

中心切割法快速分析婴幼儿配方奶粉中的维生素 A、维生素 E 及微量维生素 D

作者

杨新磊, 余彦海, 李浪, 肖尧
安捷伦科技(中国)有限公司

关键词

中心切割
奶粉
维生素



摘要

本文建立了在线中心切割法快速测定婴幼儿配方奶粉中的脂溶性维生素 A、维生素 E 和维生素 D₃。奶粉样品经过皂化、提取、过滤后直接进入中心切割系统进行分析, 经过第一维分离后可直接得到 VA 和 VE 的结果, VD 经过第一维初步净化后被切入第二维再进行分离、检测, 整个分析过程仅需 14 分钟且同时得到 VA、VE 和 VD 含量。方法线性良好, 对于 VD₃ 的检出限可以达到 10 μg/kg (或 400 IU/kg)。同时, 该方法重复性好, 以样品为考察对象, 连续 3 针进样, VA、VE 和 VD 保留时间 R.S.D. < 0.30%, 峰面积 R.S.D. < 0.81%。



Agilent Technologies

前言

婴幼儿配方奶粉又称母乳化奶粉，为了满足婴儿的营养需要，需要添加各种营养成分，组成非常复杂。其中，常加的脂溶性维生素有维生素 A、维生素 D 和维生素 E，VA 和 VE 的添加量比较大，测定相对容易，VD 的添加量较少加之紫外吸收弱、基质干扰严重，测定起来非常麻烦。有文献方法 [1] 将样品皂化后用固相萃取小柱先净化、浓缩后再以液质联用法进行分离检测。国家标准方法 [2] 测定婴幼儿配方奶粉中 VD 时先用正相液相色谱法进行纯化，收集 VD 保留时间的馏分，馏分挥发干后复溶，再经过反相 HPLC 方法测定。整个过程非常麻烦且耗时较长，造成样品分析通量不高。

本实验采用中心切割方法，利用第一维色谱柱在分析 VA 和 VE 的同时对 VD 进行净化，再将初步净化后的 VD 在线引入第二维色谱柱进行分离、测定，整个分析过程只需一次进样即可完成样品中 VA、VE 及微量 VD 的测定。该方法不仅可以节省大量的制备工作，而且稳定性良好，可以用于配方奶粉中脂溶性维生素的常规快速测定。

实验部分

仪器配置

第一维：

1260 四元泵：P/N G1311B

1260 自动进样器：P/N G1329B

1260 柱温箱：P/N G1316A，内置 2 位-6 通阀

1260 二极管阵列检测器：P/N G4212B，配 10 mm 标准流通池

第二维：

1260 脱气机：P/N G1322A

1260 二元泵：P/N G1312B

1260 二极管阵列检测器：P/N 4212B，配 60 mm 超高灵敏度流通池

软件：

OpenLab CDS ChemStation Edition C01.05[35]

HPLC方法

整个 HPLC 方法为中心切割的二维液相方法 (heart-cutting 2DLC)，包含三个阶段：第一阶段为进样/分析维生素 A，此时阀的位置为 1-2；第二阶段为净化/捕获维生素 D，阀在维生素 D 出峰前切换到位置 1-6；第三阶段第一维继续分析维生素 E，第二维则分离检测维生素 D，阀在第一维维生素 D 出峰结束后切回位置 1-2，具体见下图 1。本方法第一维采用高效短柱 (Zorbax RRHT Extend-C18, 4.6 × 50 mm × 1.8 μm) 进行快速分析，第二维采用 PAH 专用柱 (Zorbax Eclipse PAH, 2.1 × 100 mm × 3.5 μm) 以提高 VD₂ 和 VD₃ 的分离，同时第二维 DAD 检测器配备超高灵敏度流通池 (60 mm 光程) 以提高灵敏度，其他方法细节见表 1。

