

DGLC-26 在线二维柱切换 - 高效液相色谱法同时测定婴幼儿强化奶粉中维生素 A、D₃、E 的含量

关键词：高效液相色谱；维生素 D；维生素 A；维生素 E；二维色谱；婴幼儿配方奶粉

DGLC-26 Simultaneous qualification of vitamins A, D3 and E in fortified Infant formulae by Liquid Chromatography Coupled with Fully Automated Online two-dimensional column switching method

Key words: Two-dimensional separation, vitamin D, vitamin A, vitamin E, high performance liquid chromatography, dual gradient system, Fortified Infant formulae

引言

婴幼儿配方奶粉又称为母乳化奶粉，是一种以牛乳（或其他动物乳）为主要原料，通过调整成分模拟母乳，可供婴幼儿生长和发育所需要的一种人工食品^[1]。根据国家标准中奶粉营养成分有关规定，维生素指标中必须强化的包括维生素 A、维生素 D 和维生素 E 及其他水溶性维生素等；其中维生素 D 在实际母乳中含量极低，约为 4~40 IU（国际单位）/L（0.1~1.0μg/L）^[2~4]，主要对应形式为维生素 D₃ 和 25-OH 维生素 D₃^[4~5]，因此通常将维生素 D₃ 制成水可分散性的微粒形式，添加到婴幼儿强化奶粉中^[5~6]。关于奶粉中维生素 A、D 和 E 的测定方法，文献报道较多，其中高效液相色谱法是常用的分析方法。由于样品基质复杂，三种维生素对温度、光照、氧气和极端的 pH 值较敏感，且多数经过包被后再添加到食品基质中^[7]，因此分析方法常包括皂化破壁、有机溶剂萃取，浓缩和净化等步骤^[8~9]，在现行标准分析方法中^[9]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，前处理过程极其繁琐，大大影响样品分析效率。

本文首次采用在线二维柱切换 - 高效液相色谱紫外检测法，样品经过皂化、萃取后，直接进样，同时完成维生素 A、D 和 E 的分析测定，提高了方法的准确性和样品分析效率。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系列，包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵；带有两个六通阀的柱温箱；紫外检测器。连接图见图 1。

