

固相萃取 - 离子对液相色谱法测定 保健品中的叶酸

吕运开, 边超, 王燕桓, 秦新英

(河北大学化学与环境科学学院, 河北省分析科学技术重点实验室, 河北保定 071002)

摘要: 建立了一种快速、准确、灵敏的固相萃取 - 离子对反相高效液相色谱测定保健品中叶酸的方法。用 Chromabond-SB 萃取小柱富集保健品中的叶酸, 以四丁基溴化铵为离子对试剂, 优化了色谱条件。采用 Lu-Na C₁₈ 色谱柱(250mm × 4.6mm, 5 μm), SPD-6AV 紫外可见吸收检测器, 流动相为 0.05mol/L KH₂PO₄-0.01mol/L 四丁基溴化铵 - 乙腈(88:2:10, V/V), 用磷酸调节 pH5.5, 流速 1.0ml/min, 检测波长 284nm。结果表明: 叶酸在 0.06~2.40 μg/ml 浓度范围内, 峰面积和浓度呈良好的线性关系, 相关系数为 0.9996, 最小检出限为 0.008 μg/ml, 加标回收率为 95.14%~102.87%。

关键词: 固相萃取; HPLC; 保健品; 叶酸

Solid-phase Extraction and Ion-pair RP-HPLC Determination of Folic Acid in Health Food Products

LÜ Yun-kai, BIAN Chao, WANG Yan-huan, QIN Xin-ying

(Key Laboratory of Analytical Science and Technology of Hebei Province, College of Chemistry and Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: A simple, rapid, accurate and sensitive method of solid-phase extraction and ion-pair RP-HPLC was developed for the determination of folic acid (FA) in health food products. Solid-phase extraction (SPE) was performed to enrich FA extracted using a Chromabond-SB cartridge with strong anion exchange material. The addition of tetra-n-butylammonium, as an ion-pairing reagent, from samples was found to significantly increase the retention time of FA, thus leading to a well shaped and clearly separated single peak. The analysis was performed on a Lu-Na C₁₈ column (5 μm, 250 mm × 4.6 mm) using a mobile phase composed of 0.05 mol/L KH₂PO₄ solution, 0.01 mol/L tetra-n-butylammonium and acetonitrile (88:2:10, V/V, pH 5.5) at a flow rate of 1 ml/min, with the UV detection set at 284 nm. In the range of 0.06—2.40 μg/ml, a good linear relationship between peak area and FA concentration was found, and the correlation coefficient and the LOD were 0.9996 and 0.008 μg/ml, respectively. The spike recoveries for FA in three commercial health food products ranged from 95.14% to 102.87%.

Key words: solid-phase extraction; HPLC; health food products; folic acid

中图分类号: R151.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)14-0171-04

叶酸(FA)是一种重要的B族维生素,是人和动物为维持正常的生理功能而必需从食物中获得供给的微量有机物质。国际上规定叶酸的日摄入量(recommended dietary allowances, RDA)为 3mg/kg 体重。叶酸缺乏会引起巨幼红细胞贫血、高同型半胱氨酸血症,后者被认为是心血管疾病的独立危险因素。近年来,我国已在婴幼儿、老年食品中强化叶酸。因此,建立简单、

快速、准确的测定各种食物尤其是婴幼儿、孕妇强化食品中的叶酸含量的方法有重要现实意义。

有关叶酸分析的主要方法有分光光度法^[1-3]、高效液相色谱法^[4-6]等。叶立等^[3]建立紫外分光光度法,在 281 nm 波长处测定不同厂家及批号叶酸片中叶酸的含量,但分光光度法干扰因素多,难以得到理想的灵敏度和重现性。任一平等^[6]用质量分数为 0.5% 的过二硫酸钾溶液

收稿日期: 2008-10-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(20675024); 第三十七批中国博士后科学基金项目(2005037629);
河北省教育厅科学计划项目(2006407)

作者简介: 吕运开(1967—),男,教授,博士,主要从事分离科学和食品安全检测技术研究。

E-mail: lvyunkai@hbu.edu.cn

作 HPLC 柱后衍生剂, 经荧光检测器对叶酸进行定量检测, 虽然提高了检测灵敏度, 但是分离效率不高, 且操作繁琐。本实验拟以四丁基溴化铵为离子对试剂, 建立固相萃取反相高效液相色谱法测定保健品中叶酸含量的方法。以期能满足强化食品中叶酸含量的分析要求, 可用于叶酸的质量控制。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

斯利安叶酸片(批号: s071108) 北京北大药业有限公司; 黄金搭档(批号: 1166027658221) 无锡健特药业有限公司; 21 金维他(批号: 08032106) 江西巨元医药生物工程有限公司。

