

实验技术与方法

反相高效液相色谱法快速测定复方维生素片中微囊化 β -胡萝卜素

苏昭仑,李丹,张喜金,游景水

(汤臣倍健股份有限公司,广东 珠海 519040)

摘要:目的 建立一种快速测定复方维生素片中微囊化 β -胡萝卜素的反相高效液相色谱法。方法 样品经0.1 mol/L的碳酸钠溶液破坏微囊,甲醇-乙腈(7:3, V/V)混合溶液超声提取,采用Agilent SB-C₈柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μ m)分离,流动相为甲醇-乙腈(9:1, V/V),检测波长为448 nm。结果 β -胡萝卜素在本试验色谱条件下能完全分离,其线性范围为0.41~6.20 μ g/ml,平均回收率99.4%~103.3%,RSD < 2.0%。结论 该方法操作简便,能测定复方维生素片中微囊化 β -胡萝卜素,精密度和回收率高,重复性好,结果符合要求。

关键词: β -胡萝卜素; 反相高效液相色谱法; 复方维生素片; 保健食品; 检测方法

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2017)01-0056-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2017.01.012

Rapid determination of β -carotene in compound vitamin tablets by reverse-phase high performance liquid chromatography

SU Zhao-Lun, LI Dan, ZHANG Xi-Jin, YOU Jing-Shui

(By-Health Company Limited, Guangdong Zhuhai 519040, China)

Abstract: Objective To establish a method for determination of microencapsulated β -carotene in compound vitamin tablets by reverse-phase high performance liquid chromatography. **Methods** Microcapsules in the samples were destructed with 0.1 mol/L sodium carbonate solution, and ultrasonically extracted with methanol-acetonitrile (7:3, V/V) using Agilent SB-C₈ column. Methanol-acetonitrile (9:1, V/V) was the mobile phase, and the detection wavelength was 448 nm. **Results** β -carotene was completely separated in the chromatographic conditions. The linear range was 0.41-6.20 μ g/ml, the average recovery was 99.4%-103.3%, and the RSD was below 2.0%. **Conclusion** The method was fast and simple, the precision, recovery, and repeatability met the requirements, and could determine microencapsulated β -carotene in compound vitamin tablets.

Key words: β -carotene; reverse-phase high performance liquid chromatography; compound vitamin tablets; health food; test method

β -胡萝卜素是一种广泛存在于黄、绿色蔬菜和水果中的天然类胡萝卜素。联合国粮农组织和世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会认定 β -胡萝卜素为A类营养食品强化剂。 β -胡萝卜素作为维生素A的前体,是保健食品的重要成分,大量研究证实, β -胡萝卜素具有抗氧化^[1]、预防维生素缺乏症^[2]、抗癌^[3-6]、预防心血管疾病、防治白内障和保护肝脏^[7-8]等多方面的药理作用。

β -胡萝卜素遇氧、热和光时不稳定,而在弱碱下较稳定,复方维生素片中 β -胡萝卜素经过微囊化包埋增加稳定性,但是给检测分析带来了一定的困难。目前,常用来分析 β -胡萝卜素的方法有纸层析法^[9]、薄

层色谱法、分光光度法和高效液相色谱法^[10-21]等。前三种分析方法过程复杂、精密度差,而高效液相色谱法灵敏度高、准确,在 β -胡萝卜素的测定中得到广泛的应用。但报道文献中高效液相色谱法样品前处理采用回流皂化,操作繁琐,难以实现全程避光, β -胡萝卜素损失较大,采用C₁₈柱分离,仪器分析时间较长,不适合企业大批量检测的需求^[10,19-21]。本试验简化样品前处理过程,优化色谱条件,建立了反相高效液相色谱法快速测定复方维生素片中微囊化 β -胡萝卜素,提高了测定结果的准确性,对 β -胡萝卜素的质量控制具有一定的研究价值和经济效益。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

