

实验技术与方法

高效液相色谱-蒸发光散射检测器联用法测定
婴幼儿配方乳粉中胆碱的含量

刘雪梅,刘波,郭园,沈遥,陈波

(湖南师范大学 植化单体开发与利用湖南省重点实验室,湖南 长沙 410081)

摘要:目的 建立一种以高效液相色谱-蒸发光散射检测器联用测定婴幼儿配方乳粉中胆碱含量的方法。方法 样品以 ZORBAX 300 SCX 阳离子交换柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)分离,用三乙胺水溶液-乙腈(80:20,V/V)作为流动相洗脱,蒸发光散射检测器检测。结果 胆碱的检测限为 4 μg/ml,线性相关系数(r)为 0.998 1,加标回收率在 94.98%~100.90%之间,且日内精密度($RSD_{\text{日内}}$)和日间精密度($RSD_{\text{日间}}$)分别为 2.75%和 3.12%。结论 本方法操作简便、回收率高、准确度好、可缩短试验时间且目标峰峰形窄而对称,适用于对婴幼儿配方乳粉中胆碱的测定。

关键词:高效液相色谱-蒸发光散射检测器联用法;阳离子交换;胆碱;婴幼儿配方乳粉

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2016)02-0219-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.02.016

Determination of choline in infant formula by high performance liquid
chromatography-evaporative light scattering detector

LIU Xue-mei, LIU Bo, GUO Yuan, SHEN Yao, CHEN Bo

(Key Laboratory of Phytochemical R&D of Hunan Province,
Hunan Normal University, Hunan Changsha 410081, China)

Abstract: Objective A method for determination of choline in infant formula by HPLC-ELSD was optimized. **Methods**

The separation was operated on an analytical Agilent ZORBAX 300 SCX column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with water (containing 30 mmol/L triethylamine); acetonitrile (80 : 20, V/V) as mobile phase. **Results** The limit of detection was 4 μg/ml. The calibration curve was linear ($r=0.998 1$). The relative recoveries were 94.98% -100.9%, and relative standard deviations of intra-day and inter-day precision were 2.75% and 3.12%, respectively. **Conclusion** The method was simple and fast. Compared to the traditional method, analysis time was shorter, and the peak shape of choline is more narrow and symmetrical.

Key words: High performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector; cation exchange; choline; infant formula

胆碱(choline)是一类强有机碱,以游离态和结合态胆碱形式广泛存在于生物体中。胆碱的吸湿性较强,暴露于空气中可迅速吸潮。胆碱易与盐酸反应生成更稳定的氯化胆碱结晶盐。胆碱耐热性强,具有较理想的稳定性,在食品加工的过程中损失量小,在干燥条件下,可以长时间储存在食物中,其含量几乎不变。

胆碱是人体所需的重要营养物质,有促进大脑

发育、增强记忆力等功效。缺乏胆碱可能会导致脂肪肝、肝硬化以及引发肾、胰腺病变、记忆紊乱和生长障碍等疾病或危害。成人可以从蛋黄、动物肝脏、大豆、绿色蔬菜等膳食中摄取胆碱,对婴幼儿而言,婴幼儿主要从母乳或者配方乳粉中摄入胆碱,为了避免婴幼儿胆碱的摄入量过高,国家标准对婴幼儿配方乳粉中胆碱的添加量有明确的规定(800~1 500 mg/kg)^[1]。

胆碱的传统检测方法为高氯酸非水滴定法^[2],但是此方法被证明对掺杂的三甲胺类物质无法鉴别。现行国家标准 GB 5413.20—2013《婴幼儿乳粉和乳品中胆碱的测定》^[3]的胆碱检测方法是酶比色法和雷氏盐分光光度法。Sanz-Vicente I等^[4]利用酶的荧光方法对胆碱进行检测,试验发现,酶比色