一维分析柱：Acclaim 120 C₁₈，3μm 3.0 × 150mm

二维分析柱：Acclaim 120 PA II C₁₈，3μm 4.6 × 150mm

柱温：30℃

检测波长：0~5min，325nm；5~12min，296nm；12~30min，263nm

进样量：50μL

流速：0.8 ml/min

流动相组成：

一维分析泵：A，乙腈；B，甲醇；C，为甲醇 - 四氢呋喃（80：20）

二维分析泵：A，乙腈；B，异丙醇
流速：0.8mL/min
梯度洗脱程序：见表 1

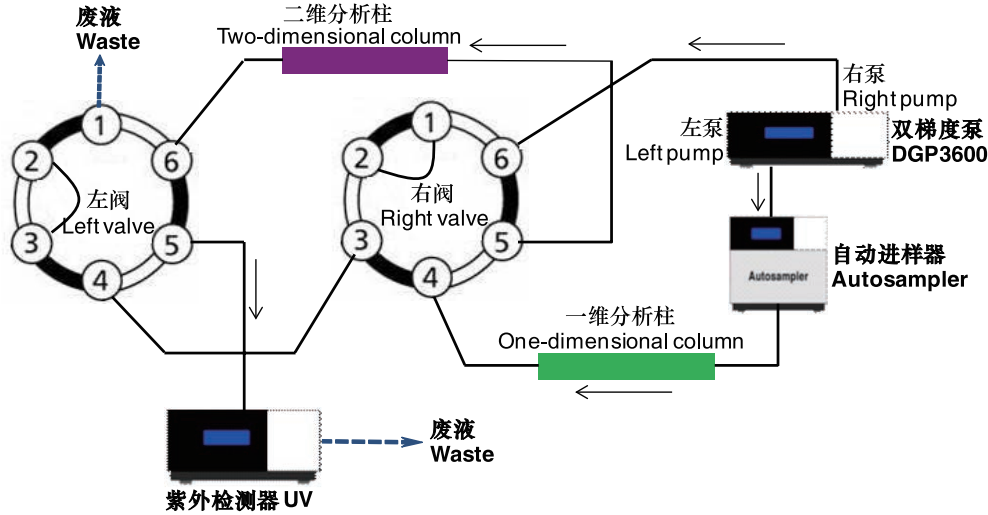


图 1 仪器连接图

表 1 一维分离和二维分离梯度程序

一维分析泵				二维分析泵		
时间 (min)	A%	B%	C%	时间 (min)	A%	B%
Time (min)				Time (min)		
0	60	40	0	0	100	0
15	60	40	0	9	100	0
15.1	0	0	100	25	80	20
25	0	0	100	28	80	20
25.1	60	40	0	28.1	100	0
30	60	40	0	30	100	0

样品前处理方法

精密称取奶粉 10 g（液态奶 50mL），于 250 mL 锥形瓶中，加入 30mL 热水使溶解（液态奶不需加入），再加入 15g/L 的维生素 C 乙醇溶液 100mL，再加入 55% 的氢氧化钾水溶液 25mL，磁力搅拌 45min，温度 53℃。将皂化液移至 500mL 分液漏斗中，以石油醚萃取 3 次，每次 100mL，合并萃取液，萃取液以水洗涤 3~5 次，至中性（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 1~2mL 时转移至 10mL 棕色瓶中，氮气吹干，再以 3~5mL 甲醇使溶解并转移至 10mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，摇匀，待用。未用完溶液放入 4℃ 冰箱保存。

结果和讨论

标准品和样品色谱图

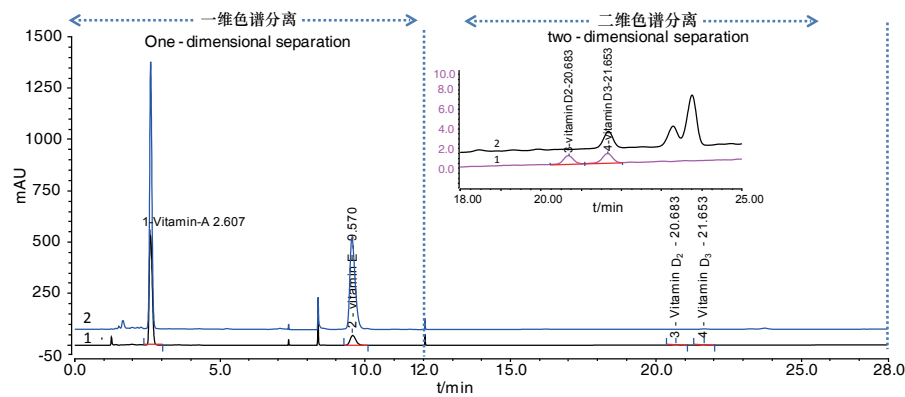


图 2 采用二维柱切换法测定维生素 A、D₂、D₃ 和 E 的分离谱图（1 标准品，2 样品）

方法学考察

方法线性范围、定量限、精密度考察

分别精密量取维生素 D₃、维生素 A 和 E 的标准工作溶液适量，至 10mL 棕色量瓶中，制成系列混合标准品溶液，再分别精密加入等量的浓度为 10mg/L 的维生素 D₂ 的内标溶液 0.5mL，甲醇稀释至刻度，进样 50μL，以浓度为横坐标，维生素 D₃/D₂ 峰面积比值为纵坐标，做线性回归，结果维生素 D₃ 在 20~2000μg/L 的范围内，相关系数 r 为 0.9995；维生素 A 在 1.71~855mg/L 的范围内，r 为 0.9979；维生素 E 在 4.12~1030mg/L 范围内，r 为 0.9998。其中维生素 D₃ 最低定量限为 20μg/kg，相当于 800IU/kg。

取已知混合标准品溶液，连续进样 6 次，结果维生素 D₂、维生素 D₃ 的峰面积的 RSD 分别为 1.94% 和 2.82%，维生素 E 峰面积的 RSD 为 0.44%，维生素 A 峰面积的 RSD 为 0.43%，表明方法的精密度较好。

