

在线二维高效液相色谱法快速分析配方奶粉中的维生素A、D和四种维生素E异构体含量

刘兴国 曹建明 金燕

赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词

二维液相色谱, 快速分析, 维生素A, 维生素D, 维生素E, 生育酚, 配方奶粉

摘要

本文基于赛默飞Vanquish Flex液相色谱系统, 建立了在线二维液相色谱快速分析配方奶粉中维生素A、D和E异构体的方法。通过优化色谱条件, 更换二维色谱柱为Accucore aQ, 从而在较短时间内实现了维生素A、维生素D₂和D₃以及维生素E的四种异构体的同时分离, 使分析速度有了较大的提高。

1. 引言

维生素是人和动物为维持正常的生理功能而必须从食物中获得的一种微量有机物质, 根据物理性质不同分为水溶性和脂溶性两大类, 其中脂溶性维生素A、D、E在人体的视觉能力、免疫功能、抗氧化抗衰老能力等诸方面都有着重要的生理功能^[1]。维生素不足会造成人体的亚健康, 因此对于维生素的补充越来越受到人们的重视。婴幼儿及成人配方乳品是脂溶性维生素强化的重要形式之一。

针对奶粉样品基质复杂的特点, 我国^[2]和欧洲^[3]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, 分析效率很低。本文在前期研究的基础上^[4, 5], 基于赛默飞Vanquish Flex液相色谱系统, 重新进行色谱柱筛选, 优化了色谱条件, 实现了配方奶粉维生素A、维生素D₂和D₃以及维生素E的四种生育酚异构体快速同时分析, 样品分析时间缩短为12min, 提高了分析效率。

2. 实验部分

2.1 仪器

Thermo Fisher Vanquish Flex高效液相色谱仪

泵: Vanquish Dual Pump (含两个独立三元梯度泵)

自动进样器: Vanquish Autosampler (100 μ L Sample Loop)

柱温箱: Vanquish Column Compartment (含一个Viper Only 2p-6p切换阀)

检测器: Vanquish Diode Array Detector HL (含10mm流通池); U3000 VWD3100 Detector (含11 μ L流通池)

样品收集环体积: 500 μ L

色谱软件: 变色龙Chromeleon 7.3

2.2 试剂与标准品

2.2.1 试剂: 乙腈、甲醇、乙醇、石油醚、乙醚、丙酮、乙酸乙酯、正己烷、二氯甲烷(色谱级, Fisher公司), 去离子水(18.2M Ω , Millipore纯水机), 氢氧化钾、抗坏血酸、2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)和无水硫酸钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

2.2.2 标准品: 维生素A (all-trans retinol, \geq 95%, Sigma-Aldrich), 维生素D₂ (98.1%, Dr.Ehrenstorfer GmbH),

维生素D₃ (99.6%, Dr.Ehrenstorfer GmbH), α-生育酚 (α-tocopherol, 98.0%, Sigma-Aldrich), β、γ、δ-生育酚 (≥96%, Sigma-Aldrich)。

2.3 对照品溶液制备

分别精密称量维生素A、D₂、D₃、α、β、γ和δ-生育酚标准品适量, 至10mL棕色容量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 配制成浓度分别为0.571、0.097、0.097、1.144、2.283、2.651和2.062 mg/mL的标准品溶液。

标准混合溶液制备为分别精密量取上述维生素A、D₂、D₃、α、β、γ和δ-生育酚标准品溶液适量, 至10mL棕色容量瓶中, 甲醇稀释定容成系列标准混合溶液。

2.4 供试品溶液制备

参考GB 5009.82-2016的方法^[2], 精密称取固体奶粉试样约10g (精确到0.01g) 于150mL平底烧瓶中, 用约30mL 45℃~50℃温水使其溶解, 混匀。于上述处理的试样溶液中加入1.0g抗坏血酸和0.1g BHT, 混匀, 加入30mL无水乙醇, 充分混匀后加入约20mL 0.5g/g的氢氧化钾水溶液混匀, 在80℃恒温水浴振荡皂化约30min后, 取出立刻用冷水冷却到室温。

