

高效液相色谱法测定强化奶及食品中维生素 D 含量*

吴怀春 程 华 田嘉荣 王喜生

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所 天津 300050)

提 要 介绍用反相高效液相色谱法(HPLC)测定食品中 VD 含量,样品经皂化、正己烷提取、正相 HPLC 净化,用反相 HPLC 定量分析。回收率为 94.88%~99.70%,批内和批间 CV 分别为 1.62% 和 2.12%。分析了奶粉、要素膳、肉松、儿保饮料等 8 种食品中 VD 含量,亦可用于各种食品中 VD 分析。

关键词 高效液相色谱法,维生素 D,强化奶,食品

分类号 O658/TS2

1 前言

维生素 D(VD)常被用于强化食品,以防治婴儿佝偻病和成人骨质疏松症。国外从 70 年代起开始研究用高效液相色谱法(HPLC)分析食品中 VD^[1],方法日趋成熟,但仍有改进的报道^[2]。国内亦有报道^[3,4],但样品处理较复杂,操作困难,提取溶剂毒性大。我们建立了牛奶和其它食品中 VD 的反相 HPLC 分析法,操作简单、回收率高。

2 材料与方 法

2.1 仪器和试剂

高效液相色谱仪(Waters 公司),液体混合器,电热恒温水浴锅。

甲醇、无水乙醇、正己烷、环己烷、异丙醇、KOH 和 VC 均为 AR 级。维生素 D₂,精确称取 10mg,甲醇定容 100mL, - 21℃ 冰箱储存。

2.2 样品处理

取牛奶 15mL(或干食品 5g)置于烧瓶中,加水 15mL、无水乙醇 15mL、VC 0.4g、KOH 7.5g,混匀,75℃ 水浴皂化 30min。冷却至室温,倾入分液漏斗中,依次用水 15mL、无水乙醇 5mL 和正己烷 45mL 洗涤皂化瓶,倒入分液漏斗中。振荡 10min,静止分层。两液界面若有乳化层,可加几滴无水乙醇轻轻摇动即可消除。下层皂化液放入另一分液漏斗中再用 45mL 正己烷提取,共萃取 3 次。抽提液依次用 5% KOH 50mL、蒸馏水 75mL、55% 乙醇 75mL 振荡洗涤,移入三角烧瓶,50℃ 水浴减压蒸干。残渣用正己烷溶解移入试管,氮气吹干,加入正相色谱流动相 200 μ L 溶解备用。

2.3 样品净化色谱条件

色谱柱:硅胶柱(10 μ m, 30cm \times 4mm),检测器 UV254nm,灵敏度 0.05Aufs,流动相为正己烷:环己烷(1:1),含异丙醇 0.8%,流速 1.5mL/min。

2.4 样品定量分析色谱条件

色谱柱: C₁₈柱(10 μ m, 30cm \times 4mm),检测器 UV254nm,灵敏度 0.01Aufs,流动相为甲醇:水(98:2, V/V),用前脱气,流速 0.7mL/min。

2.5 样品 VD 含量计算

在分析样品过程中,按不同时间将 VD₂ 标液进样 3 次,取其平均峰高(或峰面积)计算样品中 VD 含量。

3 结果与讨论

3.1 样品净化

食品中 VD 含量远低于干扰物,定量前需净化富集。本法用正相 HPLC 净化样品,以方法中简述的色谱条件将 VD₂ 标液进样,测得的保留时间为 13.20min。注入试样 60 μ L,收集保留时间为 12.50~14.50min 的洗脱液于试管中(图 1-a)。氮气吹干,残留物溶于 100 μ L 甲醇,用于反相 HPLC 定量分析。我们探讨了样品净化中流动相对 VD 保留时间的影响。正己烷与环己烷比例不变时,异丙醇加入量增多,则 VD 的保留时间缩短,反之延长。加入 0.8% 异丙醇可以调节 VD 的保留时间,使之与干扰物分离。

