

手性液相色谱法直接定量乳粉中 *RRR*- α -生育酚

王枚博¹, KAREN J. Schimpf², 宋 畅^{1*}

[1. 雅培贸易(上海)有限公司, 上海 200233; 2. Abbott Nutrition, Analytical Research and Development, Columbus OH 43219]

摘 要: **目的** 建立手性液相色谱法直接测定乳粉中 *RRR*- α -生育酚的检测方法。**方法** 样品经氢氧化钾皂化, 石油醚-异丙醚萃取。经小粒径纤维素衍生物型手性柱 Daicel Chiralcel OD-3 (2.1 mm×150 mm, 3 μ m) 直接分离, 采用无水乙醇-正己烷(5:995, *V:V*) (A) 和三乙胺-正己烷(5:995, *V:V*) (B) (A:B=10:90) 作为流动相进行等度洗脱, 流速为 0.2 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长为 294 nm, 外标法定量。**结果** *RRR*- α -生育酚和其他 α -生育酚异构体的分离度大于 1.2。在 0.5~50 μ g/mL 范围内线性关系良好, 相关系数大于 0.999, 检出限为 0.20 mg/100 g, 定量限为 0.60 mg/100 g, 加标回收率为 95.0%~109.4%, 相对标准偏差为 2.7%。**结论** 该方法快速、准确、灵敏, 适合测定乳粉中 *RRR*- α -生育酚的含量。

关键词: *RRR*- α -生育酚; 维生素 E; 手性; 液相色谱法; 乳粉

Direct quantification of *RRR*- α -tocopherol in milk powder by chiral liquid chromatography

WANG Mei-Bo¹, KAREN J. Schimpf², SONG Chang^{1*}

[1. Abbott Laboratories Trading (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 200233, China; 2. Abbott Nutrition, Analytical Research and Development, Columbus OH 43219, U.S.A.]

ABSTRACT: Objective To establish a method for directly determining *RRR*- α -tocopherol in milk powder by chiral liquid chromatography. **Methods** The samples were saponified with potassium hydroxide and extracted with petroleum ether-isopropyl ether. DAICEL Chiralcel OD-3 (2.1 mm×150 mm, 3 μ m) was directly separated on a small particle size cellulose derivative chiral column, and isocratic elution was performed using absolute ethanol-n-hexane (5:995, *V:V*) (A) and triethylamine-n-hexane (5:995, *V:V*) (B) (A:B=10:90) as the mobile phases, with the flow rate of 0.2 mL/min, the column temperature of 30 $^{\circ}$ C, the detection wavelength of 294 nm, and the quantification by external standard method. **Results** The resolutions of *RRR*- α -tocopherol and other α -tocopherol isomers were greater than 1.2. The linearities were good within the range of 0.5–50 μ g/mL, with the correlation coefficient greater than 0.999. The limit of detection was 0.20 mg/100 g, and the limit of quantitation was 0.60 mg/100 g. The recoveries after standard addition were 95.0%–109.4%, and the relative standard deviation was 2.7%. **Conclusion** This method is rapid, accurate and sensitive, and is suitable for the determination of *RRR*- α -tocopherol in milk powder.

KEY WORDS: *RRR*- α -tocopherol; vitamin E; chiral; liquid chromatography; milk powder

*通信作者: 宋畅, 硕士, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: angela.song@abbott.com

*Corresponding author: SONG Chang, Master, Abbott Laboratories Trading (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 200233, China. E-mail: angela.song@abbott.com

0 引言

维生素E(生育酚)是婴幼儿生长发育的必需营养素。婴儿出生后,主要通过母乳或者婴幼儿配方乳粉摄取必需的维生素E^[1-3]。在生育酚的4种结构异构体(α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚和 δ -生育酚)中, α -生育酚被普遍认为生物活性最高^[4-6]。在 α -生育酚的化学结构中有3个手性碳原子,分别是2、4'和8'。根据手性的不同, α -生育酚共有8种立体异构体,分别是RRR、RRS、RSR、RSS、SSS、SSR、SRS和SRR。根据来源不同, α -生育酚又可分为DL- α -生育酚和D- α -生育酚。其中,DL- α -生育酚为工业合成,是8种立体异构体的外消旋混合物,每种异构体各占八分之一,而D- α -生育酚由植物在体内天然合成,其仅以RRR- α -生育酚(2R,4'R,8'R- α -生育酚)形式存在^[7-9],通常被认为是天然维生素E。不同来源的 α -生育酚的生物活性有所不同,RRR- α -生育酚的生物活性是DL- α -生育酚的1.36~2倍^[10-13]。

