

2.7 不同前处理方法的比较

为进一步验证本方法的准确性,挑选3份酱油样品,分别稀释10倍直接测定和微波消解后稀释10倍再测定,测定结果见表6。由结果比较可见,采用上述两种前处理方法,12种元素的测定结果误差基本在10%以内,表明酱油样品稀释后存在的有机物对雾化效率及电离效率影响不大,直接测定方法准确可靠。样品1的铝误差稍大,不排除消解过程带来污染。

表6 酱油样品不同前处理方法测定结果(mg/L)

Table 6 Result of soy sauce with different pretreatment

元素	样品1		样品2		样品3	
	直接稀释	微波消解	直接稀释	微波消解	直接稀释	微波消解
Al	1.10	1.81	0.516	0.431	0.826	0.807
Cr	0.046	0.032	0.057	0.060	0.022	0.022
Mn	6.92	7.01	2.08	1.85	4.46	4.42
Fe	11.40	11.20	5.33	5.29	6.09	6.22
Ni	1.16	1.19	0.572	0.512	0.891	0.882
Cu	0.050	0.051	0.044	0.042	0.024	0.019
Zn	2.77	2.65	3.46	3.47	3.15	3.03
As	0.0075	0.0070	0.0042	0.0048	0.010	0.010
Se	0.015	0.012	0.0072	0.0074	0.013	0.012
Cd	0.0023	0.0022	0.0058	0.0057	0.0078	0.0076
Sb	0.0015	0.0018	0.0022	0.0028	0.0072	0.0074
Pb	0.0051	0.0042	0.0063	0.0067	0.012	0.014

3 小结

本研究建立了直接稀释、ICP-MS测定酱油中12种金属的方法,前处理简便、快速准确,适用于高盐液体食品的金属测定。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. GB 2717—2003 酱油卫生标准[S]. 北京:中国标准出版社,2003.

[2] 林立,陈玉红,田艳玲,等. 电感耦合等离子体质谱法直接测定酱油中的铅[J]. 环境化学,2007,26(3):410-412.

[3] 彭荣飞,侯建荣,黄聪. ICP-MS直接测定酱油中Pb和As的研究[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(7):1315-1316.

[4] 彭荣飞,黄聪,卓召模,等. 碰撞池ICP-MS测定近海水中的Cr、As、Se、Cd、Cu、Zn、Hg和Pb[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(12):2529-2531.

[5] 彭寨玉,杜二青,徐淑暖,等. 电感耦合等离子体质谱法直接测定酱油中铅[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(11):2275-2276.

[6] 刘奋,戴京晶,林奕芝,等. ICP-MS测定食品中多种金属元素[J]. 现代预防医学,2002,29(1):43-45.

[7] 蒋励,殷忠. 电感耦合等离子体质谱法测定水中砷的方法改进[J]. 环境卫生学杂志,2013,3(4):369-372.

[8] 荆森,沈阳,沈金灿,等. 应用带八级杆碰撞/反应池(ORS)的电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)同时测定大洋海水中的微量元素[J]. 环境化学,2004,23(5):600-604.

实验技术与方法

高效液相色谱-柱后光化学衍生-荧光检测法测定强化食品中的叶酸

赵海燕,杨永红,刘泰然,李兵,赵榕

(北京市疾病预防控制中心,北京 100013)

摘要:目的 建立柱后光化学衍生-高效液相色谱法(HPLC)测定强化食品中叶酸的分析方法。方法 采用SunFire C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)色谱柱,以乙腈-50 mmol/L磷酸二氢钾溶液(pH=5.0)为流动相梯度洗脱,叶酸在254 nm紫外光照射下进行柱后衍生,荧光检测器检测,激发和发射波长分别为344和428 nm。结果 本方法的线性范围为0.01~2.0 μg/ml,r=0.9999;方法的定性检出限和定量检出限分别为0.01和0.03 μg/g;加标回收率为90.0%~98.0%,RSD均小于5%。结论 本方法简便、快速、准确、重现性好,适用于强化食品中叶酸含量的测定。

