

高效液相色谱法测定乳粉中泛酸的含量

王惠玉, 张佳佳

(海能未来技术集团股份有限公司, 山东 济南 250104)

摘要: 本文使用悟空 K2025 高效液相色谱仪测定乳粉中泛酸的含量。色谱条件: C₁₈ 色谱柱 (4.6×250mm, 5μm), 流速为 1.0mL/min, 柱温为 35°C, 进样量为 10μL, 检测波长为 210nm。实验结果: 重复性测试中, 将泛酸标准溶液连续进样 7 针, 保留时间的 RSD 为 0.060%, 峰面积的 RSD 为 0.230%; 灵敏度测试中, 泛酸的仪器检出限为 0.014μg/mL, 仪器定量限为 0.046μg/mL; 泛酸在测定浓度范围内具有良好的线性关系, 确定系数 R² 为 0.9999。因此, Wooking K2025 高效液相色谱仪满足《GB 5009.210-2016 食品安全国家标准 食品中泛酸的测定 高效液相色谱法 (第二法)》中泛酸含量测定的需求。

关键词: 乳粉;泛酸;含量

泛酸, 又称维生素 B5、遍多酸, 是一种水溶性 B 族维生素, 由 2,4-二羟基-3,3-二甲基丁酸与β-丙氨酸用酰胺键连接构成; 为浅黄色粘稠油状物, 能溶于水、醋酸乙酯、冰醋酸等, 略溶于乙醚、戊醇, 几乎不溶于苯、氯仿, 具有右旋光性; 对酸、碱和热都不稳定; 在动植物中广泛分布, 故名泛酸。

泛酸有合成抗体的功效; 与此同时还能保持皮肤、头发、血液健康。缺乏泛酸, 会导致生长发育异常, 引起贫血, 皮炎, 肾病等。普通食品中含量较多, 一般不会出现泛酸缺乏症。

利用泛酸易溶于水, 在弱酸性至中性条件下 (pH5.0~7.0) 稳定的理化性质, 经 C₁₈ 反相色谱柱分离, 用紫外检测器于 210nm 波长处检测, 根据色谱峰的保留时间及紫外光谱图定性, 外标法定量。

1 试剂与材料

水: 符合 GB/T6682 的一级水;

甲醇: 色谱纯;

盐酸: 分析纯;

盐酸溶液 (1mol/L): 准确量取 41.67mL 浓盐酸 (3.3) 于 500mL 容量瓶中, 用水稀释并定容至刻度, 混匀备用;

氢氧化钠: 分析纯;

氢氧化钠溶液（1mol/L）：准确称取 20g 氢氧化钠（3.5）于 500mL 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀备用；

磷酸：色谱纯；

磷酸二氢钾：优级纯；

磷酸二氢钾溶液：准确称取磷酸二氢钾（3.8）6.8g，加 500mL 水溶解，用磷酸（3.7）调节 pH 至 3.0，用水定容至 1000mL，最后用 0.45 μ m 滤膜过滤，备用；

泛酸钙标准品：CAS 号：137-08-6，纯度为 95%；

泛酸标准储备液：准确称取泛酸钙标准品（3.10）约 10mg，置于 10mL 棕色容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，摇匀，即得泛酸浓度为 882.705 μ g/mL 的标准储备液；

泛酸系列标准工作液：准确吸取泛酸标准储备液（3.11）适量，用水逐级稀释，制得泛酸浓度依次为 0.441 μ g/mL、0.883 μ g/mL、1.765 μ g/mL、4.414 μ g/mL、8.827 μ g/mL 和 17.654 μ g/mL 的系列标准工作液；

0.22 μ m 微孔水相滤膜。

2 仪器与设备

高效液相色谱仪：K2025 P2 二元高压输液泵、K2025 AS 自动进样器、K2025 CO 柱温箱、K2025 UVD 紫外-可见光检测器、Wookinglab 色谱工作站；