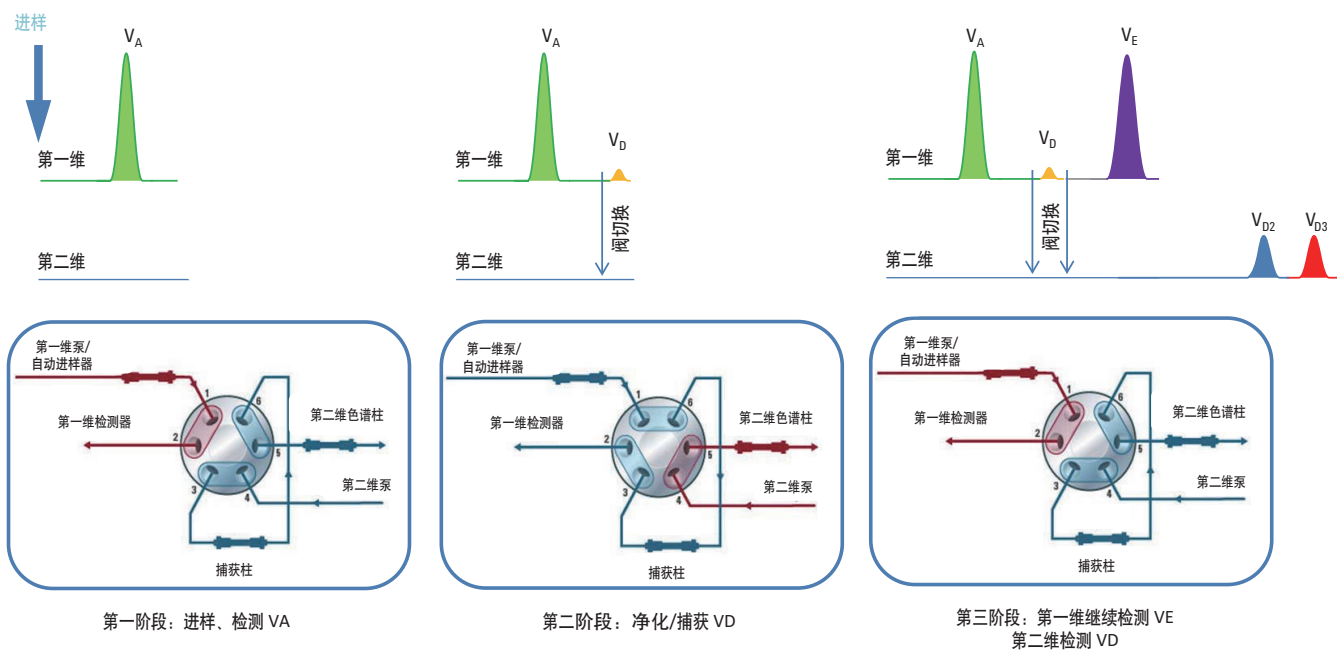


图 1. 中心切割法同时分析 VA、VE 和 VD₂/VD₃ 示意图

表 1. 中心切割方法参数

	第一维	第二维																								
泵	1 mL/min	0.6 mL/min																								
流动相 A	H ₂ O	ACN																								
流动相 B	MeOH	MeOH																								
自动进样器	10 μL																									
色谱柱	Zorbax RRHT Extend-C18, 4.6 × 50 mm × 1.8 μm	Zorbax Eclipse PAH, 2.1 × 100 mm × 3.5 μm																								
捕获柱	Zorbax Extend-C18, 4.6 × 12.5 mm × 5 μm (放置于保护柱卡套中)																									
柱温	35 °C																									
检测器	0-3.5 min: 325 nm (4 nm, Ref off) 3.5-14 min: 290 nm (4 nm, Ref off), 20 Hz	265 nm (4 nm, Ref off), 20 Hz																								
梯度程序	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>B%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>90</td></tr> <tr><td>3</td><td>100</td></tr> <tr><td>10</td><td>100</td></tr> <tr><td>10.1</td><td>90</td></tr> <tr><td>14</td><td>90</td></tr> </tbody> </table>	时间 (min)	B%	0	90	3	100	10	100	10.1	90	14	90	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>B%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>5</td></tr> <tr><td>10</td><td>5</td></tr> <tr><td>10.1</td><td>100</td></tr> <tr><td>12</td><td>100</td></tr> <tr><td>12.1</td><td>5</td></tr> </tbody> </table>	时间 (min)	B%	0	5	10	5	10.1	100	12	100	12.1	5
时间 (min)	B%																									
0	90																									
3	100																									
10	100																									
10.1	90																									
14	90																									
时间 (min)	B%																									
0	5																									
10	5																									
10.1	100																									
12	100																									
12.1	5																									
阀	0-4.4 min: 位置 1-2 (第一阶段) 4.4-4.6 min: 位置 1-6 (第二阶段) 4.6-10 min: 位置 1-2 (第三阶段)																									