3.2 VD 的分离与定性

在上述反相 HPLC 条件下,VD₂ 和 VD₃ 的保留时间均为 9.05min(图 1-b),谱峰重叠。本法是以 VD₂ 作为标准定量分析样品中的 VD 的。测得值可能是单一的 VD₂ 或 VD₃,也可能是两者混合物。样品分离图谱中保留时间为 9.03min 的峰与标准品 VD₂ 的保留时间一致(图 1-c)。样品加标进样,

* 本文收稿日期:1995-10-17,修回日期:1996-01-27

9.03m in 峰值升高, 未见新峰出现, 由此确认 9.03m in 峰为 VD。另外还分析了未强化 VD₂ 的鲜牛奶, VD 峰消失, 进一步证实 9.03m in 峰是 VD。

3.3 VD 定量分析

标准曲线: 从 VD₂ 储备液中分别取 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 和 0.5mL 用甲醇定容至 10mL, 依次进样 10, 20, 30, 40 和 50ng, 以进样量与相应的峰高作图, 两者呈过原点的直线关系 ($r = 0.9999$)。

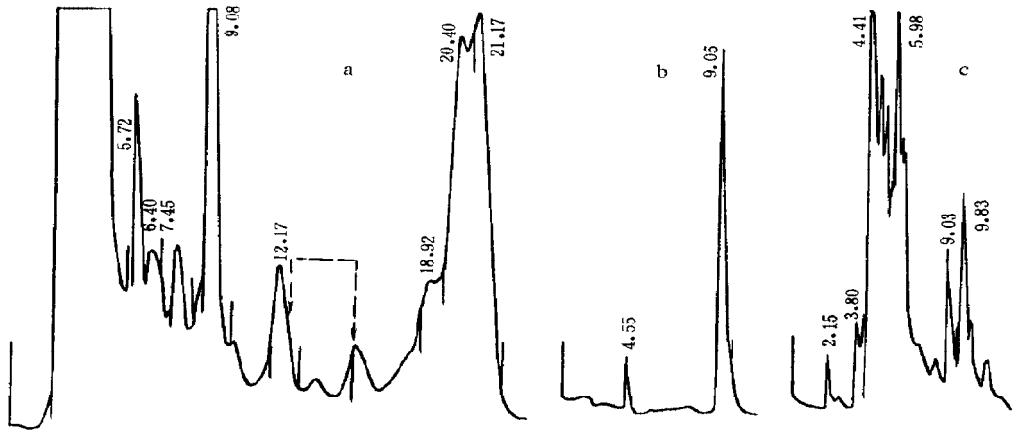


图 1 硅胶柱上牛奶提取物(箭头指处为收集 VD 洗脱液的起止时间)(a)、C₁₈柱上 VD₂ 标准品(b)和强化牛奶提取净化物(c)的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of milk extracts on silica (eluate collected containing vitamin D is indicated by arrows) (a), standard of vitamin D₂ on reversed-phase column (b) and fortified milk (collected as in b, on reversed-phase column) (c).

回收率: 在已知 VD 含量牛奶中加入 VD₂ 400 和 800IU, 经与样品相同处理步骤操作, 计算回收率, 5 次回收率平均为 96.52%, CV 是 1.79%, 表明本法样品处理和净化过程中 VD 损失少。

3.4 定量分析精密度

一份已制备的样品液日内 5 次分析平均值为 788IU/L, CV 是 1.62%。52 天内不同日期重复测定 5 次的精密度是 3.19%。这表明已净化的样品液储存于低温冰箱(-21℃)中短期内不分析, VD 的含量无明显损失。在本实验中我们还把一批牛奶连续分析 6 次, 每升强化量 400IU, 测得值为 415IU ± 8IU, CV 为 2.12%。此外本法连续分析了 9 批工厂生产的强化奶, 5 批强化量 400IU, 4 批为 800IU, 前者测得值为 403IU ± 18IU, 后者为 826IU ± 93IU, 表明本法准确性较好。

3.5 几种食品中 VD 含量分析

用本法分析了要素膳、奶粉等 8 种食品中 VD 含量(表 1)。由于各食品成分不同, 干扰物种类数量各异, VD 含量亦相差大, 分析时应考虑取样量和前处理程序。如肉松的脂类含量多, 用牛奶样品皂化条件不能将脂类完全皂化, 但温度升至 95℃, 并延长皂化时间, 可取得较好的分析结果。

