

高效液相色谱法测定婴幼儿配方奶粉中 1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯

戴嵘德^{1,2}, 刘峰³, 傅武胜^{1,2,4,*}, 黄思婷^{1,2}, 杨贵芝², 刘文菁⁵

(1.福建医科大学公共卫生学院, 福建 福州 350122; 2.福建省疾病预防控制中心, 福建 福州 350012;

3.宁夏疾病预防控制中心, 宁夏 银川 750000; 4.福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122;

5.福建省产品质量检验研究院, 福建 福州 350002)

摘要:建立了婴幼儿配方乳粉中1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯(1,3-dioleoyl-2-palmitoyl-glycerol, OPO)的检测方法。样品经氨水水解,用有机溶剂提取脂肪,氨基固相萃取柱净化,使用银离子色谱柱分离,以0.55%乙腈-正己烷为流动相洗脱,用高效液相色谱-蒸发光散射检测器检测。该方法实现了OPO和1,2-二油酸-3-棕榈酸甘油三酯的基线分离,可对OPO进行准确定性定量分析;方法在25~500 μg/mL质量浓度范围内线性关系良好,决定系数 $R^2=0.9996$,检出限和定量限分别为0.30、0.90 g/kg,加标含量为1~96 g/kg的范围内,OPO的平均回收率在97.1%~104.2%之间,相对标准偏差为1.2%~2.9%,精密度和正确度等方法学指标均符合要求;还通过了实验室间的协同性验证。调查分析了我国39份市售OPO强化婴幼儿配方奶粉,OPO含量仅为标签标示量的28.4%~59.7%,这主要是因为检测方法不一致。

关键词: 高效液相色谱; 1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯; 婴幼儿配方奶粉

Determination of 1,3-Dioleic acid-2-palmitoyl triglyceride in Infant Formula by High Performance Liquid Chromatography

DAI Rongde^{1,2}, LIU Feng³, FU Wusheng^{1,2,4,*}, HUANG Siting^{1,2}, YANG Guizhi², LIU Wenjing⁵

(1. School of Public Health, Fujian Medical University, Fuzhou 350122, China; 2. Fujian Provincial Center for Disease Control and Prevention,

Fuzhou 350012, China; 3. Ningxia Center for Disease Control and Prevention, Yinchuan 750000, China;

4. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China;

5. Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality, Fuzhou 350002, China)

Abstract: A method for the quantification of 1,3-dioleoyl-2-palmitoyl-glycerol (OPO) in infant formula was developed. The samples were treated with ammonia and extracted with organic solvents. The fat containing OPO was purified on a NH_2 solid-phase extraction (SPE) cartridge packed with aminopropyl as the sorbent. The eluate was separated by silver ion chromatography using 0.55% acetonitrile-hexane as the mobile phase. The detection was carried out with a high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD). This novel procedure enabled the complete separation of OPO and its isomer 1,2-dioleoyl-3-palmitoyl-glycerol (OOP), thus allowing for the accurate quantification of OPO. The developed method showed the desired linearity in the concentration range of 25–500 μg/mL with a determination coefficient (R^2) of 0.9996. The limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) were 0.30 and 0.90 g/kg, respectively. At spiked concentrations from 1 to 96 g/kg, the average recoveries of OPO varied from 97.1% to 104.2% with relative standard deviations (RSD) between 1.2% and 2.9%. The precision and accuracy of this method met the relevant requirements, and it passed the inter-laboratory collaborative validation. Our investigation analyzed 39 commercial samples of OPO-fortified infant formula in China, revealing that the measured OPO content only accounted for 28.4% to 59.7% of the labelled value, which is mainly due to the inconsistency of detection methods.

Keywords: high performance liquid chromatography; 1,3-dioleic acid-2-palmitoyl triglyceride; infant formula

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230712-153

中图分类号: TS252.7

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2024)08-0265-07

收稿日期: 2023-07-12

基金项目: 卫生部食品安全国家标准制定项目 (spaq-2012-71)

第一作者简介: 戴嵘德 (1998—) (ORCID: 0000-0002-9775-8234), 男, 硕士, 研究方向为公共卫生。E-mail: 2697110243@qq.com

*通信作者简介: 傅武胜 (1971—) (ORCID: 0000-0003-0508-2415), 男, 主任技师, 博士, 研究方向为食品化学污染物的检测技术和风险评估。E-mail: fwsfqm@126.com

引文格式:

戴嵘德, 刘峰, 傅武胜, 等. 高效液相色谱法测定婴幼儿配方奶粉中1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯[J]. 食品科学, 2024, 45(8): 265-271. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230712-153. <http://www.spkx.net.cn>

DAI Rongde, LIU Feng, FU Wusheng, et al. Determination of 1,3-dioleic acid-2-palmitoyl triglyceride in infant formula by high performance liquid chromatography[J]. Food Science, 2024, 45(8): 265-271. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230712-153. <http://www.spkx.net.cn>