在常规液相色谱柱上,RRR- α -生育酚和DL- α -生育酚保留时间一致,难以区分。传统测定RRR- α -生育酚的方法^[9,11,14-19]需要分2步进行,首先通过皂化、提取和液相色谱分离,测定样品中 α -生育酚的总含量,然后将 α -生育酚立体异构体甲基化衍生,经手性色谱柱分离,得到RRR- α -生育酚色谱峰的峰面积占各异构体峰面积总和的百分比,最终将RRR- α -生育酚的面积百分比乘以 α -生育酚的总含量得到RRR- α -生育酚的含量。该方法步骤烦琐、耗时长、溶剂消耗量大,难以满足实际工作中高通量的检测要求。与常规液相色谱柱相比,手性色谱柱具有分离不同异构体的优势,可用于RRR- α -生育酚和7种 α -生育酚立体异构体的分离研究^[20]。

为了有效考察不同 α -生育酚立体异构体的分离情况,需要采用各异构体标准品进行定位。目前,除了RRR- α -生育酚的商品化标准品可以获取外,其他7种 α -生育酚立体异构体标准品均难以获取。因在DL- α -生育酚中,8种 α -生育酚立体异构体各占八分之一(12.5%),故通过色谱峰的面积比,可判断每个色谱峰包含 α -生育酚立体异构体的数量,结合色谱峰之间的分离度可有效判断不同 α -生育酚立体异构体的分离情况。

本研究通过RRR- α -生育酚在8种 α -生育酚立体异构体中的面积比结合色谱峰之间的分离度准确判断RRR- α -生育酚是否与其他7种 α -生育酚立体异构体有效分离,并通过优化色谱分离条件,建立乳粉中RRR- α -生育酚的直接定量方法,可满足日常乳粉中RRR- α -生育酚高效准确检测的需求。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1260 Infinity 高效液相色谱仪(配紫外检测器,美国

Agilent 公司); G10S UV-Vis 紫外分光光度计、HERAEUS MULTIFUGE X3R 离心机(美国 Thermo 公司); DK-S22 恒温水浴(上海精宏公司); STD MINI 230V 涡旋仪(美国 Fisher Scientific 公司); DC24H-RT 氮吹仪(上海安谱公司)。

RRR- α -生育酚标准品(纯度 98%, 加拿大 TRC 公司); DL- α -生育酚标准品(纯度 96.8%, 德国 Sigma-Aldrich 公司)。

甲醇、正己烷(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 无水乙醇、石油醚(30~60 °C)、异丙醚、抗坏血酸、氢氧化钾(分析纯, 中国国药集团); 2,6-二叔丁基对甲酚(butylated hydroxytoluene, BHT)(分析纯, 德国 Aldrich 公司); 三乙胺($\geq 99\%$, 德国 Sigma-Aldrich 公司); 0.22 μm 尼龙滤膜(上海安谱公司); 实验室用水为 Milli-Q 超纯水。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制

RRR- α -生育酚标准溶液配制: 称取 RRR- α -生育酚标准品适量, 用正己烷配制质量浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液, -20 °C 保存可保存 6 个月, 临用前将溶液回温至室温, 并按照 GB 5009.82—2016《食品中维生素 A、D、E 的测定》进行浓度校正。精密量取 RRR- α -生育酚标准储备液适量, 用正己烷稀释成质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准中间液, 临用新制。分别精密量取 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00 mL RRR- α -生育酚标准中间液于 10 mL 容量瓶中, 用正己烷稀释并定容至刻度, 作为标准曲线溶液(质量浓度依次为 0.5、1、2、5、10、20、50 $\mu\text{g/mL}$), 临用新制。

