



经济 实用 简便 普适性好



DGLC 全自动在线二维色谱

脂溶性维生素 A、D、E 分析

Thermo
SCIENTIFIC

背景介绍

维生素A (retinol)、D (vitamin D2和vitamin D3)、E (tocopherol) 是机体维持正常代谢和机能的所必需的一类脂溶性维生素。在多种强化食品或饲料中，尤其是婴幼儿配方食品中所必需添加的营养素类成分。在GB10765-2010中规定了各个维生素的每100kJ或100kcal的含量区间及其相关分析方法，准确测定维生素的含量对控制食品营养和安全具有重要作用。由于样品基质十分复杂，包括脂肪、乳化剂、蛋白、甾醇和其他脂溶性物质等，同时目标分析物不稳定，因此传统分析方法包含了十分复杂的样品制备过程。GB5413.9-2010液相色谱法是目前现行的测定维生素A、D、E的主要方法。其主要流程如下：

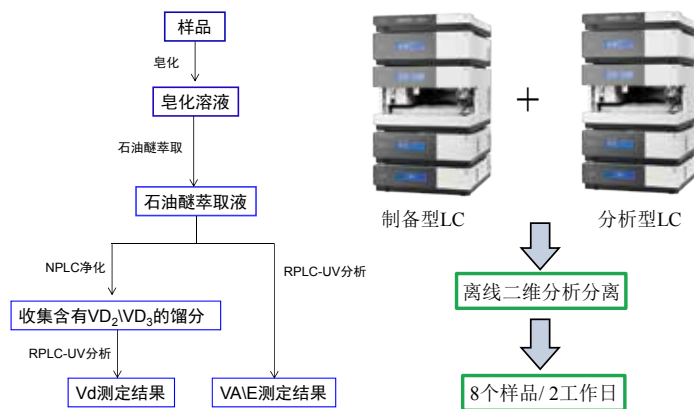


图 1. GB5413.9-2010 方法主要流程

显然，根据 GB5413.9-2010 方法维生素 A、D、E 测定需要两套液相，两个熟练的操作人员才能完成，不仅分析成本高，而且操作复杂，对工作人员要求较高。其他方法如 LC-MS/MS 的同位素内标法，二维柱切换法等，同样或操作繁琐、分析效率低，或分析成本高、对操作人员技术水平要求较高，或针对不同基质类样品存在方法耐用性和重现性问题等。

双梯度液相色谱系统

赛默飞UltiMate 3000双三元液相色谱 (DGLC) 作为2006年匹兹堡金奖产品，采用独特的双泵设计，每个泵都作为一个单独的体系，有各自独立的比例阀和流动相体系，可同时单独控制三种不同的流动相，在Chromeleon变色龙软件的控制下，结合独特的阀切换技术，通过灵活的流路连接设计，可以轻松实现在线二维或多维色谱分离等高级应用，帮您简化维生素A、D、E的分析，获得可靠、准确的结果。



基于全自动在线二维液相色谱脂溶性维生素A、D、E分析平台

基于DGLC在线二维色谱脂溶性维生素A、D、E分析平台，主要针对食品、饲料等复杂基质样品，以方法实用性和操作简便性为特点。

样品前处理：

参考GB 5413.9-2010方法，采用1.25g/ml的氢氧化钾对样品在60℃下进行45min皂化，皂化反应中需加入抗坏血酸乙醇溶液并避光，防止目标物损失，待皂化液冷却后，以石油醚萃取目标物，萃取液经过水洗和无水硫酸钠脱水后，低温减压回收溶剂至近干，用甲醇定容。

样品分析：

基于双梯度液相色谱的全自动在线二维色谱系统利用左泵，通过自动进样器将样品带到一维色谱柱上实现维生素A和E的分离、定量和维生素D的净化，并确认维生素D的切割时间窗口，将含有维生素D的馏分储存在500微升定量环中；然后利用右泵流动相将环中目标馏分转移至二维色谱柱中实现维生素D₂和D₃的分离和定量。系统连接如图2所示。