关键词:高效液相色谱;柱后光化学衍生;叶酸;强化食品;强化营养素

中图分类号:R155.5;TS201.2 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)04-0347-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.04.011

收稿日期:2013-12-17

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_zhaohaiyan@sina.com

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

Determination of folic acid in fortified foods by high performance liquid chromatography with post-column photochemical derivatization

ZHAO Hai-yan, YANG Yong-hong, LIU Tai-ran, LI Bing, ZHAO Rong

(Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of folic acid in fortified foods by high performance liquid chromatography (HPLC) with post-column photochemical derivatization. **Methods** Chromatographic separation was carried out using a SunFire C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phases was acetonitrile and 50 mmol/L potassium dihydrogen phosphate solution (pH = 5.0) with an optimized gradient elution. Post-column photochemical derivatization of folic acid was under UV-light irradiation at 254 nm. The fluorescence detection was performed with the excitation at 344 nm and the emission at 428 nm. **Results** The linear range was 0.01-2.0 μg/ml, $r = 0.9999$. The limit of detection (LOD) was 0.01 μg/g and the limit of quantification (LOQ) was 0.03 μg/g. The average recoveries were 90.0%-98.0% and the RSD of the method was less than 5%. **Conclusion** The method was simple, rapid, accurate, reproducible, and suitable for the determination of folic acid in fortified foods.

Key words: High performance liquid chromatography; post-column photochemical derivatization; folic acid; fortified foods; strengthening nutrients

叶酸是一种重要的B族维生素,是机体细胞生长和繁殖的必需物质,与许多重要的生化过程密切相关,是维持生物体正常生命过程所必需的一类有机物质^[1-2]。许多研究证实了叶酸与新生儿缺陷,成年与老年心血管病、精神科疾病、胃肠功能异常、免疫学缺陷及肿瘤等具有相关性。此外,研究还发现,叶酸对孕妇尤其重要,产妇每天摄入400 μg叶酸盐,可防止新生儿体重过轻、早产以及婴儿腭裂(兔唇)等先天性畸形^[3]。

美国1998年1月1日起已强制规定在某些谷物食品中强化叶酸,FDA规定1000g谷物食品(如面包、面粉、谷物、大米等)强化1.4mg叶酸。我国已在婴幼儿、老年食品中强化叶酸,但服用过量会出现厌食、恶心、腹胀等胃肠道症状;影响锌的吸收,导致锌缺乏,使胎儿发育迟缓。

目前常用的检测叶酸方法有:高效液相色谱法(HPLC)^[3-7]、分光光度法、吸附溶出伏安法、微生物放射法、荧光衍生法。微生物法的测定步骤繁琐,操作复杂,且属半定量法。分光光度法的选择性较差,特别对复杂成分的样品,干扰较大,检测结果准确性较差。HPLC实现了叶酸的完全分离,特异性高,但由于叶酸的含量较其他水溶性维生素低,使用紫外检测器时须加大取样量,从而对结果造成严重干扰。由于叶酸本身的荧光很弱,一般用间接荧光法测定。间接荧光法^[8-9]有两种:一种是氧化法,通常采用高锰酸钾或过氧化氢为氧化剂,经过氧化后叶酸的荧光强度明显提高;另一种是光化学反应法,叶酸在254 nm^[9]紫外光照射后光化学产物的荧光强度能较大增强,具有较高的灵敏度。目前这些方法仅用于片剂或维生素制剂中痕量叶

酸的测定,对于复杂样品,由于其他水溶性B族维生素的也具有较弱的荧光效应,给定量分析造成很大干扰。

叶酸作为添加剂被适量加入到一些营养强化食品、保健食品中,准确测定叶酸含量对产品的生产加工、功效评价等有重要意义。因此建立简单、快速、准确的测定各种食物尤其是婴幼儿、孕妇强化食品及老年食品中的叶酸含量有重要的现实意义。本方法将HPLC与光化学衍生叶酸荧光增强的特点相结合,建立简便、无需外加试剂、重现性及选择性好、灵敏度较高的检测方法。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂

高效液相色谱仪(配备有Waters-Allains2695泵控及自动进样系统,以及Waters-2475荧光检测器)、光化学柱后衍生器、离心机、超声振荡器。

乙腈、磷酸二氢钾(色谱纯)、氢氧化钾、乙酸、乙酸钠(分析纯),试验用水均为超纯水;乙酸-乙酸钠缓冲液:23g无水乙酸钠加22ml乙酸,稀释至1000ml,调pH=5.0;0.5%氨水溶液:取2.5ml氨水到500ml超纯水中。

叶酸标准品(编号:LB82494v,纯度97%,美国Supelco)。叶酸标准储备液:精密称取0.0100g叶酸标准品于100.0ml容量瓶中,加入适量0.5%氨水超声使叶酸完全溶解后用0.5%氨水定容至刻度,浓度为100.0 μg/ml。

标准系列的配制:移取叶酸储备液1.0ml于10.0ml容量瓶中,用水定容至刻度,浓度为10.0 μg/ml,分别移取稀释液0.01、0.05、0.1、0.5、

1.0、2.0 ml 于 10.0 ml 容量瓶中,用水定容至刻度,浓度为 0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.0 $\mu\text{g/ml}$ 。

1.2 方法

1.2.1 样品处理

低蛋白质含量样品:准确称取 0.20~2.00 g 于 50.0 ml 塑料离心管中,加入 20.0 ml 0.5% 氨水超声提取 20 min 后定容至刻度,摇匀,再以 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 10 μl 液相色谱测定。

配方奶粉等 高蛋白质含量样品:准确称取 1.00~5.00 g 于 50.0 ml 塑料离心管中,加入乙酸-乙酸钠缓冲液/乙腈(90:10, V/V) 20.0 ml 超声提取 20 min 后定容至刻度,摇匀,再以 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 10 μl 液相色谱测定。由于叶酸的光不稳定性,在样品前处理过程中需避光操作。

1.2.2 液相色谱条件

SunFire™ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相 A:50 mmol/L 磷酸二氢钾水溶液(pH=5.0);B:乙腈。梯度洗脱:0~15 min, A:98%~78%, B:2%~22%;15~16 min, A:78%~98%, B:22%~2%;16~25 min, A:98%~78%, B:2%~22%;检测波长: $\lambda_{\text{ex}}=344\text{ nm}$ 、 $\lambda_{\text{em}}=428\text{ nm}$;流速 1.0 ml/min,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,进样体积 10 μl 。

1.2.3 定性及定量

分别取标准和样品各 10 μl 进样,HPLC 测定。以保留时间定性,外标法定量。

1.2.4 计算公式

$$C = \frac{c \times v}{W}$$

式中,C:样品中的含量($\mu\text{g/g}$),c:叶酸的测定浓度($\mu\text{g/ml}$),v:定容体积(ml),W:样品重量(g)。

2 结果与分析

2.1 流动相的选择

2.1.1 流动相中盐的选择

分别选用对磷酸二氢钾-乙腈及乙酸铵-乙腈两种流动相体系进行对比试验发现,乙酸铵作为流动相时叶酸的荧光响应值很低,而磷酸二氢钾作为流动相时叶酸的荧光响应值很高,方法的灵敏度高,故选用磷酸二氢钾溶液作为流动相。

2.1.2 流动相浓度的确定

选择浓度分别为 20、30、40、50、60 mmol/L 磷酸二氢钾作为流动相,对同一叶酸标准品进行检测,比较响应值。发现随着磷酸二氢钾溶液的浓度上升,色谱响应值也会随之上升,且随着离子浓度的增加,待测组分与杂质的分离效果越好,在流动相中磷酸二氢钾浓度为 50 mmol/L 时,待测组分可以

与杂质完全分离,灵敏度也足够分析低含量样品。

2.1.3 流动相 pH 的确定

在 50 mmol/L 磷酸二氢钾浓度下调节 pH 值为 4.2、4.5、5.0、6.0,比较色谱图,来确定最佳 pH 值。通过试验发现,当 pH=5.0 时,色谱峰峰型对称,没有拖尾现象。