分析天平：精确到 0.0001g；

涡旋振荡器；

超声波清洗机；

pH 计；

容量瓶：10mL、50mL、500mL、1000mL，棕色带刻度。

3 测定步骤

3.1 样品前处理

称取约 5g（精确至 0.001g）乳粉试样，置于 50mL 容量瓶中，加水 25mL，涡旋混匀，先用盐酸溶液（3.4）调节 pH 至 1.7，静置，再用氢氧化钠溶液（3.6）调节 pH 至 4.6，最后用水定容至刻度，混匀后过滤，取续滤液待液相色谱仪测定。

3.2 色谱条件

a) 色谱柱：C₁₈ 色谱柱，4.6 \times 250mm，5 μ m 或者相当的色谱柱；

b) 流动相：甲醇（3.2）：磷酸二氢钾溶液（3.9）=5：95；

- c) 流速: 1.0mL/min;
- d) 柱温: 35°C;
- e) 进样量: 10 μ L;
- f) 检测器: 紫外检测器, 检测波长为 210nm。

4 实验结果

4.1 重复性测试

按照上述色谱条件 (5.2) 进行采集, 泛酸标准溶液 (浓度为 4.414 μ g/mL) 的色谱图如图 1 所示, 积分结果如表 1 所示。

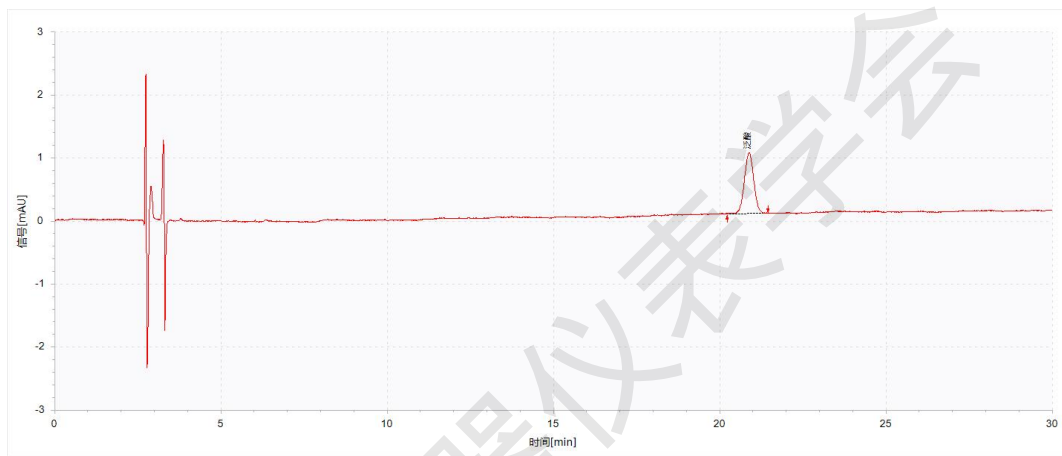


图 1 泛酸标准溶液的色谱图

表 1 泛酸标准溶液色谱图积分结果

目标物	保留时间 (min)	峰面积 (mAU.s)	峰高 (mAU)	理论塔板 数	分离度	对称/拖尾因 子
泛酸	20.892	18.950	0.969	26596	-	1.04