母乳是婴幼儿的最佳食物, 母乳富含甘油三酯 (triacylglycerols, TAG) 等各类营养成分, TAG中最丰富的是1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯 (1,3-dioleoyl-2-palmitoyl-glycerol, OPO) 和1-油酸-2-棕榈酸-3-亚油酸甘油三酯 (1-oleate-2-palmitate-3-linoleate-glycerol, OPL) 等2位棕榈酸 (*sn*2-棕榈酸) [1-3]。因此, OPO的添加在一定程度上弥补了婴幼儿配方奶粉与母乳之间TAG成分的差异, OPO具有促进脂肪、钙、镁等矿物质的吸收[4-6], 软化粪便[7], 改善肠道菌群[8-10], 减少婴幼儿哭闹及肠绞痛频率等作用[11-13], 但欧洲食品安全局, 欧洲儿科胃肠病学、肝病学和营养学学会并未认同*sn*2-棕榈酸的上述作用; 美国食品药品监督管理局认定OPO属于GRAS级 (即一般公认为安全) [4,14-15]。2008年原卫生部批准了OPO为食品营养强化剂[16], 2012年进一步规范其允许添加量为24~96 g/kg[17], 要求以OPO纯品计; 2015年发布了GB 30604—2015《食品营养强化剂 1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯》, 明确添加剂产品中OPO相对含量 $\geq 40\%$ (以C₅₂TAG质量计), 在附录A中给出了测定OPO的气相色谱-氢离子火焰检测器 (gas chromatography-flame ionization detection, GC-FID) 法[18]。

在检测过程中, 需要将OPO的同分异构体1,2-二油酸-3-棕榈酸甘油三酯 (1,2-dioleoyl-3-palmitoyl-glycerol, OOP) 与OPO分离开, 主要的检测方法有高效液相色谱-蒸发光散射检测器 (high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector, HPLC-ELSD) 检测法[19-21]、GC-FID法[22-23]、液相色谱-串联质谱 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 法[24]、气相色谱-质谱 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 法[25]等。研究表明, GC-FID、GC-MS尚无法实现二者的充分分离, 文献报道HPLC-ELSD、LC-MS/MS法可以一定程度实现二者的分离, 但分离效果不佳或者保留时间较长[24,26-27]。其中银离子色谱柱对于同分异构体的分离效果最好[20,28-30]。

银离子色谱法已经被用于分离TAG的同分异构体, 魏婷婷[29]、Adlof[21]等通过串联两根银离子色谱柱测定OOP、OPO, 但未实现两者的基线分离, 且分析时间较长; 韦伟[20]、宋戈[28]等利用HPLC-ELSD, 以二氯甲烷-丙

酮为流动相, 建立了婴幼儿配方奶粉 (以下简称婴配) 样品中OPO的测定方法, 但OOP和OPO仍然分离不完全, 有部分色谱峰重叠, 无法准确定量。Lisa等[24]根据脂肪酸链中双键的数量和位置不同, 以己烷-乙腈-异丙醇为流动相, 利用3根银离子色谱柱串联测定TAG及其同分异构体的组成, 同样OOP和OPO也未实现基线分离, 且多根色谱柱串联导致分析时间长。

本研究旨在建立婴配中OPO含量的检测方法, 以期为国家建立相关食品安全标准提供可靠的方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

OPO (纯度为99%, CAS: 1716-07-0)、OOP (纯度为98%, CAS: 2190-30-9) 瑞典Larodan AB公司; 三棕榈酸甘油酯 (1,2,3-tripalmitoyl glycerol, PPP) (纯度为99%, CAS: 555-44-2)、1,2-棕榈酸-3-油酸甘油三酯 (1,2-palmitin-3-olein, PPO) (纯度为99%, CAS: 1867-91-0)、1,3-棕榈酸-2-油酸甘油酯 (1,3-palmitin-2-olein, POP) (纯度为99%, CAS: 2190-25-2)、1-棕榈酸-2-亚油酸-3-硬脂酸甘油酯 (1-palmitate-2-linoleate-3-stearate-glycerol, PLS) (纯度为99%, CAS: 2190-12-7)、三油酸甘油三酯 (1,2,3-trioleoyl-glycerol, OOO) (纯度为99%, CAS: 122-32-7)、1-硬脂酸-2-油酸-3-亚油酸甘油酯 (1-stearin-2-olein-3-linolein, SOL) (纯度为99%, CAS: 2680-59-3)、1-棕榈酸-2-亚油酸-3-油酸甘油酯 (1-palmitate-2-linoleate-3-oleate-glycerol, PLO) (纯度为99%, CAS: 2579-00-2)、1,2-亚油酸-3-棕榈酸甘油酯 (1,2-dilinoate-3-palmitate-glycerol, LLP) (纯度为99%, CAS: 2190-15-0) 美国Panphy化学品公司; 1-油酸-2-棕榈酸-3-亚油酸甘油三酯 (1-oleate-2-palmitate-3-linoleate-glycerol, OPL) (纯度为99%, CAS: 2534-97-6) 上海甄准生物科技有限公司。

二氯甲烷、乙腈、正己烷 (均为色谱纯), 氨水 (质量分数约25%)、乙醚、石油醚和乙醇 (均为分析纯) 国药集团化学试剂公司; 氨基固相萃取柱 (500 mg/6 mL) 深圳逗点公司; 特殊医学婴幼儿配方食品8号样品 河北省食品检验研究院; 爱韵天使

孕产妇配方乳粉 北京三元食品公司；星飞帆1段婴幼儿配方奶粉（编号：QZ22202，脂肪标示值：272 g/kg，OPO：60 g/kg） 中国飞鹤有限公司；秦益爱贝聪2段婴幼儿配方奶粉（编号：10097W，脂肪标示值：225 g/kg，OPO：24 g/kg） 陕西省定边县乳品实业有限公司；实验用水均为超纯水。