维他客多种维生素矿物质片、多种维生素片

收稿日期:2016-07-18

作者简介:苏昭仑 男 执业药师 研究方向为中药和保健食品安全检测 E-mail:suwheel@126.com

(女士)、每日每加多种维生素矿物质片(女士),均购自汤臣倍健股份有限公司。

1.1.2 主要仪器与试剂

1260 型高效液相色谱仪(配 DAD, 美国安捷伦),分析天平。

β -胡萝卜素(批号 41030, 纯度 96.3%, 德国 Dr. Ehrenstorfer), 甲醇、乙腈均为色谱纯, 三氯甲烷、无水碳酸钠均为分析纯, 纯化水。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

标准储备液: 精密称取 β -胡萝卜素对照品 10.73 mg, 置于烧杯中, 加三氯甲烷溶解, 再转移至 100 ml 棕色容量瓶中并定容至刻度(浓度约为 0.1 mg/ml), 储备液于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存备用。

标准工作液: 分别精密移取储备液 0.20、0.50、1.00、2.00、3.00 ml 于 50 ml 棕色容量瓶中, 用甲醇-乙腈(7:3, V/V) 混合溶液定容至刻度, 摇匀, β -胡萝卜素浓度分别为 0.41、1.03、2.07、4.13、6.20 $\mu\text{g/ml}$ 。

1.2.2 样品前处理

将样品粉碎, 精密称取 100.0 mg 样品粉末于 50 ml 棕色容量瓶中, 加入 2.0 ml 0.1 mol/L 的碳酸钠溶液, 混匀, 室温超声破坏微囊 5 min, 加入甲醇-乙腈(7:3, V/V) 混合溶液 40 ml, 室温超声提取 15 min, 冷却至室温, 用甲醇-乙腈(7:3, V/V) 混合溶液定容至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后备用。

1.2.3 仪器条件

色谱柱: Agilent SB-C₈ (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm); 流速 1.0 ml/min; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 10 μl ; 检测波长 448 nm; 流动相 A 为甲醇, B 为乙腈, A: B = 9:1。

2 结果与分析

2.1 方法波长的选择

在 1.2.3 色谱条件下, 对 β -胡萝卜素标准工作液进行全波长扫描, 在 448 nm 处有最大吸收峰, 故本试验选择 448 nm 波长测定, 见图 1。

2.2 方法专属性试验

在 1.2.3 色谱条件下, β -胡萝卜素的保留时间为 5.18 min, 分离度良好, 无干扰, 见图 2。进行全波长扫描, 阈值设置为 999, 检查样品中 β -胡萝卜素的峰纯度, 能得到良好的纯度, 证明该方法具有很好的专属性。

2.3 线性关系

在试验条件下, 对标准工作液进行测定, 结果表明, β -胡萝卜素在 0.41 ~ 6.20 $\mu\text{g/ml}$ 范围内有良好的线性关系, $r = 1.000\ 00$, 线性方

