

HPLC 法测定特殊医学用途婴配食品中视黄醇 棕榈酸酯和视黄醇醋酸酯

Determination of retinol palmitate and retinol acetate in formulas for special medical purposes intended for infants by HPLC

李涛¹ 周艳华² 孙桂芳¹ 杨滔¹ 尹伟成¹ 杨庆懿¹

LI Tao¹ ZHOU Yan-hua² SUN Gui-fang¹ YANG Tao¹ YIN Wei-cheng¹ YANG Qing-yi¹

(1. 湖南省食品质量监督检验研究院, 湖南 长沙 410111; 2. 长沙环境保护职业技术学院, 湖南 长沙 410004)

(1. Hunan Provincial Food Quality Supervision and Inspection Institute, Changsha, Hunan 410011, China;

2. Changsha Environmental Protection Vocational College, Changsha, Hunan 410004, China)

摘要:采用正相高效液相色谱法测定特殊医学用途婴配食品中视黄醇棕榈酸酯和视黄醇醋酸酯的含量。采用氨基柱(150 mm×4.6 mm, 5.0 μm)为色谱柱,流动相:正己烷-25%叔丁基甲醚正己烷(体积比 95:5),等梯度洗脱;流速:1.0 mL/min,柱温:30℃;进样量:50 μL;紫外检测器波长:325 nm。结果表明:视黄醇棕榈酸酯保留时间为3.5 min,视黄醇醋酸酯保留时间为6.0 min,在0.05~10.0 μg/mL呈线性相关($R^2=0.999\ 9$),检出限分别为2.0、2.5 μg/100 g。特殊医学用途婴儿配方食品中视黄醇棕榈酸酯含量为0.0~817.0 μg/100 g,精密密度为0.9%~9.4%,视黄醇醋酸酯含量为0.0~8 683.0 μg/100 g,精密密度为3.3%~6.3%,不同添加浓度回收率为81.0%~90.0%。该方法简单、快速、准确、精密度高,分离度好。

关键词:特殊医学用途婴配食品;视黄醇棕榈酸酯;视黄醇醋酸酯;检测;正相高效液相色谱法

Abstract: Retinol palmitate and retinol acetate in formulas for special medical purposes intended for infants was determined using NP-HPLC. The HPLC system consisted of NH₂ column (150 mm×4.6 mm, 5.0 μm), mobile phase of n-hexane-25.0% tert-butyl methyl ether n-hexane solution (95:5), flow rate of 1.0 mL/min, injection volume of 50 μL, column temperature of 30℃, UV detector detection wavelength of 325 nm. Results showed that retention time of retinol palmitate and retinol acetate were 3.5 min and 6.0 min, respectively the linearity was good in the range of 0.05~

10.0 μg/mL with a correlation coefficient of 0.999 9, the detection limits were 2.0 and 2.5 μg/100 g respectively. The content of retinol palmitate and retinol acetate in formulas for special medical purposes intended for infants were 0~817.0 and 0~8 683.0 μg/100 g, the precision were 0.9%~9.4% and 3.3%~6.3% respectively. The recoveries of spiked samples at three levels were 81.0%~90.0%. The developed method presented the benefits of simplicity, rapidity, good separation, high accuracy, high precision.

Keywords: formulas for special medical purposes intended for infants; retinol palmitate; retinol acetate; determination; NP-HPLC

特殊医学用途婴儿配方食品(以下简称特医婴配食品)是指针对患有特殊紊乱、疾病或医疗状况等特殊医学状况的营养需求而设计的粉状或液态配方食品。针对不同的婴儿患病类型分为6种配方,包括无乳糖或低乳糖配方、乳蛋白部分水解配方、乳蛋白深度水解或氨基酸配方、早产/低出生体重婴儿配方、母乳营养补充剂配方、氨基酸代谢障碍配方^[1]。维生素A是一类脂溶性维生素,又称视黄醇,其主要生理功能是维持正常视觉、增强机体抗感染力及维持骨骼健康^[2]。维生素A在特医婴配食品中为必须营养强化成分,通过添加视黄醇棕榈酸酯和视黄醇醋酸酯进行营养强化^[3-4]。