1.2 仪器与设备

LC-20AD型高效液相色谱仪、ELSD-LT II型蒸发光散射检测器、SPD-M20A型紫外检测器 日本Shimadzu公司；24位氮吹仪 上海安谱公司；水浴恒温振荡器 金坛市精达仪器公司；XM-P10H超声波清洗机 小美超声仪器（昆山）公司；TU-1900双光束紫外-可见分光光度计 北京普析通用公司；34H24R1离心机 长沙湘智离心机仪器有限公司；Luna 5 μm SCX 100A-silver色谱柱（5 μm ，250 mm \times 4.6 mm） 美国Phenomenex公司；Chromspher 5 Lipids银离子色谱柱（5 μm ，250 mm \times 4.6 mm） 美国Agilent公司；C₁₈色谱柱（5 μm ，3.9 mm \times 150 mm） 美国Waters公司。

1.3 OPO的测定方法

1.3.1 脂肪提取

参考GB 5009.6—2016《食品中脂肪的测定》及文献[31-32]的方法并进行适当调整，主要减少称样量。准确称取婴幼儿配方乳粉0.5 g（精确至0.001 g），加入2 mL、（65 \pm 5） $^{\circ}\text{C}$ 水溶解，加入1.0 mL氨水，在（65 \pm 5） $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下振摇30 min，冷却至室温后，加入3.0 mL乙醇混匀。加入乙醚、石油醚各5 mL，均振摇5 min，离心后取上清液到50 mL离心管，再加入乙醚和石油醚重复提取一次。于55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下氮吹至干，准确加入3.00 mL正己烷溶解残余物，充分混匀，备用。

1.3.2 脂肪净化的优化

氨基固相萃取柱预先用10 mL正己烷活化后，准确移取2.00 mL上述溶液上柱，比较不同洗脱溶剂（二氯甲烷、三氯甲烷、四氯化碳、乙酸乙酯、10%二氯甲烷-正己烷）对溶液净化效果（用吸光度表示）及回收率的影响，在上述基础上比较不同比例二氯甲烷-正己烷（2%、4%、6%、8%、10%、15%、20%）洗脱溶液对回收率的影响，并考察了不同体积洗脱溶液（2、4、6、8、10 mL）对回收率的影响，将上样后的流出液和洗脱液一同收集，于55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴氮吹至干；准确加入2.00 mL正己烷涡旋混匀，精确取出200 μL ，用正己烷定容至1.00 mL，涡旋混匀，过0.22 μm 有机滤膜，供液相色谱测定。

1.3.3 液相色谱条件的优化

色谱柱条件优化：比较Luna 5 μm SCX 100A-silver色谱柱（以下简称Luna色谱柱）（5 μm ，

250 mm \times 4.6 mm）、Chromspher 5 Lipids银离子色谱柱（5 μm ，250 mm \times 4.6 mm）、C₁₈色谱柱（5 μm ，3.9 mm \times 150 mm）的分离效果。

流动相条件优化：比较不同比例（0.5%、0.55%、0.6%、0.7%）乙腈的正己烷（现配现用，超声30 min）的分离效果。

ELSD条件优化：比较不同漂移管温度（40、60、80 $^{\circ}\text{C}$ ）、不同氮气流速（1.2、1.4、1.6、2.0 L/min）对信噪比（ R_{SN} ）的影响。

其他固定条件：进样量：10 μL ；柱温：35 $^{\circ}\text{C}$ ；流速：1.2 mL/min，洗脱时间：30 min。

1.4 数据处理

使用岛津公司LabSolutions工作站对色谱数据进行处理，用Excel 2019进行数据预处理，使用SPSS 27.0.1统计并分析数据，并用Origin 2018软件作图。

2 结果与分析

2.1 ELSD参数优化

TAG没有荧光特性，在紫外波长（ $<210\text{ nm}$ ）条件下才有较弱的吸收，因此紫外检测器和荧光检测器不适合用于OPO的定性和定量测定^[29]。国内外分析TAG大多采用LC-MS/MS法，本研究选择ELSD作为信号的检测手段。

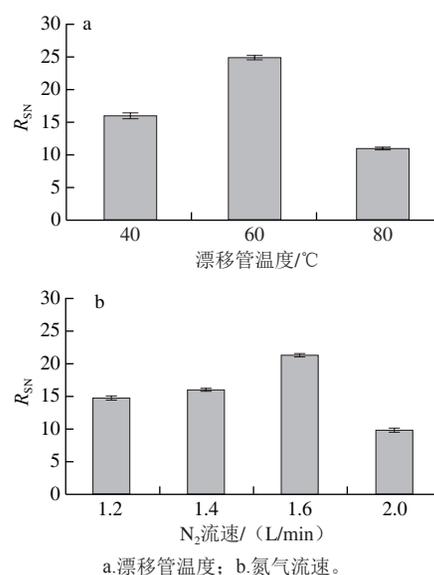


图1 漂移管温度和 N_2 流速对信噪比（ R_{SN} ）的影响

Fig. 1 Influence of drift tube temperature and nitrogen gas flow rate on signal-to-noise ratio

ELSD中影响待测物灵敏度的参数主要是漂移管的蒸发温度和氮气流速，蒸发温度升高将促进流动相的快速挥发，使得噪音降低。比较漂移管3种温度（40、60、80 $^{\circ}\text{C}$ ）发现，当温度为60 $^{\circ}\text{C}$ 时，OPO的 R_{SN} 最大