通过上述试验比较,最终确定流动相为 50 mmol/L 磷酸二氢钾水溶液(pH=5.0)和乙腈,采取梯度洗脱,有效改善峰型,增强了保留时间,可有效地与杂质分开(见图 1、2)。

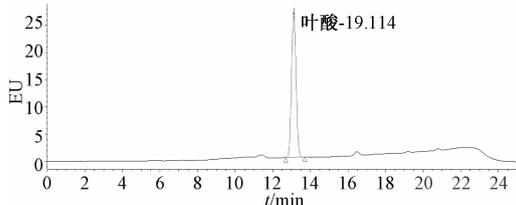


图 1 叶酸标准色谱图

Figure 1 Chromatogram of folic acid standard

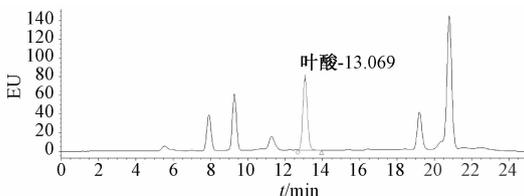


图 2 样品色谱图

Figure 2 Chromatogram of a real sample

2.2 检测波长的选择

将叶酸加入空白奶粉中进行 HPLC 分离,并对其激发和发射波长进行扫描(见图 3、4)。选择检测波长 $\lambda_{\text{ex}}=344\text{ nm}$ 、 $\lambda_{\text{em}}=428\text{ nm}$ 为最佳检测波长。

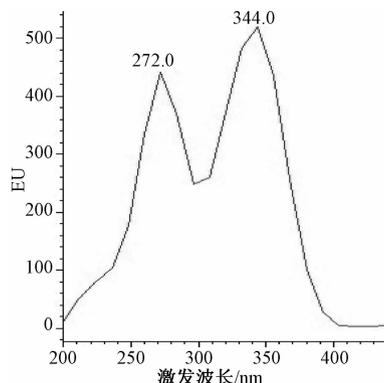


图 3 叶酸的激发光谱图

Figure 3 Excitation spectra of folic acid

2.3 样品制备方法的优化

由于叶酸具有在酸性溶液不稳定,在中性及碱性溶液中稳定的特性。对同一样品,分别用 0.5% 氨水和水做提取,比较结果。发现用 0.5% 氨水的提取效率比用水的高,且重现性好。

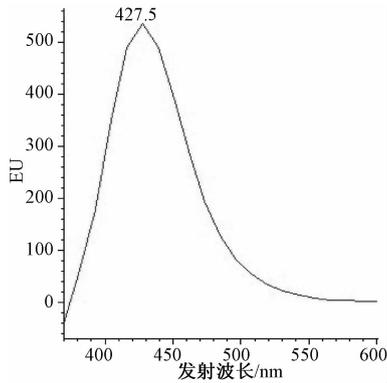


图4 叶酸的发射光谱图

Figure 4 Emission spectra of folic acid

乳制品提取中有蛋白沉淀产生,使得上清液不够清亮,故乳制品提取中存在蛋白沉淀去除的问题。本研究采取乙腈、乙酸、乙酸-乙酸钠缓冲溶液以及乙酸-乙酸钠缓冲溶液/乙腈(90:10, V/V)来进行提取效率的比较。用乙腈提取,蛋白沉淀无法完全去除。用乙酸提取,响应值较低,测得叶酸含量下降。用乙酸-乙酸钠缓冲溶液提取,可以将蛋白沉淀去除,但回收率较低。若乙酸-乙酸钠缓冲溶液提取时加少量乙腈,可以将蛋白沉淀去除,且损失较小,回收率较高。通过试验发现最佳提取溶液为乙酸-乙酸钠缓冲溶液/乙腈(90:10, V/V)。

2.4 回归方程及检出限结果

在最佳液相色谱条件下,分别将配制好的标准系列注入 HPLC 测定,检出限和定量限分别为 0.01 和 0.03 $\mu\text{g/g}$,以峰面积为纵坐标(y),浓度为横坐标(x),绘制标准曲线为 $y = 20800000x + 11100$ 。叶酸浓度在 0.01 ~ 2.00 $\mu\text{g/ml}$ 范围内与响应值成良好的线性关系, $r = 0.9999$ 。