DL- α -生育酚标准溶液配制: 称取 DL- α -生育酚标准品适量, 用正己烷配制质量浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液, -20 °C 保存可保存 6 个月。精密量取 DL- α -生育酚标准储备液适量, 用正己烷稀释成质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液, 临用新制。

氢氧化钾溶液: 称取 50 g 氢氧化钾, 加入 50 mL 水溶解, 冷却后, 储存于聚乙烯瓶中。

1.2.2 样品前处理

(1)皂化 称取 1 g(精确至 0.0001 g)样品于 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 水, 充分溶解。加入抗氧化剂(抗坏血酸和 BHT)适量, 再加入 10 mL 无水乙醇, 混匀, 再加入氢氧化钾溶液适量, 涡旋使混匀。将离心管置 80 °C 水浴中皂化 30 min(每隔 10 min 取出振摇 1 次)。皂化后立即用冷水冷却至室温。

(2)提取 加入 10 mL 水和 10 mL 石油醚(30~60 °C)-异丙醚(3:1, V:V), 涡旋 30 s, 4000 r/min 离心 5 min, 将上层溶液转移到玻璃管中。再重复上述提取操作 1 次, 将上层溶液合并至相应的玻璃管中, 37 °C 氮气吹干。用正己烷分次将残留物溶解并转移至 10 mL 容量瓶中, 定容至刻度, 摇匀。用 0.22 μm 滤膜过滤, 备用。

1.2.3 液相色谱条件

大赛璐 Chiralcel® OD-3 色谱柱(2.1 mm×150 mm, 3 μ m); 连接大赛璐 Chiralcel® OD-3 保护柱(4.0 mm×10 mm, 3 μ m); 流动相: 无水乙醇-正己烷(5:995, *V:V*) (A), 三乙胺-正己烷(5:995, *V:V*) (B), A:B=10:90; 流速: 0.2 mL/min; 进样体积: 10 μ L; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 检测波长: 294 nm; 进样盘温度: 8 $^{\circ}$ C。

1.2.4 *RRR*- α -生育酚定位

取 *DL*- α -生育酚标准工作液(20 μ g/mL)和 *RRR*- α -生育酚标准溶液(5 μ g/mL)各 10 μ L 分别进样, *RRR*- α -生育酚与其他 α -生育酚立体异构体的分离度应不小于 1.0。分别计算 *DL*- α -生育酚中 *RRR*- α -生育酚色谱峰的峰面积以及各 α -生育酚立体异构体色谱峰的峰面积总和, *RRR*- α -生育酚峰

