



阀切换系统实现食品中维生素 D、辅酶 Q10 的高灵敏度分析

周提军 荒井裕子 城田修

(资生堂(中国)投资有限公司)

摘要: 通过阀切换方式使食品中低含量的营养素分析变得准确、快捷。奶粉中维生素 D 及西兰花中辅酶 Q10 的分析时, 存在杂质对样品的分离干扰严重、分离困难的共通现象, 本实验通过阀切换系统对大部分杂质进行弃除, 仅将含有目标物质的部分切换到分析系统中, 在分析系统中进行二次分离, 有效改善了分离效果, 同时由于只让少量杂质进入色谱柱, 起到了保护色谱柱, 延长色谱柱使用寿命的效果。

Abstract: Column-switching methods to analyze trace amount of nutritives in food more accurately and quickly were developed. Matrices in food sample are known to badly interfere with determination of nutritives, such as vitamin D in milk powder and coenzyme Q10 in broccoli. The methods are designed to remove most of impurities with a column-switching process, which only transfer the analyte-containing fraction to a secondary separation. The new analytical method were found to improve both separation efficiency and lifetime of the analytical column.

关键词: 阀切换, 维生素 D, 辅酶 Q10

一、介绍

通常, 食品中亲油性微量物质的检测具有较高难度, 因为亲油性物质一般含在油份或是表面活性剂物质中, 所以使用仪器分析进行定量一般不太容易。一般来说, 根据样品成分信息考察前处理方法时, 总会采取操作繁琐, 但能够准确定量的方法。为此, 我们开发了使用半微柱 HPLC 的柱切换法对体液中的微量物质进行直接定量的方法。此次, 我们将报告利用半微柱 HPLC 柱切换法进行食品中亲油性微量物质分析的两个应用例: 维生素 D 和辅酶 Q10 的分析。

二、实验部分

1. 阀切换方法分析奶粉中的维生素 D

1.1. 仪器与试剂

半微柱高效液相色谱仪(资生堂), 高压切换阀, 二极管阵列检测器, 旋转蒸发仪, 高纯氮气瓶, 万分之一天平, 恒温磁力搅拌器。

超纯水, 无水硫酸钠, 无水乙醇(分析纯), 异丙醇(色谱纯), 正己烷(色谱纯), 石油醚(沸程 30℃~60℃), 维生素 C 的乙醇溶液(15g/L), 氢氧化钾水溶液(250g 固体氢氧化钾加入 200mL 水中溶解), 维生素 D 的标准品, 几种不同厂家奶粉样品。

1.2 样品处理和标准溶液的配制

1.2.1 样品处理

称取 10g 奶粉样品于 250mL 三角瓶中，用 50mL 45℃~50℃ 超纯水使其溶解，混合均匀。于上述处理的试样溶液中加入约 100mL 维生素 C 的乙醇溶液，充分混匀后加入 25mL 氢氧化钾水溶液混匀，放入磁力搅拌棒，充氮气排出空气，盖上胶塞。1000mL 烧杯中加入约 300mL 的水，当水温控制在 $53 \pm 2^\circ\text{C}$ 时，将三角瓶放入烧杯中，磁力搅拌皂化约 45 分钟，取出后冷却到室温。用少量水将皂化液全部转入 500ml 分液漏斗中，加入 100mL 石油醚，轻轻摇动，室温下振荡约 10 分钟后静止分层，将水相转入到另一 500mL 分液漏斗中，按上述方法进行第二次萃取，合并醚液，水洗至中性。醚液通过无水硫酸钠过滤脱水，滤液收入 500mL 圆底烧瓶中，于旋转蒸发器上在 $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 条件下蒸至近干。残渣用少量石油醚转移至小烧杯中，用氮气吹干后用 3mL 正己烷溶解，待测。

1.2.2 标准溶液的配置

称取 10.4mg 维生素 D₃ 于 100mL 容量瓶中用正己烷溶解定容，取 100 μL 标准溶液用 900 μL 正己烷进行 10 倍稀释，该稀释溶液分别用移液枪吸取 20 μL 、40 μL 、60 μL 、80 μL 、100 μL 用正己烷配置成 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.4 $\mu\text{g/mL}$ 、0.6 $\mu\text{g/mL}$ 、0.8 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液。

