

在线二维液相色谱法快速同时测定婴幼儿配方奶粉中维生素 A, D 和 4 种 VE 异构体的含量

Simultaneous determination vitamins A, D and four E isomers in infant formula by online two-dimensional liquid chromatography

关键词

高效液相色谱, 维生素 A, 维生素 D, α -生育酚, β -生育酚, γ -生育酚, δ -生育酚, 二维色谱, 婴幼儿配方奶粉

Key words: Two-dimensional separation, vitamin D, α -retinol, β -retinol, γ -retinol, δ -retinol, vitamin A, high performance liquid chromatography, Infant formula

引言

维生素 A (retinol)、维生素 D (vitamin D₂ 和 vitamin D₃)、维生素 E (tocopherol) 是机体维持正常代谢和机能的所必需的脂溶性维生素。其中维生素 E 有 8 种异构体形式, 即 4 种生育酚 (α 、 β 、 γ 、 δ -tocopherols) 和 4 种三烯生育酚 (α 、 β 、 γ 、 δ -tocotrienols), 均具有重要的生物活性, 被认为是一类主要的抗氧化剂。通常 α -生育酚被报道是活性最高的一种维生素 E 形式^[1], 因此很多文献报道的分析方法仅测定了 α -生育酚的含量^[2-4]。最近研究表明, 其他几种异构体形式也在人体中具有重要的作用, 并且 γ -生育酚具有抗癌作用^[5]。维生素 E 异构体结构的复杂性和活性的差异, 决定了建立一种准确可靠的分析方法, 来分离和测定食品基质中各个异构体含量, 具有重要意义^[6]。目前分离维生素 E 异构体的方法有薄层色谱法、气相色谱法和液相色谱法, 其中基于正相色谱分离的高效液相色谱法是常用方法^[7]。另外维生素 D 也是婴幼儿配方食品中一

种重要的营养素, 但因为其在食品中含量较低, 且对光热较敏感, 再加上复杂的食品基质成分干扰, 决定了其分析方法也十分复杂。我国^[8]和欧洲^[9]的关于食品中维生素 D 现行标准方法中, 需采用正相制备色谱、反相分析色谱两套仪器, 分别进行净化制备和分析, 极大的影响样品分析效率。

本文在前期工作中已建立同时测定食品中维生素 A, D 和 α -维生素 E 含量的在线二维液相色谱法^[10], 在此基础上, 本文又继续优化了色谱条件, 一维色谱结合荧光检测器完成维生素 A 和 4 种生育酚异构体的分离和定量, 二维色谱完成维生素 D 的定量, 大大改善了样品的分析效率。

仪器和软件

Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate™ 3000 x2 Dual HPLC system, including:

- DGP-3600RS Dual-Gradient Rapid Separation Pump System with SRD-3600 Integrated Solvent and Degasser Rack

- WPS-3000TRS Rapid Separation Wellplate Sampler, Thermostatted, with a 100 μ L sample loop and a 100 μ L syringe
- TCC-3000RS Rapid Separation Thermostatted Column Compartment equipped with two 2p-6p valves
- DAD-3000RS Rapid Separation Diode Array Detector with 2.5 μ L flow cell
- Sample Loop for 500 μ L Volume
- Thermo Scientific™ Dionex™ Chromeleon™ Chromatography Data System (CDS) software version 7.2 SR3

试剂和材料

维生素 D₃ ($\geq 95\%$, HPLC 级, 供含量测定用, 中国药品生物制品检定所)。维生素 D₂ ($\geq 95\%$, HPLC 级, 供含量测定用, 中国药品生物制品检定所); 维生素 A (all-trans retinol, $> 95\%$, Acros Organics)、 α -维生素 E (α -tocopherol, $\geq 96\%$, Sigma, HPLC), β 、 γ 、 δ -生育酚 (纯度 $> 96\%$, HPLC, 购自 Supelco)。

氢氧化钾 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 乙腈、甲醇 (色谱级, Fisher 公司), 去离子水 (18.2 M Ω , Millipore 纯水机), 抗坏血酸 ($\geq 95\%$, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

标准品溶液制备

取维生素 A、D₂、D₃ 和 E 标准品适量, 精密称定, 至 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 制成浓度分别为 1.0 mg/mL 维生素 D₃ 和 D₂ 溶液, 1.24 mg/mL 维生素 A 溶液和 2.06 mg/mL 维生素 E 储备溶液。

分别精密量取维生素 D₃、维生素 A 和 E 的标准品溶液适量, 至 10 mL 棕色量瓶中, 成系列标准品混合溶液, 再分别精密加入等量的浓度为 10 μ g/mL 的维生素 D₂ 的内标溶液, 甲醇稀释至刻度, 各标准品浓度见表 1。

Table 1. Preparation of mixed working standard solutions of fat-soluble vitamins.