收稿日期:2015-12-23

作者简介:刘雪梅 女 硕士生 研究方向为分析化学

E-mail:578901046@qq.com

通信作者:沈遥 女 讲师 研究方向为分析化学

E-mail:lvy33@163.com

法的检测限较高,但是由于酶的价格较高,存在成本问题;雷氏盐分光光度法操作繁琐,分析时间长,而且在样品前处理时易造成样品损失,所以在实际应用上具有一定的局限性。近几年有通过高效液相色谱-串联质谱法^[5]以及离子色谱法^[6-9]测定胆碱的报道,这些方法具有质谱成本较高、离子色谱的普及性不高、通用性较差等不足,随后出现了高效液相色谱-蒸发光散射检测器联用法(HPLC-ELSD)测定婴幼儿配方乳粉中胆碱的含量的相关报道^[10],此方法操作简单、通用性好,但是峰性较宽、灵敏度不高。本文在采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器联用法检测胆碱的含量基础上,通过优化流动相和仪器条件、蒸发光散射检测器的相关参数,取得了较为理想的结果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

采集市售婴幼儿配方乳粉样品(简称乳粉样品)共8份,其中1段乳粉1份,2段乳粉5份,3段乳粉2份。

1.1.2 主要仪器与试剂

岛津20AT高效液相色谱仪(配岛津ELSD-LTII低温型蒸发光散射检测器,日本岛津)、ZORBAX 300-SCX阳离子交换柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm; 美国Agilent)、PHS-3C pH计。

氯化胆碱对照品(100147,中国食品药品检定研究所),乙胺水溶液、二乙胺、三乙胺、乙酸铵、冰醋酸、盐酸均分析纯,HPLC级乙腈(瑞典Oceanpak),试验用水为超纯水。

1.2 方法

1.2.1 样品预处理和标准溶液的配制

乳粉样品预处理:准确称取乳粉样品5.00 g于250 ml锥形瓶中,加入30 ml 1 mol/L的盐酸溶液;置于70℃烘箱中反应3 h,每隔1 h晃动一次锥形瓶,反应完毕后取出冷却到室温;将酸水解后的样品摇匀,用漏斗和定量滤纸过滤至50 ml容量瓶中,用超纯水反复冲洗锥形瓶多次,洗涤液一并过滤到容量瓶中,定容至50 ml,用0.22 μm孔径滤膜过滤待测。

胆碱标准储备液的配制:将氯化胆碱标准品置于105℃烘箱中加热3 h至质量恒定;快速并准确称取0.045 0 g氯化胆碱的标准品于50 ml容量瓶中,用超纯水溶解并定容至50 ml,配成浓度为0.9 mg/ml的氯化胆碱标准液。用超纯水对储备液进行梯度稀释,配制成浓度为20、50、100、200、300 μg/ml的标准工作溶液。

1.2.2 仪器条件

色谱柱:ZORBAX 300-SCX(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)阳离子交换柱;流动相A:30 mmol/L三乙胺水溶液,用冰醋酸调节至pH=6,流动相B:乙腈,流动相比A:B=80:20(V/V,下同),等度洗脱;流速1.0 ml/min,进样量20 μl。雾化气为氮气,漂移管温度40℃,压力310 kPa,增益值设为8。

1.2.3 回收率试验

准确称取已知胆碱含量的5.00 g乳粉样品于250 ml锥形瓶中,加入30 ml 1 mol/L的盐酸溶液,分别加入低、中、高3个水平的胆碱标准品进行回收率试验,按照1.2.1对样品进行预处理,进行液相分析。

2 结果与分析

2.1 流动相的优化

2.1.1 流动相的选择

本文选用阳离子交换柱,以离子交换实现对胆碱的分离。离子交换分离是基于流动相离子和样品离子之间对固定相有效交换容量的竞争,故分离结果与流动相离子的选择,即流动相的组成有关。

分别以浓度为30 mmol/L,pH=6的三乙胺、二乙胺、乙胺水溶液为流动相A,乙腈为流动相B,以50、100 μg/ml的胆碱标准溶液进行分析。对3种不同流动相条件下胆碱的保留时间以及峰形进行比较,胆碱半峰宽从小到大排序为三乙胺、二乙胺、乙胺,由此说明三乙胺作为流动相时,胆碱的峰形较窄且对称性较好,能缩短胆碱在阳离子交换柱上的保留时间,从15.112 min减少到7.091 min(当胆碱浓度为50 μg/ml时),从15.042 min减少到7.098 min(当胆碱浓度为100 μg/ml时),见表1。

表1 不同流动相条件下胆碱色谱图的参数对比

Table 1 Comparison of chromatogram parameters at different mobile phase modifier conditions