1.3 色谱分析条件

色谱柱初次分离时使用 CAPCELL PAK NH₂ UG80 S5 2.0mm i.d.×150mm，二次分离时使用两根 Silica SG80 S5 2.0mm i.d.×250mm 串联；初次分离流动相为正己烷：异丙醇（98/2，v/v），二次分离流动相为正己烷：异丙醇（95/5，v/v）；流速 200 $\mu\text{L/min}$ ；检测器 PDA265nm；温度 40℃；进样量 10 μL ；阀切换：从开始到 4.8 分钟以内，阀处于位置 A，4.8 分钟到 6.5 分钟，阀切换到 B 的位置，6.5 分钟后，阀切换到 A 的位置，运行到分析结束，装置流路见 Figure1。

【装置流路】

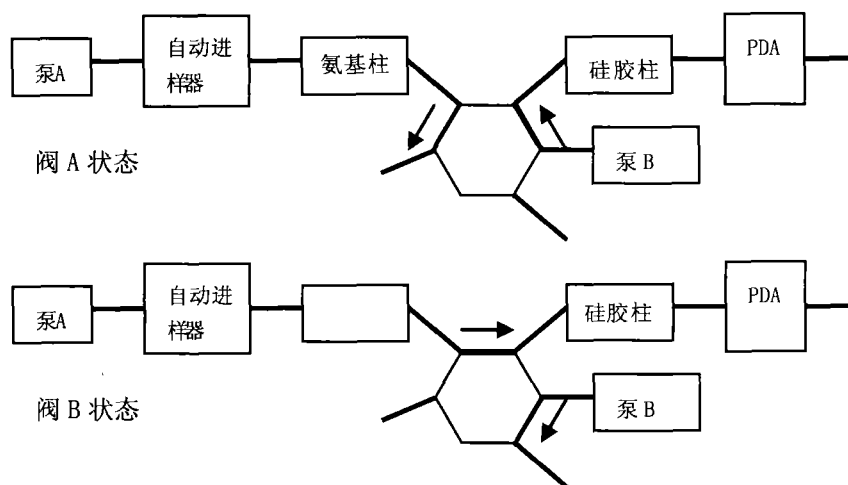


Figure1 维生素 D 装置流路图

2. 食品中辅酶 Q10 的分析

2.1. 仪器与试剂

半微柱高效液相色谱仪（资生堂），高压切换阀，电化学检测器，离心机（转速 ≥ 5000 转），万分之一天平，超声仪。

异丙醇（色谱纯），甲醇（色谱纯），高氯酸钠，超纯水，氧化型辅酶 Q10 标品，还原型辅

酶 Q10 标品, 辅酶 Q10 胶囊, 西兰花。

2.2 样品的处理和标准品溶液的配制

2.2.1 食用 Q10 胶囊: 取 0.5030g 样品溶于 10mL 异丙醇中, 超声 10min, 取 100 μ L 样品加入 10mL 容量瓶中, 加入 10mL 90% 异丙醇水溶液定容, 用 0.45 μ m 膜过滤, 待测。

2.2.2 西兰花中 Q10 处理: 将西兰花干燥, 用研钵研磨成粉末, 称取粉末 0.4681g, 加入到 10mL 容量瓶中, 加入 10mL 异丙醇, 超声提取 30min, 吸取上述溶液 50 μ L 加入 950 μ L 90% 异丙醇水溶液, 用 0.45 μ m 膜过滤, 待测。

2.2.3 标准品溶液的配制

精密称取 10mg 氧化型辅酶 Q10 用 90% 异丙醇水溶液超声溶解, 配置成 0.1mg/mL 的标准品备用。经稀释得到 1ng/mL, 10ng/mL, 20ng/mL, 50ng/mL, 100ng/mL, 200ng/mL, 500ng/mL, 1000ng/mL, 2000ng/mL, 3000ng/mL, 5000ng/mL 的标准品溶液。