结果与讨论

第一维方法的确定

采用反相 C18 色谱柱可以轻松分离 VA、VD₂ (或 VD₃) 和 VE, 但即使奶粉样品经过皂化、萃取处理, 仍然存在一些干扰物质, 因此优化第一维梯度应以皂化后的实际样品为宜, 以排除 VA 和 VE 出峰时的干扰为最佳。对于 VD₂/VD₃, 梯度优化时应充分考虑峰宽, 避免峰太宽, 不利于捕获柱的完全捕集。根据本实验结论, VD₂ 的峰起点和 VD₃ 的峰终点时间差不能超过 0.2 min (1 mL/min 条件下), VD₂ 和 VD₃ 在第一维柱上可以没有分离效果, 或者共洗脱。第一维条件参考表 1 详述。

阀切换时间的确定

对于中心切割方法阀切换时间至关重要, 为提高 VD 的回收率和净化效果, 阀切换时间需设定在 VD₂ 出峰时间前和 VD₃ 出峰时间后。考虑到色谱柱的批次间重现性以及长期使用后柱效的下降, 每次使用中心切割方法前应以含有 VD₂ 和 VD₃ 混合标样为考察对象, 采用第一维梯度方法 (同 2.1 优化的方法) 进行分析, 重新确定阀切换时间。

第二维方法的确定

第二维方法以分离 VD₂ 和 VD₃ 以及排除样品中的干扰为主要目的。本文采用 Zorbax Eclipse PAH 柱 (2.1 × 100 mm × 3.5 μm) 采用等度方法即可完成 VD₂ 和 VD₃ 的分离以及样品中干扰物质的排除。

样品制备方法

样品制备如图 2 所示 (参考 GB 5413.9—2010 婴幼儿食品和乳品中维生素 A、D、E 的测定)