叶酸(结构式见图 1)标准品 中国药品生物制品检定所; 甲醇(色谱纯) 美国 Fisher (Springfield)公司; 乙腈(色谱纯) 天津第二试剂公司; 标准溶液和样品溶液的制备均使用二次蒸馏水, 其他试剂(特别标明的除外)均为分析纯。

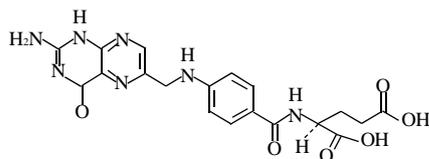


图 1 叶酸结构式

Fig.1 Structure of folic acid

1.2 仪器与设备

LC-9A 高压液相输液泵(配有 SPD-6AV 可变波长紫外可见检测器) 日本岛津公司; Chromabond-SB 萃取小柱(500mg, 3ml); Rheodyne(USA)型进样阀; PHS-29A 型酸度计 上海第二分析仪器厂; HW-2000 色谱工作站 南京千谱软件有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液的配制

精密称取叶酸对照品 30.21mg, 置于 50ml 容量瓶中, 用少量氢氧化钾溶液(3mmol/L)溶解后, 用 0.025mol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.9)稀释至刻度, 定容, 作为标准储备液。分别取一定体积的该标准储备液, 用流动相稀释, 配制成 0.06、0.20、0.50、0.80、1.20、1.60、2.00、2.40 $\mu\text{g/ml}$ 的对照品溶液。

1.3.2 标准工作曲线

选定的色谱条件下, 分别取上述各标准溶液, 进样 10 μl , 记录峰面积, 以峰面积为纵坐标 y, 以叶酸标准溶液浓度($\mu\text{g/ml}$)为横坐标 x, 得叶酸的线性回归方程、线性范围、相关系数。精密吸取叶酸标准溶液 10 μl , 重复进样 5 次, 记录峰面积测得精密度。

1.3.3 固相萃取及供试溶液的配制

将固体样品研细, 精密称取适量(约相当于含叶酸 50 μg)于 50ml 容量瓶中, 加水超声溶解, 并稀释至刻度、摇匀。依次用两倍于 SPE 柱体积(6ml)的环己烷、甲醇和水各 12ml 活化萃取小柱。取溶解后样品 10ml 过滤, 将滤液转移至 SPE 柱中。调节真空压力, 使样品流出速度为 1 滴/s。样品富集完毕后, 用 10ml 0.1mol/ml 醋酸钠溶液(含 10% 氯化钠)进行洗脱, 洗脱液经 0.45 μm 滤膜过滤, 制成供试溶液。

1.3.4 色谱条件

色谱柱: Lu-Na C_{18} 柱(250mm \times 4.6mm, 5 μm); 流动相: 0.05mol/L KH_2PO_4 -0.01mol/L 四丁基溴化铵-乙腈(88:2:10, V/V), 使用前用 0.45 μm 的滤膜过滤并超声脱气; 磷酸调节 pH5.5; 流速: 1.0ml/min; 检测波长: 284 nm; 柱温: 室温。

2 结果与分析

2.1 SPE 条件的优化

在 0.5、1、2、3 滴/s 的上样体积流速下, 洗脱液中检出的叶酸含量依次递减, 说明分析物的回收率与上样的淋洗液体积流速负相关, 但是过慢的上样和淋洗的体积流速会延长样品处理时间, 综合考虑各方面因素以 1 滴/s 的淋洗体积流速比较适用。

在小柱活化和样品富集的流速均为 1 滴/s 条件下, 分别用磷酸盐、醋酸盐溶液及二氯甲烷作固相萃取柱洗脱剂。结果显示用 0.1mol/ml 醋酸钠溶液(含 10% 氯化钠)对样品进行洗脱, 效果较好。

2.2 检测波长的选择

将适当质量浓度的标准溶液倒入比色皿, 在 200~400nm 的波长范围内测定吸收曲线。由扫描图谱选定叶酸的吸收波长为 281nm, 紫外扫描图谱见图 2。在实际检测中, 叶酸在波长 284nm 处有最大吸收, 与扫描结果有些差异。所以, 最终选定 284nm 为检测波长。

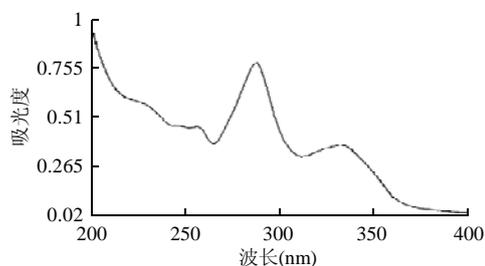


图 2 叶酸紫外扫描图谱

Fig.2 UV absorption spectrum of a standard of FA

2.3 流动相的组成

分别实验了以甲醇和乙腈作为流动相的有机相对色谱峰形的影响。结果显示, 用甲醇作为有机相较乙腈

可以得到较高的理论板数,但是由于甲醇的沸点低于乙腈,使得甲醇作为有机相的流动相在色谱系统中表现出较高的基线噪音。综合考虑各方面因素,选定乙腈作为流动相的有机相,并加入适当离子对试剂来提高分离度。