(图1a), 所以确定最佳温度为60 °C。对于氮气流速而言, 在控制其他条件不变的前提下, 载气流速越大, 雾化时的液滴尺寸越小, 其散射光减少, 相应的响应信号越小, 最佳气体流量应该是在可接受的低噪音基线条件下产生最大峰面积时的流量。实验表明, 氮气流速低(1.2、1.4 L/min)时, 背景信号高, 导致噪声变大, 进而引起灵敏度下降; 当流速为1.6 L/min时, OPO的 R_{SN} 最大; 流速达到2.0 L/min时, 流速过大, OPO可能容易被吹走, 导致 R_{SN} 明显下降(图1b), 故确定氮气的最佳流速为1.6 L/min。

2.2 色谱条件的优化

比较 C_{18} 色谱柱、Luna色谱柱、Chromspher 5 Lipids银离子色谱柱对OOP和OPO的分离效果。从实验结果来看, C_{18} 色谱柱在二氯甲烷和乙腈为流动相进行梯度洗脱时, 无法实现OOP和OPO的完全分离, 文献[28]的结果也表明, C_{18} 色谱柱难以将TAG的同分异构体分离开。对于Luna色谱柱, 采用二氯甲烷-丙酮、乙腈-正己烷等梯度洗脱两种条件进行实验。结果表明, 乙腈-正己烷体系的分离效果更好, 故选择该体系进行继续优化, 包括Agilent色谱柱的优化。

使用Luna色谱柱, 以乙腈-正己烷体系为流动相, 通过调整该体系中的乙腈的比例提高OOP和OPO的分离度, 对比乙腈比例为1.0%、0.8%、0.7%、0.6%的乙腈-正己烷, 结果显示, 含0.7%乙腈的正己烷能够将OPO和OOP完全分开, 分离度约为1.6, 保留时间为20 min, OPO的 R_{SN} 约为16; 含0.6%乙腈的正己烷也能够将二者充分分离, 分离度约为1.9, 但保留时间较长, 尤其OPO响应较低, 其 R_{SN} 仅为2.0, 远低于含0.7%乙腈的正己烷洗脱效果。综合考虑, 初步选择含0.7%乙腈的正己烷为流动相。但该色谱柱用于实际样品分离时, 无法实现OOP和OPO的基线分离, 且OPO色谱峰附近有许许多多干扰峰, 无法准确测定OPO的含量。

使用Chromspher 5 Lipids银离子色谱柱, 流动相比例以Luna色谱柱的体系为参考, 对比含不同比例乙腈的乙腈-正己烷为流动相, 分别进样标准溶液和婴儿样品, 结果见图2、3。用0.55%乙腈-正己烷的流动相时, 目标物的分离度高, 达到基线分离, 保留时间较0.5%乙腈-正己烷为流动相时更短, 且实际样品OOP和OPO也能实现有效分离, 因此选择0.55%乙腈-正己烷为流动相。

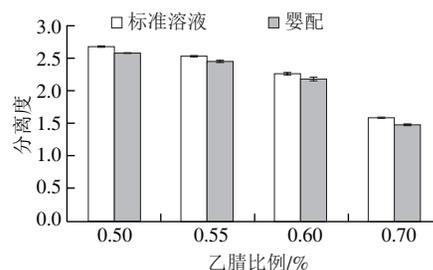
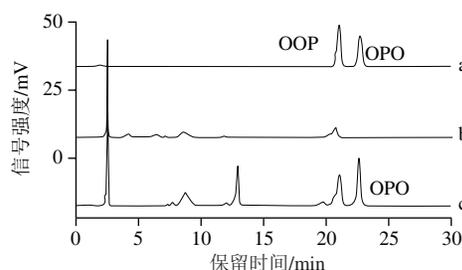


图2 不同比例乙腈条件下标准溶液和婴儿样品中OPO和OOP的分离度
Fig. 2 Effect of various acetonitrile and *n*-hexane mixtures on the separation of OPO and OOP in standard solutions and infant formula



a. OPO、OOP混合标准溶液(100 µg/mL); b. 婴儿配; c. 加标后婴儿配。
图3 混合标准溶液及婴儿配中OOP和OPO的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of OOP and OPO in standard solutions and infant formula

用双泵按照等度输送流动相时, 发现OOP和OPO的保留时间和峰面积不够稳定, 这可能与乙腈和正己烷之间溶解性低有关, 因此流动相使用前充分超声, 以提高两者的互溶程度; 同时存放流动相的试剂瓶应采用安全盖, 以降低因蒸发引起的溶剂比例改变。结果显示, 当超声达到30 min, 其保留时间、峰面积的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)分别为5.38%、0.65%, 变化小且重复性好。

实际样品中TAG种类繁多, 在母乳和婴儿样品分析中报道了以下几种。总碳数为48的饱和TAG 48:0, 如PPP; 总碳数为50、双键为1的TAG 50:1, 如PPO、POP; TAG 52:2, 如OOP、OPO、PLS和TAG 52:4, 如LLP, TAG 54:3, 如OOO、SOL, TAG 52:3, 如OPL、PLO等^[33-34]。饱和、单不饱和和三不饱和的TAG在银离子色谱分离中预计不会与OPO、OOP重叠^[35], 但仍然必须排除OPO、OOP与样品中可能存在的其他不饱和TAG重叠的可能性, 如PLS及其区域异构体。因此, 利用现有标准品证实, 在优化后的条件下, 这些TAG异构体(PLS、OOP、PLO、OPL、OOO、LLP)在银离子柱中能与OPO明显分离(图4), PLS能与OPO、OOP有效分离, 且OPL及其同分异构体也不对OPO的分离产生影响, 可以认为该条件下OPO的色谱峰不存在其他TAG的干扰。