目前,维生素A测定主要有液相法和液相色谱串联质谱法^[5-6]。现有食品安全国家标准中维生素A测定是将视黄醇酯类皂化为醇类进行分析,一般需对样品进行酶解、皂化、提取、分离、浓缩等步骤,操作极其繁琐耗时^[7-8]。特医婴配食品有6种配方,经研究发现按照现有标准中皂化条件进行皂化,会出现皂化不完全、严重乳化、维生素A不能完全游离等现象,且脂溶性维生素不稳定,在此分析过程中易损耗,回收率不高,不能进行批量操作。本试验拟采用正相高效液相色谱法直接测定特殊医学用途配方食品中的视黄醇棕榈酸

基金项目:2017年度湖南省自然科学基金项目(编号:2017JJ5062)

作者简介:李涛,男,湖南省食品质量监督检验研究院助理研究员,硕士。

通信作者:周艳华(1982—),女,长沙环境保护职业技术学院工程师,硕士。E-mail: boylitao@163.com

收稿日期:2017-12-18

酯和视黄醇醋酸酯^[9],以期能准确测定产品中营养强化视黄醇的类别及含量,为检测特医婴配食品中维生素 A 提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

特医无乳糖配方奶粉(A)、特医乳蛋白部分水解配方奶粉(B)、特医乳蛋白深度水解配方奶粉(C1)/氨基酸配方奶粉(C2)、特医早产/低出生体重婴儿配方乳(D)、特医母乳营养补充剂(E)、特医氨基酸代谢障碍配方乳(F):市售;

视黄醇棕榈酸酯标准品:纯度 98.1%,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;

视黄醇醋酸酯标准品:纯度 98.5%,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;

叔丁基甲醚、正己烷、异辛烷:色谱纯,上海安谱实验科技有限公司;

氢醌、无水乙酸钠:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

木瓜蛋白酶:酶活> 400 U/mg,合肥博美生物科技有限责任公司。

1.1.2 主要仪器设备

高效液相色谱仪:LC-20A 型,带 DAD 检测器,日本岛津公司;

漩涡振荡器:HMS-350 型,上海珂淮仪器有限公司;

电子分析天平:BS224S 型,德国赛多利斯公司;

台式冷冻离心机:X1R 型,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;

pH 酸度计:PB-10 型,德国赛多利斯公司;

电热恒温水浴锅:HWS-28 型,上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的制备 称取视黄醇棕榈酸酯约 25 mg(精确至 0.1 mg)至 25 mL 容量瓶中,异辛烷溶解并定容至刻度;称取视黄醇醋酸酯约 25 mg(精确至 0.1 mg)至 25 mL 容量瓶中,无水乙醇溶解并定容至刻度。分别精取 0.50 mL 标准溶液至 50 mL 容量瓶中,异辛烷稀释至刻度,得 10.0 μg/mL 混标储备液,分别精取 0.050,0.10,0.20,0.50,1.0,2.0,5.0 mL 混标储备液至 10 mL 容量瓶中,异辛烷稀释至刻度,得浓度为 0.05~10.0 μg/mL 的标准使用液。

1.2.2 供试品溶液的制备

(1) 样品称量:固体样品精确称重 25 g 至 250 mL 碘量瓶中,加入 200 mL 纯水(约 40~45 ℃),溶解并冷却,称重。转移 5.0 g 溶解后的新样品至 50 mL 离心管,计算样品质量(粉末当量);液态样品精确称取 5.0 g 至 50 mL 离心管中。

(2) 酶解:800 U/mL 木瓜蛋白酶溶液:称取 100 mg 氢醌和 4.0 g 无水乙酸钠于 100 mL 容量瓶中,加纯水 80 mL 溶解,用盐酸溶液调节 pH 至 5.0,加入 0.2 g 木瓜蛋白酶超声 5 min,冷却后定容至刻度。向样品溶液中加入 5.0 mL 木瓜蛋白酶溶液,混匀后置于(37±2) ℃水浴 30 min 后冷却。

(3) 提取:向酶解液中加入 20.0 mL 2%醋酸甲醇,振荡 15 min,加入 10.0 mL 异辛烷振荡提取 15 min,5 000 r/min 离心 10 min,取异辛烷层用于高效液相色谱分析。

1.2.3 色谱条件 色谱柱:Agilent Zorbax NH₂ (4.6 mm×150 mm,5 μm);流动相:正己烷-25%叔丁基甲醚正己烷(体积比 95:5),等梯度洗脱;柱温:30 ℃;流速:1.0 mL/min;进样量:50 μL;紫外检测器波长:325 nm。

