

高效液相色谱法测定食品中的叶酸

任一平¹ 张爱珍² 朱黎炎² 黄百芬¹ 铁晓威¹ Ts20 A

1(浙江省疾病预防控制中心, 杭州, 310009) 2(浙江大学医学院, 杭州, 310009)

摘要 在食品样品中加入体积分数 60% 高氯酸溶液去蛋白, 过滤后进样检测叶酸。流动相选用 pH3.5, 体积分数 12% 的乙腈, 浓度 50 mmol/L 的 KH_2PO_4 溶液。流速为 1 mL/min, 经 ODS C18 柱分离(柱温为 40℃), 用质量分数 0.5% 的过二硫酸钾溶液作柱后衍生剂, 流速为 0.3 mL/min, 柱后反应温度为 60℃, 经荧光检测器(E_x : 365 nm, E_m : 450 nm)检测定量。实验结果表明, 在 0.01 ~ 3.2 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内, 线性良好, 相关系数为 0.9999; 最低检出浓度为 0.01 $\mu\text{g/mL}$; 方法回收率为 98.1%; 变异系数为 2.3%。

关键词 柱后衍生, 过二硫酸钾, 叶酸

叶酸是一种重要的 B 族维生素, 是体内生化反应中一碳单位转移酶系的辅酶, 起一碳单位传递体的作用, 与许多重要的生化过程密切相关。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。孕妇缺乏叶酸是引起胎儿神经管畸形的主要原因, 且会出现先兆子痫, 胎盘早剥发生率增高。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。

叶酸广泛存在于各种动植物食品中, 但天然食物所含叶酸大部分以多谷氨酸叶酸的形式存在, 且含量不高。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 1 000 g 谷物食品(如面包、面粉、早餐谷物、大米等)强化 1.4 mg 叶酸^[1]。我国已在婴幼儿、老年食品中强化叶酸。但由于缺少快速的检测方法, 因而一般实验室还未开展叶酸含量的测定。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。

目前用于叶酸含量的测定方法有: 微生物法, 放射免疫法, 气相-质谱联用法等。国

外 20 世纪 70 年代提出叶酸的色谱分析方法, 包括高效离子交换层析、离子对分配层析、高效液相色谱方法等, 这类方法可以进行 1 种或几种叶酸类物质的分析检测, 实现叶酸不同成分的分离, 因此发展较快。色谱法在叶酸分析中得到日益广泛的应用, 尤其是高效液相法。1991 年 Hahn 等提出了对本身无荧光的叶酸在强氧化剂如过二硫酸钾等的作用下可以产生荧光, 从而用荧光检测器检测分析。在其他研究中, 对叶酸的检测仍以紫外为主, 波长范围在 250 ~ 310 nm 之间, 样品包括了猪血浆血清、乳制品、小鼠的红细胞^[6]以及经叶酸强化的谷物等。Kelly 等用高效液相结合微生物法检测叶酸, 发现方法可行, 而且适用于人体叶酸摄入后的血清叶酸水平的连续监测。随着毛细管电泳法的发展, 其在叶酸分析中的作用也逐渐被人们重视, 但目前应用不多。文中用高效液相柱后衍生法建立一个适用于天然或强化食品中叶酸定量检测的快速、简便、准确的方法。

1 试剂与仪器

1.1 试剂

乙腈, HPLC 级; KH_2PO_4 , AR 级; H_3PO_4 , AR 级; 氨水, AR 级; 叶酸标准品, 生

第一作者: 大学毕业, 教授级高工。

收稿时间: 2003-04-15, 改回时间: 2003-10-17

化试剂(购自 Sigma 公司);过二硫酸钾,AR 级;高氯酸,AR 级;质量分数 0.5% 过二硫酸钾溶液,称取过二硫酸钾 2.5 g,加水溶解并定容至 500 mL,用 0.45 μm 的滤膜过滤;体积分数 50% 氨水,吸取氨水 50 mL,加水稀释至 100 mL;体积分数 60% 高氯酸,量取 60 mL 氯酸,加水溶解并稀释至 100 mL;体积分数 50% 磷酸,吸取磷酸 50 mL,加水稀释至 100 mL;50 mmol/L 的 KH_2PO_4 溶液(pH = 3.5),称取 KH_2PO_4 6.8 g,加水溶解,并用 50% 磷酸调 pH 3.5,然后定容至 1000 mL,用 0.45 μm 的滤膜过滤;流动相配制,用 50 mmol/L KH_2PO_4 溶液与乙腈按适当比例混合(均使用重蒸水)。

1.2 仪器

GOLD 高效液相色谱仪(Beckman, U. S. A), RF-10AXL 荧光检测器(日本岛津), RF-540 荧光检测器(日本岛津), ODS C18 色谱柱, dp5 μm , ϕ 4.6 mm \times 250 mm, 高速离心机 0~20 000 r/min, Beckman 231 柱后反应器, 超声波振荡器(上海超声波振荡器厂生产), 其他实验室常用仪器与设备。