将上述皂化液转移入250mL分液漏斗中, 加入50mL石油醚-乙醚混合液 (1:1, V:V), 振荡萃取5min, 将下层溶液转移至另一个250mL分液漏斗, 加入50mL石油醚-乙醚混合液再次萃取, 合并醚液, 用约100mL水洗涤醚液, 重复3次, 至醚液洗至中性。醚液通过无水硫酸钠脱水过滤, 滤液收入250mL圆底烧瓶中, 于旋转蒸发仪上在40℃水浴旋蒸至约2mL, 立即氮气吹干, 用甲醇复溶转移至10mL容量瓶后定容, 上机分析。

2.5 色谱条件

一维色谱柱: Accucore PFP (150mm×2.1mm, 2.6μm) (PN17426-152130)

二维色谱柱: Accucore aQ (150mm×2.1mm, 2.6μm) (PN17326-152130)

进样体积: 5μL

柱温: 25℃

检测器条件: DAD 264nm, 296nm, 325nm; UV264nm

表1 梯度洗脱条件及阀切换时间

一维分析泵 (VA, VE)				二维分析泵 (VD)				阀切换	
Time, min	A%	B%	C%	Time, min	A%	B%	C%	Time, min	LowerValve
0.0	0	84	16	0.0	60	40	0	0	1_2
2.0	0	84	16	3.0	60	40	0	3.65	6_1
7.0	0	97	3	3.1	40	0	60	4.25	1_2
7.5	0	100	0	5.0	40	0	60		
8.0	0	100	0	6.0	100	0	0		
8.1	0	84	16	8.0	60	40	0		
12.0	0	84	16	12.0	60	40	0		

仪器连接图:

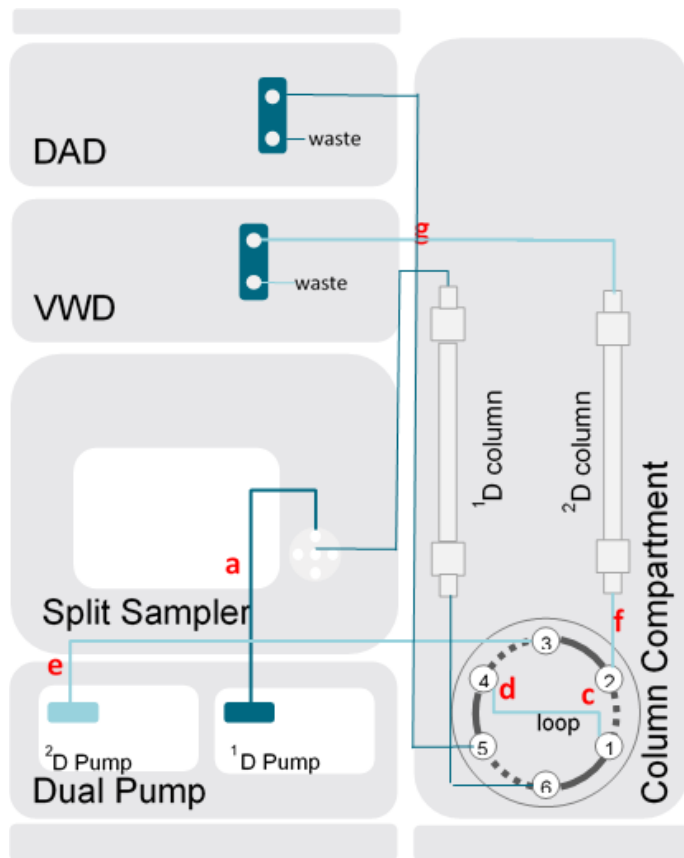


图1 仪器连接图 (两个检测器一个六通阀)

本方法使用了两个检测器, 也可以使用一个检测器两个六通阀来实现。如下图:

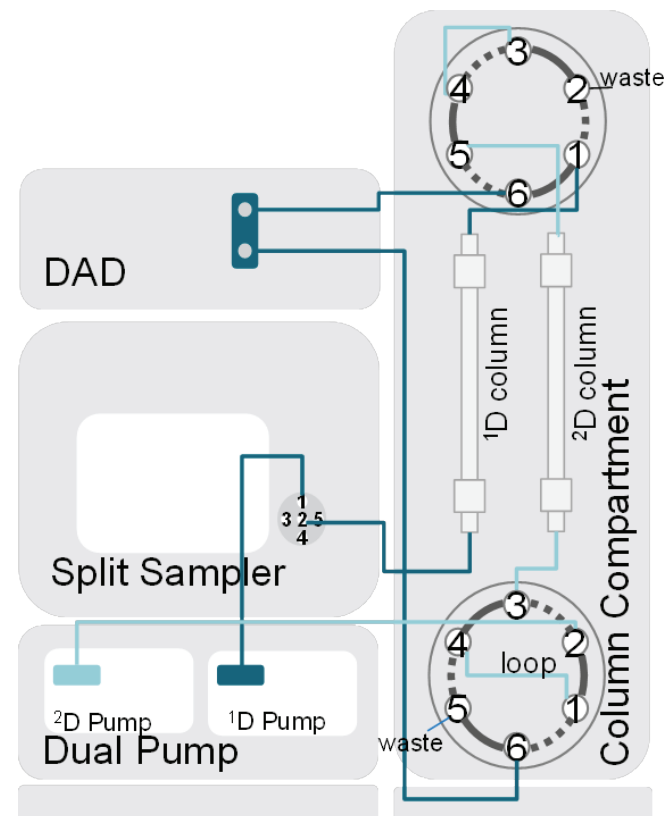


图2 仪器连接图 (一个检测器两个六通阀)

3. 实验结果与讨论

3.1 二维色谱条件的优化

本方法在之前方法的基础上将一维和二维色谱柱改为2.1mm细内径150mm长的色谱柱,可以在保证分离的前提下提升分析效率。对二维色谱柱进行考察时,对比了Accucore Polar Premium(50mm×2.1mm, 2.6 μ m)、FOODKIT1&2ADE(100mm×4.6mm, 2.6 μ m)和Accucore aQ (150mm×2.1mm, 2.6 μ m)三根色谱柱的分离效果与分析时间,其中Accucore Polar Premium(50mm×2.1mm, 2.6 μ m)色谱柱分析时间短但维生素D₂和D₃的分离度小于1.5, FOODKIT1&2ADE(100mm×4.6mm, 2.6 μ m)这根色谱柱分析时间较长, Accucore aQ 色谱柱较好地达到了缩短分析时间提高分离度的效果,所以最终二维色谱柱采用了这根色谱柱。