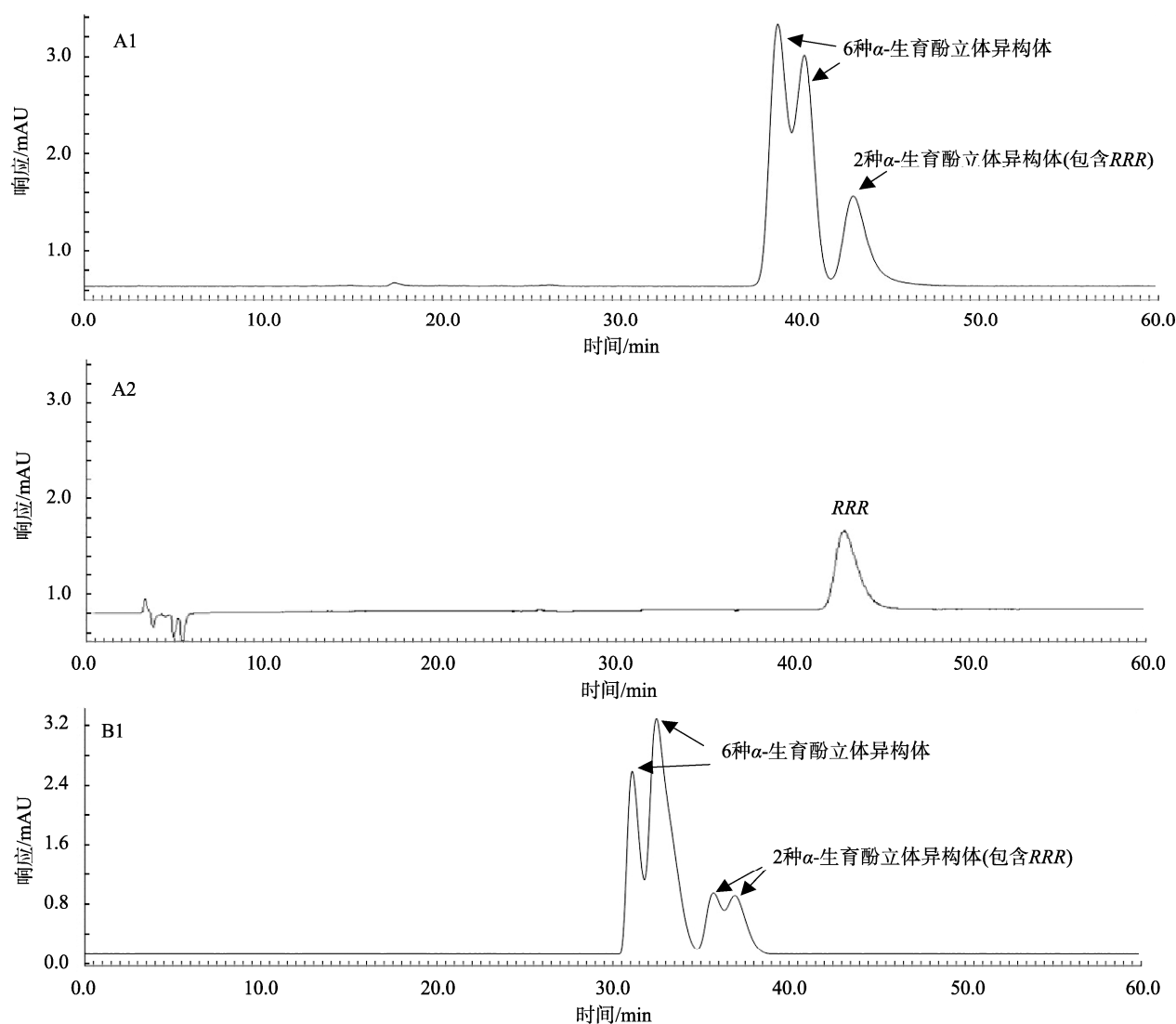
面积与 α -生育酚面积总和的比例应等于八分之一。

2 结果与分析

2.1 色谱条件优化

2.1.1 色谱柱的选择

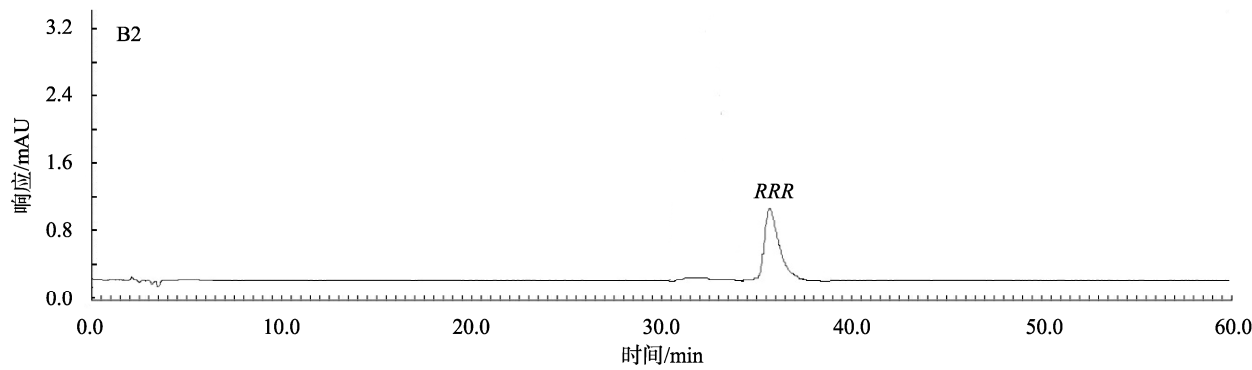
分别以大赛璐 Chiralcel® OD-H (4.6 mm×250 mm, 5 μ m)和大赛璐 Chiralcel® OD-3 (2.1 mm×150 mm, 3 μ m)作为色谱柱, 本研究比较了不同色谱柱对 *DL*- α -生育酚标准工作液中 *RRR*- α -生育酚和其他 α -生育酚立体异构体的分离度的影响。经考察, 小粒径的 Chiralcel® OD-3 优于 Chiralcel® OD-H (见图 1), 最终选择 Chiralcel® OD-3 作为色谱柱。