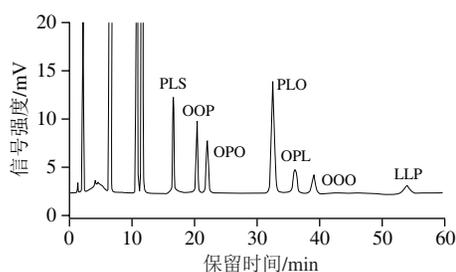


图4 HPLC-ELSD测定中OPO与其他TAG分离的色谱图

Fig. 4 HPLC-ELSD chromatogram showing separation of OPO from other TAGs

2.3 样品前处理优化

在实际样品检测过程中,发现进样样品有一定程度的基质效应,且对后续进样结果及色谱柱柱效产生影响^[36]。因此,本研究采用氨基固相萃取柱对样品净化。比较不同洗脱溶剂(图5),以10%二氯甲烷-正己烷为流动相时,洗脱液的紫外吸收最低,且回收率符合要求,说明其含有的具有紫外吸收的杂质较少。在此基础上,进一步比较了不同比例二氯甲烷-正己烷的洗脱效果(图6),OPO的回收率在40.5%~104.5%之间,当二氯甲烷占正己烷比例达到10%时,回收率效果最佳。

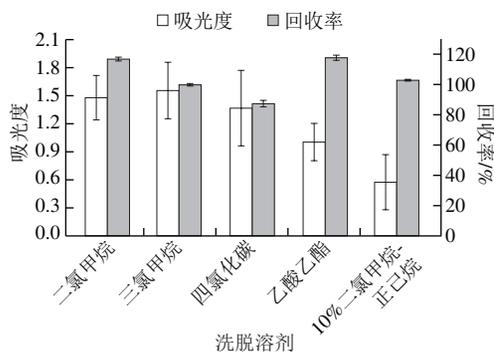


图5 洗脱溶剂对杂质去除效果及OPO回收率的影响

Fig. 5 Effects of neat and mixed solvents on the removal of impurities and on the recovery of OPO

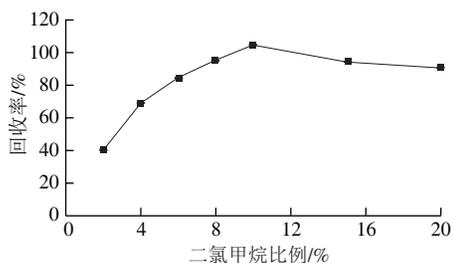


图6 洗脱溶剂中二氯甲烷比例对OPO回收率的影响

Fig. 6 Effect of various dichloromethane and *n*-hexane mixtures on OPO recovery

用占比为10%二氯甲烷-正己烷洗脱,每2 mL收集1管进行测定,结果表明,当洗脱液达到8 mL时,OPO

的回收率接近100%,并基本保持稳定,为使目标物得到充分洗脱,因此最终选择10 mL占比为10%的二氯甲烷-正己烷为洗脱剂。

2.4 提取次数的考察

首先采用加标实验考察样品中OPO的回收率,样品提取1次时OPO的回收率约为77.4%,提取2次时OPO的回收率约为102.6%,提取3次时OPO的回收率约为102.16%,这初步说明两次提取即可满足OPO的回收率要求。考虑加标实验有一定的局限性,因此更进一步考察实际婴配样品脂肪、OPO提取的情况。用飞鹤婴配样品(IF1)和爱贝聪婴配样品(IF2)进行对比实验,两种奶粉的脂肪及OPO含量详见1.1节,结果如图7所示。两种奶粉第一次提取的脂肪量占婴配中脂肪含量标示值的82.3%~94.4%,符合标准要求^[37]。前两次提取脂肪总量之和占提取总量的99.2%(IF1)、94.4%(IF2),提取OPO总量之和占提取总量的100%、95.9%。第3次提取时,IF1、IF2中脂肪的提取率分别为0.8%、5.5%,OPO的提取率分别为0%、4.1%,造成这两种婴配中脂肪和OPO提取率有一定差异的原因可能是两者的脂肪来源及制作工艺不同。提取两次时,IF1、IF2中OPO含量分别为19.25、11.14 g/kg,分别占产品标示值的32.1%、46.4%(根据初步了解,很大可能为采用GC-FID法得到值或推测值)。综上,第3次所提取的脂肪含量及OPO含量较低,只占总量的0%~5.5%,对测定结果影响不大,可忽略不计。考虑有机溶剂节约和工作效率,因此确定提取2次可满足要求。

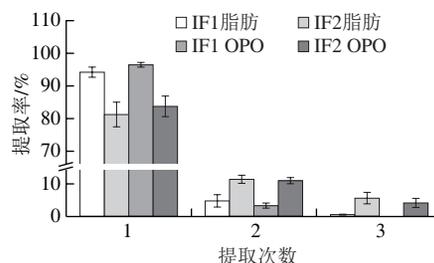


图7 提取次数对脂肪和OPO提取率的影响

Fig. 7 Impact of number of extraction cycles on the extraction efficiencies of fat and OPO