3.2 对照品溶液测定谱图

对照品溶液分析谱图见图3。

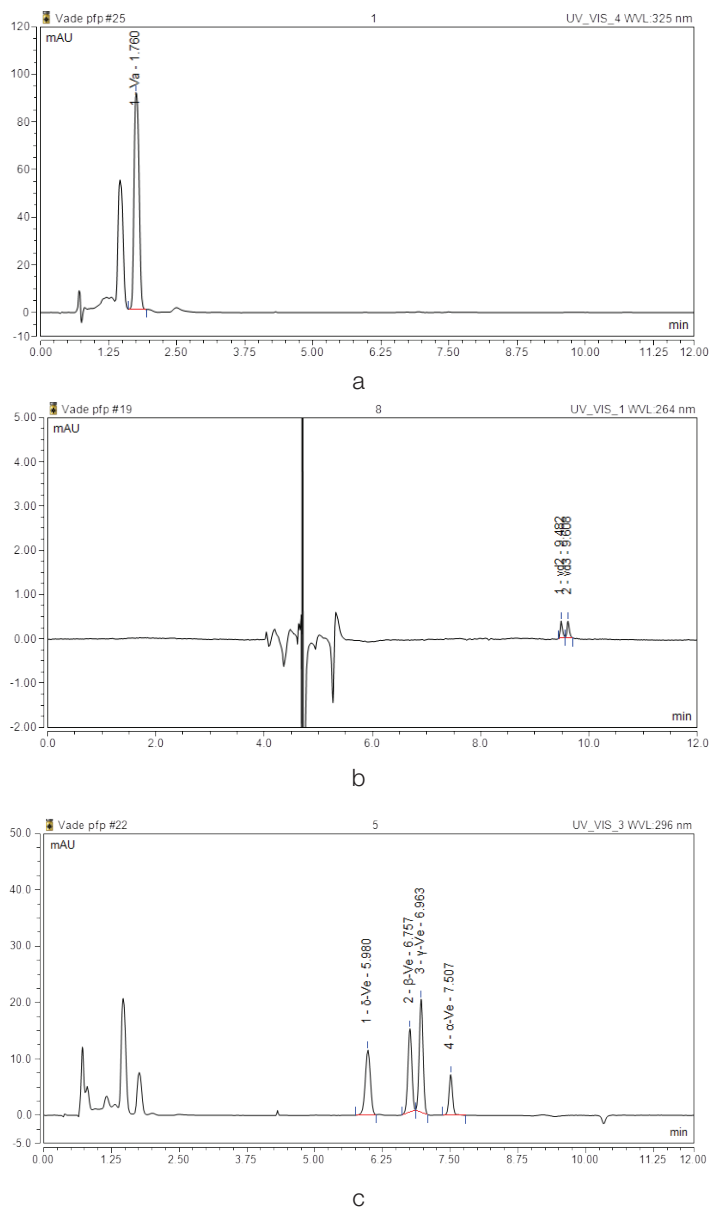


图3. 维生素A、D和E混合标准溶液分析谱图 (a: 维生素A; b: 维生素D₂和D₃; c: 维生素E四个异构体)