注: A1: *DL*- α -生育酚, Chiralcel® OD-H; A2: *RRR*- α -生育酚, Chiralcel® OD-H; B1: *DL*- α -生育酚, Chiralcel® OD-3; B2: *RRR*- α -生育酚, Chiralcel® OD-3。

图 1 不同手性色谱柱上的色谱图

Fig.1 Chromatograms on different chiral columns



注: A1: *DL*- α -生育酚, Chiralcel® OD-H; A2: *RRR*- α -生育酚, Chiralcel® OD-H; B1: *DL*- α -生育酚, Chiralcel® OD-3; B2: *RRR*- α -生育酚, Chiralcel® OD-3。

图 1(续) 不同手性色谱柱上的色谱图

Fig.1 Chromatograms on different chiral columns

2.1.2 流动相的优化

经考察, 仅以正己烷作为流动相无法对 *RRR*- α -生育酚进行有效分离。根据色谱柱说明书, 在流动相中添加一定比例的三乙胺或者无水乙醇, 对于改变不同异构体的保留时间以及改善异构体之间的分离度可能有一定作用。经考察, 当流动相 A 为无水乙醇-正己烷(5:995, *V*:*V*), 流动相 B 为三乙胺-正己烷(5:995, *V*:*V*), A:B=10:90 时, *RRR*- α -生育酚与其他 α -生育酚立体异构体的分离度最佳(*RRR*- α -生育酚与其前面出峰的 6 种 α -生育酚立体异构体的分离度为 1.2, 与其后面出峰的 1 种 α -生育酚立体异构体的分离度为

1.5), 具体结果见图 2。

2.1.3 *RRR*- α -生育酚与其他 α -生育酚立体异构体的分离

当采用 *RRR*- α -生育酚标准品进行定位后, 色谱峰的面积比可用于判断 *DL*- α -生育酚中其他 7 种立体异构体是否会干扰 *RRR*- α -生育酚色谱峰。当 *RRR*- α -生育酚对应色谱峰的面积占 *DL*- α -生育酚色谱峰总面积的八分之一(12.5%)时, 可对 *RRR*- α -生育酚对应色谱峰进行准确定位, 进一步结合分离度数值可判断 *RRR*- α -生育酚是否与其他 α -生育酚立体异构体被有效分离(详见表 1 和图 2)。