2 结果与分析

2.1 线性关系考察

取标准使用液注入液相色谱仪测定,以峰面积(Y)为纵坐标,进样浓度(X)为横坐标,绘制标准曲线。视黄醇棕榈酸酯线性方程为:Y=286 042X-662.074 5(R²=0.999 9),视黄醇醋酸酯线性方程为 Y=309 862.3X-4 460.171(R²=0.999 9),标准工作液浓度为 0.05~10.00 μg/mL,校准曲线线性良好,线性低点是 GB 5009.82—2016 中低点的 1/4 倍,测定范围更广。

2.2 检出限和定量限

取空白响应值的 2~3 倍对应浓度的混合标准溶液 0.05 μg/mL,平行测定 11 次,根据检出限的计算方法 LOD=3sd/b 和 LOQ=10sd/b(sd 为标准偏差,b 为工作曲线斜率),当取样量为 0.5 g,异辛烷体积为 10.0 mL 时,方法检出限和定量限见表 1。此方法的检出限与定量限是 GB 5009.82—2016 的 1/3,说明此检验方法具有更高的灵敏度。

2.3 样品含量测定和精密度试验

特医婴配食品 A~F 分别平行取样 6 组,按供试品溶液制备方法制备供试品溶液,进液相色谱测定,特医婴配食品 A~F 号中视黄醇棕榈酸酯和视黄醇醋酸酯含量及精密度结果见表 2、3。结果显示特医婴配食品中通常添加一种视黄醇酯类作为维生素 A 来源,且添加量依据适用对象的差异而不

表 1 检出限和定量限

Table 1 Detection limit and limit of quantification

化合物		仪器响应值/mAU						标准偏差 sd	方法检出限/ (10 ⁻² μg·g ⁻¹)	方法定量限 / (10 ⁻² μg·g ⁻¹)
视黄醇棕 榈酸酯	14 550	14 794	14 845	14 529	14 823	14 782	119.4	103.5	2.5	8.4
视黄醇醋 酸酯	14 725	14 677	14 755	14 513	14 704	/			2.0	6.7

表 2 特医婴配食品中视黄醇棕榈酸酯含量及精密度

Table 2 Content and precision of retinol palmitate in formulas for special medical purposes intended for infants

样品 配方	测定值/(10 ⁻² μg · g ⁻¹)						平均值/ (10 ⁻² μg · g ⁻¹)	RSD/%
	1	2	3	4	5	6		
A	658.7	636.8	629.0	632.9	625.1	648.3	638.5	2.0
B	811.6	811.0	818.4	827.0	810.3	823.7	817.0	0.9
C1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	/
C2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	/
D	23.0	19.2	19.4	19.5	22.9	23.0	21.2	9.4
E	22.5	23.8	25.3	25.4	25.6	26.3	24.8	5.6
F	397.1	425.1	430.6	401.2	423.5	435.4	418.8	3.8

表 3 特医婴配食品中视黄醇醋酸酯含量及精密度

Table 3 Content and precision of retinol acetate in formulas for special medical purposes intended for infants

样品 配方	测定值/(10 ⁻² μg · g ⁻¹)						平均值/ (10 ⁻² μg · g ⁻¹)	RSD/%
	1	2	3	4	5	6		
A	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	/
B	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	/
C1	903.3	991.2	978.2	990.9	947.6	984.6	966.0	3.6
C2	988.4	909.2	933.5	933.5	938.7	920.3	938.9	3.3
D	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	/
E	8 099.4	7 884.4	9 147.6	8 842.8	9 052.4	9 071.4	8 683.0	6.3
F	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	/

同,各配方中视黄醇棕榈酸酯含量为 0.0~817.0 μg/100 g,精密度为 0.9%~9.4%;视黄醇醋酸酯含量为 0.0~8 683.0 μg/100 g,视黄醇醋酸酯精密密度为 3.3%~6.3%,精密密度均满足测定要求。