3.3 供试品溶液测定谱图

供试品溶液分析谱图见图4。

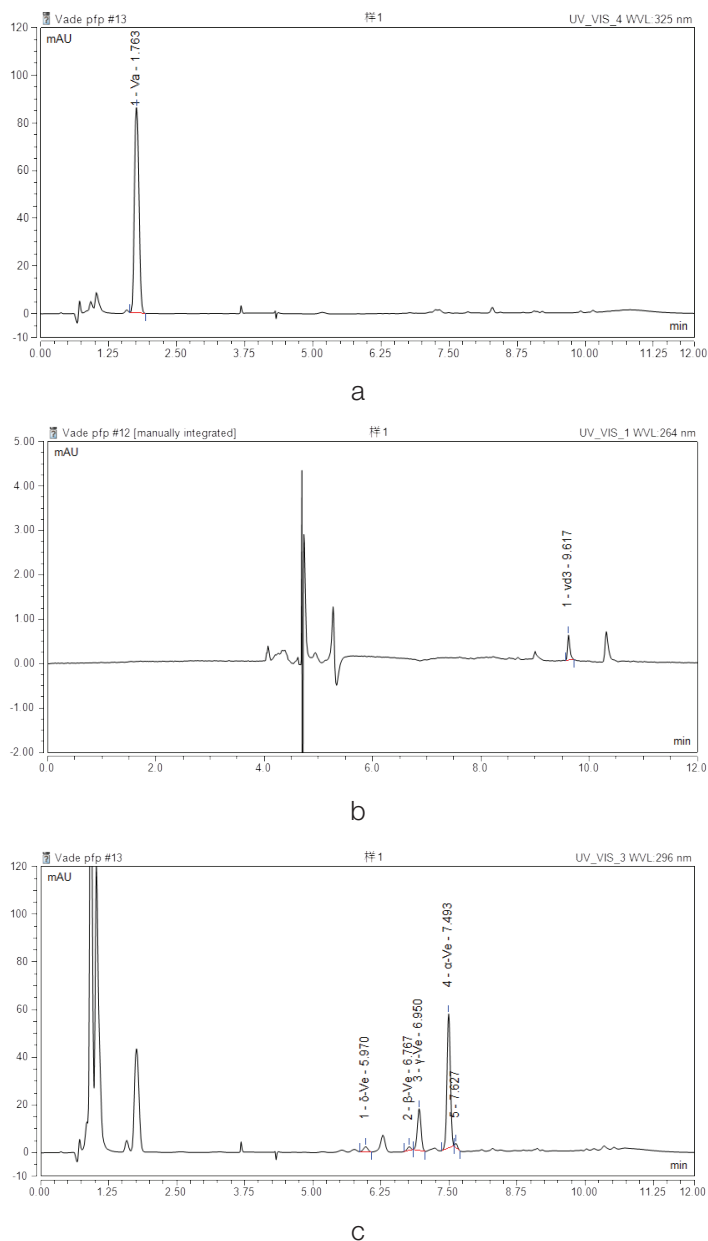


图4. 配方奶粉样品分析谱图 (a: 维生素A; b: 维生素D₂和D₃; c: 维生素E四个异构体)

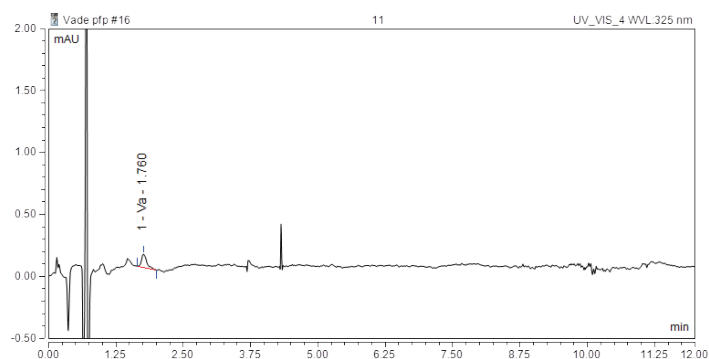
3.4 方法线性及定量限

分别精密量取维生素A、D₂、D₃, α 、 β 、 γ 、 δ -生育酚对照品溶液适量,至10mL棕色容量瓶中,用甲醇稀释成系列标准混合溶液,进样5 μ L,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,考察方法的线性范围及定量限。结果显示,各化合物在其浓度范围内线性良好,相关系数均>0.9990。方法灵敏度较高,维生素D₃定量限满足要求,各化合物定量限测定谱图见图5。方法线性及定量限(S/N \geq 10)结果见表2。

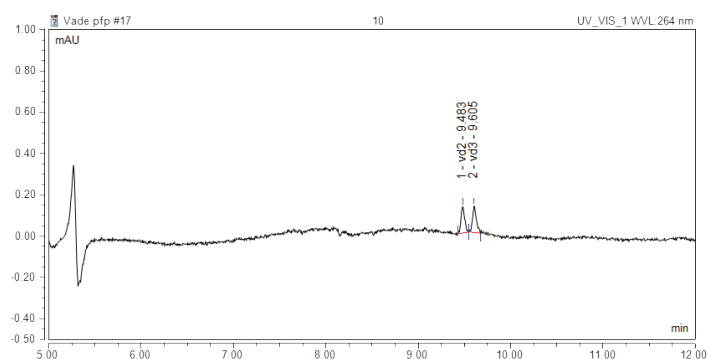
表2. 方法线性及定量限结果

Vitamins	Detection wavelength, nm	Range, $\mu\text{g/mL}$	Linearity equation	R^2	LOQ, ng/mL
VA	DAD, 325	2.285-22.848	$Y=0.6841x+0.3880$	0.9998	18.01
α -VE	DAD,296	4.576-45.760	$Y=0.1243x+0.1076$	0.9991	11.44
β -VE		1.141-22.826	$Y=0.1648x-0.0662$	0.9994	11.41
γ -Ve		2.651-53.028	$Y=0.0769-0.0051$	0.9998	9.46
δ -VE		1.030-16.490	$Y=0.0618x-0.0523$	0.9990	10.30
VD ₂	WVD, 264	0.049-0.973	$Y=0.3706 x-0.006$	0.9990	16.2
VD ₃	WVD, 264	0.049-0.971	$Y=0.3621x-0.0055$	0.9991	17.3