还原型辅酶 Q10 溶液的配制, 取实验用辅酶 Q10 胶囊一颗 (含还原型 Q10 30 μ g),

切开放入 10mL 容量瓶中, 加 10mL 异丙醇, 超声溶解 1min; 取 100 μ L 上述溶液放入样品瓶中, 加 10mL 容量瓶中, 用 90% 异丙醇水溶液定容, 充分混合, 待用。

2.3 色谱分析条件

色谱柱采用 SHISEIDO CQ-C (前处理色谱柱, 资生堂 C18 2.0mm i.d. \times 35mm, 5 μ m), SHISEIDO CQ-S (分析色谱柱, 资生堂 C18 2.0mm i.d. \times 150mm, 5 μ m) 和 SHISEIDO CQ-R (还原色谱柱 2.0mm i.d. \times 20mm, 5 μ m); 前处理柱流动相采用甲醇: 水 (95/5, V/V) 并含有 50mM NaClO₄ 的溶液, 流速 200 μ L/min; 分析流动相采用甲醇: 异丙醇 (90/10, V/V) 并含有 50mM NaClO₄ 的溶液, 流速 240 μ L/min; 电化学检测器电压设定在 650mV; 柱温箱 40 $^{\circ}$ C; 自动进样器冷却温度为 4 $^{\circ}$ C; 切换阀设定 (见下图): 从开始到 2 分钟内, 阀处于 A 位置, 2 分钟后, 阀切换至 B 位置, 直至分析结束, 装置流路见 Figure2。

三、结果与讨论。

1. 奶粉样品前处理。

分别加入正己烷直接萃取固体奶粉、加入水溶解奶粉后直接用正己烷萃取。其中直接加入正己烷萃取, 无法将维生素 D 萃取出来, 加水溶解后的样品不经过皂化直接萃取时, 会出现大量的乳化层, 在分层时造成困难, 会有部分样品丢失, 检测结果偏低, 最后选择了国标前处理方法, 未进行回收率实验。



【装置流路】

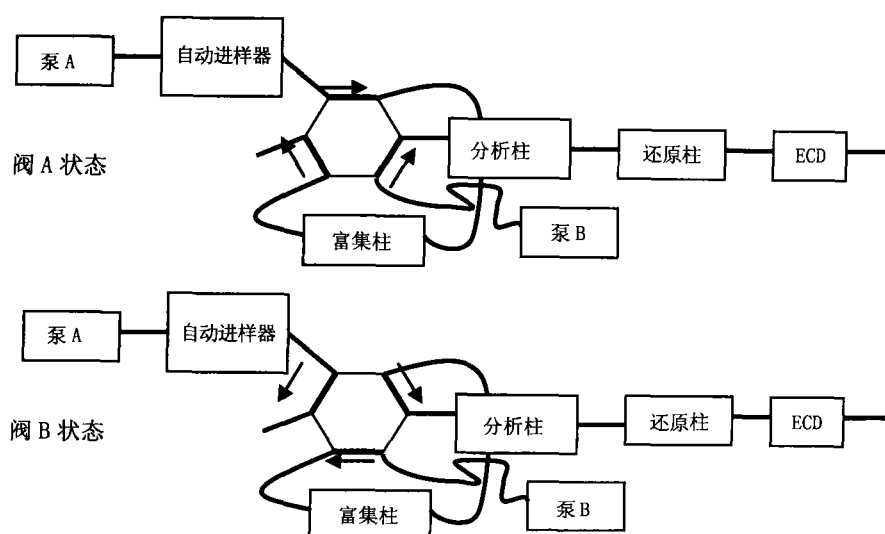


Figure2 辅酶 Q10 装置流路图

2. 维生素 D 的确认。

通过单标保留时间及维生素 D 紫外吸收光谱图来确认，相似度 0.9945，见图 Figure3。

3. 复溶液体积对维生素 D 分析的影响

旋转蒸发的样品通过正己烷洗到小烧杯中，吹干后用不同的体积的正己烷溶解，对液相

分析的基线会有影响，使得基线抬升。本实验考察了 1mL 正己烷溶解和 3mL 正己烷溶解两组不同数据。通过实验可以看出样品浓度过高时，基质对样品分析影响较大，稀释后得到解决，见图 Figure4。