2.5 精密度试验

对同一样品取样 6 份处理后进样测定。配方奶粉:0.556、0.556、0.607、0.569、0.571、0.573 $\mu\text{g/g}$ 。维生素泡腾冲剂剂:15.642、15.899、15.303、15.312、16.3、15.69 $\mu\text{g/g}$ 。RSD 分别为 4.2% 和 2.6%。

2.6 回收率试验

用不含叶酸辅料的泡腾片和奶粉作为样品,分别准确称取 1.0 g 作为空白本底,在奶粉中分别加入叶酸标准溶液(10.0 $\mu\text{g/ml}$) 80.0、60.0、40.0 μl ; 泡腾片中分别加入 300.0、600.0、900.0 μl 叶酸标准溶液,按 1.2 方法处理样品并测定,回收率结果见表 1。

2.7 实际样品测定

对 8 种样品进行测定的结果表明,本方法从低含量到高含量样品均可测定,结果见表 2。

表1 加标回收试验($n=6$)

样品类型	加标量 /($\mu\text{g/g}$)	测定值 /($\mu\text{g/g}$)	平均回收率 /%	RSD /%
奶粉	0.8	0.78	97.5%	4.3
	0.6	0.54	90.0%	3.4
	0.4	0.36	90.0%	2.9
泡腾片	3.0	2.94	98.0%	2.8
	6.0	5.53	92.2%	2.3
	9.0	8.34	92.7%	2.1

表2 样品测定结果

Table 2 Analytical results of folic acid in real samples by the method

样品名称	测定值/($\mu\text{g/g}$)
B 族维生素补充剂	37.89
复合维生素补充剂	112.08
复合维生素胶囊	57.73
儿童维生素泡腾冲剂	16.30
婴幼儿配方奶粉 1	0.57
婴幼儿配方奶粉 2	1.03
婴幼儿配方奶粉 3	0.72
婴幼儿配方奶粉 4	0.70

3 小结

本研究采用柱后光化学衍生技术,与高效液相色谱技术结合建立了强化食品中叶酸的检测方法,使叶酸转化为具有荧光吸收的物质,灵敏度大大提高,干扰减小,且线性范围宽,相关性好,精密度和准确性均较高,满足检测要求,为食品中叶酸的检测提供实用的技术手段。

参考文献

- [1] 阚静,李莉,许激扬.叶酸的生物合成及其代谢工程研究进展[J].中国生化药物杂志,2009,30(4):284-286.
- [2] Barbara A, Bowman, Robert M, et al. 现代营养学[M]. 荫士安,汪之项,王茵.北京:人民卫生出版社,2008:273-298.
- [3] 包怡红,石丹,贾云虹,等.固相萃取-反相高效液相色谱法检测婴幼儿配方乳粉中叶酸的含量[J].营养学报,2009,31(3):289-292.
- [4] 刘莉治,罗晓燕,周洪伟,等.高效液相色谱柱后衍生法测定婴幼儿食品中的叶酸[J].中国卫生检验杂志,2007,17(7):1179-1180.
- [5] 国际生命科学学会中国办事处,中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,中国营养学会保健食品分会.食品营养成分检测技术学术研讨会——维生素专题[C].北京,2006.
- [6] 陈璇,白小红.固相萃取-光化学荧光-高效液相色谱测定血浆中叶酸含量[J].中国药学杂志,2005,40(17):1346-1348.
- [7] Achim F, Peter S, Michael R. Specific and sensitive quantification of folate vitamers in foods by stable isotope dilution assays using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Anal Bioanal Chem, 2003(376):149-156.
- [8] 郭健,李敏,孟妍,等.荧光分光光度法测定食品中叶酸的含量[J].中国公共卫生,2003,19(10):1259-1261.
- [9] 贾蕊,安会梅,朱若华,等.衍生荧光法测定蔬菜样品中痕量叶酸含量的研究和应用[J].首都师范大学学报:自然科学版,2006,27(1):59-62.