

- [2] 王静,杨丽君,李兆杰,等. 昆明系小鼠生物法定量测定水产品中河豚毒素[J]. 食品科学,2011,32(4):181-184.
- [3] 林蔚,林健,黄宗绣. 用 ICR 小鼠生物法测定烤鱼片河豚毒素的研究[J]. 海峡预防医学杂志,2008,14(4):49-50.
- [4] Stokes A M, Williams B L, French S S. An improved competitive inhibition enzymatic immunoassay method for tetrodotoxin quantification[J]. Biological Procedures Online,2012,14:3.
- [5] 骆和东,贾玉珠,朱宝平. 固相萃取-超过滤-液相色谱/质谱联用法测定织纹螺中的河豚毒素[J]. 色谱,2007,25(6):917-921.
- [6] 金玉娥,马佳鸣,熊丽蓓,等. HPLC-MS 法测定鲜鱼中的河豚毒素[J]. 中国司法鉴定,2012(2):22-25.
- [7] Dell' Aversano C, Eaglesham G K, Quilliam M A. Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2004, 1028(1):155-164.
- [8] Dell' Aversano C, Hess P, Quilliam M A. Hydrophilic interaction liquid chromatography mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins[J]. J Chromatogr A, 2005,1081(2):190-201.
- [9] 吴平谷,赵永信,沈向红,等. 河豚鱼中河豚毒素的气相色谱质谱法测定[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(3):549-551.
- [10] 达情,刘伟,沈保华,等. 液相色谱-串联质谱法分析生物检材中的河豚毒素[J]. 法医学杂志,2010,26(6):432-435.
- [11] 李爱峰. 液-质联用技术分析海洋生物毒素的研究[D]. 山东:中国科学院研究生学院,2005.
- [12] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 23217—2008 水产品中河豚毒素的测定液相色谱-荧光检测法[S]. 北京:中国标准出版社,2008.

实验技术与方法

微波萃取-反相高效液相色谱法测定钙片中维生素 D₃ 的含量

赵飞,高广慧,王凤娇

(辽宁省食品检验检测院,辽宁 沈阳 110000)

摘要:目的 建立微波萃取-反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定钙片中维生素 D₃ 含量的分析方法。方法 以甲醇为萃取溶剂,微波萃取保健食品中的维生素 D₃。甲醇为流动相,检测波长 264 nm,流速 1 ml/min,经 C₁₈ 反相高效液相色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)分离分析,测定钙片中维生素 D₃ 的含量。结果 采用本方法的线性范围为 0~4 μg/L($r=0.9998$),检出限为 0.02 μg/L,回收率为 98.8%~100.0%,RSD 为 0.4%($n=9$)。结论 本文建立的方法具有操作简单、快速,准确度高,稳定性好等优点,适用于实验室测定钙片中维生素 D₃ 的含量。

关键词:微波萃取;反相高效液相色谱法;钙片;维生素 D₃

中图分类号:R155; Q565⁺.3 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)01-0030-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.01.008

Determination of vitamin D₃ in calcium tablet with microwave extraction by RP-HPLC

ZHAO Fei, GAO Guang-hui, WANG Feng-jiao

(Liaoning Institute for Food Control, Liaoning Shenyang 110000, China)

Abstract: Objective To develop a RP-HPLC method for determination of vitamin D₃ in calcium tablet with microwave extraction. **Methods** Vitamin D₃ was extracted by microwave in the ethanol. The HPLC analysis was carried out on a C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) with ethanol at the flow rate of 1 ml/min. The detection wavelength was set at 264 nm. **Results** The calibration curves were linear within the range of 0-4 μg/L ($r=0.9998$), and the detection limit was 0.02 μg/L. **Conclusion** The recoveries for vitamin D₃ were between 98.8%-100.0%, and RSD was 0.4%. This method was simple, accurate and practical for the detection of vitamin D₃ in health food.