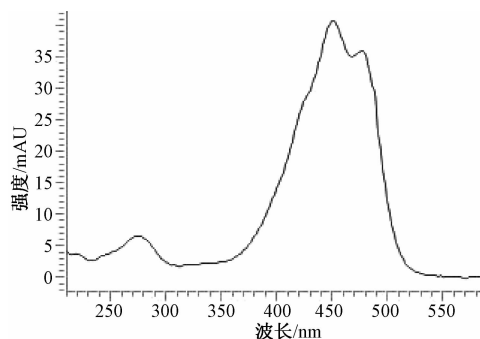


图 1 β -胡萝卜素光谱

Figure 1 Spectrum of β -carotene

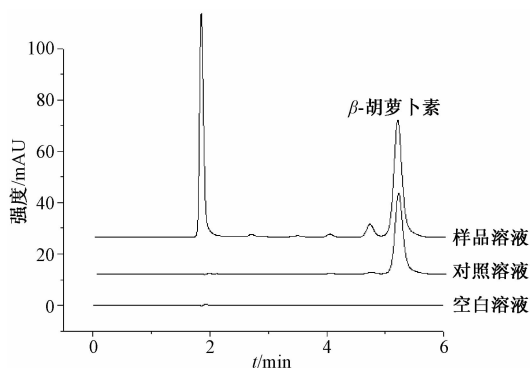


图 2 空白样品、 β -胡萝卜素对照和样品的色谱图

Figure 2 Chromatogram of blank samples, β -carotene contrast and samples

程: $y = 153.70783x + 1.09134$ 。

2.4 精密度试验

在试验条件下, 对同一标准工作液进行重复进样 6 次测定, 结果显示, 其保留时间稳定, β -胡萝卜素浓度为 2.071 3 ~ 2.101 9 $\mu\text{g/ml}$, RSD 为 0.6%。结果表明, 精密度良好。

2.5 稳定性试验

精密称取 100.0 mg 样品, 按 1.2.2 中的方法制得供试品溶液, 分别在 0、1、2、4、6、8 h 进样, 测定 β -胡萝卜素浓度为 2.904 3 ~ 2.970 2 $\mu\text{g/ml}$, RSD 为 0.8%。结果表明, 供试品溶液 8 h 内稳定。

2.6 重复性试验

分别精密称取 100.0 mg 样品, 按 1.2.2 中的方法制得供试品溶液, 测定 β -胡萝卜素的含量。检测结果略高于理论值含量, 其 RSD 分别为 1.3%、1.0%、1.4%, 表明该方法准确, 重复性好, 见表 1。

表 1 β -胡萝卜素的重复性试验($n = 6$)

样品	Table 1 Repeatability of β -carotene		理论值含量 /(mg/100 g)
	本方法测得含量 /(mg/100 g)	RSD /%	
维他客多种维生素矿物质片	102.5 ~ 106.1	1.3	100.0
多种维生素片(女士)	12.8 ~ 13.3	1.0	12.0
每日每加多种维生素矿物质片(女士)	12.2 ~ 12.6	1.4	12.0

2.7 最低检出限和最低定量限试验

取信噪比 3:1 时为最低检出限, β -胡萝卜素的浓度为 0.022 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 取信噪比 10:1 时为最低定量限, β -胡萝卜素的浓度为 0.074 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2.8 回收率试验

精密称取已测定含量 (104.9 $\text{mg}/100\text{g}$) 的同一样品 9 份, 分别添加 0.50、1.00、1.50 ml 标准储备液 (103.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 进行加标回收试验, 结果见表 2。本方法平均回收率 99.4% ~ 103.3%, 且 $RSD < 2.0\%$, 说明该方法准确度可以满足 β -胡萝卜素的检测要求。

表 2 加标回收率和 RSD ($n=3$)

本底含量/ μg	加标量/ μg	测得量/ μg	平均回收率/%	RSD /%
	51.65	158.25	103.3	1.2
104.9	103.30	210.06	101.8	0.7
	154.95	258.92	99.4	0.4

2.9 与国标方法对比

分别精密称取 100.0 mg 样品, 按本方法与 GB 5413.35—2010《食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中 β -胡萝卜素的测定》^[10] 的样品前处理, 制得供试品溶液, 测定 β -胡萝卜素的含量。本方法检测结果与国标对比, 相对偏差为 4.6%, 表明该方法检测结果准确, 见表 3。

表 3 样品前处理方法的对比 ($n=6$)

样品前处理方法	测得平均含量 /($\text{mg}/100\text{g}$)	RSD /%	相对偏差 /%
本方法	104.9	1.3	4.6
GB 5413.35—2010	100.2	3.9	

3 讨论

本试验采用反相高效液相色谱法、等度洗脱, 测定了复方维生素片中微囊化 β -胡萝卜素的含量, 为该类制剂质量标准的制定提供了定量依据。

采用甲醇、甲醇-乙腈 (9:1, V/V)、甲醇-乙腈 (7:3, V/V)、甲醇-乙腈 (5:5, V/V) 为提取溶剂, 提取时间为 15 min, 结果表明, 甲醇提取率最低, 甲醇-乙腈 (9:1, V/V) 提取率明显升高, 甲醇-乙腈 (7:3, V/V) 与甲醇-乙腈 (5:5, V/V) 的提取率并无明显差别, 因此, 采用甲醇-乙腈 (7:3, V/V) 作为提取溶剂。