2.5 溶液膜过滤的考察

考察尼龙、聚四氟乙烯和聚偏氟乙烯3种微孔滤膜(规格均为13 mm、0.22 μm)的过滤效果,OPO的回收率结果显示,3种滤膜对于OPO的回收率影响小,均能满足要求。

2.6 方法验证

2.6.1 线性范围、检出限和定量限

根据最佳仪器条件进行实验,以OPO标准品质量浓度(C)的对数值lg C(x)与峰面积(A)的对数值lg A(y)

绘制线性回归曲线, 其线性方程为 $y = 1.7795x + 1.7623$, 决定系数 $R^2 = 0.9996$, 线性范围 $25 \sim 500 \mu\text{g/mL}$ 。选择OPO未检出的婴配样品提取脂肪后, 溶液以氨基固相萃取柱净化后, 加入OPO进行实验, 以3倍信噪比($R_{\text{SN}} = 3$)确定检出限(limit of detection, LOD), 以10倍信噪比($R_{\text{SN}} = 10$)确定为定量限(limit of quantitation, LOQ), OPO的LOD为 0.30 g/kg , LOQ为 0.90 g/kg 。

2.6.2 正确度和精密度

以未检出OPO的1段婴配(陕HZ2020)为基质, 进行5个含量水平(1、2、10、24、96 g/kg)的加标回收实验($n=6$), 覆盖了LOQ, 符合GB 14880—2012《食品营养强化剂使用标准》中允许强化量要求, 结果见表1。OPO的回收率均值在 $97.1\% \sim 104.2\%$ 之间, RSD范围为 $1.2\% \sim 2.9\%$ 。

表1 婴配样品中OPO的加标回收率和RSD结果($n=6$)

| 加标含量/ (g/kg) | 实测平均值/ (g/kg) | 平均 回收率/% | RSD/% |
|-----------------|------------------|-------------|-------|
| 1 | 1.04 ± 0.01 | 104.2 | 2.5 |
| 2 | 2.04 ± 0.02 | 101.3 | 2.8 |
| 10 | 9.80 ± 0.11 | 97.1 | 2.9 |
| 24 | 24.54 ± 0.12 | 102.3 | 1.2 |
| 96 | 98.67 ± 0.50 | 102.8 | 1.3 |

福建省疾病预防控制中心(Lab4)邀请青岛海关技术中心(Lab1)、福建省产品质量检验研究院(Lab2)、莆田市疾病预防控制中心(Lab3)参加了实验室间协同性验证, 分别对婴配(IF3)、特膳奶粉(IF4)、调制乳粉(IF5)这3种基质进行24、96 g/kg两种水平的加标实验, 结果如图8所示。可以看出, 4家实验室的平均回收率和RSD均符合GB/T 27417—2017《合格评定化学分析方法确认和验证指南》的要求^[38], 说明本方法检测OPO结果准确可靠。

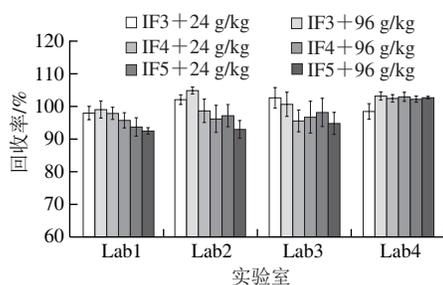


图8 实验室间协同性验证OPO回收率和精密度结果

Fig. 8 Recoveries and RSDs of OPO in infant formula in inter-laboratory collaborative validation

2.7 实际样品分析

利用研制的方法对我国39份OPO强化婴配进行OPO检测, OPO含量占产品标示值比例如表2、图9所示; 对比3个段数(0~6、6~12、12~24月龄)婴配之间该

比值差异不大。本次调查OPO强化后婴配中OPO含量在 $5 \sim 20 \text{ g/kg}$ 之间, 仅为OPO标示值($26 \sim 68 \text{ g/kg}$)的 $28.4\% \sim 59.7\%$, 这可能主要因为本实验HPLC法测定特异性强, 能将OPO与其同分异构体OOP分开。据了解, 目前较多采用食品营养强化剂标准GB 30604—2015^[18]附录A中GC-FID法测定产品中OPO含量。从该方法分析原理可知, 由于使用的气相色谱柱(DB-1 HT)无法将OPO和OOP分离开, 测得结果为3个脂肪酰基中总碳数为52的 C_{52} TAG的总含量; 本实验室研究表明, 婴配中普遍含有较高含量的OOP, 因此用GC-FID法测定OPO时, 测定结果将明显偏高。

表2 市售婴配中OPO含量占标示值的比例

Table 2 Percentages of measured OPO contents relative to the labelled values of 39 commercial samples of infant formula

| 样品份数 | 段数 | OPO含量占标示值的百分比/% | | |
|------|---------|-----------------|-------|------------------|
| | | 最大值 | 最小值 | 平均值 |
| 11 | 0~6月龄 | 49.50 | 32.30 | 39.90 ± 1.50 |
| 14 | 6~12月龄 | 57.80 | 28.40 | 44.60 ± 2.38 |
| 14 | 12~24月龄 | 59.70 | 32.20 | 44.20 ± 2.17 |