回收率实验

分别取某品牌婴幼儿配方奶粉样品 3 份，每份 10g，精密称定，分别精密加入浓度为 10mg/L 的维生素 D₂ 的内标溶液 0.5mL，再分别加入维生素 A、D₃、E 的标准品适量，按照 2.4 项下处理样品并测定维生素 A、D₃、E 的总量，计算回收率。结果维生素 A、D₃、E 的平均回收率分别为 114%、100.68% 和 93.98%，其相应的 RSD 分别为 0.16%、2.9% 和 0.58%。

样品含量测定结果

分别取各品牌婴幼儿和儿童配方奶粉 10 g，精密称定，按照 2.4 项下的样品溶液制备方法制备样品溶液，测定维生素 A、D₃ 和 E 的含量，结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果

样品名称	维生素 A(mg/kg)		维生素 E(mg/kg)		维生素 D ₃ (μg/kg)	
	标示量	测得量	标示量	测得量	标示量	测得量
奶粉 -1	5.70	6.16	40	40.9	79	84
奶粉 -2	5.91	6.49	87	83	84	76
奶粉 -3	4.50	5.04	150	132	80	70
AD 钙奶	0.06	0.065	—	—	17	14.5

讨论

二维色谱流路构建和阀切换时间的确定

维生素 A、E 在配方奶粉中含量较高，样品经过皂化萃取后，可直接在一维色谱柱中实现分离。维生素 D 含量较低，且样品基质干扰较大，原标准方法需经过正相制备色谱的净化，再将含有维生素 D 的馏分蒸干定容后，再在反相色谱上进行分析。本文采用二维色谱分离的中心切割法，样品在一维色谱柱实现初步分离后，将含有维生素 D 的馏分切割至二维色谱柱中进行分离。系统连接图见图 1。由于外界因素影响，维生素 D 在一维色谱分离中的保留时间会有微小波动，因此切割的时间窗太窄容易造成目标物的损失，时间窗太宽，会使切换到二维分离柱的溶剂体积过大，对二维分离产生溶剂效应，本实验通过连续进样，考察了保留时间波动范围，确定了最终的切换时间。在一维色谱分离中，维生素 A、E 在 12min 内即可完成分离过程，而在二维色谱分离中维生素 D 的保留时间约为 21~22min，因此方法采用两位置六通阀实现了色谱柱后的紫外检测器共用。左侧阀的切换时间定在 12min，在 12min 之前，一维色谱柱与检测器连接；在 12min 之后，二维色谱柱与检测器连接，从而实现维生素 A、D 和 E 的同时检测。

色谱分离条件选择

在色谱分离模式选择上，文献中一般采用正相色谱或反相色谱法进行分析。反相色谱法的优势是可以将维生素 D₂、维生素 D₃ 以及维生素 D 前体和非活性的异构体分开，因此可以选择维生素 D₂ 作为内标，以补偿在前处理过程中维生素 D₃ 的损失，提高测定结果的准确性和可靠性，另外考虑到流动相的兼容性，本实验在一维色谱和二维色谱分离中均采用反相色谱法。在色谱柱选择上，二维分离选择性的变化能够改善样品的 2 个或更多色谱峰的分离度，能使色谱图中被大峰掩盖的小峰分离出来，减少色谱峰重叠，因此实验中采用 C₁₈ 作为一维分析柱，采用 PA II C₁₈ (Embedded-polar-group C₁₈) 作为二维分析柱。在流动相选择上，甲醇、乙腈、乙醇、异丙醇以及水是常用溶剂，由于样品溶液中含有大量低极性的物质，因此本实验采用了非水反相系统，以增加低极性物质的溶剂量。在一维色谱分离中，为减少强保留、低极性成分的干扰，在维生素 A、E 分离结束后，加入了四氢呋喃-甲醇的混合溶剂清洗色谱柱的过程。本实验对比了一维常规分离谱图（见图 3）和二维柱切换法的分离谱图（图 2），可以看出后者分离结果较好。

