

气相色谱法测定氨基酸婴儿配方粉中肌醇的含量

刘莹莹, 洪泽淳, 刘小玉, 熊含鸿, 简德威, 雷毅, 梁旭霞*

(广东省食品检验所, 广州 510435)

摘要: **目的** 建立一种适用于氨基酸婴儿配方粉中肌醇检测的气相色谱方法。**方法** 样品中的肌醇用水和乙醇提取后, 与硅烷化试剂衍生, 正己烷提取, 经气相色谱分离, 氢火焰离子化检测器检测, 外标法定量。**结果** 优化了硅烷化条件, 改进了前处理过程, 肌醇衍生物在 0~20 mg/L 范围内线性关系良好, 相关系数 r^2 为 0.9995, 在 3 个添加水平的回收率为 88.0%~108.0%, 相对标准偏差为 1.0%~5.4%, 方法检出限为 1.0 mg/100 g, 定量限为 3.0 mg/100 g。**结论** 该方法准确可靠, 重复性好, 适用于氨基酸婴儿配方粉中肌醇含量的测定。

关键词: 氨基酸婴儿配方奶粉; 肌醇; 气相色谱法

Determination of inositol in free amino acid infant formula by gas chromatography

LIU Ying-Ying, HONG Ze-Chun, LIU Xiao-Yu, XIONG Han-Hong, JIAN De-Wei, LEI Yi, LIANG Xu-Xia*

(Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China)

ABSTRACT: Objective To determination inositol in free amino acid infant formula by gas chromatography. **Methods** After the inositol was extracted from the sample with water and ethanol, it was derived from silane reagent, extracted with n-hexane, separated by gas chromatography, detected by hydrogen flame ionization detector, and quantified by external standard method. **Results** The pretreatment process was improved and the silylation conditions were optimized. The inositol derivatives had a good linear relationship in the concentration range of 0–20 mg/L with correlation coefficients of 0.9995. The recoveries were 88.0%–108.0% for inositol at 3 spiked levels. The relative standard deviations were 1.0%–5.4%. The limit of detection and limit of quantitation for inositol were 1.0 mg/100 g and 3.0 mg/100 g, respectively. **Conclusion** The proposed method is accurate, reliable and reproducible, which is suitable for detecting inositol in free amino acid infant formula.

KEY WORDS: free amino acid infant formula; inositol; gas chromatography

1 引言

肌醇, 又名肌糖、环己六醇, 是动物、微生物的生长因子, 结构类似于葡萄糖, 具有多羟基化合物所具有的一般性质, 能溶于水而有甜味, 耐酸、碱及热^[1-3]。肌醇是一种水溶性维生素, 在细胞生成、脂质合成、细胞膜结构形

成、细胞生长等生命过程中发挥重要作用^[3,4], 常被作为食品营养强化剂添加到保健食品、功能饮料和婴幼儿配方食品中^[5,6]。

氨基酸婴儿配方粉作为特殊医学用途婴儿配方食品中的一种^[7], 不含肽段, 完全由游离氨基酸按一定配比组成, 可有效改善牛奶蛋白过敏患儿的过敏症状, 为患儿生

*通讯作者: 梁旭霞, 博士, 主任技师, 主要研究方向为食品理化检测与食品安全。E-mail: liangxuxia@126.com

*Corresponding author: LIANG Xu-Xia, Ph.D, Chief Technician, Guangdong Institute of Food Inspection, No.1103 Zengcha Road, Baiyun District, Guangzhou 510435, China. E-mail: liangxuxia@126.com

长发育提供足够的能量和营养^[8,9]。GB 5009.270-2016《食品安全国家标准 食品中肌醇的测定》中的第二法是气相色谱法,适用范围包括婴幼儿食品^[10],但在试验中发现该法用于测定氨基酸婴儿配方粉时,测定值严重偏低,硅烷化试剂与被测物的衍生反应条件依被测物的类型和样品基质的不同而不同^[11],可能是因为氨基酸婴儿配方粉样品基质的特殊性使得衍生化反应效果较差,从而导致测定结果不准确。针对氨基酸婴儿配方粉中肌醇含量的测定方法,目前相关文献报道相对较少。