胆碱浓度 /(μg/ml)	流动相	保留时间 /min	峰宽	半峰宽	拖尾 因子
50	三乙胺	7.091	0.517	0.164	1.300
	二乙胺	9.500	0.554	0.206	1.444
	乙胺	15.112	0.825	0.308	1.489
	醋酸铵	15.800	0.975	0.325	1.710
100	三乙胺	7.098	0.504	0.178	1.490
	二乙胺	9.502	0.675	0.225	1.406
	乙胺	15.042	1.104	0.342	1.743
	醋酸铵	15.695	1.209	0.4015	1.804

将三乙胺的水溶液与已报道过的醋酸铵水溶液对比^[10],相对于醋酸铵而言,三乙胺用做流动相时,胆碱的保留时间缩短了约一半,分析周期更短,而且峰形更对称。其原因是本研究选用强阳离子

交换柱,它的固定相是在硅胶微粒上键合了磺酸基团,根据离子交换的机理,由于三乙胺比醋酸铵更易与磺酸基结合,比醋酸铵有更强的竞争力,从而能更快的将胆碱洗脱下来,缩短胆碱的保留时间。

由于三乙胺的挥发性大于醋酸铵盐的挥发性,在ELSD检测时,因流动相挥发性的增加,从而减低了基线背景响应值,也提高了目标物胆碱的检测灵敏度,见图1。

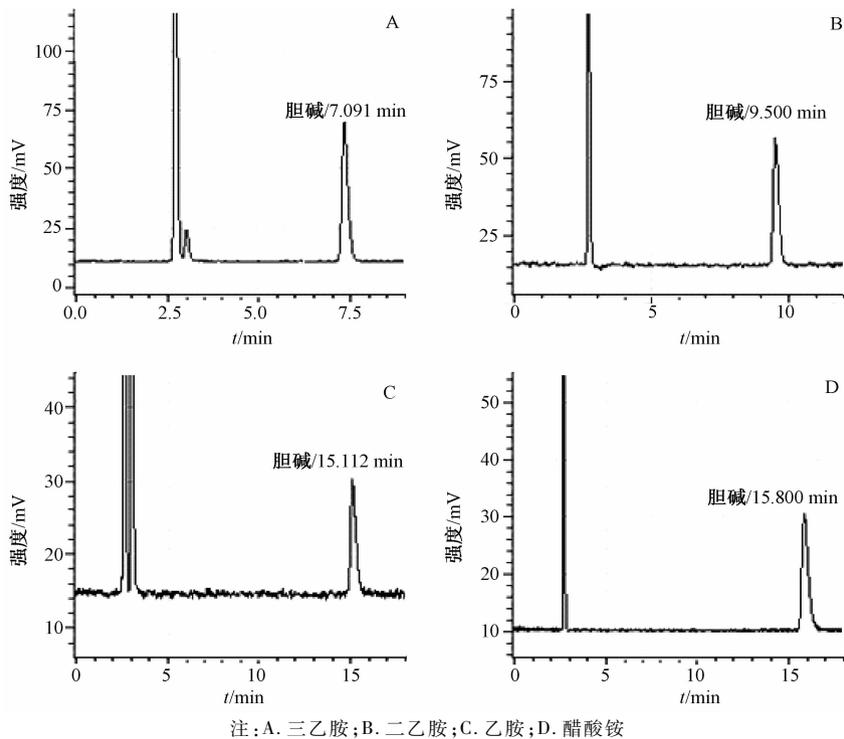


图1 不同流动相条件下胆碱标准液(50 µg/ml)色谱图

Figure 1 Chromatogram of choline(50 µg/ml) at different mobile phase modifier conditions