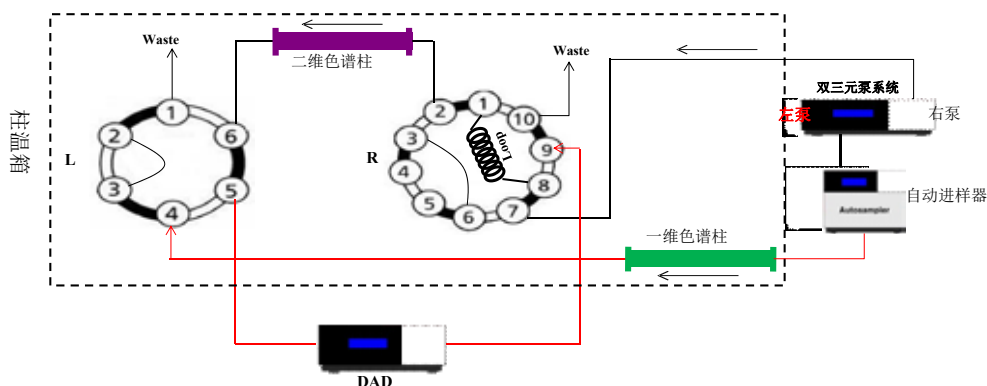


图 2. 全自动在线二维液相色谱系统

典型样品分析谱图

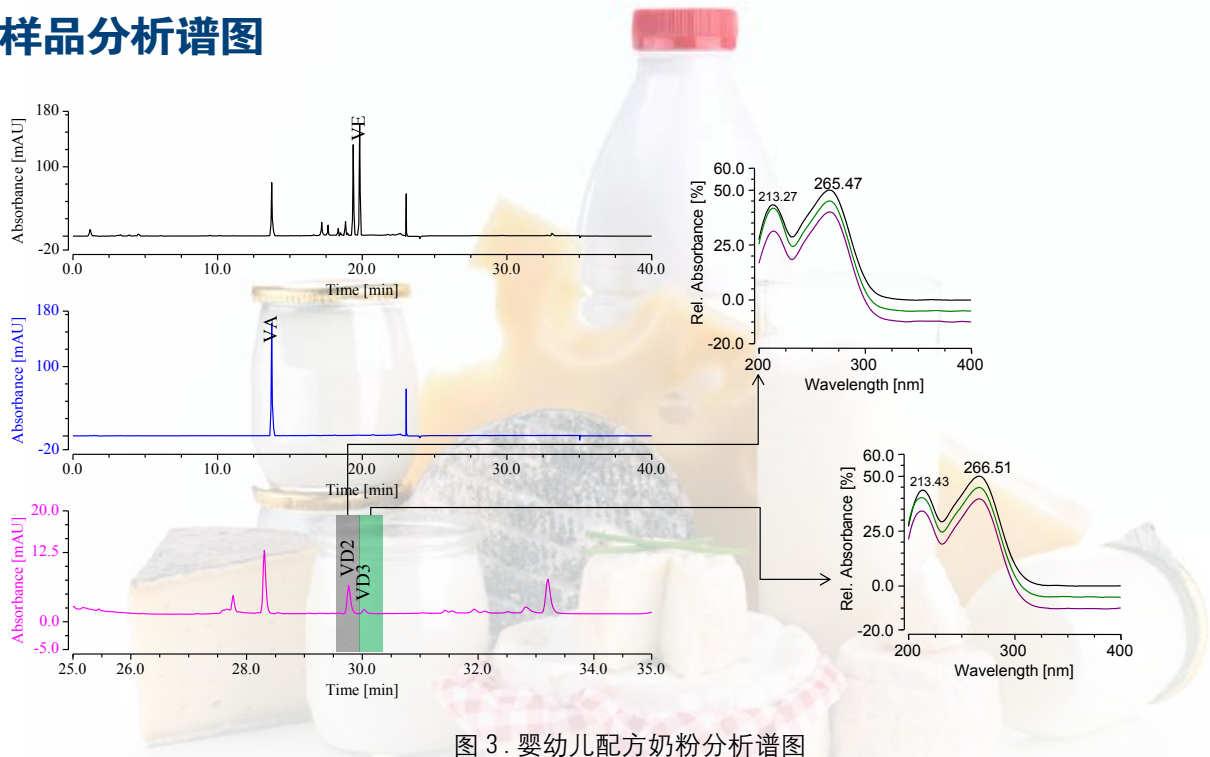


图 3. 婴幼儿配方奶粉分析谱图

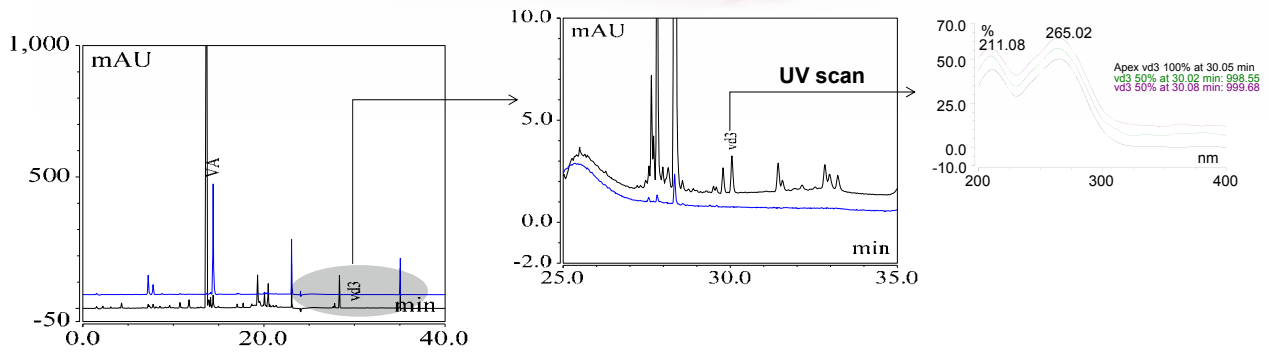


图 4. 某品牌高钙豆奶粉分析谱图

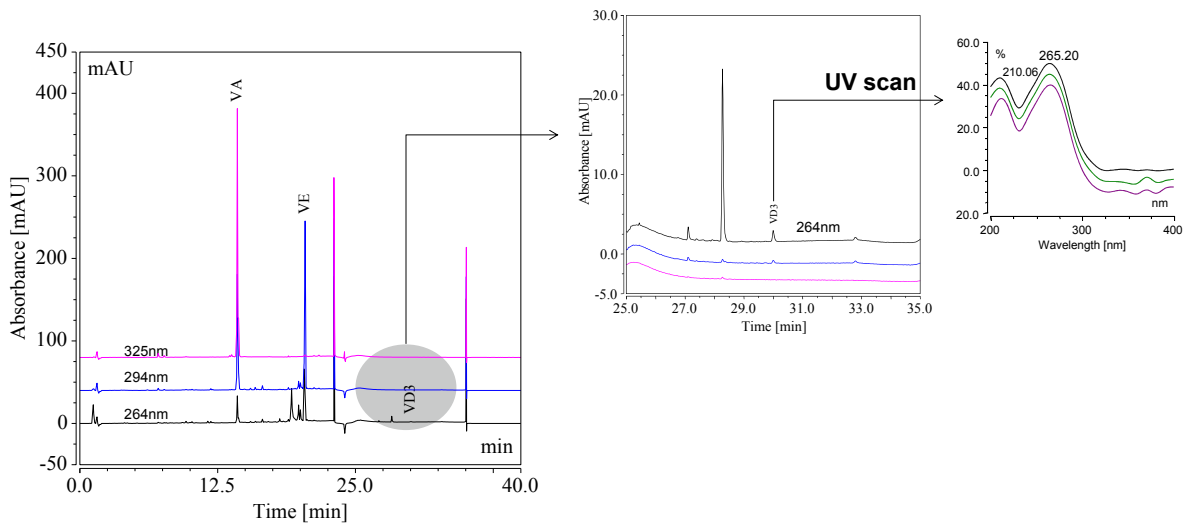


图 5. 某品牌肉羊复合预混饲料中 VADE 分析谱图

方法准确性和稳定性考察结果

取液态奶、婴幼儿配方奶粉、奶酪等样品，分别按照本法和GB5413.9-2010方法测定维生素D的加标回收率，结果见表1。

表 1. 回收率测试主要结果

Name	NO	2-D method(%)	GB5413.9-2010(%)
纯牛奶	1	80.05	68.00
	2	77.05	66.50
	3	81.00	71.00
	4	81.97	58.00
	5	79.15	56.00
	6	80.00	53.00