2 实验方法

2.1 样品的处理

2.1.1 称样

准确称取 5~10 g 样品(内含叶酸 5 μg 以上)于 50 mL 容量瓶中, 固体或半固体样品用捣碎机捣碎后再称样, 加水溶解, 混匀并用超声波振荡 10 min。

2.1.2 脱脂和去蛋白

加入 60% 高氯酸 3 mL, 混匀并定容至刻度(50 mL)。

2.1.3 离心

将样品溶液置于 20 000 r/min 下离心 10 min。

2.1.4 过滤

取中间清液经 0.45 μm 的滤膜过滤后留作进样用。

2.2 色谱条件

2.2.1 流动相

含体积分数 12% 乙腈的 50 mmol/L KH_2PO_4 溶液, 流速 1 mL/min, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 激发波长 365 nm, 发射波长 450 nm。

2.2.2 柱后衍生剂

质量分数 0.5% 过二硫酸钾溶液, 流速: 0.3 mL/min, 反应器温度: 60 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.3 计算

采用外标法, 以保留时间定性, 峰面积定量。

3 结果与讨论

3.1 最佳波长的选择

将标准溶液倒入比色皿, 作荧光波长扫描。由扫描图谱中选定叶酸的激发波长为 356 nm, 发射波长为 444 nm。在实际检测中, 叶酸在 E_x 365 nm, E_m 450 nm 时有最高吸收, 结果如表 1 所示。与扫描结果有些差异, 但与 Hahn 等的实验结果一致, 所以叶酸检测的最佳波长为激发波长 365 nm, 发射波长 450 nm。

3.2 最佳流动相配比的选择

分别使用含有乙腈 16%、12%、8%、4% 的 50 mmol/L KH_2PO_4 溶液作为流动相, 检测同一浓度标准溶液, 比较其保留时间。由结果可知, 随着乙腈量的增加, 流动相洗脱强度加大, 出峰时间提前, 以 10%~14% 为最佳。

3.3 流动相最佳 pH 的选择

分别用 pH 为 2、2.5、3、3.5、4 的 50 mmol/L KH_2PO_4 溶液(乙腈含量均为 12%)作流动相, 检测同一浓度标准溶液, 由峰面积结果可见, 流动相 pH 3.5 时峰面积最大, 故检测时选择的最佳流动相 pH 值为 3.5。

3.4 衍生剂的最佳浓度及流速的选择

在同样的检测条件下, 叶酸的直接检测与柱后衍生法检测的灵敏度差异较大, 前者仅为后者的 3.67%, 因此选用柱后衍生法, 衍生剂选用过二硫酸钾。

3.4.1 最佳浓度选择

分别用为质量分数为 0.25%、0.5%、1%、2%、3% 的过二硫酸钾溶液,以 0.5 mL/min 的流速,检测同一浓度的标准溶液。从实验结果可以看出,衍生剂为 0.5% 时叶酸出峰面积最大,因此衍生剂最佳为 0.5%。

3.4.2 最佳流速选择

分别用 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mL/min 的流速,衍生剂为 0.5%,检测同一进样量的峰面积。从实验结果看出,衍生剂流速为 0.3 mL/min 时出峰面积最大,因此衍生剂最佳流速为 0.3 mL/min。

3.5 最低检出浓度的测定

将 5-甲基四氢叶酸每次 10 倍稀释后测定,测得最低检出浓度为 0.01 ng/mL,完全能满足天然或强化样品中 5-甲基四氢叶酸的含量测定。

3.6 线性范围

准确将标样稀释为 0.01、0.02、0.05、

0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 $\mu\text{g/mL}$,流动相选用含乙腈 12%、pH 为 3.5 的 50 mmol/L 磷酸二氢钾溶液。实验结果表明,在 0.01~3.2 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内,线性良好,相关系数为 0.9999。

3.7 回收率测定

测定叶酸的含量并计算其回收率,取 3 份等量的样品,在其中 2 份样品中分别加入标样(浓度为 0.94 $\mu\text{g/mL}$)为 10 mL。得平均回收率 98.1%。

3.8 精密度测定

准确称取 5.00g 样品平行 6 份(样品采用雀巢婴儿奶粉),按预处理步骤处理后测定,所得变异系数为 2.3%。

3.9 实际样品的测定及结果

样品经预处理后分别进样,各样品的叶酸含量见表 1、图 1 和图 2。

表 1 各种强化、天然食品中叶酸的含量测定结果

样品名称	生产单位	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
贝因美孕产妇葡萄糖	杭州贝因美科工贸股份有限公司	5.26
健宝维存片	美国制药公司	4.07
贝因美幼儿成长奶粉	杭州贝因美科工贸股份有限公司	3.51
雀巢婴儿奶粉	美国雀巢公司	1.97