Mixed working standard solution	RT.min	1	2	3	4	5	6
VA	10.59	0.124	0.248	0.413	0.62	1.24	6.2
α -VE	17.022	0.24	0.48	2.4	12	24	120
β -VE	22.26	0.2	0.4	2	10	20	100
γ -VE	22.68	0.16	0.32	1.6	8	16	80
δ -VE	21.11	0.24	0.48	2.4	12	24	120
VD ₃	27.097	0.02	0.04	0.08	0.4	2	10

样品溶液制备

参考 GB 5413.9-2010^[5] 的方法, 精密称取奶粉 10 g, 于 250 mL 锥形瓶中, 加入 30 mL 热水使溶解 (液态奶不需加入), 再加入 15 g/L 的维生素 C 乙醇溶液 100 mL, 再加入 1.25 g/mL 的氢氧化钾溶液 25 mL, 精密加入 10 μ g/mL 的维生素 D₂ 内标溶液 1.0 mL, 磁力搅拌 45 分钟, 温度 60 ± 2 $^{\circ}$ C。将皂化液转移至 500 mL 分液漏斗中, 以石油醚萃取 3 次 (若出现乳化, 可加饱和的氯化钠溶液破乳), 每次 100 mL, 合并萃取液, 萃取液以水洗至偏中性 (pH 试纸测试), 收集石油醚层, 经过无水硫酸钠脱水。低温减压回收石油醚, 至 1~2 mL 时转移至 10 mL 棕色瓶中, 氮气吹干, 再以 3~5 mL 甲醇使溶解并转移至 10 mL 棕色量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 待用。未用完溶液放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

色谱条件

一维色谱柱	FOODKIT 2 ADE 3.0 X 150 mm, P/N: VITADE-005K2
二维色谱柱	FOODKIT 1&2 ADE 4.6 X 100 mm, P/N: VITADE-004K1
柱温	30 $^{\circ}$ C
流动相 A	乙腈
流动相 B	甲醇
流动相 C	水
流速	一维分离泵: 0.5 mL/min 二维分离泵: 0.8 mL/min
检测	UV: 264 nm, 296 nm, 325 nm FLD: 激发波长: 295 nm, 发射波长: 330 nm, Sensitivity: 1
进样量	10 μ L

一维及二维梯度程序见表 2, 阀切换时间及过程见表 3。

表 2. 一维分离和二维分离梯度程序

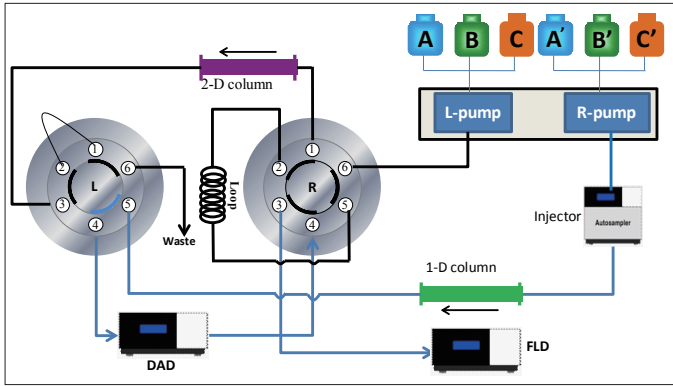
时间 (分钟) Time (min)	一维分析泵			时间 (分钟) Time (min)	二维分析泵		
	A%	B%	C%		A%	B%	C%
0	50	0	50	0	40	0	60
3	50	0	50	21	40	0	60
6	0	75	25	23	100	0	0
21	0	90	10	31	60	40	0
23	0	100	0	34	60	40	0
30	0	100	0	35	40	0	60

表 3. 阀切换时间及过程

Time	左阀	右阀	说明
0	6_1	2_1	UV 与一维色谱柱连接, 分析 vitamins A, E 和 D 净化
17.9	6_1	6_1	将含有 VD 的馏分转移并储存在 Loop 中
18.4	6_1	2_1	右泵流动相将 Loop 环中馏分转移至二维色谱柱中
25	1_2	6_1	UV 与二维色谱柱连接, 对 VD 进行定量分析
35	6_1	2_1	分析完成, 阀切换到初始状态