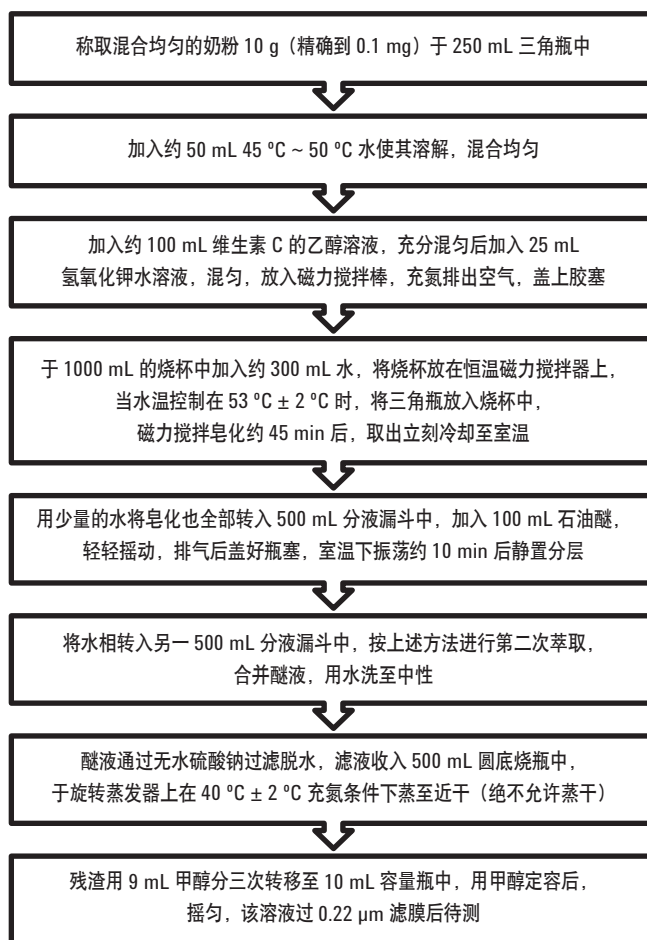


图 2. 样品制备流程图

线性、检出限、重复性

婴幼儿配方奶粉中 VA 和 VE 含量都比较高且固定，在保证样品前处理无损失的前提下可以准确测出其含量。对于 VD 其添加量通常较低且存在较多干扰，需要同时关注检出限、线性范围和专属性。图 3 为本文方法 VA、VE 和 VD₃ 的线性范围，其中 VA 在 2.5 ~ 12.5 μg/mL 内线性相关系数为 0.99996；VE 在 50 ~ 250 μg/mL 内线性相关系数为 0.99984，VD₃ 在 0.05 ~ 0.25 μg/mL 内线性相关系数为 0.99988。按信

噪比 S/N = 3 计算，VD₃ 的检出限为 0.01 μg/mL，换算为奶粉样品中 VD₃ 的含量为 10 μg/kg（或 400 IU/kg）。

采用本文方法进行奶粉中 VD 含量测定可以很好的排除样品基质中杂质对 VD 的干扰，专属性高，图 4 为典型的标准品和样品色谱图。以实际样品考察方法重复性，连续三针进样，保留时间 R.S.D. < 0.30%，峰面积 R.S.D. < 0.81%，见表 2。