	Average	79.87	62.08
	RSD%	2.11	11.84
婴幼儿配方奶粉	1	75.50	71.50
	2	82.00	65.40
	3	77.00	74.40
	4	77.00	74.40
	5	82.00	65.00
	Average	78.70	70.14
	RSD%	3.91	6.65
中老年奶粉	1	92.00	76.00
	2	83.00	71.00
	3	92.00	64.00
	Average	89.00	70.33
	RSD%	5.84	8.57
奶酪	1	83.00	70.00
	2	78.00	70.00
	3	85.00	79.00
	Average	82.00	73.00
	RSD%	4.40	7.12

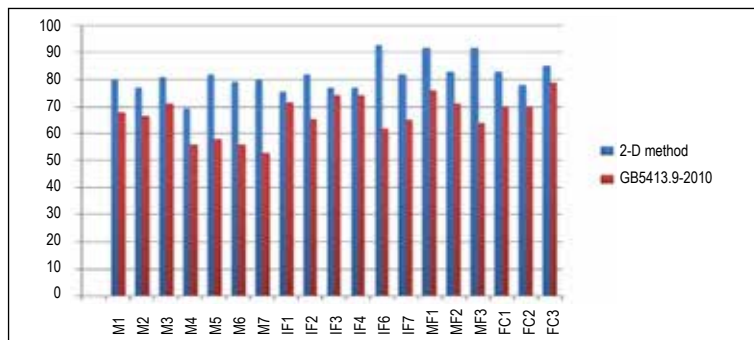


图 6. 回收率对比结果

由上述结果可知，采用本法目标分析物 VD 在前处理过程中损失量更少，因无需正相色谱的制备过程，所以整体回收率较高，方法重现性更好。采用本法连续进样 200 次后，维生素 D3 仍然可以获得较好的分离度，可见方法耐用性更佳（见图 7）。