系统连接见图 1。

图 1. 全自动在线二维柱切换系统流程图示意图



结果与讨论

色谱条件优化

本文所建立的在线二维液相色谱法测定维生素 A, D 和 E 的 4 种异构体, 从色谱柱选择上, 主要考虑从以下几个方面进行优化: 首先作为一维色谱柱, 维生素 E 要实现基线分离, 这是准确定量的前提; 其次要考虑到 VD 的净化过程效果, 以及要兼顾到 VD_2 和 VD_3 的分离等。在一维色谱柱选择上, 本文尝试了 C 8, C 18, C 30, 苯基柱、PAH 柱等, 结果 β 、 γ -维生素 E 在 C 8、C 18 色谱柱上重叠, 无法实现分离, 二者在 C 30 色谱柱 (150 × 4.6 mm × 2.6 μ m), 也无法实现基线分离, 苯基柱和 PAH 专用柱可实现二者的分离, 但峰展宽严重。而在 FOODKIT2 ADE 专用色谱柱可实现 4 种生育酚异构体的基线分离, 且 VD_2 、 VD_3 色谱峰在该色谱柱上重叠, 利用此特点可减少 VD 馏分 (即从一维色谱柱将含 VD_2 和 VD_3 切割至二维色谱柱中) 的溶剂体积, 从而减少对二维色谱分离的溶剂效应, 确保二维色谱柱的分离柱效。因此确定该色谱柱作为一维色谱柱。在前期方法的基础上^[10], 本文仍选择极性改性的反相色谱柱作为第二维色谱柱, 保持了一维和二维色谱柱良好的正交性, 结果 VD_2 、 VD_3 分离较好, 可对 VD_2 、 VD_3 进行准确定量。

荧光检测器仅对有荧光吸收的化合物有响应, 具有灵敏度高、选择性好等特点。维生素 E 具有较好的荧光响应, 因此本实验在紫外检测器的基础上, 串联了荧光检测器, 既能提高维生素 E 的检测灵敏度, 也可减少了部分复杂奶粉基质成分对维生素 E 分离和定量的影响, 弥补了紫外检测上的不足。混合标准品溶液分析谱图及典型的样品分析谱图分别见图 2 和图 3。