2.4 加标回收率试验

选取深度水解配方奶粉(C1)为代表进行特医婴配食品回收率试验,共 9 份,每个浓度 3 份,分别添加约 0.5,1.0,2.0 倍样品检测浓度的混合标准溶液,低中高 3 个加标浓度添加量分别为 3.0,6.0,10.0 μg。按供试品溶液制备方法制备供试品溶液,进液相色谱仪测定。视黄醇棕榈酸酯和视黄醇醋酸酯加标回收率见表 4。由表 4 可知,视黄醇棕榈酸酯的不同添加浓度下回收率为 82.6%~90.0%,RSD 值为 1.8%~2.5%,视黄醇醋酸酯不同添加浓度下回收率为 81.0%~88.6%,RSD 值为 2.2%~4.5%,深度水解配方奶粉为特医婴配奶粉中最复杂基质之一,说明该方法对特医婴配食品中不

同浓度视黄醇棕榈酸酯和视黄醇醋酸酯的测定具有较高的准确度。

2.5 检验方法的选择性

视黄醇棕榈酸酯和视黄醇醋酸酯的标准溶液图谱见图 1,7 种特医婴配食品中视黄醇酯图谱见图 2,检验方法系统性评价参数结果见表 5。由图 1 可知,视黄醇棕榈酸酯保留时间为 3.5 min,视黄醇醋酸酯保留时间为 6.0 min,样品测定过程中 2 种视黄醇酯均未发生明显漂移,该检验方法能准确定性。由表 5 可知,混合标准溶液及样品中 2 种视黄醇酯的分离度均>1.8,高于 R≥1.5 的一般要求,理论塔板数均

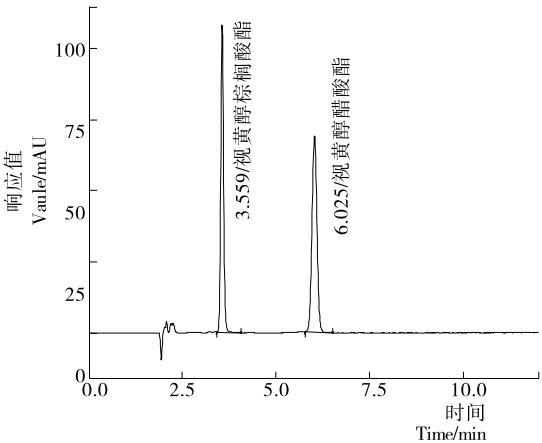


图 1 标准溶液中视黄醇棕榈酸酯和视黄醇醋酸酯
Figure 1 Chromatogram of retinol palmitate and retinol acetate in standard solution

表 4 样品加标回收率

Table 4 Results of recovery for spiked samples

名称	添加量/μg	回收率/%			RSD/%
视黄醇棕 榈酸酯	3	86.4	82.6	85.6	2.4
	6	88.4	86.9	85.2	1.8
	10	85.6	87.3	90.0	2.5
视黄醇醋 酸酯	3	81.2	85.3	83.1	2.5
	6	88.6	84.0	81.0	4.5
	10	80.9	82.7	84.6	2.2

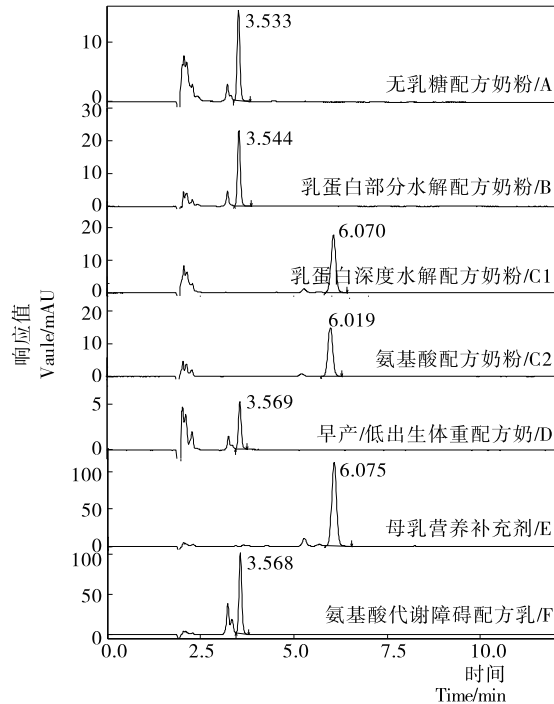


图2 特医婴配食品中视黄醇棕榈酸酯和视黄醇醋酸酯
Figure 2 Chromatogram of retinol palmitate and retinol acetate in formulas for special medical purposes intended for infants