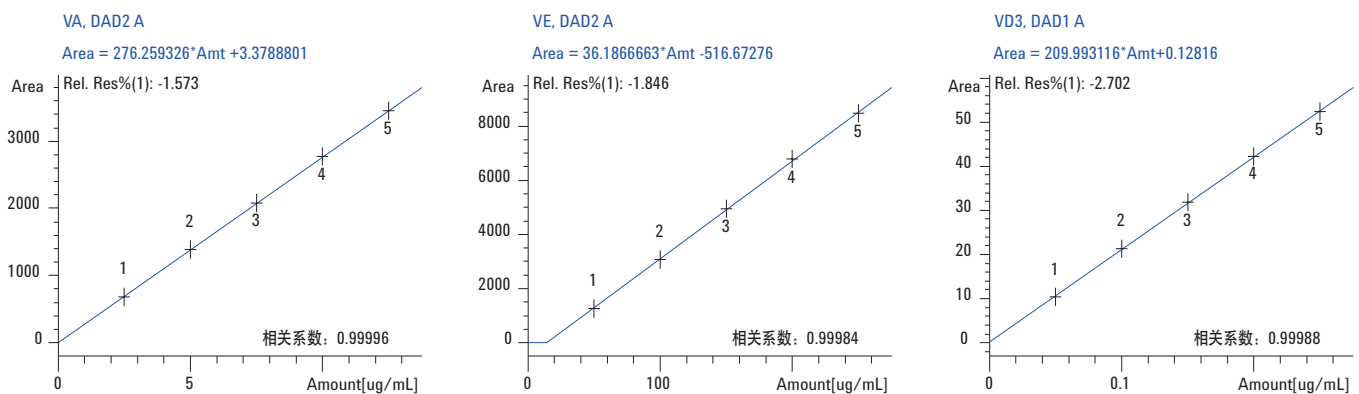


图 3. VA、VE 和 VD₃ 的校准曲线及线性拟合相关系数

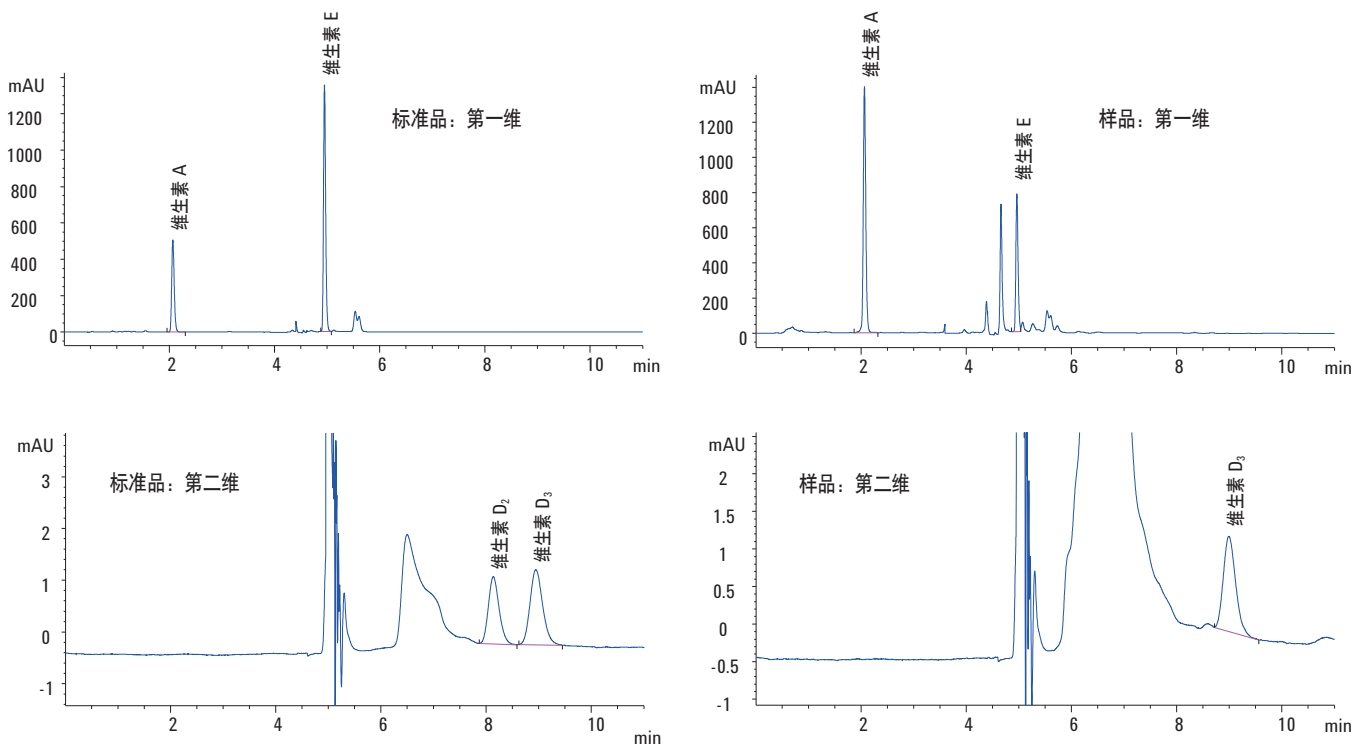


图 4. 标准品及样品色谱图

表 2. 样品连续 3 针进样保留时间和峰面积重复性

进样次数	VA		VE		VD3	
	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积
1	2.064	4645.55273	4.951	2301.32178	8.953	20.24444
2	2.063	4658.86182	4.961	2301.61694	8.991	20.56408
3	2.064	4660.52637	4.965	2301.80396	9.005	20.48096
RSD(%)	0.03	0.18	0.14	0.01	0.30	0.81

结论

相比于现有方法关于婴幼儿配方奶粉中脂溶性 VA、VE 和 VD 的测定，本文中心切割法具有自动化程度高、操作简单、成本低等特点。对于样品中微量 VD 的检测，该方法灵敏度高、专属性强，样品中杂质不会干扰 VD 的测定。实验数据表明，本文方法可用于乳品企业 QC 部门关于奶粉中 VA、VE 和微量 VD 的同时测定。

参考文献

- [1] Olivier Heudi, et al., J. Chroma. A, 1022(2004), 115-123
- [2] GB 5413.9-2010, 婴幼儿食品和乳制品中维生素 A、D、E 的测定.

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦不对本文可能存在的错误或由于提供、展示或使用本文所造成的间接损失承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2014

2014年8月26日，中国印刷

出版号：5991-5194CHCN