本研究在国标方法^[10]的基础上,参考保健食品中肌醇的测定方法^[12],对其前处理方法进行了改进,建立了一种准确而有效可行的氨基酸婴儿配方粉中肌醇的气相色谱测定方法,为检测机构准确评价氨基酸婴儿配方粉的营养成分提供科学指导。

2 材料和方法

2.1 仪器与试剂

GC-2030 气相色谱仪(日本岛津公司); ST8 离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); WBK-6B 电热恒温水浴锅(广东环凯微生物科技有限公司); Milli-Q 去离子水发生器(美国 Millipore 公司)。

肌醇标准品(纯度 > 98%, 美国 Stanford Analysis Chemicals 公司); 无水乙醇、正己烷、N, N-二甲基甲酰胺(分析纯, 广州化学试剂厂); 三甲基氯硅烷、六甲基二硅胺烷(上海麦克林生化科技有限公司); 实验用水为 Milli-Q 超纯水。

测试样品的来源为市场购买氨基酸婴儿配方粉。

2.2 试验方法

2.2.1 溶液配制

肌醇标准溶液: 准确称取 10.0 mg 肌醇标准品, 用 70%乙醇溶解并定容至 10 mL, 配制成 1.0 mg/mL 的肌醇标准储备液, 4 °C 条件下保存。准确移取 500 μ L 肌醇标准储备液用 70%乙醇定容至 50 mL, 得到浓度为 10 μ g/mL 的标准工作液。

硅烷化试剂: 分别吸取体积比为 1:2:8(V:V:V)的三甲基氯硅烷、六甲基二硅胺烷、N, N-二甲基甲酰胺^[13], 混匀, 现用现配。

2.2.2 样品前处理

(1) 试样处理

称取试样 1 g(精确至 0.1 mg)于 50 mL 比色管中, 加入 12 mL 40 °C 温水溶解试样, 超声提取 10 min, 用 95%乙醇定容至刻度, 混匀。静置 20 min 后, 取 10 mL 于 15 mL 离心管中, 5000 r/min 离心 5 min。取上清液 5 mL 于旋转蒸发浓缩瓶中。

(2) 衍生

向浓缩瓶中加入 10 mL 无水乙醇, 在 75 °C 水浴旋转

浓缩至近干时再加入 5 mL 无水乙醇继续浓缩至彻底干燥。向浓缩瓶中加入硅烷化试剂, 溶解后转移至有螺纹盖的离心管中, 放置于水浴锅中进行衍生反应, 反应后取出冷却至室温, 加入与硅烷化试剂等量的水, 混匀后再加入 5 mL 正己烷, 涡旋 2 min, 离心分层后, 取上清液 3 mL 于预先加少量无水硫酸钠的带螺纹盖离心管中, 振荡后离心, 取上层清液上机测定。

2.2.3 气相色谱条件

色谱柱: SH-Rtx-5(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m), 检测器: 氢火焰离子化检测器(flame ionization detector, FID), 氮气流速: 1 mL/min, 进样口温度: 280 °C, 检测器温度: 300 °C, 进样体积: 1 μ L, 进样模式: 分流, 分流比: 10:1, 温度程序: 120 °C, 以 10 °C/min 升温至 250 °C(保持 4 min), 最后以 30 °C/min 升温至 300 °C(保持 7 min)。

3 结果与分析

3.1 前处理条件的选择

3.1.1 硅烷化条件的选择

采用 2.2.1 中硅烷化试剂为衍生剂, 按照 2.2.2 的方法对氨基酸婴儿配方粉进行处理, 以肌醇衍生物的峰面积响应值作为评价指标, 考察衍生剂用量、衍生温度和衍生时间对肌醇含量测定的影响。