将泛酸标准溶液连续进样 7 针, 叠加的色谱图如图 2 所示, 结果见表 2。

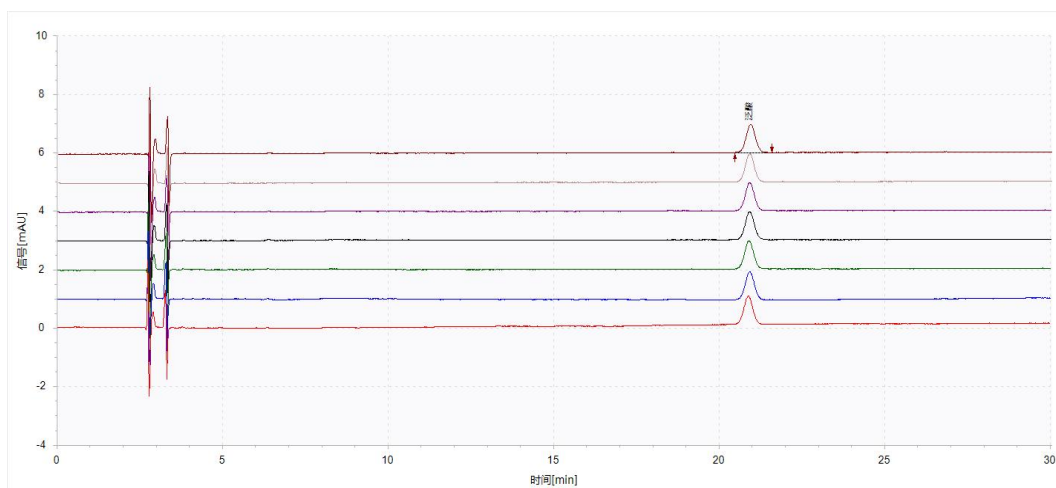


图2 泛酸标准溶液连续进样7针叠加的色谱图

表2 泛酸标准溶液连续进样7针重复性数据统计

目标物	1	2	3	4	5	6	7	平均值	RSD%
保留时间	20.892	20.925	20.892	20.908	20.892	20.892	20.900	20.900	0.060
峰面积	19.164	19.086	19.115	19.129	19.117	19.023	19.121	19.108	0.230