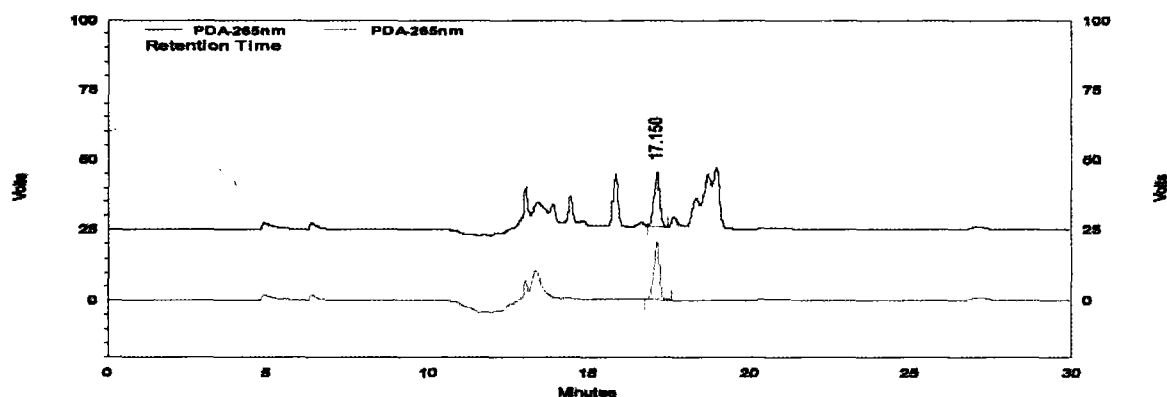
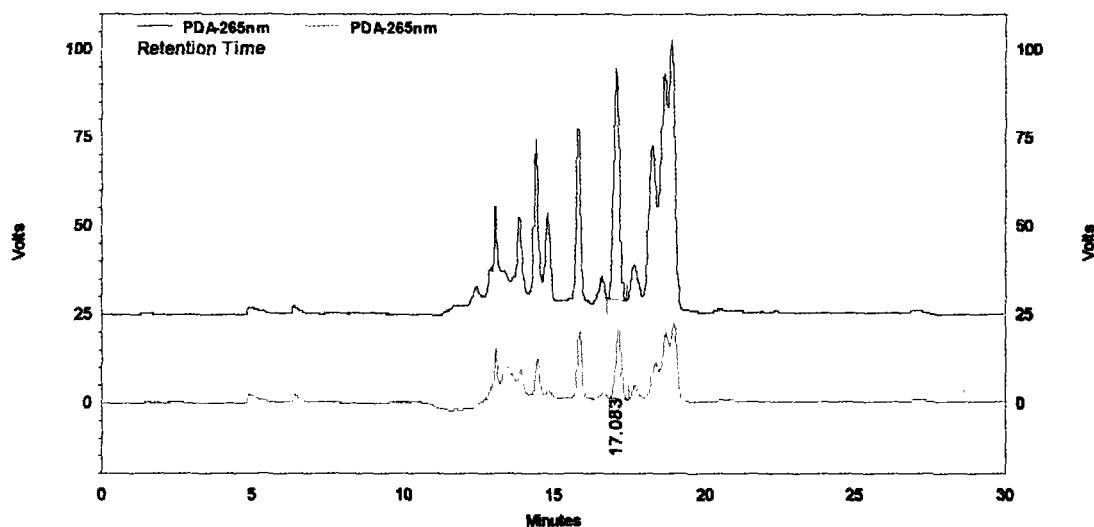


Figure3 维生素D的确认



4. 几种不同厂家样品的分析。

本实验选择了杂质含量较高的婴幼儿奶粉两种以及一种成人奶粉进行分析。杂质和样品分离效果较好，其中分析结果 B 公司及 C 公司检测结果偏高。

样品名称	检测 VD 含量	VD 标称含量
婴幼儿成长配方奶粉 (A 公司)	9.8 $\mu\text{g}/100\text{g}$	10 $\mu\text{g}/100\text{g}$
较大婴幼儿配方奶粉 (B 公司)	15.1 $\mu\text{g}/100\text{g}$	350 IU/100g
全脂甜奶粉 (C 公司)	9.0 $\mu\text{g}/100\text{g}$	6.5 $\mu\text{g}/100\text{g}$