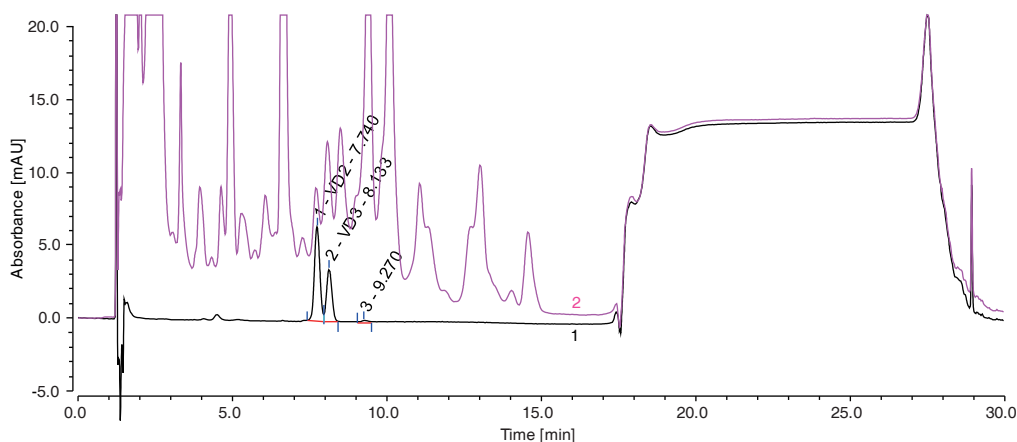


图 3 常规分离谱图（1 维生素 D₂、D₃ 标准品溶液；2 加 VD₂ 样品）

可行性分析

本文建立了在线二维柱切换-紫外检测法测定婴幼儿配方奶粉和乳品中维生素 A、D₃ 和 E 的含量测定方法，本方法具有以下特点：

（1）二维分离方法可以减少色谱峰重叠现象。在维生素 D₃ 测定中，利用一维和二维色谱柱分离选择性差异，可以更好的降低复杂基质成分对维生素 D₃ 测定的干扰。

(2) 与国标方法比较, 本方法可减少正相色谱的净化过程, 一次进样同时测定脂溶性维生素 A, E 和 D₃ 的含量, 大大提高了样品的分析效率。

(3) 在检测方法选择上, 紫外检测器和电化学检测器是应用较多的两种检测器。质谱检测器在复杂基质样品中对痕量组分的定性和定量上具有优势, 在婴幼儿奶粉检测中应用也越来越多。本文立足于方法的普适性, 选择紫外检测器, 利用其波长切换方式, 同时分析维生素 A, E 和 D₃, 通过一个六通切换阀, 实现检测器的共用, 所有过程在软件支持下, 可以实现全自动化控制。

作为二维分离方法, 相对于常规分析, 仍较复杂, 影响测定结果的因素较多。今后本实验将继续扩大样品分析范围, 考察方法耐用性, 并开展联合实验室的验证工作, 以完成对方法的综合评价。

参考文献

- [1]. ZHAO Rong, XUE Ying, WU Guo-Hua, ZHAO Hai-Yan, LUO Ren-Cai. Chinese J. Chromatogr., 2008, 26 (1): 113~115
赵榕, 薛颖, 吴国华, 赵海燕, 罗仁才. 色谱, 2008, 26(1): 113~115
- [2]. AOAC Official Method 995.05. Vitamin D in Infant Formulas and Enteral Products (Liquid Chromatographic Method). 1995
- [3]. GB 5413.9-2010, Determination of vitamins A, D, E in foods for infants and young children. National food safety standard.
GB 5413.9-2010, 婴幼儿食品和乳品中维生素 A、D、E 的测定, 食品安全国家标准
- [4]. Ball G.F.M. Determination of the fat-soluble vitamins in foods by high-performance liquid chromatography. In: Nollet M.L., Dekker M. (eds), Handbook of Food Analysis. New York: Leo Pub., 1996:601-647
- [5]. HUANG Fang, WU Hui-Qin, HANG Yi-Ping. PTCA (PART B: CHEM. ANAL. (理化检测 - 化学分册)). 2010, 47 (5): 577~582.
黄芳, 吴惠勤, 杭义萍. 理化检测 - 化学分册. 2010, 47(5): 577~582.
- [6]. Olivier Heudi, Marie-José Trisconi, Christopher-John Blake. Journal of Chromatography A, 2004, 1022 (1-2): 115-123.