本实验考察了四甲基溴化铵、四丁基溴化铵、苄基三甲基氯化铵等离子对试剂。结果四甲基溴化铵、苄基三甲基氯化铵的效果均不理想,只有四丁基溴化铵能够有效改善峰形,增加叶酸的保留时间。

分别使用含有乙腈 20%、16%、12%、8%、4% 的 0.05mol/L KH_2PO_4 溶液(含 2% 0.01mol/L 四丁基溴化铵)作为流动相,检测同一浓度标准溶液,通过 k' 的变化,比较其保留时间。

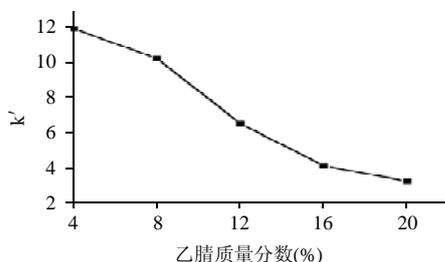


图3 流动相中乙腈质量分数对容量因子的影响

Fig.3 Effects of concentration of acetonitrile on capacity factor

由图 3 可知,当乙腈质量分数较低时,保留时间过长,不利于快速测定;随着乙腈量的增加,流动相洗脱强度加大,出峰时间提前,以 8%~12% 为最佳。因此,最终选定 0.05mol/L KH_2PO_4 -0.01mol/L 四丁基溴化铵-乙腈为 88:2:10(V/V)作为流动相。

2.4 pH 值的影响

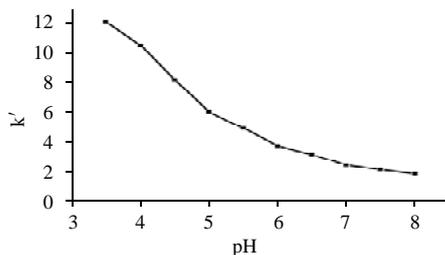


图4 流动相 pH 值对容量因子的影响

Fig.4 Effects of pH value of mobile phase on capacity factor

用磷酸调节流动相的 pH 值,研究了 pH 值对容量因子的影响(图 4)。为了保证离子对的稳定,本实验考察了 pH 值在 3.5~8.0 内变化对组分色谱行为的影响。结果当 $\text{pH} < 5$ 时保留时间太长,随 pH 值的增大,叶酸的峰形得到有效改善,当 $\text{pH} > 6$ 时保留时间明显缩短,难以实现叶酸在样品中与其他组分的分离。为在合适的时间内实现叶酸在样品中与其他组分分离,且不影响分

离效率,选定 $\text{pH} 5.5$ 为流动相 pH 值。

2.5 线性结果

由线性回归实验得样品的回归方程为: $y = 203186.17x + 1079.21$, 线性相关系数 $r = 0.9996$, 线性范围为 $0.06 \sim 2.40 \mu\text{g/ml}$ 。可见在实验所测的浓度范围内,测定结果呈良好的线性关系。在优化后的色谱条件下,叶酸的保留时间为 8.2min,标准品进样色谱图见图 5。

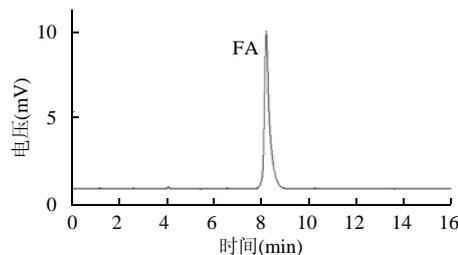


图5 对照品色谱图

Fig.5 HPLC chromatogram of folic acid standard

2.6 精密度及最小检出限

由精密度实验计算叶酸的 $\text{RSD}(n = 5)$ 为 0.54%; 以 3 倍信噪比计算被测物叶酸的检出限为 $0.008 \mu\text{g/ml}$ 。

2.7 溶液稳定性实验

精密量取叶酸标准溶液,分别于 0、1、4、8、12、16、20、24h 进样,记录色谱图,以叶酸峰面积计算 $\text{RSD}(n = 5)$ 为 0.37%(表 1)。结果表明:将标准溶液和样品溶液在 -10°C 左右避光储存于冰箱之中,在 24h 内,这些溶液中叶酸的色谱峰面积没有明显的改变,也没有观察到明显的降解现象,表明标准溶液和样品溶液至少在 24h 内是稳定的。

表 1 溶液稳定性实验测定结果(n = 5)

Table 1 HPLC peak area indicating the stability of folic acid standard solution during storage at -10°C (n = 5)