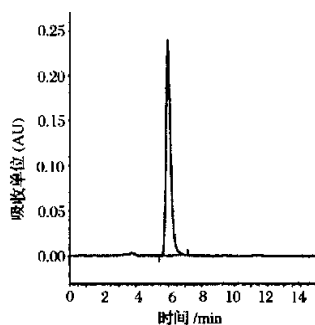


图 1 叶酸标准样

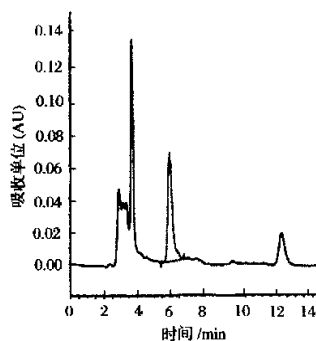


图 2 贝因美幼儿成长奶粉

4 结 论

(1) 样品中加入体积分数 60% 高氯酸去蛋白效果好,且处理方法简单可靠,适用于天然或强化食品的测定。

(2) 本法选用常用的 ODS C18 柱,以含

12% 乙腈的 50 mmol/L KH_2PO_4 溶液(pH=3.5)为流动相,流速为 1 mL/min,用质量分数 0.5% 的过二硫酸钾溶液作柱后衍生剂,流速为 0.3 mL/min,叶酸能与杂质完全分离,并用荧光检测器检测。完全满足对食品

中叶酸的分离。

(3)实验结果表明,叶酸的最低检出浓度为0.01 ng/mL,相关系数为0.9999,样品回收率为98.1%,变异系数为2.3%,完全满足各类样品的测定。

本方法具有灵敏度高、杂质干扰少、操作简单等优点,且线性范围良好,重现性好,回收率高,是一个适用范围较广的测定方法。

参考文献

1 DHHS (U S Depart of Health and Human Ser-

vices). Fed Registr, 1996, 61:8781~8807

2 Hahn A, Stein J, Rehner G. J Chromatogr, 1991, 540:207~215

3 Natsuhori M, Shimoda M, Kokue E I et al. Am J Physiol, 1991, 261:R82~R86

4 Kelly P, Mcpartlin J, Scott J. Anal Biochem, 1996, 238:179~183

5 Albala H S, Veciana N M T, Izquierdo P M et al. J Chromatogr A, 1997, 778(1~2): 247~253

6 Belz S, Nau H. Anal Biochem, 1998, 265: 157~166

7 Osseyi E S, Wehling R L, Albrecht J A. J Chromatogr A, 1998, 826:235~240

Measurement of Folic Acid in Food Using HPLC

Ren Yiping¹ Zhang Aizhen² Zhu Liyan²

Huang Baifen¹ Tei Xiaowei¹

1(Zhejiang Center for Disease Prevention and Control, Hangzhou, 310009)

2(Medical School of Zhejiang University, Hangzhou, 310009)

ABSTRACT 60% perchloric acid was added into food sample to remove protein. After filtering the sample, the filtrate was injected into HPLC to measure its folic acid. 50mmol/L potassium dihydrogen phosphate containing 12% acetonitrile (v/v), pH 3.5 was used as mobile phase, the flow rate was 1mL/min. ODS C18 was used as separating column, column temperature was 40°C. Potassium persulfate was chosen as postcolumn derivative agent, the flow rate was 0.3 mL/min, reaction temperature was 60°C. The folic acid derivate was measured with fluorescence detector (Ex:365nm, Em: 450nm). It is seen that the standard curve was linear with the range of 0.01~3.2 μ m/mL, its related coefficient was 0.9999. The determination limit of this method was 0.01ng/mL, the yield was 98.1% and the variation coefficient was 2.3%.

Key words post column derivation, potassium persulfate, folic acid

市
场
动
态

美国酒市讯息 D

尽管2002年的经济不稳定、股市持续走低,但消费者对酒精类饮料的需求还是刺激了美国的酒市并创下了不俗的销售业绩。美国的蒸馏酒销售持续上涨已经保持了5年,去年消费量上涨1.8%,进口和国产葡萄酒的销售业绩也令人满意,他们创下了连续9年销售增长的记录,销售量2002年上涨了3.3%,而且,进口酒比国产酒增长得还要快。享有最大市场份额的啤酒依然保持着它的地位,去年的上涨量为1.8%,而且啤酒的新种类越来越多,受到了广大消费者的喜爱。

一位业内人士说:“低醇啤酒”这种30年前还未出现的新品种,现在已牢牢占有了市场,良好的包装和适宜的价格让低醇啤酒利润可观。占有率达45.9%,使得它占有啤酒市场最大的份额。啤酒中较低的热量应该是低醇啤酒走俏的一个原因。”

酒
精
与
健
康

酒精与健康 D

经过一项长达7年的关于酒精对65岁以上人群健康的影响的研究,科学家们发现,如果饮酒正当且适量,就能避免患阿尔茨海默性痴呆和其他类型的早发性痴呆。

经过对5000多名65岁以上老人饮酒习惯的跟踪调查,研究人员收集每周每人饮酒量的信息,并最终锁定研究373名患早发性痴呆的病人和373名无任何病兆的老年人。研究结果表明,每周饮酒1~6次的老年人比滴酒不沾的人患痴呆症的几率低54%,每周饮酒7~13次的老年人患病几率低31%。研究人员说,体内脂肪会沉淀在血管壁内侧然后堵塞血管,进而引起心脏病和脑部供血减少,最后会导致早发性痴呆。而酒精恰好能阻止脂肪的沉淀从而预防了早发性痴呆的发生。当然前提是每周饮酒的量要适当,否则就适得其反了。