2.1.2 流动相中水相与有机相比率的优化

在2.1.1部分的条件下,对水相与有机相的

比例进行考察,本研究考察了三乙胺水溶液和乙腈比例为60:40、70:30、80:20时的试验结果,图2

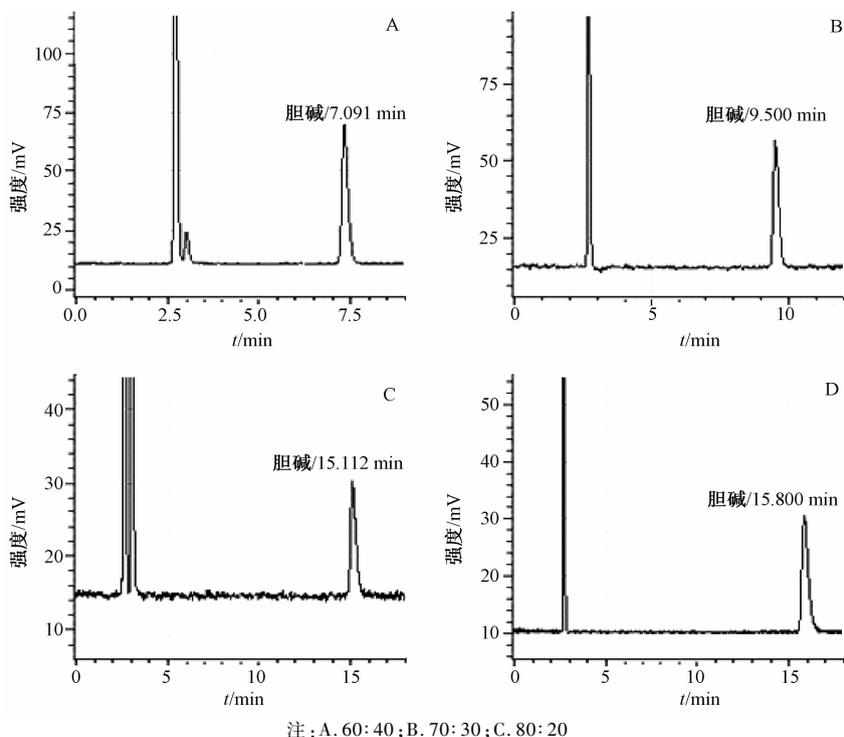


图2 10 µg/ml胆碱在不同有机相与水相比例下的色谱图

Figure 2 Chromatogram of choline(10 µg/ml) with different proportion of organic mobile phase to aqueous mobile phase

为 10 $\mu\text{g/ml}$ 胆碱在不同水相与有机相比例下的色谱图。水相和有机相的比例会对胆碱的保留时间和峰形造成影响,相关参数见表 2,三乙胺水溶液和乙腈比例为 80:20 时,胆碱的保留时间为 7.588 min,与比例为 60:40 时相比,提前了 2.876 min;半峰宽和拖尾因子从比例为 60:40 到 80:20 逐渐减小,说明三乙胺水溶液和乙腈比例为 80:20 时的胆碱的峰形更窄,对称性也更好。故本研究选择三乙胺水溶液和乙腈流动相比例为 80:20。

表 2 不同比例流动相条件下的胆碱色谱图的参数对比

Table 2 Comparison of chromatogram parameters with different proportion of organic mobile phase to aqueous mobile phase

胆碱浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	流动相 比例	保留时间 /min	峰宽	半峰宽	拖尾 因子
10	60:40	10.465	0.500	0.235	1.416
10	70:30	8.667	0.500	0.196	1.258
10	80:20	7.588	0.425	0.159	1.228

2.2 蒸发光散射检测器参数的优化

雾化器的气体压力、漂移管的温度以及增益值都会对检测器的响应造成影响。根据 ELSD 的使用手册,本课题组考察了 310、330、350 kPa 的气体压力条件下胆碱的响应情况,结果显示响应变化不明显;本课题组随后考察不同温度(40、60、80 $^{\circ}\text{C}$)对试验的影响,发现温度越高,响应越低;考察增益值分别为 6、8、10、12 时的响应变化情况,响应变化同样不明显。冯埃生等^[11]对影响 ELSD 性能的因素进行考察,发现漂移管温度对基线水平以及噪声大小的影响没有一定的规律可循。温度过低可能造成流动相的挥发不完全,导致基线水平较高;温度过高则可能会使噪音增大。另外,提高气体压力,随着气体流速增大,溶质粒子体积变小,散射光能力变弱,从而使响应值减小。故本试验中选取 310 kPa、40 $^{\circ}\text{C}$ 、增益值为 8 作为仪器使用条件。

2.3 方法验证

试验直接测定的是氯化胆碱的含量,折算成胆碱的含量。胆碱含量($\mu\text{g/g}$) = 氯化胆碱含量($\mu\text{g/g}$) \times [$M_{\text{胆碱}}(\text{g/mol})/M_{\text{氯化胆碱}}(\text{g/mol})$]。