(1) 衍生剂用量的选择

选取 5 个不同的衍生剂用量, 分别为 5、8、10、12 和 15 mL, 80 °C 水浴衍生反应 15 min。结果如图 1 所示, 选择衍生剂用量 5 mL 时, 样品中肌醇已能够完全被衍生, 在 5~15 mL 范围内, 随着衍生剂用量的增大, 定容样液中肌醇衍生物的峰面积响应值越小, 衍生剂用量超过 5 mL 后, 有部分硅烷化试剂会溶解在上层正己烷中, 可观察到离心后得到的正己烷层的体积大于定容时的体积(5 mL), 这样使得定容样液中肌醇衍生物的浓度降低, 峰面积响应也相应降低, 试验中标准溶液和样品同时进行衍生, 衍生条件是一致的, 但为了避免衍生剂用量过多对实验结果的准确性造成影响, 选取 5 mL 作为衍生剂用量。

(2) 衍生温度的选择

选择衍生剂用量为 5 mL, 选取 5 个不同的衍生温度, 分别为 50、60、70、80、90 °C, 衍生反应 15 min。结果如图 2 所示, 在 50~90 °C 范围内, 随着衍生温度的升高, 肌醇衍生物的峰面积响应值变化趋势不明显, 但温度在 80 °C 以上时, 肌醇才能与硅烷化试剂结合生成结构稳定的六(三甲硅氧基)环己烷^[14], 为保证试验的稳定性和准确性, 选择 80 °C 作为衍生温度。

(3) 衍生时间的选择

选择衍生剂用量为 5 mL, 衍生温度为 80 °C, 选取 5 个不同的衍生时间, 分别为 5、10、15、20、25、30 min。结果如图 3 所示, 在 5~30 min 范围内, 随着衍生时间的增加,

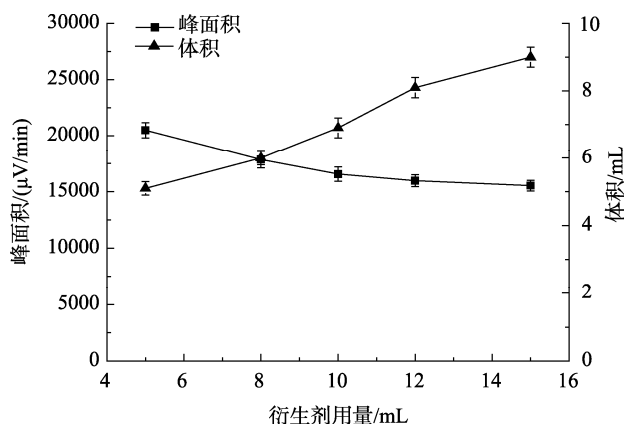


图 1 不同衍生剂量下肌醇衍生物峰面积和正己烷层体积变化曲线($n=3$)

Fig.1 Changing curves for peak area of inositol derivatives and volume of n-hexane layer with different dosages of derivatives ($n=3$)

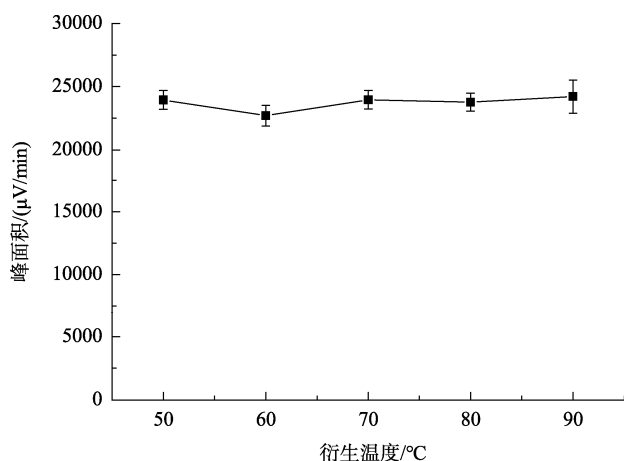


图 2 不同衍生温度下肌醇衍生物峰面积变化曲线($n=3$)

Fig.2 Changing curves for peak area of inositol derivatives at different derivative temperatures ($n=3$)