表5 检验方法系统性评价参数结果

Table 5 Results of method systematic evaluation parameter

参数	R		t	
	视黄醇棕榈酸酯	视黄醇醋酸酯	视黄醇棕榈酸酯	视黄醇醋酸酯
标准溶液	2.3	1.8	8 158	9 530
A	2.0	/	8 475	/
B	2.2	/	8 425	/
C1	/	1.9	/	9 882
C2	/	1.8	/	9 888
D	2.2	/	8 259	/
E	/	1.8	/	9 641
F	2.1	/	8 136	/

大于8 000,高于 $t \geq 3\,000$ 的一般要求,表明该检验方法将待测成分与其它杂质进行了基线分离,分离效能良好,说明该检验方法具有良好的系统适用性。特医婴配食品成分极其复杂,但样品基质不会干扰视黄醇酯分离,表明该检验方法对特殊医学用途婴幼儿食品中2种视黄醇酯具有良好选择性,分离度高。

3 结论

本试验建立了正相高效液相色谱测定特殊医学用途婴儿配方食品中视黄醇棕榈酸酯和视黄醇醋酸酯的方法。采用木瓜蛋白酶酶解拥有脂肪胶束涂层的亲水性蛋白,释放视黄醇棕榈酸酯和视黄醇醋酸酯,酸化甲醇沉淀蛋白质,异辛

烷提取,氨基柱正相分离,紫外检测2种视黄醇酯。在0.05~10.0 $\mu\text{g/mL}$ 时呈线性相关($R^2 = 0.999\,9$),视黄醇棕榈酸酯和视黄醇醋酸酯检出限分别为2.0,2.5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$,不同添加浓度回收率为81.0%~90.0%,也可通过公式(维生素A=视黄醇棕榈酸酯 $\times 0.55$ +视黄醇醋酸酯 $\times 0.87$)换算得到特医婴配食品中维生素A含量,此试验的线性范围和检出限均优于现有食品安全国家标准GB 5009.82—2016。

前期试验研究表明现有国标测定特医婴配食品中视黄醇时,多种配方产品皂化时会出现乳化现象严重、皂化不完全和精密差等问题。本试验方法无需将视黄醇酯皂化为视黄醇,采用直接测定样品中视黄醇棕榈酸酯和视黄醇醋酸酯,避开操作繁杂的皂化过程,流程简单,精密度和准确度高,可实现批量检测。此试验建立的检测方法简单、快速、准确,针对特医婴配产品中的视黄醇棕榈酸酯和视黄醇醋酸酯检测重复性好。此试验前处理酶解液还可用于测定 α 生育酚醋酸酯和 α 生育酚,后续将对此进一步研究。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. GB 25596—2010 食品安全国家标准 特殊医学用途婴儿配方食品通则[S]. [出版地不详]: 中国标准出版社, 2011: 1-12.
[2] 邢亚东, 王玲玲, 黄丽丹. 正相高效色谱法测定多维片类保健品中维生素A的含量[J]. 安徽医药, 2015, 19(4): 672-674.
[3] 王星, 李雅慧. 特殊医学用途婴儿配方食品与婴幼儿配方食品法规标准比较分析[J]. 中国乳品工业, 2016(11): 29-37.
[4] 华家才, 姜艳喜, 黄强, 等. 国内外特殊医学用途婴儿配方食品标准分析[J]. 浙江科技学院学报, 2014, 26(5): 371-378.
[5] 朱姜, 张鹏, 杨嘉, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定奶粉中维生素A、维生素D、维生素E[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(11): 1 733-1 739.
[6] 黄诚, 林胜军. 直接皂化-高效液相色谱法测定奶粉中维生素A和E[J]. 生命科学仪器, 2012, 10(4): 3-5.
[7] 颜景超. 婴儿配方奶粉中维生素A的稳定性研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2012: 6-12.
[8] 中华人民共和国卫生部. GB 5009.82—2016 食品安全国家标准 食品中维生素A、D、E的测定[S]. 北京: [出版者不详], 2016: 1-24.
[9] ADRIENNE M M. Determination of vitamin E and vitamin A in infant formula and adult nutritionals by normal-phase high-performance liquid chromatography: collaborative study, final action 2012.10[J]. Journal of AOAC International, 2016, 99(1): 223-241.