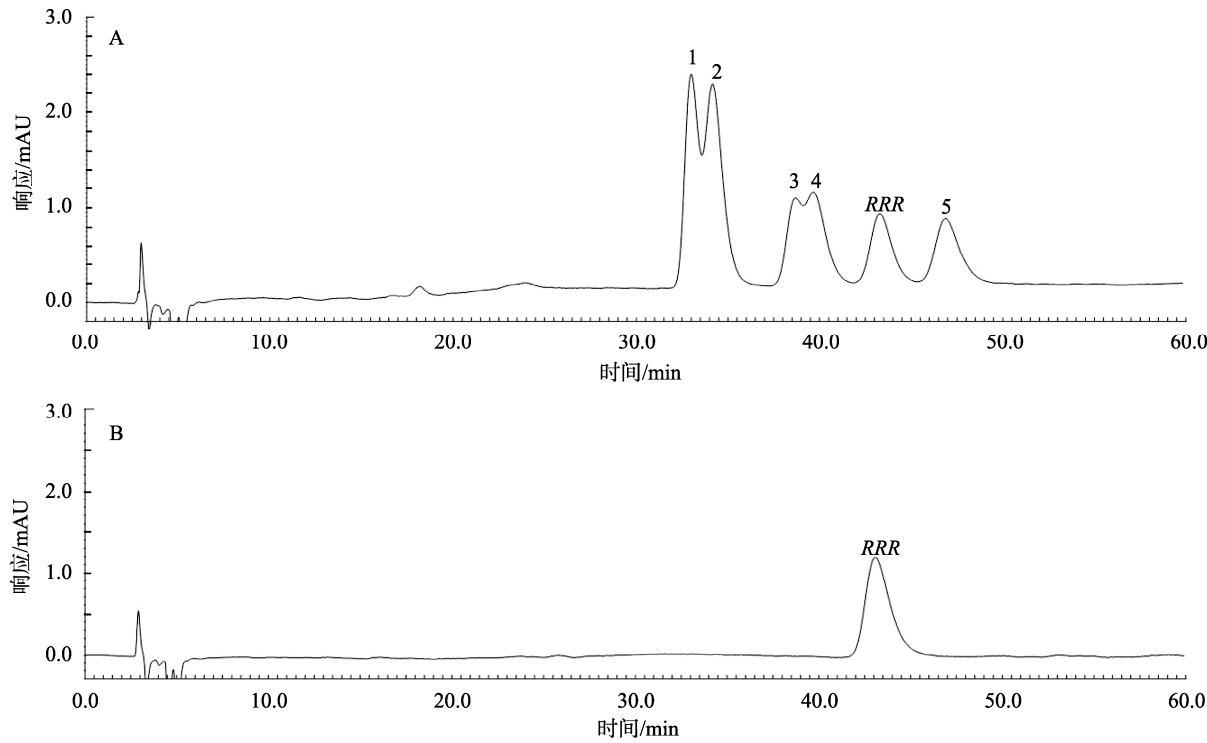


图 2 *DL*- α -生育酚标准工作液 (20 μ g/mL, A)、*RRR*- α -生育酚标准品溶液(5 μ g/mL, B)和乳基奶粉样品溶液(C)的色谱图

Fig.2 Chromatograms of *DL*- α -tocopherol standard working solution (20 μ g/mL, A), *RRR*- α -tocopherol standard solution (5 μ g/mL, B) and milk-based milk powder sample solution (C)

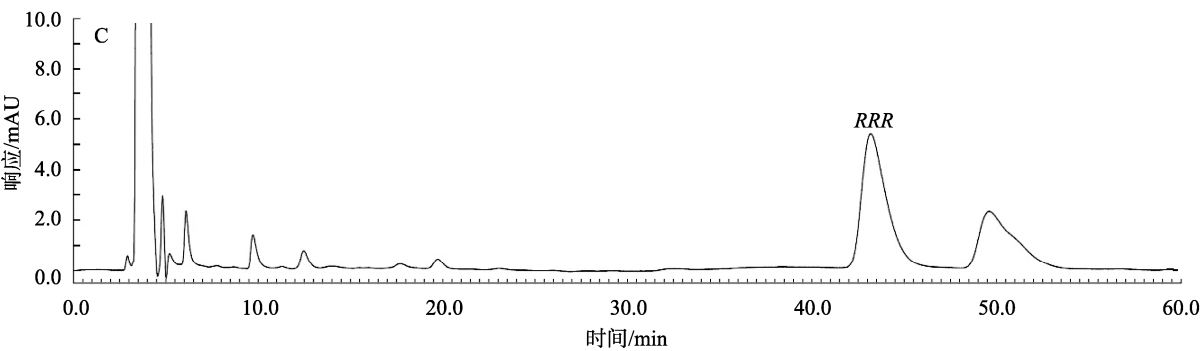


图 2(续) *DL*- α -生育酚标准工作液 (20 $\mu\text{g/mL}$, A)、*RRR*- α -生育酚标准品溶液(5 $\mu\text{g/mL}$, B)和乳基乳粉样品溶液(C)的色谱图
Fig.2 Chromatograms of *DL*- α -tocopherol standard working solution (20 $\mu\text{g/mL}$, A), *RRR*- α -tocopherol standard solution (5 $\mu\text{g/mL}$, B) and milk-based milk powder sample solution (C)

表 1 图 2(A) *DL*- α -生育酚中不同立体异构体的峰面积及其在总面积中的比例
Table 1 Peak area and area ratio of different stereoisomers in *DL*- α -tocopherol in figure 2 (A)

色谱峰编号	保留时间/min	峰面积	峰面积总和	各峰面积在总面积中的比例/%
1	32.996	115644	522861	22.1
2	34.167	145744		27.9
3	38.707	52559		10.1
4	39.670	77807		14.9
<i>RRR</i>	43.284	65518		12.5
5	46.892	65589		12.5