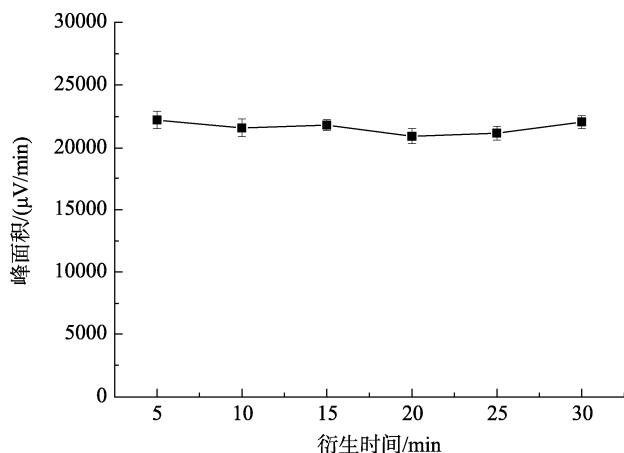


图 3 不同衍生时间下肌醇衍生物峰面积变化曲线($n=3$)

Fig.3 Changing curve for peak area of inositol derivatives at different derivative time ($n=3$)

肌醇衍生物的峰面积变化趋势不明显, 但 20 min 以后, 离心后的正己烷层变得浑浊, 选择 15 min 作为衍生时间。综合考虑, 选取 5 mL 作为衍生剂量, 80 °C 作为衍生温度, 15 min 作为衍生时间, 能满足试验要求, 且有利于一般实验室的日常检测。

3.1.2 前处理过程的改进

与 GB 5009.270-2016 的前处理过程^[10]相比, 主要在以下 3 个方面做了改进:

(1) 省去烘干的步骤, 提升了工作效率。衍生反应要求无水条件, 但通过试验证明, 旋蒸时将浓缩瓶彻底干燥后, 不经过烘干的步骤直接进行衍生化反应, 与经过烘干步骤得到的结果是一致的, 不会影响到实验结果的准确性。

(2) 衍生化反应后增加加水的步骤, 使正己烷与其他组分更容易分离。不加水时, 离心后澄清透明的正己烷层放置一段时间后会慢慢变得浑浊, 直接上机将对检测器造成污染^[3], 加水后再加入正己烷提取, 正己烷层能保持澄清透明。但该前处理方法用于婴幼儿配方奶粉时, 加水后使得正己烷与其他成分混合后难以分离, 该现象可能与婴幼儿配方奶粉中含有某些蛋白质成分、肽类和乳化剂等物质有关。

(3) 改变硅烷化试剂的添加顺序, 增强了衍生效果。使用 GB 5009.270-2016 的前处理方法测定氨基酸婴儿配方粉中肌醇的含量时发现, 先用 N,N-二甲基甲酰胺溶解目标物, 再加入 1:2(V:V)的三甲基氯硅烷和六甲基二硅胺烷进行衍生反应, 结果测定值仅为标示值的 15% 左右, 增大三甲基氯硅烷和六甲基二硅胺烷的用量后仍未得到改善, 而将三者预先混合后再一次性加入样品中进行衍生反应, 测定结果正常。

3.2 方法的线性范围及检出限

分别吸取 0、1.00、2.00、4.00、6.00、8.00、10.0 mL 肌醇标准溶液于浓缩瓶中, 按 3.1 中选取的硅烷化条件和 2.2.2 中衍生步骤操作。以定容液中肌醇衍生物的浓度为横坐标, 肌醇衍生物色谱峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 如图 4 所示, 线性回归方程为: $Y=3449775.60X-496.16$, $r^2=0.9995$, 结果表明, 肌醇衍生物在 0~20 mg/L 范围内线性关系良好, 相关系数大于 0.999。测定氨基酸婴儿配方粉样品, 检出限以 3 倍信噪比计算, 定量限以 10 倍信噪比计算, 当称样量为 1 g, 稀释倍数为 10, 定容体积为 5 mL 时, 得到方法检出限为 1.0 mg/100 g, 定量限为 3.0 mg/100 g, 与国标方法^[10]一致。

