45 ^{bc}
B ₅	80.602 9 \pm 2.52 ^b	82.960 1 \pm 1.93 ^{ab}	81.518 3 \pm 1.07 ^{ab}	84.131 3 \pm 1.07 ^a
B ₆	50.114 1 \pm 1.83	48.896 9 \pm 1.67	49.283 8 \pm 1.12	49.960 9 \pm 1.73
B ₁₁	4.737 2 \pm 0.81	4.557 7 \pm 0.98	4.627 7 \pm 0.56	4.648 1 \pm 0.65

注:肩注不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$);肩注不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$),以下相同。

由表2表明,放牧白牦牛在青草期所分泌乳中维生素A的平均含量显著高于其他放牧时期($P < 0.05$),在青草期乳中维生素A的平均含量为46.099 2 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$,枯草末期和返青期之间不存在显著差异,但和枯草期之间分别存在显著差异($P < 0.05$),维生素A在枯草期乳中的含量最低,平均含量为29.857 3 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ 。乳中维生素E的平均含量在青草期极显著高于枯草期和枯草末期($P < 0.01$),而和返青期之间不存在显著性差异($P > 0.05$),枯草期、枯草末期和返青期之间相互不存在显著差异,最高含量在青草期的平均值为104.224 1 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ 。

B族维生素中,维生素B₁、B₆和B₁₁3种维生素在白牦牛不同放牧时期含量无显著性差异($P > 0.05$)。乳中维生素B₂的含量在枯草末期最高(181.688 7 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$),枯草末期、返青期和青草期之间无显著差异,但显著高于枯草期($P < 0.05$)。维生素B₃的含量在枯草末期最高(349.513 0 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$),显著高于枯草期和青草期,和返青期之间不存在显著性差异。维生素B₅的含量在青草期最高(84.131 3 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$),显著高于枯草期($P < 0.05$),枯草末期和返青期之间不存在显著性差异。

由以上分析结果可知,天祝白牦牛不同放牧季节对乳中脂溶性维生素的含量影响显著(维生素A)($P < 0.05$)或极显著(维生素E)($P < 0.01$),对B族维生素的含量影响除B₂、B₃和B₅显著($P < 0.05$)以外,其余的都不显著($P > 0.05$)。

2.2 不同放牧地白牦牛乳中维生素的含量

天祝岱乾上南台、乌鞘岭和下南泥沟3个不同牧场白牦牛乳中维生素含量分析如表3所示。

由表3可知,白牦牛乳中脂溶性维生素A和E的含量在3个不同的放牧地无显著差异($P > 0.05$),乳中维生素A的含量在乌鞘岭为最高,在岱乾上南台含量最低,两者相差7.207 8 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ 。乳中维生素E的含量在下南泥沟为最高,在乌鞘岭含量最低,相差2.957 9 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ 。B族维生素中,除维生素B₁₁外,其余的B族维生素的含量在3个不同的放牧地不存在显著性差异。其中,在下南泥沟牧场,牦牛乳中维生素B₁、B₂、B₅和B₆的含量在3个牧场中处于最高;维生素B₃的含量在乌鞘岭牧场最高。维生素B₁₁的含量在下南泥沟牧场牦牛乳中极显著高于乌鞘岭和岱乾上南台牧场牦牛乳($P < 0.01$),而在乌鞘岭和岱乾上南台牧场牦牛乳中其含量无显著性差异。

研究结果表明,不同放牧牧场对牦牛乳中维生素的含量影响不大,只有维生素B₁₁的含量在下南泥沟牧

场牦牛乳中极显著($P < 0.01$)高于乌鞘岭和岱乾上南台牧场牦牛乳中的含量外,其余维生素的含量在牦牛不同的放牧牧场之间不存在显著差异($P > 0.05$)。

表3 不同放牧地白牦牛乳中维生素的含量

 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$

维生素种类	维生素含量($\bar{x} \pm s$)		
	岱乾上南台	乌鞘岭	下南泥沟
A	33.559 3 \pm 0.90	40.767 1 \pm 2.74	38.073 7 \pm 6.95
E	103.764 6 \pm 2.94	100.958 5 \pm 2.41	103.916 4 \pm 4.13
B ₁	33.358 9 \pm 2.69	34.205 1 \pm 0.84	36.263 4 \pm 2.61
B ₂	181.584 4 \pm 3.78	178.896 7 \pm 2.60	183.141 0 \pm 2.55
B ₃	343.245 1 \pm 7.43	345.039 5 \pm 5.65	344.477 8 \pm 6.53
B ₅	83.920 0 \pm 5.71	85.447 4 \pm 4.64	90.264 2 \pm 1.45
B ₆	45.376 3 \pm 4.54	44.780 8 \pm 4.48	52.636 4 \pm 5.49
B ₁₁	4.692 3 \pm 0.20BC	4.769 2 \pm 0.38B	6.076 7 \pm 0.20A

3 讨论

牛乳中的脂溶性维生素来源不同,有的来自饲料中的维生素,如维生素A和E,其含量的高低受季节和放牧情况等因素的影响较大。乳中维生素A的浓度受牛所采食牧草的质量决定,因此,饲料中含胡萝卜素越多,则乳中维生素A的含量也越多^[3]。牛乳中维生素E浓度随季节而变化,反映了维生素摄入的变化,与 β -胡萝卜素一样,干牧草不是维生素E的良好来源。天祝白牦牛放牧牧场草地营养水平受季节影响变化较大,这种变化直接影响牦牛的四季营养状况,进而影响到牦牛所分泌乳中维生素的含量,也影响到牦牛乳其他常规营养成分和乳中活性物质的含量,另外对牦牛的泌乳量也会产生影响^[13]。