2.2 线性范围、检出限和定量限

将 *RRR*- α -生育酚标准曲线溶液注入到色谱仪, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归分析。回归方程为 $Y=26300X-5000$, 相关系数 $r=0.99986$, 表明 *RRR*- α -生育酚在 0.5~50 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内线性关系良好。以 3 倍信噪比所对应的量为检出限, 10 倍信噪比对应的量为定量限, 计算 *RRR*- α -生育酚的检出限与定量限, 分别为 0.20 和 0.60 $\text{mg}/100\text{ g}$ 。

2.3 重复性及回收率实验

以实验室自制添加 *RRR*- α -生育酚的乳基乳粉样品, 按照 1.2.2 操作进行 6 次平行测定, 所得重复性结果如表 2, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 2.7%, 精密度良好。

以脱脂乳粉为样品基质, 精确称取 1.0 g 样品共 18 份, 其中 6 份样品加入质量浓度为 1.204 mg/mL 的 *RRR*- α -生育酚标准溶液各 10 μL , 作为低浓度水平加标回收样品; 其中 6 份样品加入浓度为 1.204 mg/mL 的标准溶液各 140 μL , 作为中浓度水平加标回收样品; 另 6 份样品加入浓度为 1.204 mg/mL 的标准溶液各 200 μL , 作为高浓度水平加标回收样品, 按照 1.2.2 操作并进行色谱分析。由表 3 可知,

回收率为 95.0%~109.4%, 相对标准偏差为 1.1%~1.6%, 该方法准确性良好。

表 2 方法精密度
Table 2 Method precision

编号	称样量/g	<i>RRR</i> - α -生育酚含量 /($\text{mg}/100\text{ g}$)	相对标准偏差 /%
1	0.9576	21.9	2.7
2	0.9787	22.0	
3	0.9765	20.7	
4	1.0133	20.8	
5	1.0758	21.9	
6	1.0234	21.5	

3 结 论

本研究通过优化色谱条件, 将 *RRR*- α -生育酚与其他 α -生育酚立体异构体进行了有效分离, 并采用手性色谱法直接测定乳粉中 *RRR*- α -生育酚的含量, 与传统的甲基衍生化法相比, 更为简便、高效。本方法也可用于鉴别样品中 α -生育酚是 *RRR*- α -生育酚还是 *DL*- α -生育酚。

表 3 回收率实验
Table 3 Recoveries test

	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均回收率 /%	相对标准 偏差/%
低浓度加标 水平	12.04	13.11	108.9	107.9	1.6
	12.04	13.17	109.4		
	12.04	12.95	107.6		
	12.04	12.60	104.7		
	12.04	13.03	108.2		
	12.04	13.05	108.4		
中浓度加标 水平	168.56	162.65	96.5	97.8	1.2
	168.56	162.95	96.7		
	168.56	166.85	99.0		
	168.56	166.88	99.0		
	168.56	163.32	96.9		
	168.56	166.12	98.6		
高浓度加标 水平	240.8	235.21	97.7	96.8	1.1
	240.8	233.27	96.9		
	240.8	235.65	97.9		
	240.8	233.96	97.2		
	240.8	228.67	95.0		
	240.8	231.83	96.3		

参考文献

[1] 姜泽如, 吴轲, 彭珊珊, 等. 维生素 E 与生命早期生长发育及疾病相关性研究进展[J]. 中国生育健康杂志, 2021, 32(1): 76–82.
LOU ZR, WU K, PENG SS, *et al.* Study progress of relativity between vitamin E and growth, development and diseases in early life [J]. Chin J Reprod Health, 2021, 32(1): 76–82.

[2] 中华预防医学会儿童保健分会. 婴幼儿喂养与营养指南[J]. 中国妇幼健康研究, 2019, 30(4): 392–417.
China Preventive Medicine Association, Society of Child Health. Guide to infant feeding and nutrition [J]. Chin J Wom Child Health Res, 2019, 30(4): 392–417.