3.3 回收率及精密度实验

按本试验方法, 平行称量 7 份样品, 制备并测试氨基酸配方婴儿粉中肌醇的含量, 平均值为 30.3 mg/100 g, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 3.3%, 在该氨基酸配方婴儿粉中加入质量浓度分别为 15 mg/100 g、30 mg/100 g 和 60 mg/100 g 的目标分析物, 每个添加水平

平行制备 3 次并测试, 然后计算平均加标回收率, 结果见表 1。由表 1 可以看出, 方法回收率为 88.0%~108.0%。该方法显示了良好的回收率和重现性。

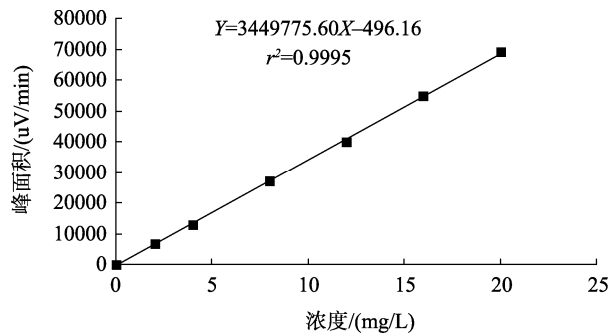


图 4 肌醇衍生物的标准曲线图
Fig.4 Standard curve of inositol derivatives

表 1 加标回收率测定结果(n=3)
Table 1 Determination results of recoveries (n=3)

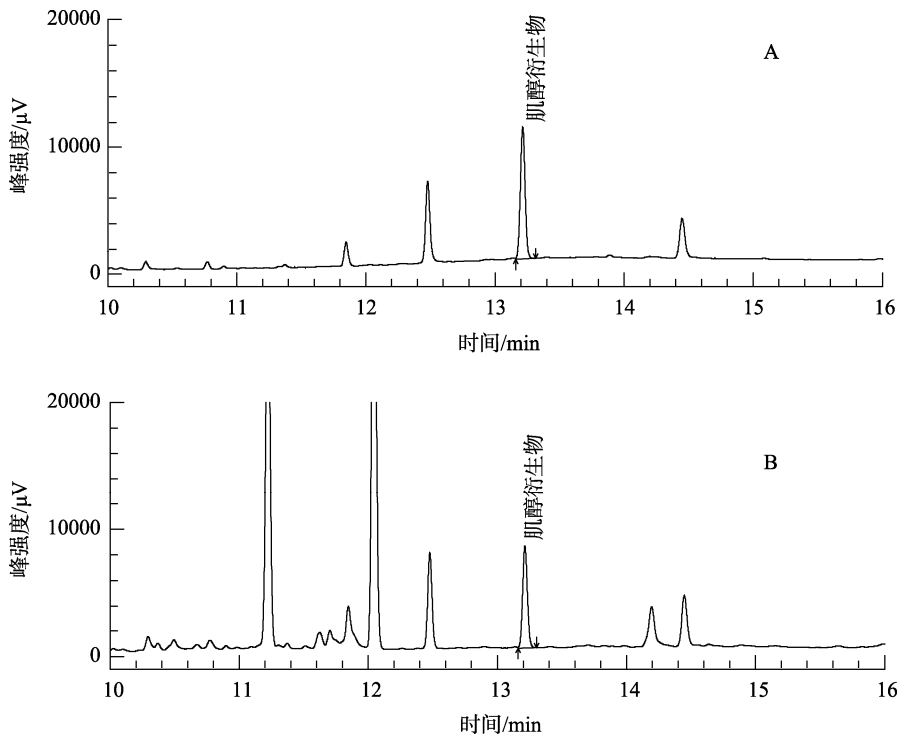
	加标量 /(mg/100 g)	平均测定值 /(mg/100 g)	RSD/%	加标回收率 /%
样品	--	30.3	3.3	--
低加标	15	43.5	5.4	88.0
中加标	30	62.7	1.0	108.0
高加标	60	86.2	2.9	93.2