重复性测试中，泛酸标准溶液连续进样7针，保留时间的RSD为0.060%，峰面积的RSD为0.230%，具有良好的定性定量重复性。

4.2 仪器灵敏度测试

灵敏度测试的谱图如图3所示，计算结果见表3。

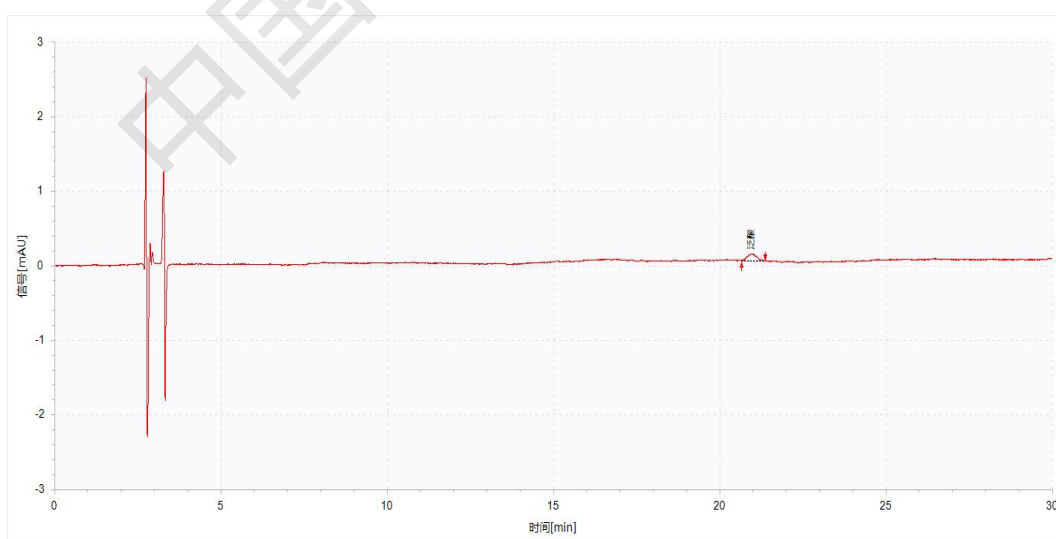


图3 仪器灵敏度的色谱图

表 3 仪器灵敏度测试数据

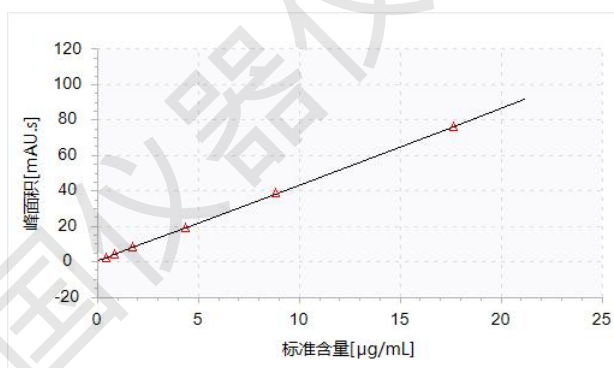
目标物	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	峰高 (mAU)	噪声 (mAU)	S/N	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
泛酸	0.441	0.095	0.001	95.0	0.014	0.046

通过计算，泛酸的仪器检出限为 $0.014\mu\text{g/mL}$ ，仪器定量限为 $0.046\mu\text{g/mL}$ 。《GB 5009.210-2016 食品安全国家标准 食品中泛酸的测定 高效液相色谱法（第二法）》中规定：当称样量为 5g 时，泛酸的检出限为 $0.025\text{mg}/100\text{g}$ ，定量限为 $0.08\text{mg}/100\text{g}$ ，根据实际称样量和定容体积，计算得到上机试液中泛酸的检出限为 $0.025\mu\text{g/mL}$ 、定量限为 $0.08\mu\text{g/mL}$ ，本实验中泛酸的检出限和定量限满足标准要求。

4.3 含量测定

4.3.1 校准曲线

按照色谱条件（5.2），将泛酸系列标准工作液（3.12）上机测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线，线性方程和确定系数如图 4 所示。



方程式 $Y=4.30501*X+0.10063$

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R^2) 0.9999

图 4 泛酸的校准曲线

由图 4 可知，泛酸在测定浓度范围内呈现良好的线性关系，确定系数 R^2 为 0.9999。泛酸系列标准工作液叠加的色谱图如图 5 所示。

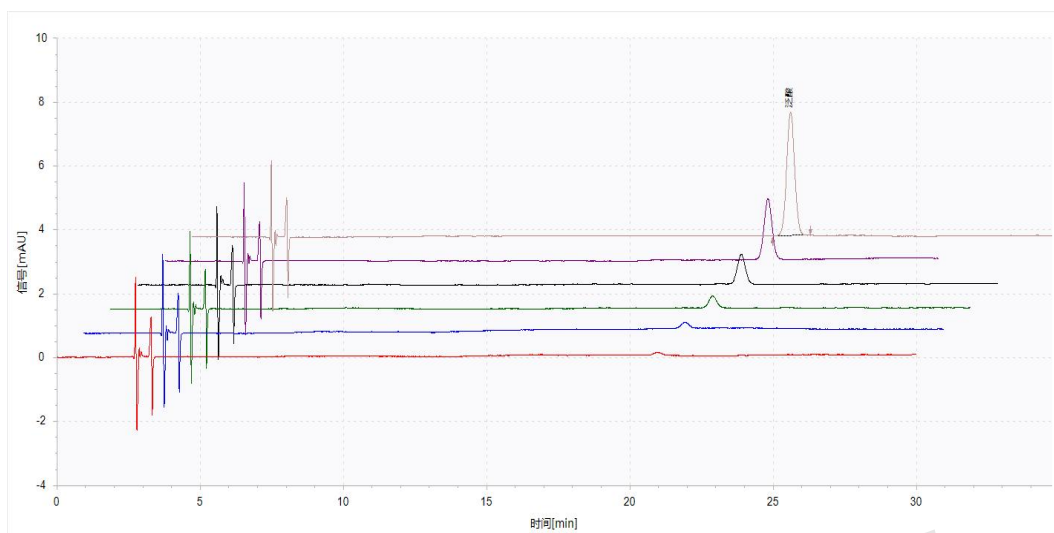


图 5 泛酸系列标准工作液叠加的色谱图

4.3.2 含量测定

以乳粉作为试样，按照流程（5.1）对其进行处理后上机测定。依据公式（1）计算乳粉中泛酸的含量。

$$\omega = \frac{C \times V \times 100}{m \times 1000} \quad \text{---- (1)}$$

式中： ω ----为试样中泛酸的含量，单位为毫克每百克（mg/100g）；

C ----为通过校准曲线得到的试样中泛酸的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V ----为试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