2.3.1 线性方程及检测限

将 20、50、100、200、300 $\mu\text{g/ml}$ 的标准工作溶液在 1.2.2 的仪器条件下测定对应峰面积,以适量浓度的常用对数值为横坐标,以峰面积常用对数值为纵坐标进行回归分析。线性回归方程 $y = 1.5693x + 3.1277$,相关系数(r)为 0.998 1。本研究中,以信噪比等于 10 为定量限($S/N = 10$),测得定量限为 10 $\mu\text{g/ml}$;以信噪比等于 3 为检测限($S/N = 3$),测得检测限为 4 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.3.2 回收率和精密度

对 1 种已知含量的样品进行加标回收试验,每组加标浓度做 3 组平行样,每个样品连续分析 3 次,结果如表 3 所示,平均回收率范围在 94.98% ~ 100.90% 之间,表明本方法加标回收率高,相对标准偏差(RSD)在 0.70% ~ 1.39% 之间。同时用此已知含量的样品考察方法的精密度,一日内,将已知含量样品制备 6 组平行样,每组样品连续分析 3 次,测得 $RSD_{\text{日内}} = 2.75\%$;另连续六日制备该已知含量的 1 种样品进行测定,每个样品连续分析 3 次,测得 $RSD_{\text{日间}} = 3.12\%$,见表 4。

表 3 回收率结果($n = 3$)

Table 3 Results of recovery

本底值 ($\text{mg}/100\text{g}$)	加标量 ($\text{mg}/100\text{g}$)	测定值/($\text{mg}/100\text{g}$)			平均回收 率/%	RSD /%
		第一次	第二次	第三次		
116.64	90	207.43	207.39	210.32	100.90	1.39
116.64	120	234.52	235.98	234.22	98.23	0.70
116.64	150	259.11	257.76	259.11	94.98	0.74

表 4 精密度试验结果($n = 6$)

Table 4 Results of precision

组别	测定值/($\text{mg}/100\text{g}$)						平均值 ($\text{mg}/100\text{g}$)	RSD /%
	第一次 (日)	第二次 (日)	第三次 (日)	第四次 (日)	第五次 (日)	第六次 (日)		
日内	111.39	108.92	113.56	114.22	116.03	114.87	113.16	2.75
日间	113.31	108.63	110.44	116.09	119.28	115.36	113.85	3.12

2.4 实际样品测定

从某超市随机购买 8 种婴幼儿配方乳粉,每个样品做 3 个水平试验,每个样品测定 3 次。样品前处理后进行液相分析,图 3 为某配方乳粉样品的色谱图。8 种乳粉相应的含量结果如表 5 所示,低于 GB 14880—2012《食品安全国家标准食品营养强化剂使用标准》^[1]的规定限值。

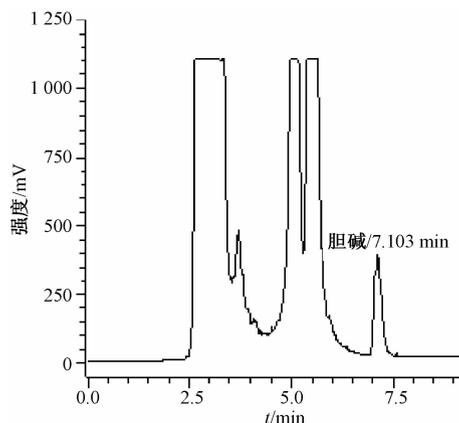


图 3 某配方乳粉样品的色谱图

Figure 3 Chromatogram of one sample

表5 样品测定结果

Table 5 Determination of choline in real samples

样品序号	标示值/(mg/100 g)	测定值/(mg/100 g)
1	96	140.76
2	96	129.80
3	80	126.93
4	135.1	148.70
5	80	142.83
6	85	114.17
7	85	116.64
8	105	139.84