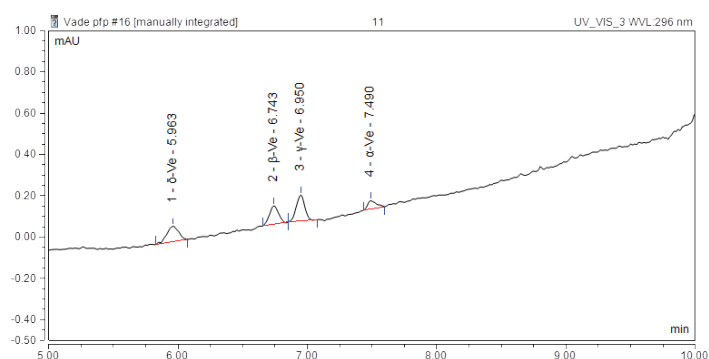
定量限测定谱图



a



b



c

图5. 定量限测定谱图 (a: 维生素A; b: 维生素D2和D3; c: 维生素E四个异构体)

3.5 样品测定结果

取市售同一品牌两种不同的配方奶粉样品, 按供试品制备方法制备样品, 进液相色谱仪测定各维生素含量, 结果见表3。

表3. 样品测定结果

Sample	Content ($\mu\text{g}/100\text{ g}$ for VD; $\text{mg}/100\text{ g}$ for VA,VE)					
	VA	VD ₃	α -VE	β -VE	γ -VE	δ -VE
样1	2.226	12.369	7.616	0.327	1.829	0.311
样2	2.284	11.779	7.756	0.239	1.563	0.241

结论

本方法基于赛默飞Vanquish Flex液相色谱平台搭建二维液相色谱方法, 12min内快速地实现了包含维生素A、D、E异构体的共7个化合物的测定, 提高了奶粉样品中脂溶性维生素的分析效率, 对日常奶粉检测与评价具有重要意义。

参考文献

- [1] 孙长颢, 孙秀发, 凌文华, 等. 营养与食品卫生学 [M]. 6版.北京: 人民卫生出版社, 2007:76-77.
- [2] GB 5009.82-2016, Determination of vitamins A, D, E in foods. National food safety standard.
- [3] BS EN 12821:2009, Foodstuffs -Determination of vitamin D by high performance liquid Chromatography — Measurement of cholecalciferol (D₃) or ergocalciferol (D₂).
- [4] 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.
- [5] AN_19048_HPLC_食品_固相萃取-在线二维液相色谱同时测定婴幼儿配方奶粉中维生素A、D和四种维生素E生育酚异构体含量.

附录

本方法如果在620bar U3000或700bar VC上使用的话，二维柱可以用FOODKIT1&2 ADE(100 mm×4.6mm, 2.6µm)这根色谱柱，一维柱用2.1内径的PPF，这样620bar可以耐受。

条件如下（使用一个检测器两个阀，仪器连接图见正文图2）：

一维色谱柱：Accucore PFP (150 mm×2.1 mm, 2.6 µm)
(PN17426-152130)

二维色谱柱：FOODKIT1&2 ADE(100 mm×4.6mm, 2.6 µm)

流动相：A：乙腈；B：甲醇；C：水；

流速：一维泵0.5 mL/min，二维泵1.3 mL/min。

流动相条件及阀切换程序见表4。

进样体积：5µL

柱温：25 °C

检测器条件：DAD 264nm, 296nm, 325nm；UV264nm。

表4. 梯度洗脱条件及阀切换时间

一维分析泵 (VA, VE)				二维分析泵 (VD)				阀切换		
Time, min	A%	B%	C%	Time, min	A%	B%	C%	Time, min	LowerValve	upperValve
0.0	0	84	16	0.0	60	40	0	0	1_2	6_1
2.0	0	84	16	1.0	60	40	0	3.65	6_1	6_1
7.0	0	97	3	1.1	40	0	60	4.25	1_2	6_1
7.5	0	100	0	5.0	40	0	60	8.50		1_2
8.0	0	100	0	6.0	100	0	0			
8.1	0	84	16	10.5	60	40	0			
15.0	0	84	16	15.0	60	40	0			



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com