本试验中 β -胡萝卜素为微囊包埋制剂, 破坏微囊的方式的选择至关重要。大部分方法采用皂化, 但操作繁琐, 难以实现全程避光, β -胡萝卜素损失较大^[10, 19-21]。本试验采用 0.1 mol/L 的碳酸钠溶液超声破坏微囊, 而且碳酸钠溶液为弱碱性, 为

β -胡萝卜素提供了稳定的溶液环境, 操作简捷, 能达到快速检测的要求。

若采用 C_{18} 柱 (4.6 $\text{mm} \times 150\text{mm}$, 5 μm) 分离 β -胡萝卜素, 单次分析时间超过 30 min。因此, 选用 C_8 柱 (4.6 $\text{mm} \times 150\text{mm}$, 5 μm), 在此条件下, β -胡萝卜素不受杂质干扰, 整个运行时间缩短至 6 min 以内, 提高了检测的效率, 适用于大批量生产的检验。

参考文献

- [1] ZHANG P, Omaye S T. Antioxidant and prooxidant roles for β -carotene, α -tocopherol and ascorbic acid in human lung cells [J]. Toxicology in Vitro, 2001, 15(1): 13-24.
- [2] Mathews-Roth M M, Pathak M A, Fitzpatrick T K. β -carotene therapy for erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases [J]. Archives of Dermatology, 1977, 113(9): 1229-1234.
- [3] Tamimi R M, Hankinson S N, Campos H, et al. Plasma carotenoids, retinol, and tocopherols and risk of breast cancer [J]. American Journal of Epidemiology, 2005, 161(2): 153-160.
- [4] Kim H J, Kim M K, CHANG W K, et al. Effect of nutrient intake and Helicobacter pylori infection on gastric cancer in Korea: a case-control study [J]. Nutrition and Cancer, 2005, 52(2): 138-146.
- [5] Dulinska J, Gil D, Zagajewski J, et al. Different effect of β -carotene on proliferation of prostate cancer cells [J]. Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease, 2005, 1740(2): 189-201.
- [6] Steinel H H, Baker R S U. Effects of β -carotene on chemically-induced skin tumors in HRASKh hairless mice [J]. Cancer Letters, 1990, 51(2): 163-168.
- [7] Oliver L K. Colorimetric analysis of vitamin A and carotene [J]. Methods in Enzymology, 1980, 67: 199-203.
- [8] Jialal I, Fuller C J. Oxidized LDL and antioxidants [J]. Clinical Cardiology, 1993, 16(1): 16-19.
- [9] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.83—2003 食品中胡萝卜素的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [10] 中华人民共和国卫生部. GB 5413.35—2010 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中 β -胡萝卜素的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [11] Prates J A M, Quaresma M A G, Bessa R J B, et al. Simultaneous HPLC quantification of total cholesterol, tocopherols and β -carotene in Barrosa-PDO veal [J]. Food Chemistry, 2006, 94(3): 469-477.
- [12] Kandlakunta B, Rajendran A, Thingnganing L. Carotene content of some common (cereals, pulses, vegetables, spices and condiments) and unconventional sources of plant origin [J]. Food Chemistry, 2008, 106(1): 85-89.
- [13] Barba A I O, Hurtado M C, Mata M C S, et al. Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables [J]. Food Chemistry, 2006, 95(2): 328-336.
- [14] Hosotani K, Kitagawa M. Improved simultaneous determination method of β -carotene and retinol with saponification in human serum and rat liver [J]. Journal of Chromatography B, 2003, 791(1/2): 305-313.
- [15] 潘红艳, 郭启雷, 杨红梅. 高效液相色谱法测定杏果肉中 β -胡萝卜素含量 [J]. 食品研究与开发, 2015, 36(3): 107-109.