牛乳中的水溶性维生素部分可在牛自身体内合成,如B族维生素可在牛的瘤胃中由微生物进行合成,其含量的高低受季节和放牧情况等因素的影响较小^[14]。牦牛瘤胃内环境会因放牧草地营养水平的变化而变化,导致瘤胃纤毛虫在不同季节的优势属种排序发生变化^[2]。在不同的放牧季节,由于牦牛所采食牧草的质量不同,因而导致牦牛瘤胃内的环境会有很大的不同,直接影响到瘤胃内各种合成B族维生素的微生物的优势种发生变化,故而对乳中部分B族维生素的含量造成一定的影响。

通过研究可知,不同的放牧牧场对天祝牦牛乳中维生素的含量影响不大,主要是由于本研究中三个牧场的海拔高度、年平均气温和牦牛放牧季节的变化等均基本一致;另外,放牧草场类型也一致,均为草甸和灌丛,且牧草的生长季节均相同,仅仅草产量有一定的差别^[13],会对白牦牛的产乳量产生影响,但对乳中各维生素的含量无显著性影响。

4 结论

天祝放牧白牦牛乳中维生素的含量受不同放牧季节的影响变化较大,主要表现为维生素A和E的含量在夏秋季高于冬春季,维生素B₁、B₆和B₁₁3种维生素的含量在白牦牛不同放牧时期无显著性差异,而不同放牧季节显著影响维生素B₃和B₅的含量,本研究中白牦牛3个不同放牧地对乳中维生素含量影响较小。

参考文献:

- [1] 唐正香,杨勤,甘伯中,等. 季节和胎次对白牦牛乳中酶活性的影响研究[J]. 中国草食动物,2007,27(1):11-13
- [2] 妥彦峰,甘伯中,杨富民,等. 天祝夏季草原放牧条件下牦牛产奶性能的研究[J]. 甘肃农业大学学报,2006,41(4):16-19
- [3] 常海军. 不同放牧条件对白牦牛乳中维生素含量的影响研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2007

- [4] 常海军,甘伯中,刘长英,等. 高效液相色谱法测定白牦牛乳中 VA 和 VE 的含量 [J]. 甘肃农业大学学报,2007,42(2): 108-111
- [5] KIYOSHI T. Simultaneous determination of cis-trans isomeric retinals by performance liquid chromatography [J]. Chromatography, 1977,134:331-336
- [6] 沈跃伟. 高效液相色谱法测定维生素 A、D、E 研究进展 [J]. 海军医学杂志,2001,22(1):92-93
- [7] 黄爱珍,刘婕. RP-HPLC 测定预混料中脂溶性维生素 [J]. 中国饲料,1999,24:12
- [8] 梁明,周靖. 水溶性维生素在高效液相色谱上的分离条件 [J]. 分析测试,2004,33(2):119-121
- [9] MONIR A. High performance liquid chromatography of water-soluble Vitamins III. Simultaneous determination of Vitamin B₁, B₂, B₆ and B₁₂ in pharmaceutical preparation [J]. Journal of Chromatography,1987,30(2):448-451
- [10] WIMALASIRI P, WILLS R B B. Simultaneous analysis of thiamin and riboflavin in foods by high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography,1985,38:412-416
- [11] 李筠,谢梅冬,农英相. 复合预混合饲料中维生素 B 族的测定 [J]. 化工技术与开发,2003,32(3):23-24
- [12] GB/T 9695.26-1991. 肉与肉制品维生素 A 含量测定 [S]. 中华人民共和国国家标准,1991
- [13] 妥彦峰. 甘肃天祝放牧白牦牛乳营养成分及脂肪酸研究 [D]. 兰州:甘肃农业大学,2006
- [14] 骆承庠. 乳与乳制品工艺学[M]:2 版. 北京:中国农业出版社,1999

Analysis of Vitamins Contents in White Yak's Milk under Different Seasons and Pastures

CHANG Hai-jun¹, ZHOU Wen-bin¹, WANG Qiang²,
YU Qun-li³, GAN Bo-zhong^{3,*}

(1. College of Environmental and Biological Engineering, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China; 2. Department of Life Science and Chemistry, Chongqing Education College, Chongqing 400067, China; 3. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Gansu Lanzhou 730070, China)

Abstract: The high performance liquid chromatography (HPLC) method for a simultaneous determination of vitamins in white yak's milk has been developed. By the analysis of vitamins contents of white yak's milk under different seasons and pastures, the results showed that vitamins contents in white yak's milk were largely affected by the different seasons, the contents of vitamin A and E were maximal at the summer time, and they were 46.10 and 104.22 μg/100 mL respectively. There were no significant differences for the contents of vitamin B₁, B₆ and B₁₁ under different seasons ($P > 0.05$), but the season affected the contents of vitamin B₃ and B₅ significantly ($P < 0.05$). The different pastures had less effect on vitamins contents for white yak's milk.

Key words: white yak's milk; vitamins; contents; seasons; pastures

责任编辑:田 静