Key words: Microwave extraction; reversed phase high-performance liquid chromatography; calcium tablet; vitamin D₃

维生素 D₃ 是一种人体必须的脂溶性维生素。自

然状态下,紫外线照射和食物性补充是人体维生素 D₃ 的主要来源。维生素 D₃ 能参与钙和磷代谢,促进其吸收并对骨质的形成具有重要的作用^[1]。

当前,样品中的维生素 D₃ 主要采用正相高效液相色谱法紫外检测器检测^[2-3],灵敏度和特异性

准确度均较高。样品中维生素 D₃ 提取的方法主要有皂化法^[4-6]。2010 版《中国药典》^[4]收录的方法和 GB 5413.9—2010《婴幼儿食品和乳品中维生素 A、D、E 的测定》^[5]中,主要是通过皂化排除样品中的干扰物质,再经乙醚萃取,浓缩,色谱分离。整套操作步骤较多,所需仪器试剂较多,耗时长。采用超声法提取维生素 D₃,对于基质较复杂的样品效果不是很理想,适用于基质中没有对维生素 D₃ 干扰、简单的样品。钙尔奇 D₃ 为复方制剂,成份主要有碳酸钙、维生素 D₃、氧化铜等。国家药品标准针对碳酸钙 D₃ 片中维生素 D₃ 的检测是采用正己烷为萃取剂,震荡提取维生素 D₃,浓缩复溶的方式。该法相比于皂化法步骤简单,但样品处理所需时间也较长,进行大批量样品分析存在一定的局限。

微波萃取是利用不同物质在微波作用下具有不同的极性耦合特征和表现,进而将目标化合物快速的从基体中分离。微波萃取过程可以对萃取物质中不同组份具有选择性、加热效率高、不破坏被分析物的分子结构等优点,已被广泛应用到多个行业。本研究采用微波萃取法,将钙片中维生素 D₃ 提取,建立了微波萃取-反相高效液相色谱法快速测定钙片中维生素 D₃ 含量的分析方法,其操作简单、快速,准确度高,稳定性好。

1 材料与amp;方法

1.1 主要仪器与试剂

2695 高效液相色谱仪(配 2487 紫外检测器,美国 Waters)、LabTech 微波消解仪(美国 Labtech)。钙尔奇小添佳咀嚼片(中国惠氏公司),维生素 D₃ 标准品(100061—200607,中国药品生物制品鉴定所),甲醇(色谱纯)、无水乙醇(分析纯)均购自天津康科德有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样品制备

称取研细混匀的钙尔奇小添佳咀嚼片 4 g,精密称定,置微波消解罐中,加入 30 ml 甲醇,置于微波消解仪中,按表 1 的微波控制程序进行微波萃取;微波萃取结束后,待温度恢复室温,将微波消解罐中的样品过滤并转移至 50 ml 棕色量瓶中,并用甲醇对消解罐进行洗涤并定容至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤后,于 4 ℃ 保存备用即可。

表 1 微波萃取程序条件

Table 1 Procedure of microwave extraction

序号	时间/min	功率/W	温度/℃	压力/bar
1	3	1 000	80	20.0
2	3	1 000	80	20.0

1.2.2 对照样品制备

用甲醇溶解维生素 D₃ 对照品,制成 100 μg/ml 的维生素 D₃ 对照品贮备溶液(零下 10 ℃ 以下避光储存)。

维生素 D₃ 标准储备液浓度校正:取维生素 D₃ 标准储备液适量体积(V),注入含有 3.00 ml 乙醇的比色皿中,264 nm 处测定吸光度(A),计算维生素 D₃ 标准储备液的浓度(C)。计算公式如下:(比吸收系数 E = 462)

$$C = \frac{A \times 3.00}{E \times V \times 100 \times 10^{-3}}$$

精密吸取该贮备液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、4.0 ml,置 100 ml 棕色量瓶中加甲醇定容并摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得,临用现配。

1.2.3 仪器条件

采用 Techmate C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),以甲醇为流动相,检测波长 264 nm,柱温 25 ℃,流速 1.0 ml/min,进样量 10 μl。