m ----为试样的质量，单位为克（g）；

100、1000----为换算系数。

结果如以泛酸钙计量，应乘以换算系数 1.087。

乳粉试样的色谱图如图 6 所示。

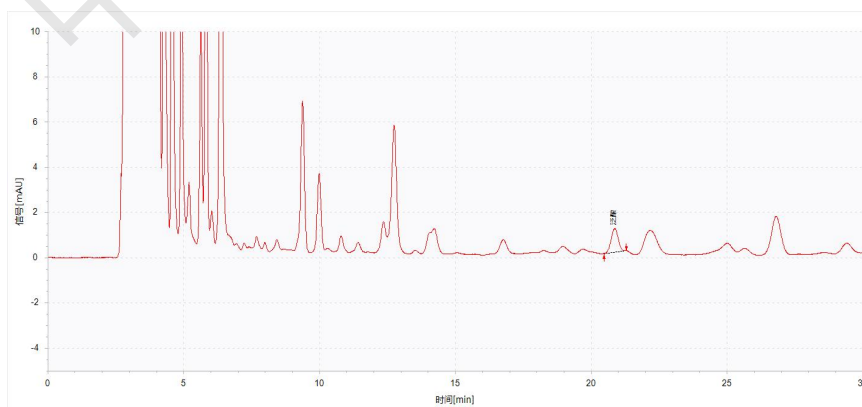


图 6 乳粉试样的色谱图

依据公式（1）进行计算，乳粉试样中泛酸的含量为 4.00mg/100g。

5 结论

通过对泛酸的重复性、灵敏度、线性的测试以及对乳粉试样中泛酸的含量进行测定，实验结果：重复性测试中，将泛酸标准溶液连续进样 7 针，保留时间的 RSD 为 0.060%，峰面积的 RSD 为 0.230%，具有良好的定性定量重复性；灵敏度测试中，泛酸的仪器检出限为 0.014 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，仪器定量限为 0.046 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，满足《GB 5009.210-2016 食品安全国家标准 食品中泛酸的测定 高效液相色谱法（第二法）》中泛酸检出限及定量限的要求；泛酸在测定浓度范围内具有良好的线性关系，确定系数 R^2 为 0.9999；对乳粉试样进行测定，其泛酸含量为 4.00mg/100g。因此，Wooking K2025 高效液相色谱仪满足《GB 5009.210-2016 食品安全国家标准 食品中泛酸的测定 高效液相色谱法（第二法）》中泛酸含量测定的需求。

附 1:

仪器配置清单

序号	单元
K2025 二元高压梯度系统	
A)	<u>Pump Unit</u> 泵单元
1	62MPa 二元高压输液泵（内置溶剂托盘）
2	流动相瓶（肖特瓶，1L）
3	脱气机
4	四通道溶剂切换阀
5	自动在线清洗系统
B)	<u>Sample Injector</u> 进样器
1	自动进样器
2	样品瓶（2mL，含瓶盖）
3	脱气组件
4	100 μL 定量环
C)	<u>Column Oven</u> 柱温箱
1	色谱柱恒温箱（室温以下 10 $^{\circ}\text{C}$ 至 85 $^{\circ}\text{C}$ ）
2	色谱柱：ChromCore AQ C ₁₈ 4.6 \times 250mm，5 μm
D)	<u>Detector</u> 检测器
1	紫外-可见光检测器
E)	<u>Workstation</u> 工作站
1	Wookinglab（中文版）

附 2:

悟空 Wooking K2025 高效液相色谱仪 (可靠、精准、友好、合规)