3.4 样品实测

用该方法对市面上购买的两种品牌氨基酸婴儿配方粉进行肌醇含量的检测, 样品成分表中列明肌醇的含量分别为 30.6 mg/100 g 和 37.8 mg/100 g, 采用该方法检测出肌醇的含量分别为 30.3 mg/100 g 和 38.9 mg/100 g, 而采用国标方法^[10]测出这 2 种样品中肌醇含量分别为 4.5 mg/100 g 和 5.6 mg/100 g。样品和标准溶液谱图见图 5, 由图 5 可看出, 目标物色谱峰与氨基酸婴儿配方粉中的其他杂质能很好地分离, 不影响目标化合物的定性和定量, 能实现肌醇含量的准确测定。

4 结论与讨论

本研究在 GB 5009.270-2016 第二法气相色谱法的基础上, 对其前处理方法进行改进后, 极大地缩短了样品前处理时间, 用于测定氨基酸婴儿配方粉中肌醇的含量, 在 0~20 mg/L 范围内肌醇衍生物质量浓度与其峰面积线性关系良好, 相关系数大于 0.999, 方法回收率在 88.0%~108.0%之间, 样品 7 次平行测定的 RSD 为 3.3%, 检出限为 1.0 mg/100 g, 定量限为 3.0 mg/100 g。本方法的准确性、回收率和精密度均满足检测要求, 适用于氨基酸婴儿配方粉中肌醇含量的测定。



注: A: 肌醇标准溶液(衍生物浓度为 8.0 mg/L); B: 氨基酸婴儿配方粉样品

图 5 肌醇标准溶液和氨基酸婴儿配方粉样品的气相色谱图

Fig.5 Gas chromatograms of inositol derivatives derived from inositol standard solution and amino acid infant formula

对婴幼儿配方奶粉和氨基酸婴儿配方粉两种不同基质样品,同时采用 GB 5009.270-2016 方法进行前处理,质谱检测器测定,除发现 2 种样品中的葡萄糖都有参与硅烷化反应外,未发现样品中有其他组分参与硅烷化反应,可认为氨基酸婴儿配方粉中组分在硅烷化反应中与肌醇不存在竞争关系。考虑到三甲硅烷衍生试剂与醇类化合物的反应主要受立体效应的影响^[15],猜想可能是由于氨基酸婴儿配方粉中某些特殊组分与肌醇被 N,N-二甲基甲酰胺溶解后,使得肌醇羟基基团的立体效应增强,从而与三甲硅烷衍生试剂的反应不完全,导致测定值偏低。也可能是 N,N-二甲基甲酰胺与样品中的氨基酸分子和肌醇分子形成了缔合体系^[16],影响到衍生化反应的效率。上述猜想是否正确,尚需进一步开展试验研究,以期找到影响氨基酸婴儿配方粉肌醇测定结果准确性的主要因素。