2 结果与分析

2.1 萃取条件的优化

2.1.1 萃取溶剂的选择

微波萃取中萃取溶剂的选择至关重要。主要考虑两个方面:一是萃取溶剂的极性;二是萃取溶剂对待萃取成分和其他杂质成分溶解能力的差别。本研究中,选取已报道用于微波萃取的 3 种溶剂:甲醇、丙酮和异丙醇,分别按照 1.2 方法对钙尔奇小添佳咀嚼片进行处理并测试,所得结果见表 2。由表 2 可知,甲醇作为萃取溶剂最优。

表 2 样品萃取溶剂的选择

Table 2 Choice of microwave extraction solvent

萃取溶剂	含量/(μg/g)
甲醇	2.574
丙酮	0.858
异丙醇	0.000

2.1.2 萃取温度的选择

本研究选择甲醇作为萃取溶剂,纯甲醇的沸点为 64.7 ℃。同一种萃取溶剂对不同物质的最佳萃取温度不同,本研究中分别测试了由室温升高至 70、80、90 ℃,并在各自温度下保持相同时间下的萃取效果,结果见表 3。由表 3 可知,80 ℃ 时萃取效果最好。

表 3 样品萃取温度的选择

Table 3 Choice of microwave extraction temperature

萃取温度/℃	含量/(μg/g)
70	2.314
80	2.574
90	2.311

2.1.3 萃取时间的选择

微波萃取时间的确定与被测样品量、溶剂体积和萃取温度等有关,萃取回收率随萃取时间的延长会有所增加,但幅度较小。因此本文中以甲醇为萃取溶剂,萃取温度为 80 ℃,分别测试了 3、5、10 min 的萃取效果,见表 4。由表 4 可知,萃取时间为 3 min 即可。

2.1.4 样品测定结果

精密吸取各对照品溶液和样品溶液 10 μl,按

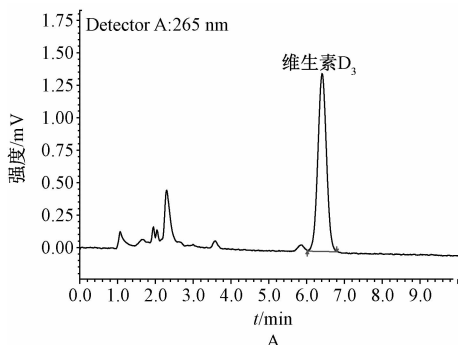
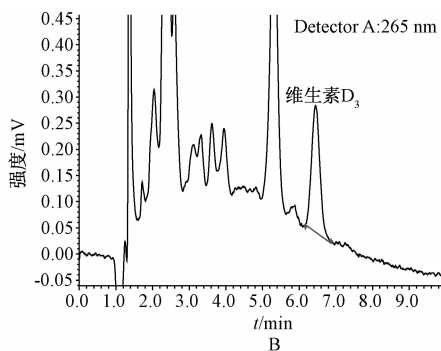


表 4 样品萃取时间的选择

Table 4 Choice of microwave extraction time

萃取时间/min	含量/(μg/g)
3	2.574
5	2.574
10	2.575

1.2.3 条件进样分析,测得钙尔奇小添佳咀嚼片中维生素 D₃ 含量为 2.574 μg/g。色谱图见图 1。



注: A 为对照品; B 为样品

图 1 维生素 D₃ 对照品和样品液相色谱图

Figure 1 Chromatograms of standard solution and sample

2.2 方法学验证

2.2.1 标准曲线、检出限及定量限

精密吸取各对照品溶液,按测定法进样分析。以对照品质量浓度(mg/L)对峰面积进行线性回归,回归方程为 $y = 55600x - 571$,相关系数为 0.999 8,线性范围 0~4 mg/ml,检出限 0.02 mg/ml,定量限 0.07 mg/ml。