3 小结

本文针对现有的高效液相色谱-蒸发光散射检测器联用测定婴幼儿配方乳粉中胆碱含量的方法进行优化,选用 ZORBAX 300 SCX 阳离子交换柱,并对流动相以及水相和有机相的比例进行改善,考察了蒸发光散射检测器的使用条件,结果显示胆碱的检测限为 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$,线性相关系数(r)为 0.998 1,加标回收率在 94.98% ~ 100.9% 之间,且 $RSD_{\text{日内}}$ 和 $RSD_{\text{日间}}$ 精密度良好,分别为 2.75% 和 3.12%。本文建立的高效液相色谱-蒸发光散射检测器联用测定胆碱含量的方法操作简单、快速、样品分析时间短,且目标峰峰形窄而对称,适用于对婴幼儿配方乳粉中胆碱的测定。

实验技术与方法

超高效液相色谱法同时测定食用植物油中的4种植物甾醇

赵海燕,詹未,李兵,吴国华,赵榕

(北京市疾病预防控制中心,北京 100013)

摘要:目的 建立超高效液相色谱(UPLC)法测定食用植物油中4种植物甾醇(菜籽甾醇、豆甾醇、菜油甾醇、 β -谷甾醇)的方法。方法 食用植物油样品经皂化后,用冰醋酸调节 $\text{pH}=6.0\sim 7.5$,乙醇定容后冷冻离心,取上清液测定。采用 Endoavorsil C_{18} (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱,以甲醇作为流动相等度洗脱,使用二极管阵列检测器在波长 205 nm 下进行检测。结果 方法的线性范围: β -谷甾醇、豆甾醇、菜籽甾醇为 20 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$;菜油甾醇为 10 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$,相关系数 r 均大于 0.999 9。方法检出限($S/N=3$):菜籽甾醇、豆甾醇、菜油甾醇、 β -谷甾醇分别为 23.2、18.8、18.6、23.8 $\mu\text{g}/\text{g}$;定量限($S/N=10$)分别为 77.5、62.8、62.2、79.4 $\mu\text{g}/\text{g}$;4 种组分按高、中、低 3 个浓度水平加标回收率为 84.7% ~ 100.7%,相对标准偏差 $RSD(n=6)$ 均 $<3\%$ 。结论 本方法简便稳定,准确灵敏,适用于食用植物油中 4 种主要植物甾醇的同时测定。

关键词:植物甾醇;食用植物油;超高效液相色谱法;食品

中图分类号:R155.5 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2016)02-0223-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.02.017

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. GB 14880—2012 食品安全国家标准食品营养强化剂使用标准[S]. 北京:中国标准出版社,2012.
- [2] 常碧颖,郭吉原,宋荣. 氯化胆碱市场的掺假新动向及应对措施[J]. 饲料广场,2002(16):3-4.
- [3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5413.20—2013 婴幼儿乳粉和乳品中胆碱的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2013.
- [4] Sanz-Vicente I, Romero J J, Marcos S D, et al. Simultaneous determination of glucose and choline based on the intrinsic fluorescence of the enzymes [J]. J Fluoresc, 2009, 4(19): 583-591.
- [5] 黄芳. 液相色谱-质谱技术在配方乳粉营养成分分析中的应用研究[D]. 广州:华南理工大学,2010.
- [6] 武中平,高巍,卢剑. 离子色谱法测定婴幼儿配方奶粉中胆碱的含量[J]. 乳业科学与技术,2011,34(5):232-233.
- [7] 刘美霞,胡彩霞,任丽,等. 离子色谱法测定奶粉中胆碱含量方法的研究[J]. 食品安全质量检测学报,2013,4(6): 1008-1883.
- [8] 黄丽,刘京平,容晓文. 在线渗析-离子色谱法直接测定奶粉中胆碱[J]. 中国卫生检验杂志,2008,118(3):444-445,457.
- [9] 李媛媛,薛静,李莹倩,等. 离子色谱法测定婴幼儿乳粉中的胆碱含量[J]. 食品科技,2008,33(12):267-270.
- [10] 薛静. 离子色谱法和高效液相色谱法测定乳粉中胆碱含量的研究[D]. 吉林:东北师范大学,2008.
- [11] 冯埃生,邹汉法,汪海洋,等. 影响高效液相色谱/挥发激光散射检测器检测性能基本因素的考察[J]. 药物分析杂志,1996,16(6):414.

收稿日期:2015-12-07

作者简介:赵海燕 女 高级工程师 研究方向为食品检验 E-mail:yan_zhaohai@sina.com

通信作者:赵榕 女 主任技师 研究方向为食品理化 E-mail:Lxyue@yeah.net