- [16] 胡建中,王可兴,潘思轶. 高效液相色谱法测定柑橘汁中类胡萝卜素[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 634-636.
- [17] 苟锐锋,柴沙驼,高丹,等. 牦牛肉及脂肪中 β -胡萝卜素含量测定[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(22): 82-86.
- [18] 罗光宏,王勤,袁小龙,等. RP-HPLC法测定螺旋藻中 β -胡萝卜素的含量[J]. 食品科学, 2013, 34(22): 243-245.
- [19] 宋书锋,张烁,刘艳君,等. 高效液相色谱法测定保健食品中微囊化 β -胡萝卜素[J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45(5): 447-448.
- [20] 刘梅芳,李帮锐,刘永康,等. 高效液相色谱法测定保健食品中 β -胡萝卜素[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(4): 847-848.
- [21] 韩志辉,许克平. 高效液相色谱法测定复方维生素片中 β -胡萝卜素[J]. 理化检验-化学分册, 2013, 49(4): 411-416.

实验技术与方法

食品及空心胶囊中铬测定的前处理方法的研究

沙博郁¹, 孟亚楠², 孙开奇¹, 薛颖¹

(1. 北京市疾病预防控制中心, 北京 100013; 2. 北京市东城区疾病预防控制中心, 北京 100009)

摘要:目的 探究不同前处理方法对食品及明胶空心胶囊中铬测定结果的影响。方法 采用湿消解法、微波消解法、干灰化法进行样品前处理,石墨炉原子吸收法进行测定。结果 3种前处理方法对标准物质的检测结果除干灰化法奶粉的检测略低外,均在标准值规定的范围内;3种前处理方法对8种样品的检测结果的统计学分析显示,湿消解法与微波消解法之间差异无统计学意义($P > 0.05$),而干灰化法与其他两种消解方法之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 本试验所用的3种前处理方法均可用于食品中铬的检测;湿消解法的实用性较强,对于任何基质的样品都可以进行很好的消解;干灰化法的空白值低,方法操作简单,但检测结果偏低;微波消解法样品消解时间短、空白值较低、试剂用量少、重现性好。

关键词: 铬; 石墨炉原子吸收; 样品消解; 食品; 空心胶囊; 前处理

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2017)01-0059-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2017.01.013

Pretreatment method for determination of chromium in foods and hollow capsule

SHA Bo-yu¹, MENG Ya-nan², SUN Kai-qi¹, XUE Ying¹

(1. Beijing Municipal Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China;

2. Dongcheng District Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100009, China)

Abstract: Objective To study the effects of different pretreatment methods for determination of chromium in food and gelatin hollow capsule. **Methods** Sample pretreatment was conducted by wet digestion, microwave digestion and dry ashing. The content of chromium in food and gelatin capsule was determined by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Results** The results of the three methods for 4 kinds of standard material were in the range of the standard value. Statistical results of the three methods for 8 samples showed that there was no significant difference between wet digestion and microwave digestion ($P > 0.05$), but there was significant difference between the dry ashing and the other two digestion methods ($P < 0.05$). **Conclusion** The three methods could be used for the determination of chromium in foods. Wet digestion was suitable for any food matrix. Dry ashing had the advantages of simple operation and low blank value, but test result was lower than the other two methods. Microwave digestion had the advantages of fast, low blank value, less reagent consumption and good repeatability.

Key words: Chromium; graphite furnace atomic absorption spectrometry; sample digestion; food; hollow capsule; pretreatment

样品前处理是元素分析中不可或缺的关键环

节,也是整个分析检测过程中最费时、费力的部分。样品的前处理直接影响着分析的结果,任何的损失或污染都会影响分析结果的准确性。

铬是自然界中广泛存在的一种元素,主要分布在岩石、土壤、大气、水及生物体中。铬主要以三价和六价的形式存在。三价铬是人体必需的微量元

收稿日期: 2016-10-24

作者简介: 沙博郁 男 主管检验师 研究方向为食品元素分析

E-mail: shaboyu@hotmail.com

通信作者: 薛颖 女 研究员 研究方向为食品理化分析

E-mail: xuey0701@sina.com