表 1 几种食品中维生素 D 的测定结果

Table 1 Content of vitamin D in several foods		含量
样品名称		Content
Samples		(10 ⁻³ IU/g)
要素膳	Pulvis elementi compound	1430
奶粉	Milk powder	1850
肉松	Dried meat floss	6200
母乳奶粉	Humanized milk powder	1450
儿童保健饮料	Children health drink	1620
奶麦粉	Milk wheat powder	1920
混合蛋白质	Mixed proteins	7090
强化奶	Fortified milk	788

本方法与国内同类方法比较减少了脂抽提、硅藻土柱分析、皂土柱分析等 5 个步骤^[3], 操作简便、快速、费用低、稳定性好, 可用于各种食品中 VD 含量分析。

参 考 文 献

- Sertl D C, Molitor B. J Assoc Off Anal Chem, 1985; 68: 177
- Sliva M G et al. J Assoc Off Anal Chem, 1992; 75: 566
- 李效宁等. 营养学报, 1983; 5: 103
- 杨素芳等. 营养学报, 1988; 2: 173

The Determination of Vitamin D in Fortified Milk and Other Foods by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Wu Huaichun, Cheng Hua, Tian Jiarong and Wang Xisheng

(Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin, 300050)

Abstract An HPLC procedure for determination of vitamin D (VD) in fortified milk and food has been developed. The samples were saponified by adding KOH, ethanol and vitamin C at 75°C for 30 min. The digest was extracted with hexane in multistep manner. The extract was washed with 5% KOH, distilled water and 55% ethanol, and evaporated under reduced pressure at 50°C. The residue was dissolved in hexane, transferred to a coentrifuge tube, evaporated under N₂ and then dissolved in 200 μL mobile phase. The latter was injected into a silica column (10 μm, 30 cm × 4 mm) for cleanup, eluted with mixture of cyclohexane-hexane containing 0.8% isopropanol and detected at UV 254 nm. VD fraction was collected according to the retention time of standard, evaporized under N₂, redissolved in 100 μL MeOH, and separated on a C₁₈ column (10 μm, 30 cm × 4 mm) with MeOH/H₂O (98: 2) as eluent. VD₂ and VD₃ were eluted as a mixture under the conditions. Recoveries of the method were 94.8% to 99.7%. The average CV (n = 5) for within and between day measurements were 1.6% and 2.1% respectively. This method was already used to determine the content of vitamin D in milk powder, pulvis elementi compound, mixed proteins, dried meat floss, humanized milk powder, children health drink, milk wheat powder and fortified milk. The method is simple, rapid and accurate.

Key words high performance liquid chromatography, vitamin D, fortified milk, food

山东省理化分析测试协会色谱专业委员会成立大会 暨山东省第五届色谱学术报告会在济南召开

为了推动色谱分析技术的普及和提高,开展学术交流,对科研、开发和生产部门提供咨询和建议,协助省科委在仪器配置和管理方面做些工作,山东省理化分析测试协会色谱专业委员会于1996年10月17日在济南召开了成立大会,并和山东省化学化工学会于10月17~18日在济南市共同举办了“山东省第五届色谱学术报告会”。

60多名学术会议代表来自全省科研院所、高等院校和厂矿企业,省内色谱界知名专家、学者被邀请出席了会议。会上,国内外有关色谱仪器的生产厂家进行了产品介绍和仪器展示。

学术报告会共收到气相色谱、液相色谱、色谱/质谱、薄层扫描和毛细管电泳等方面的论文64篇。不少论文具有较高的学术水平和较高的使用价值。经代表充分酝酿推荐,色谱专业委员会审核评定,大会选出26篇优秀论文。

代表们普遍认为这次报告会学术气氛浓厚,文集编辑印刷质量高,会议组织筹备周密,整体学术水平高于往届,是一次成功的学术会议,它将进一步促进山东省色谱技术的普及和提高。

(山东省理化分析测试协会办公室)