参考文献

- [1] 李洁,李玲,鞠香,等.气相色谱法测定婴幼儿乳粉中肌醇含量的不确定度评定[J].食品安全质量检测学报,2018,9(2): 441-446.
Li J, Li L, Ju X, et al. Uncertainty evaluation of determination of inositol in milk powder for infant by gas chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(2): 441-446.
- [2] 陈浩然,陈永菊,韩飞,等.气相色谱法测定润肤膏霜中肌醇的含量[J].理化检验(化学分册),2014,50(8): 1030-1031.
Chen HR, Chen YJ, Han F, et al. Determination of inositol in moisturizing cream by gas chromatography [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2014, 50(8): 1030-1031.
- [3] 廖燕芝,黄辉,梁锋.气相色谱法测定婴幼儿配方食品中肌醇的衍生方法的比较[J].食品安全质量检测学报,2018,9(17): 4639-4644.
Liao YZ, Huang H, Liang F. Comparison of derivative methods for inositol in infant formula foods by gas chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(17): 4639-4644.
- [4] 安彦新,郭金,王秀伟,等.人血浆肌醇气相色谱质谱联用检测方法的优化及应用[J].中国优生与遗传杂志,2017,(10): 28-31.
An YX, Guo J, Wang XW, et al. Optimization and application for determination of total human plasma inositol by GC-MS [J]. Chin J Birth Health Hered, 2017, (10): 28-31.
- [5] York JD, Guo S, Odom A, et al. An expanded view of inositol signaling [J]. Adv Enzymol, 2001, (1): 57-71.
- [6] 乔善磊,姜涛,张晓玲,等.气相色谱法及气相色谱-质谱法测定保健食品中的肌醇[J].中国卫生检验杂志,2009,19(9): 2020-2022.
Qiao SL, Qiang T, Zhang XL, et al. Determination of inositol in functional beverage by GC-MS and GC-FID [J]. Chin J Health Inspect, 2009, 19(9): 2020-2022.
- [7] GB 25596-2010 食品安全国家标准 特殊医学用途婴儿配方食品通则[S].
GB 25596-2010 National food safety standard-General rules for infant formula for special medical purposes [S].
- [8] 郑玉灿,金玉,李玫,等.游离氨基酸配方奶粉在牛奶蛋白过敏患儿中的应用[J].实用儿科临床杂志,2012,27(19): 1488-1490.
Zheng YC, Jin Y, Li M, et al. Application of free amino acid formula in

children with cow's milk allergy [J]. J Appl Clin Pediatr, 2012, 27(19): 1488-1490.

- [9] 顾丽,吴容,周慧恩,等.游离氨基酸配方粉在牛奶蛋白过敏性湿疹的临床干预研究[J].中国医学创新,2015,(22): 36-38.
Gu L, Wu R, Zhou HE, et al. Clinical intervention infant eczema free amino acids in milk powder formula feeding [J]. Med Innov China, 2015, (22): 36-38.
- [10] GB 5009.270-2016 食品安全国家标准 食品中肌醇的测定[S].
GB 5009.270-2016 National food safety standard-Determination of inositol in food [S].
- [11] 杨小玲.气相色谱衍生试剂的研究进展[J].中国科技信息,2005,(7): 25-25.
Yang XL. Study on gas chromatographic derivatives [J]. China Sci Technol Inf, 2005, (7): 25-25.
- [12] GB 5009.196-2003 保健食品中肌醇的测定[S].
GB 5009.196-2003 Determination of inositol in healthy food [S].
- [13] 招启文,张可冬,陈晓,等.气相色谱-质谱联用测定固体运动饮料中肌醇的含量[J].食品工业,2017,(7): 286-288.
Zhao QW, Zhang KD, Chen X, et al. Determination of myo-inositol content in solid exercise drink by GC-MS [J]. Food Ind, 2017, (7): 286-288.
- [14] 黄伟雄,梁富荣.肌醇硅烷化反应的质谱研究[J].华南预防医学,2002,28(6): 52-53.
Huang WX, Liang FR. Mass spectrometric study on silanization of inositol [J]. South China J Prev Med, 2002, 28(6): 52-53.
- [15] 赵媛媛,景治中,王红,等.气相色谱中的衍生试剂及新进展[J].分析科学学报,2003,19(1): 92-96.
Zhao YY, Jing ZZ, Wang H, et al. Derivative reagent in gas chromatography and its new development [J]. J Anal Sci, 2003, 19(1): 92-96.
- [16] 王培贵. N, N-二甲基甲酰胺/醇体系光谱研究及缔合模型的理论研究[D].曲阜:曲阜师范大学,2007.
Wang PG. Study on spectroscopy and the theory of association model of N, N-dimethylformamide/alcohol system [D]. Qufu: Qufu Normal University, 2007.

(责任编辑:韩晓红)

作者简介



刘莹莹, 硕士, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: lyy12051967@126.com



梁旭霞, 博士, 主任技师, 研究方向为食品理化检测与食品安全。

E-mail: liangxuxia@126.com