2.2.2 精密度、稳定性、重复性试验

取标准系列溶液 10 μl,按 1.2.3 条件连续测定

6 次,计算维生素 D₃ 的峰面积 RSD 为 0.20%,结果表明仪器精密度良好。

精密吸取室温下放置的样品分别于 0、2、4、8、12、24、48 h 进样分析,结果样品中维生素 D₃ 峰面积 RSD 为 0.47%。表明样品溶液在 48 h 内稳定性良好。

取研细混匀的钙尔奇小添佳粉末 4 g 6 份,精密称定,平行制备样品进行测定,维生素 D₃ 含量 RSD 为 0.7%,满足定量要求,结果见表 5。

表 5 重复性及精密度试验结果(n=6)

Table 5 Replicability and precision of vitamin D₃ in samples

测量指标	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD/%
称样量/g	4.001	4.001	4.010	4.008	4.001	4.002	4.004	0.7
维生素 D ₃ 含量/(μg/g)	2.580	2.572	2.537	2.590	2.577	2.586	2.574	

2.2.3 回收率试验

精密称取研细混匀的钙尔奇小添佳咀嚼片粉末 4.00 g,精密称定,共 9 份,分别精密加入维生素 D₃ 对照品 10、30、50 μg 各 3 份,制备待测样品溶液,按测定法进样分析,结果见表 6,平均回收率为 99.4% 且回收率均在 98.8%~100.0% 内。三水平回收率测试总体 RSD 为 0.4%。

2.3 实际样品测试

按照 1.2 方法对以下 3 种保健食品进行了测试,结果见表 7。

表 6 维生素 D₃ 回收率试验结果

Table 6 Recovery detection

加标量/μg	称样量/g	回收量/μg	回收率/%	RSD/%
10	4.002 3	9.9	98.9	0.1
	4.004 7	9.9	98.8	
	4.003 1	9.9	99.0	
30	4.003 3	29.8	99.3	0.1
	4.005 2	29.9	99.6	
	4.002 6	29.9	99.6	
50	4.001 3	49.7	99.4	0.3
	4.004 8	50.0	100.0	
	4.002 9	49.8	99.6	

表 7 样品中维生素 D₃ 含量的测定结果

Table 7 Detection of real sample

名称	批号	含量/(μg/g)
根得牌珍 D 钙	20120709	2.86
钙尔奇小添佳咀嚼片	1210220	4.67
医嘉牌派达胶囊	111002	1.43

3 小结

本研究建立了微波萃取-反相高效液相色谱法测定保健食品钙片中维生素 D₃ 的分析方法。通过微波

萃取法对样品中的维生素 D₃ 进行提取,参照文献 [6-12] 中报道的维生素 D₃ 样品处理方法与本研究做对比,本研究优势主要在于提取方法快速、简便,分析成本低,准确度和重现性好。通过试验探究,得出微波萃取钙片中维生素 D₃ 的最优条件,为钙片中维生素 D₃ 的快速提取和检测提供依据。

参考文献

[1] 冯志华,刘观忠,张义明. 维生素 D 在动物营养中的应用研究 [J]. 中国畜牧兽医,2004,31(8):16-18.
 [2] 张敏,游理军,唐俊,等. 固相萃取-高效液相色谱法测定婴幼儿食品中的维生素 D₂、D₃ [J]. 中国食品添加剂,2014,(2):240-242.
 [3] 王尚,郑枫,丁黎. RP-HPLC 法测定维生素 D₃ 制剂中的有关物质 [J]. 中国药科大学学报,2012,43(1):55-59.
 [4] 国家药典委员会. 中国药典 [M]. 2010 年版. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录 52-53.