时间(h)	0	1	4	8	12	16	20	24
峰面积(A)	293768	293609	293481	293192	292774	292107	291232	290985
RSD(%)	0.37							

注:峰面积为平均值。

2.8 加标回收率

表 2 回收率测定结果(n = 3)

Table 2 Spike recoveries for folic acid in three commercial health food products (n = 3)

样品名称	原始值(mg/g)	加入值(mg/g)	测定值(mg/g)	回收率(%)
斯利安叶酸片	3.177	2.00	4.951 ± 0.084	95.63
		3.00	6.102 ± 0.076	98.79
		5.00	8.013 ± 0.095	97.99
黄金搭档	0.051	0.05	0.097 ± 0.003	96.04
		0.10	0.147 ± 0.004	97.35
		0.15	0.192 ± 0.004	95.52
21 金维他	0.127	0.12	0.235 ± 0.005	95.14
		0.24	0.359 ± 0.007	97.82
		0.36	0.501 ± 0.006	102.87

注:测定值为“平均值±标准差”。下同。

取已知叶酸含量的保健品3份,分别加入不同量的叶酸标准液,按样品中叶酸的含量测定方法(1.3.3节)测定,每份平行测定3次,计算回收率,结果见表2。

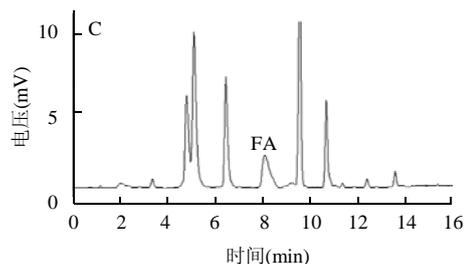
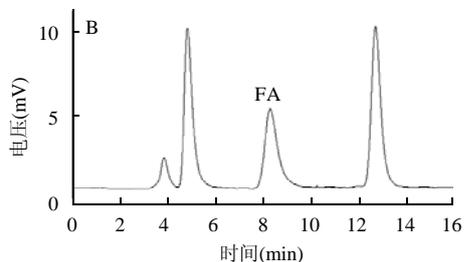
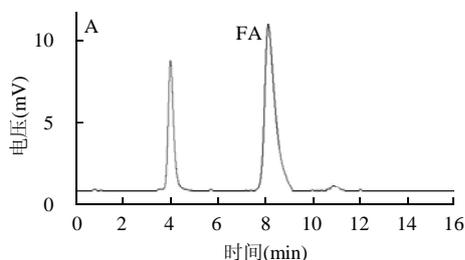
2.9 样品测定结果

精密吸取各样品供试溶液进样10 μ l,色谱图见图6,记录峰面积,用峰面积结合叶酸线性方程计算各保健品中叶酸含量。计算结果见表3。

表3 样品叶酸标示值和测定值分析($n=3$)

Table 3 Comparison of label contents and determined contents of folic acid in three commercial health food products ($n=3$)

样品名称	样品标示值(mg/g)	样品测定值(mg/g)
斯利安叶酸片	3.250	3.177 \pm 0.051
黄金搭档	0.050	0.051 \pm 0.003
21金维他	0.139	0.127 \pm 0.005



A. 斯利安叶酸片; B. 黄金搭档; C. 21金维他。

图6 样品色谱图

Fig.6 Chromatogram of folic acid in health products samples

3 结论

采用固相萃取-反相高效液相色谱法测定保健品中叶酸的含量,以四丁基溴化铵为离子对试剂,对色谱条件进行系统的优化选择,分析方法简便,重现性好,灵敏度高,测定结果令人满意,可用于食品安全部门检测、实验室研究和工业生产中保健品中叶酸的含量测定。

参考文献:

- [1] GHASEMI J, VOSOUGH M. Simultaneous spectrophotometric determination of folic acid, thiamin, riboflavin, and pyridoxal using partial least-squares regression method[J]. Spectroscopy Letter, 2002, 35(2): 153-170.
- [2] 安会梅, 贾蕊, 朱若华. 荧光分光光度法测定奶粉及尿液中叶酸[J]. 理化检验: 化学分册, 2007, 43(10): 870-872.
- [3] 叶立, 田义梅. 紫外分光光度法测定叶酸片的含量[J]. 天津药学, 2000, 12(3): 63-64.
- [4] 童成亮, 吴小英, 钟淮滨. HPLC 测定马来酸依那普利叶酸片中两种组分的含量[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(15): 1181-1183.
- [5] 陈雄, 吴周和, 吴传茂. 利用高效液相色谱仪初步研究叶酸的稳定性[J]. 食品科学, 2001, 22(7): 70-71.
- [6] 任一平, 张爱珍, 朱黎炎, 等. 高效液相色谱法测定食品中的叶酸[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(10): 46-49.