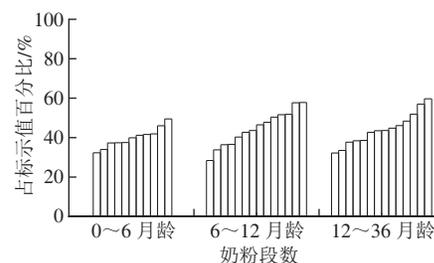


图9 HPLC法调查39份市售婴配中OPO含量占产品标签标示值的比例

Fig. 9 Percentages of OPO contents measured by HPLC relative to the label values of 39 commercial samples of infant formula

进一步研究表明, 本法既能够将OPO与OOP分离, 也能将OPO与其他 C_{52} TAG分离开, 能测定单一的OPO物质; 所调查OPO强化婴儿、幼儿、学龄前配方奶粉中的OPO均能与OOP类干扰物较好地分离, 这说明本方法能较好地适用于婴幼儿食品中OPO含量的测定, 并满足GB 14880—2012^[17]测定OPO纯品的要求。

3 结论

本方法通过优化银离子色谱柱的分离条件, 成功实现了OPO与其同分异构体OOP, 以及其他 C_{52} 甘油三酯的分离, 优化了ELSD的参数, 建立了HPLC法, 可精确测定婴配中OPO的含量, 方法重复性好、准确度高, 较好地满足了婴配中OPO的检测需求; 测定方法用于调查我国16个品牌共39份市售婴配中OPO的含量, 结果表明, 全部样品中以HPLC法测定的OPO含量仅为产品标签标示值的 $28.4\% \sim 59.7\%$, 含量普遍较低, 这很大程度因为测定方法之间的原理不同。

参考文献:

- [1] KALLIO H, NYLUND M, BOSTROM P, et al. Triacylglycerol regioisomers in human milk resolved with an algorithmic novel electrospray ionization tandem mass spectrometry method[J]. Food Chemistry, 2017, 233: 351-360. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.04.122.
- [2] FABRITIUS M, LINDERBORG K M, TARVAINEN M, et al. Direct inlet negative ion chemical ionization tandem mass spectrometric analysis of triacylglycerol regioisomers in human milk and infant formulas[J]. Food Chemistry, 2020, 328: 126991. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.126991.
- [3] ZHANG X H, QI C, ZHANG Y R, et al. Identification and quantification of triacylglycerols in human milk fat using ultra-performance convergence chromatography and quadrupole time-of-flight mass spectrometry with supercritical carbon dioxide as a mobile phase[J]. Food Chemistry, 2019, 275: 712-720. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.09.150.
- [4] BRONSKY J, CAMPOY C, EMBLETON N, et al. Palm oil and beta-palmitate in infant formula: a position paper by the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (ESPGHAN) committee on nutrition[J]. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2019, 68(5): 742-760. DOI:10.1097/MPG.0000000000002307.
- [5] LITMANOVITZ I, DAVIDSON K, ELIAKIM A, et al. High beta-palmitate formula and bone strength in term infants: a randomized, double-blind, controlled trial[J]. Calcified Tissue International, 2013, 92(1): 35-41. DOI:10.1007/s00223-012-9664-8.
- [6] SHEN L L, HUANG W H, XU X B, et al. Stool saponified fatty acid, behavior, growth, and stool characteristics in infants fed a high-OPO formula: a randomized, double-blind clinical trial[J]. Frontiers in Pediatrics, 2021, 9: 712201. DOI:10.3389/fped.2021.712201.
- [7] 余章斌, 韩树萍, 朱春, 等. 配方奶添加棕榈油对婴儿营养吸收和排便影响的Meta分析[J]. 中华儿科杂志, 2009, 47(12): 904-910. DOI:10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2009.12.006.
- [8] YARON S, SHACHAR D, ABRAMAS L, et al. Effect of high beta-palmitate content in infant formula on the intestinal microbiota of term infants[J]. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2013, 56(4): 376-381. DOI:10.1097/MPG.0b013e31827e1ee2.
- [9] WANG J, LIU L H, LIU L B, et al. Absorption of 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol and intestinal flora profiles changes in mice[J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2020, 71(3): 296-306. DOI:10.1080/09637486.2019.1648386.
- [10] 郭丹颖. 添加sn-2棕榈酸酯的婴儿配方奶粉对婴儿肠道菌群和代谢物的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2022: 29-44.
- [11] NI M M, WANG Y Y, WU R, et al. Total and sn-2 fatty acid profile in human colostrum and mature breast milk of women living in inland and coastal areas of China[J]. Annals of Nutrition and Metabolism, 2021, 77(1): 29-37. DOI:10.1159/000510379.
- [12] 董玲, 周昕玥, 姜毅康, 等. 母乳中二位棕榈酸酯含量分析及研究现状[J]. 食品与机械, 2022, 38(9): 1-6. DOI:10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.60074.
- [13] WEI W, SUN C, WANG X S, et al. Lipase-catalyzed synthesis of sn-2 palmitate: a review[J]. Engineering, 2020, 6(4): 406-414. DOI:10.1016/j.eng.2020.02.008.
- [14] AGOSTONI C, BRESSON J L, FAIRWEATHER-TAIT S, et al. Scientific opinion on the substantiation of a health claim related to beta-palmitate and increased calcium absorption pursuant to article 14 of regulation (EC) No 1924/2006[J]. EFSA Journal, 2011, 9(7): 2289. DOI:10.2903/j.efsa.2011.2289.
- [15] AGOSTONI C, CANANI R B, FAIRWEATHER-TAIT S, et al. Scientific opinion on the substantiation of a health claim related to beta-palmitate and contribution to softening of stools pursuant to article 14 of regulation (EC) No 1924/2006[J]. EFSA Journal, 2014, 12(2): 3578. DOI:10.2903/j.efsa.2014.3578.
- [16] 国家卫生健康委员会. 中华人民共和国卫生部公告(2008年 第13号)[J]. 中华人民共和国卫生部公报, 2008(7): 6-19.
- [17] 国家卫生健康委员会. 食品营养强化剂使用标准: GB 14880—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012: 10.
- [18] 国家卫生健康委员会. 食品营养强化剂 1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯: GB 30604—2015[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015: 3-5.
- [19] 陈思宇. 银离子色谱柱用于食用油成分分析的研究[J]. 农业与技术, 2020, 40(6): 34-36. DOI:10.19754/j.nyyjs.20200330012.
- [20] 韦伟, 屠海云, 王红青, 等. Silver-ion HPLC测定1,3-二油酸-2-棕榈酸三酰甘油的含量[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(1): 105-109.
- [21] ADLOF R, LIST G. Analysis of triglyceride isomers by silver-ion high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1046(1/2): 109-113. DOI:10.1016/j.chroma.2004.06.012.
- [22] 马小宁, 田燕, 宋小莉, 等. 气相色谱法测定婴幼儿配方乳粉中1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(6): 32-38.
- [23] SASAKI R, UMEZAWA M, TSUKAHARA S, et al. Assignment of milk fat fatty acid propyl esters by GC-FID analysis with the aid of Ag-ion solid-phase extraction[J]. Journal of Oleo Science, 2015, 64(12): 1251-1258. DOI:10.5650/jos.ess15125.
- [24] LISA M, VELINSKA H, HOLCAPEK M. Regioisomeric characterization of triacylglycerols using silver-ion HPLC/MS and randomization synthesis of standards[J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(10): 3903-3910. DOI:10.1021/ac900150j.
- [25] 尚东洋, 高杨. 气相色谱-质谱联用法测定婴幼儿配方乳粉中1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯含量[J]. 中国乳业杂志, 2017(5): 77-79. DOI:10.16172/j.cnki.114768.2017.05.019.
- [26] HOLCAPEK M, VELINSKA H, LISA M, et al. Orthogonality of silver-ion and non-aqueous reversed-phase HPLC/MS in the analysis of complex natural mixtures of triacylglycerols[J]. Journal of Separation Science, 2009, 32(21): 3672-3680. DOI:10.1002/jssc.200900401.
- [27] 何榕, 山晓琳, 董方圆, 等. 反相超效液相色谱-质谱联用分离分析食用油中的甘油三酯[J]. 分析化学, 2015, 43(9): 1377-1382. DOI:10.11895/j.issn.0253-3820.150264.
- [28] 宋戈, 亢美娟, 杨金宝. 正相液相色谱法测定婴幼儿配方乳粉中1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯[J]. 色谱, 2016, 34(3): 351-355. DOI:10.3724/SP.J.1123.2015.11013.
- [29] 魏婷婷, 杨虹, 杨天奎. 串联银离子色谱柱分析结构甘油三酯同分异构体的研究[J]. 中国油脂, 2012, 37(7): 79-81.
- [30] GIUFFRIDA F, MARMET C, TAVAZZI I, et al. Quantification of 1,3-olein-2-palmitin (OPO) and palmitic acid in sn-2 position of triacylglycerols in human milk by liquid chromatography coupled with mass spectrometry[J]. Molecules, 2019, 24(1): 22. DOI:10.3390/molecules24010022.
- [31] 林丽珊, 傅武胜, 张一可, 等. 气相色谱-串联质谱法测定婴幼儿配方奶粉中氯丙醇酯和缩水甘油酯[J]. 食品科学, 2020, 41(22): 295-300. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200218-185.
- [32] 国家食品药品监督管理总局, 国家卫生和计划生育委员会. 食品中脂肪的测定: GB 5009.6—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 5-7.
- [33] KURVINEN J P, SJÖVALL O, KALLIO H. Molecular weight distribution and regioisomeric structure of triacylglycerols in some common human milk substitutes[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2002, 79(1): 13-22. DOI:10.1007/s11746-002-0428-3.
- [34] VYSSOTSKI M, BLOOR S J, LAGUTIN K, et al. Efficient separation and analysis of triacylglycerols: quantitation of β -palmitate (OPO) in oils and infant formulas[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(26): 5985-5992. DOI:10.1021/acs.jafc.5b01835.
- [35] MOMCHILOVA S M, NIKOLOVA-DAMYANOVA B M. Advances in silver ion chromatography for the analysis of fatty acids and triacylglycerols: 2001 to 2011[J]. Analytical Sciences, 2012, 28(9): 837-844. DOI:10.2116/analsci.28.837.
- [36] 黄宝勇, 欧阳喜辉, 潘灿平. 色谱法测定农产品中农药残留时的基质效应[J]. 农药学报, 2005, 7(4): 299-305.
- [37] 卫生部. 预包装食品营养标签通则: GB 28050—2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011: 4.
- [38] 国家标准化委员会, 国家质量监督检验检疫总局. 合格评定化学分析方法确认和验证指南: GB/T 27417—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017: 4-15.