[3] GAHCHE JJ, HERRICK KA, PPTISCHMAN N, *et al.* Dietary supplement use among infants and toddlers aged<24 months in the United States, NHANES 2007–2014 [J]. J Nutr, 2019, 149(2): 314–322.

[4] Food and Nutrition Board & Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids [M]. Washington, DC: National Academies Press, 2000.

[5] AHSAN H, AHAD A, SIDDIQUI WA. A review of characterization of tocotrienols from plant oils and foods [J]. J Chem Biol, 2015, 8: 45–59.

[6] AZZI, ANGELO. Many tocopherols, one vitamin E [J]. Mol Asp Med, 2018, 61: 92–103.

[7] KUCHAN MJ, MOUNLTON CJ, DYER RA, *et al.* RRR- α -tocopherol is the predominant stereoisomer of α -tocopherol in human milk [J]. Curr Dev Nutr, 2018, 2(8): 1–7.

[8] LEONARD SW, TERASAWA Y, FARESE RV, *et al.* Incorporation of deuterated RRR-or all-rac- α -tocopherol in plasma and tissues of α -tocopherol transfer protein-null mice [J]. Am J Clin Nutr, 2002, 75:

555–560.

[9] FU JY, HTAR TT, SILVA LD, *et al.* Chromatographic separation of vitamin E enantiomers [R]. Molecules, 2017, 22: 233–248.

[10] HYMØLLER L, LASHKARI S, CLAUSEN TN, *et al.* Distribution of α -tocopherol stereoisomers in mink (*Mustela vison*) organs varies with the amount of all-rac- α -tocopheryl acetate in the diet [J]. Br J Nutr, 2018, 120: 1332–1337.

[11] JENSEN SK, LAURIDSEN C. Alpha-tocopherol stereoisomers [J]. Vitam Horm, 2007, 76: 281–308.

[12] GAUR S, KUCHAN MJ, LAI CS, *et al.* Supplementation with RRR-or all-rac- α -tocopherol differentially affects the alpha-tocopherol stereoisomer profile in the milk and plasma of lactating women [J]. J Nutr, 2017, 147: 1301–1307.

[13] RANARD KM, ERDMAN JW. Effects of dietary RRR α -tocopherol vs all-racemic α -tocopherol on health outcomes [J]. Nutr Rev, 2018, 76: 141–153.

[14] REY AI, LOPEZ-BOTE CJ. Alpha-tocopherol stereoisomer analysis as discriminant method for distinguishing Iberian pig feed intake during the fattening phase [J]. Food Chem, 2014, 142: 342–348.

[15] KLACZKOV G, ANUSZEWSKA EL. Determination of the stereoisomers of racemic α -tocopherol in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography and gas chromatography [J]. Drug Res, 2008, 65: 715–721.

[16] ZHAO Y, MONAHAN FJ, MCNULTY BA, *et al.* α -Tocopherol stereoisomers in human plasma are affected by the level and form of the vitamin E supplement used [J]. J Nutr, 2015, 145: 2347–2354.

[17] LAURIDSEN C, JENSEN SK. Influence of supplementation of all-rac- α -tocopheryl acetate preweaning and vitamin C postweaning on α -tocopherol and immune responses of piglets [J]. J Anim Sci, 2005, 83: 1274–1286.

[18] 吴轲, 孙涵潇, 毛颖异, 等. 母乳 α -生育酚中天然 RRR 及合成构型分布[J]. 营养学报, 2019, 41(6): 539–543.
WU K, SUN HX, MAO YY, *et al.* Natural RRR- α -tocopherol and synthetic α -tocopherol stereoisomers in human breast milk [J]. Act Nutr Sin, 2019, 41(6): 539–543.

[19] RHODES JS, RENDEIRO C, MUN JG, *et al.* Brain α -tocopherol concentration and stereoisomer profile alter hippocampal gene expression in weanling mice [J]. J Nutr, 2020, 150: 3075–3085.

[20] GILL BD, INDYK HE. Separation of RRR- α -tocopherol by chiral chromatography [J]. J AOAC Int, 2020, 103: 1288–1292.

(责任编辑: 张晓寒 王欣)

作者简介



王枚博, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: meibo.wang@abbott.com



宋 畅, 硕士, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: angela.song@abbott.com