5. 通过上述方法对食用辅酶 Q10 及富含辅酶 Q10 的西兰花进行了检测，样品与杂质有较好的分离，检测结果见 Figure5、Figure6。

奶粉中维生素 D 及食用辅酶 Q10、西兰花中辅酶 Q10 的共同点是分析时样品杂质较多，对目标峰干扰过大，通过阀切换方法仅将含有目标峰部分切入到二次分离色谱柱中，通过二次分离色谱柱对该样品进行二次分离，这样大大降低了杂质的干扰，使得分析定量结果更加准确，见 Figure7。

本实验中维生素 D 分析的方法均为正相系统切换到正相系统，使得方法看起来有局限性，如果进行接下来的实验，尝试完成正相系统切换到反相系统将对该实验有个比较大的推动作用。对辅酶 Q10 的分析时，由于样品极易氧化，前处理样品时没有对样品采取保护措施，使得样品中 Q10 分析并不十分准确，再次进行分析时应对样品中加入抗氧化剂，使得前处理效果更好。

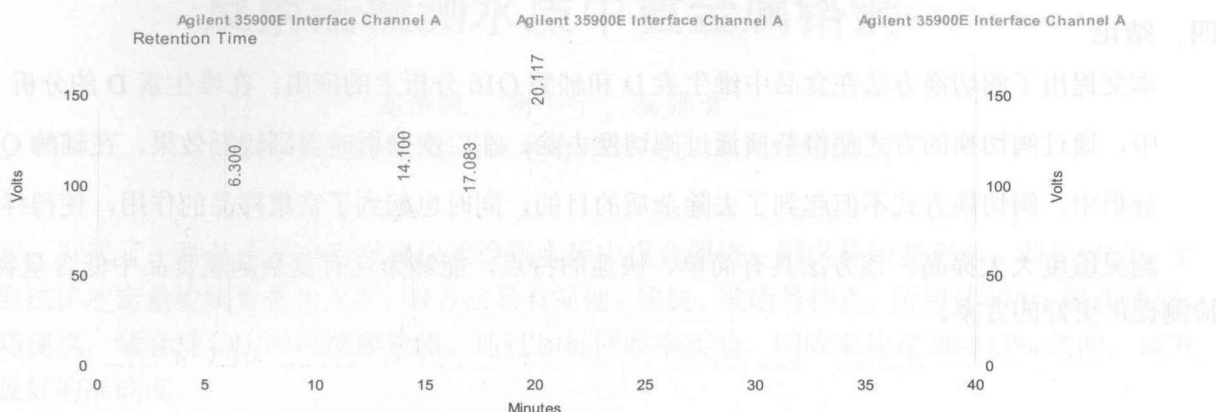


Figure 5 CoQ10胶囊分析谱图