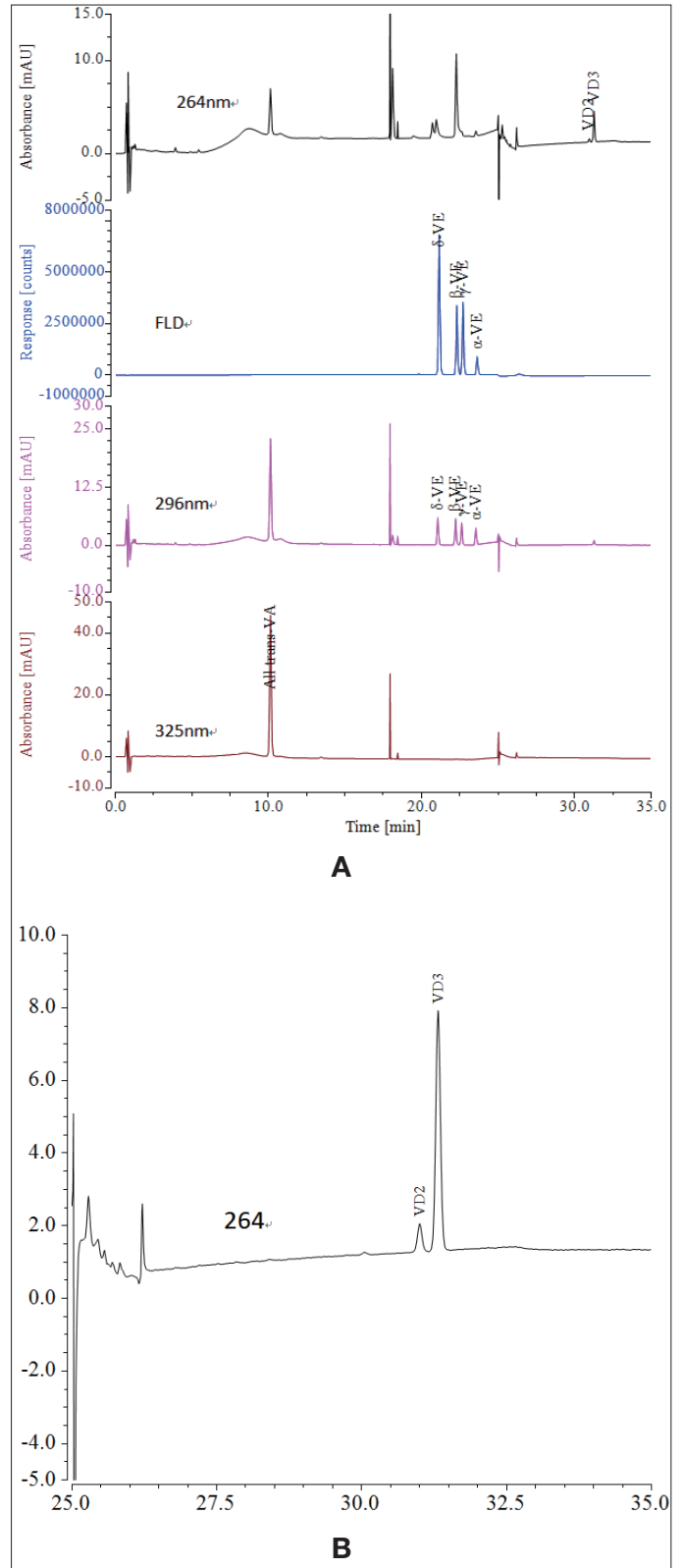


图 2. 维生素 A、D₃、E 标准品分析谱图 (A, 其中 0~20 min 为一维分离谱图, 20~30 min 为二维分离谱图) 和二维分离放大图谱 (B)

表 5. 样品维生素 A、D₃ 和 E 含量测定结果 (n=2)

Name	Content (μg/100 g for VA,D; mg/100 g for VE)					
	VA	VD ₃	α-VE	β-VE	γ-VE	δ-VE
婴幼儿配方奶粉-1	778	11.48	16.51	0.72	11.2	2.51
婴幼儿配方奶粉-2	894	10.04	14.33	0.50	7.37	2.42

采用本法测得 VA, VD₃ 及 α-VE 的含量均在标示量范围内。另外样品中 γ-VE 和 δ-VE 的含量也较高, 而 β-VE 含量相对较低, 两个样品中 α、β、γ 和 δ-VE 含量比例总体上趋于一致。虽奶粉营养标签中未标示 β、γ 和 δ-VE 的含量, 但 4 种 VE 异构体的总含量及其比例, 对评价 VE 的总体效价, 控制产品质量具有重要意义。

结论

本文基于二维色谱原理, 利用双梯度泵系统, 结合两个切换阀, 构建了全自动在线二维液相色谱分析方法, 通过紫外检测器和荧光检测器的串联, 一次进样同时完成脂溶性维生素 A, D₂, D₃ 及其 α, β, γ 和 δ-VE 的定量分析, 方法验证结果表明, 本法能够准确测定婴幼儿配方奶粉中各待测营养素的含量。且 4 种 VE 异构体的拆分和定量, 对于产品的质量控制具有重要意义。另外本法自动化程度高, 操作简便快速, 可用于日常奶粉样品的检测工作中。

参考文献

- [1] Hewavitharana A K., Lanari M C, Becu C., J. Chromatogr. A. 2004, 1025: 313
- [2] Ruperez F J, Barbas C, Castro M, Herrera E, Determination of α-tocopherol and α-tocopheryl acetate in diets of experimental animals Study of stability in the diets, J Chromatogr A[J]. 1999, 839: 93- 99
- [3] Ake M, Fabre H, Malan A K., Mandrou B. Column Liquid chromatography determination of vitamins A and E in powdered milk and local flour: a validation procedure[J]. J Chromatogr A, 1998, 826: 183-189
- [4] Charlotta Turner, Lennart Mathiasson, Determination of vitamins A and E in milk powder using supercritical fluid extraction for sample clean-up, J Chromatogr A, 2000, 874: 275 - 283.
- [5] Campbell S, Stone W, Whaley S, Krishnan K. Crit. Ver. Oncol. Hematol., 2003, 47(3): 249-259
- [6] A. Kamal-Eldin, S. Gorgen, J. Petterson, A.M. Lampi, J.