[5] 中华人民共和国卫生部. GB 5413.9—2010 婴幼儿食品和乳品中维生素 A、D、E 的测定 [S]. 北京:中国标准出版社,2010.
 [6] 许强,刘金生,王铁鹏,等. 反相高效液相色谱法测定维生素 D₂ 和维生素 D₃ [J]. 理化检验,2011,47(10):1168-1172.
 [7] 赵榕,薛颖,吴国华,等. 固相萃取-高效液相色谱法测定钙强化食品中的维生素 D [J]. 色谱,2008,26(1):113-115.
 [8] 贺利民,吕岱竹,吴莉宇,等. 高效液相色谱法同时测定无骨海鱼中的维生素 A、D 和 E [J]. 分析试验室,2004,23(5):77-79.
 [9] 刘红河,尹江伟,仲岳桐,等. HPLC-DAD 同时测定食品中维生素 A、D、E 研究 [J]. 中国卫生检验杂志,2005,15(9):1047-1049.
 [10] 周提军,王莎,李兵,等. 基于柱切换技术的高压液相色谱法检测奶粉中的维生素 D [J]. 食品安全质量检测学报,2013,4(2):467-471.
 [11] 刘永刚,高玉丛,朱俊平,等. 食品添加剂中维生素 A、D 和 E 的检测方法研究 [J]. 中国乳品工业,2004,32(12):47-48.
 [12] 曾义. 高效液相色谱-质谱法检测血清中维生素 D 含量 [J]. 中国药业,2013,22(20):17-18.

实验技术与方法

高效液相色谱法同时测定小麦粉及其制品中过氧化苯甲酰和苯甲酸

许秀敏^{1,2}, 梁旭霞², 龙朝阳², 高燕红², 黄湘东², 杨杏芬²

(1. 中山大学公共卫生学院, 广东 广州 510080; 2. 广东省疾病预防控制中心, 广东 广州 511430)

摘要:目的 建立同时测定小麦粉及其制品中过氧化苯甲酰和苯甲酸的高效液相色谱检测方法。方法 样品中过氧化苯甲酰和苯甲酸用无水乙醇进行提取,采用色谱柱为 Symmetry C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm),以甲醇-0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱,检测波长 235 nm。结果 过氧化苯甲酰、苯甲酸与杂质基线分离,过氧化苯甲酰和苯甲酸在 0.10~20 mg/L 浓度范围内线性良好,相关系数 *r* 均在 0.999 9 以上。过氧化苯甲酰和苯甲酸回收率分别为 95.2%~99.5% 和 95.3%~105%,方法检出限分别为 0.10 和 0.08 mg/kg,定量限分别为 0.30 和 0.24 mg/kg。结论 本方法操作简便、灵敏度高、结果准确,适用于小麦粉及其制品中过氧化苯甲酰和苯甲酸同时分析。

关键词:小麦粉及其制品; 过氧化苯甲酰; 苯甲酸; 高效液相色谱; 违法添加物

中图分类号:R155; S512.1; TS213.2 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)01-0033-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.01.009

Simultaneous determination of benzoyl peroxide and benzoic acid in wheat flour and its products by high performance liquid chromatography

XU Xiu-min, LIANG Xu-xia, LONG Chao-yang, GAO Yan-hong, HUANG Xiang-dong, YANG Xing-fen
 (School of Public Health, Zhongshan University, Guangdong Guangzhou 510080, China)

Abstract: Objective To develop an analytical method for the simultaneous separation and determination of residual benzoyl peroxide (BPO) and benzoic acid (BA) in flour and wheat products by HPLC. **Methods** BPO and BA were extracted by ethanol, and separation and determination were carried out on Symmetry C₁₈ column using a gradient mobile phase by HPLC at 235 nm. **Results** BPO and BA showed good linearity (*r* > 0.999 9) in the range of 0.10-20 mg/L. For BPO and BA, the recoveries were 95.2%-99.5% and 95.3%-106%, respectively; the limits of detection (LOD) were 0.10 and 0.08 mg/kg; the limits of quantification (LOQ) were 0.30 and 0.24 mg/kg. **Conclusion** The method is

收稿日期:2014-10-08

作者简介:许秀敏 女 副主任技师 研究方向为食品安全 E-mail:48546862@qq.com

通讯作者:杨杏芬 女 教授 研究方向为应用毒理学和食品安全风险评估 E-mail:yangxingfen@21cn.com