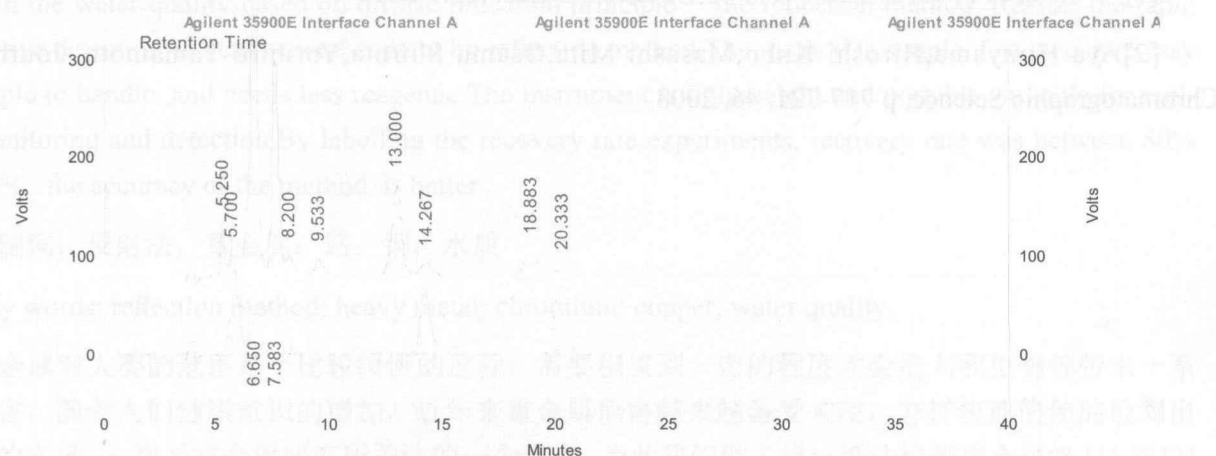
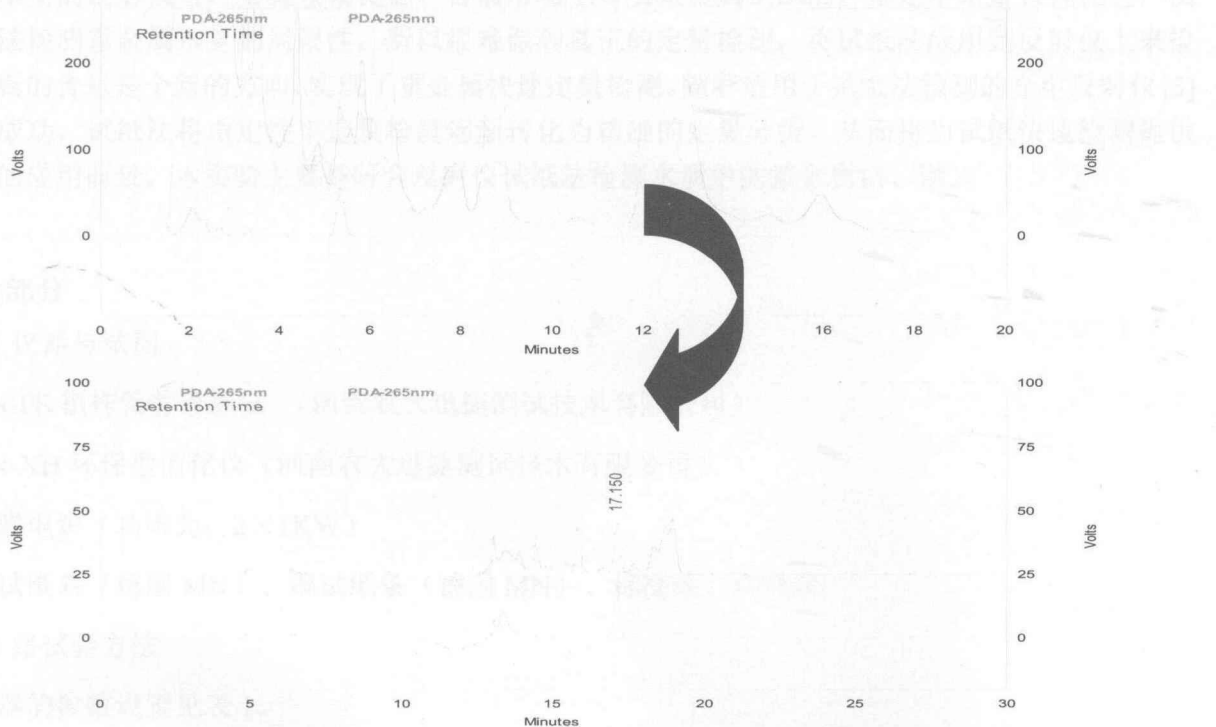


Figure 6 西兰花分析谱图





四、结论

本文提出了阀切换方法在食品中维生素 D 和辅酶 Q10 分析上的应用。在维生素 D 的分析中,通过阀切换的方式使得杂质通过阀切换去除,在二次分析时得到较好效果。在辅酶 Q10 分析中,阀切换方式不但起到了去除杂质的目的,同时也起到了富集样品的作用,使得样品检测灵敏度大大提高。该方法具有简单、快速的特点,能够为含有复杂基质食品中低含量物质的检测提供更好的方案。

【参考文献】

- [1] 中华人民共和国卫生部 食品安全国家标准 GB5413.9-2010
- [2] Aya Hirayama, Hiroshi Kubo, Masashi Mita, Osamu Shirota, Yorihiro Yamamoto. Journal of Chromatographic Science, p 717-721, 46, 2008