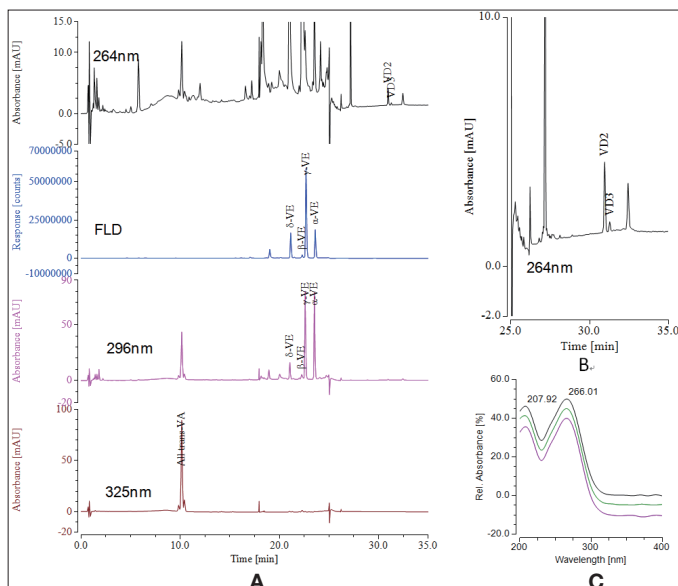


图 3. 婴幼儿配方奶粉样品分析谱图 (A)、二维分离放大图谱 (B, 264 nm) 及其中 VD₃ 色谱峰的紫外扫描谱图 (C)

线性、最低定量限、精密度实验

分别精密量取维生素 A、D₂、D₃ 和 α, β, γ, δ-维生素 E 的标准品溶液适量, 至 10 mL 棕色量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 制成系列标准品混合溶液, 进样 5 μL, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 考察方法的线性范围。结果各目标化合物在其浓度范围内, 线性相关系数 > 0.999, 表明各化合物线性相关关系较好。线性方程及其方法检出限的结果见表 4。

Table 4. Calibration data and MDLs for the fatty-soluble vitamins

Fatty-soluble vitamins	Detection wavelength (nm)	Range (μg/mL)	Regression equation	r	MDL (μg/mL)
A	325	0.44-174.0	y=0.3120x-0.0527	0.9999	0.0082
D ₃	264	0.04-4	y=0.3643x-0.0028	0.9999	0.015
D ₂	264	0.04-4	y=0.2519x-0.0034	0.9997	0.015
α-VE	296	2.4-120	y=13292.5x-57679.1	0.9990	0.068
β-VE	296	0.4-100	y=47811.7x-78353.7	0.9994	0.035
γ-VE	296	0.32-80	y=61533.3x-78492.2	0.9994	0.025
δ-VE	296	0.48-120	y=77930.7x-118076.7	0.9996	0.015

取 0.1 μg/mL 的混合标准品溶液, 连续进样 6 次, 结果 VD₃ 的峰面积的 RSD 分别为 0.82%, 维生素 A 峰面积的 RSD 为 1.89%, α, β, γ, δ-VE 峰面积的 RSD 分别为 2.53%, 1.79%, 1.64% 和 1.1%, 表明连续进样, 方法精密度较好。

样品测定

取市售的两份婴幼儿配方奶粉样品, 每份 10 g, 精密称定, 按照 2.2.2 中样品溶液制备方法制备样品溶液, 测定结果见表 5。

Chromatogr. A 881 (2000), 217.

- [7] Abidi S L. J. Chromatogr. A, 2000, 881(1-2): 197-216
- [8] GB 5413.9-2010, Determination of vitamins A, D, E in foods for infants and young children. National food safety standard.
- [9] BS EN 12821:2009, Foodstuffs -Determination of vitamin D by high performance liquid Chromatography — Measurement of cholecalciferol (D₃) or ergocalciferol (D₂)
- [10] 张艳海, 其布勒哈斯, 金燕, 等. 在线二维液相色谱法同时测定婴幼儿和成人配方营养品中的维生素 A, D₃ 和 E 的含量 [J]. 色谱, 2015, 33 (3) : 291-297.
Zhang YH, Qibule HS, Jin Y, et al. simultaneous determination of vitamins A, D₃ and E in infant formula and adult nutrition by online Two-dimensional liquid chromatography [J]. Chinese journal of chromatography, 2015, 33 (3) : 291-297.



赛默飞色谱及痕
量元素分析

赛默飞世尔科技(中国)有限公司

www.thermofisher.com

全国服务热线: 800 810 5118
400 650 5118 (支持手机用户)

thermo
scientific

A Thermo Fisher Scientific Brand