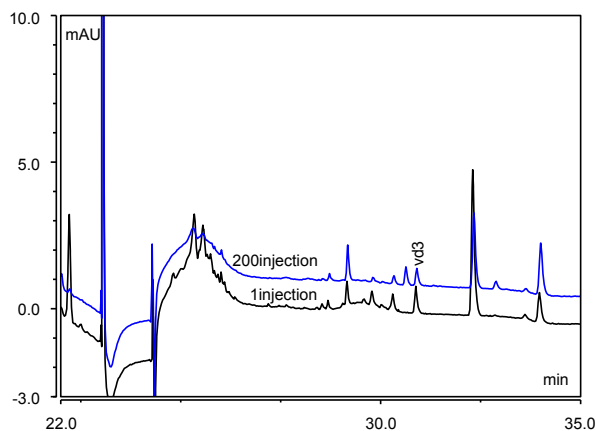


图 7. 耐用性考察结果

与GB5413.9-2010法测定结果对比

采用本法随机测定了婴幼儿、学生、中老年配方奶粉，奶酪和酸奶等强化乳品中维生素A、D3和E的含量，测定结果与现行标准分析方法（GB 5413.9-2010）的测定结果差异无统计学意义，因此本法可作为标准方法的备用方法应用到日常样品的分析检测中。

经济效益及应用前景

与现行标准方法比较，本法具有以下优点：

1、分析效率高、分析成本低。

采用GB方法不仅需要两套高压液相色谱（一套分析型LC，一套制备型LC），而且从表2可知耗时较长，平均每日仅能处理6批样品。而本法无需正相色谱制备过程，只需一套双三元液相色谱配置紫外检测器即可一次进样同时完成维生素A、D、E的测定，平均每日可处理12个样品。因此采用本法可提高至少1倍的分析效率，而且在检测成本上，仪器、耗材成本节省约40%，人力成本减少约50%。

2、普适性好、自动化程度高。

基于DGLC所构建全自动在线二维色谱分析平台，方法重现性、耐用性好，且一法多用，具有较好的普适性，除适用于强化奶粉（包括婴幼儿配方奶粉）、液态奶、酸奶等乳品以及牛羊预混饲料、浓缩饲料外，还可应用于其他强化食品，包括保健品（如代餐饮品、复合维生素片和维生素D钙软胶囊等）和药品维生素AD滴剂中脂溶性维生素的分析，真正实现“一法多用”。此外，利用本平台尚能用于全反式维生素A和13-顺式维生素A的分离和定量，可推广至所有基于中心切割模式的在线二维色谱定量分析中。

表 2. 与 GB 5413.9-2010 方法分析时间比较

步骤		时间 /min	
		GB5413.9-2010	本法
样品提取	皂化	45	45
	萃取	30	30
	水洗	20	20
	脱水	10	10
	低温回收溶剂	20	20
	平衡校正	40	—
	收集馏分	30	—
	氮吹、定容	20	—
样品制备总时间	215	125	
上机分析	30	40	

更安全

ThermoFisher
SCIENTIFIC

更清洁

更健康

赛默飞致力于帮助您使世界变得

关于赛默飞世尔科技

赛默飞世尔科技（纽约证交所代码：TMO）是科学服务领域的世界领导者。公司年销售额 170 亿美元，在 50 个国家拥有约 50,000 名员工。我们的使命是帮助客户使世界更健康、更清洁、更安全。我们的产品和服务帮助客户加速生命科学领域的研究、解决在分析领域所遇到的复杂问题与挑战，促进医疗诊断发展、提高实验室生产力。借助于首要品牌 Thermo Scientific、Applied Biosystems、Invitrogen、Fisher Scientific 和 Unity Lab Services，我们将创新技术、便捷采购方案和实验室运营管理的整体解决方案相结合，为客户、股东和员工创造价值。欲了解更多信息，请浏览公司网站：www.thermofisher.com

赛默飞世尔科技中国

赛默飞世尔科技进入中国已超过 30 年，在中国的总部设于上海，并在北京、广州、香港、台湾、成都、沈阳、西安、南京、武汉等地设立了分公司，员工人数约 3700 名。为了满足中国市场的需求，现有 8 家工厂分别在上海、北京和苏州运营。我们在北京和上海共设立了 9 个应用开发中心，将世界级的前沿技术和产品带给国内客户，并提供应用开发与培训等多项服务；位于上海的中国创新中心结合国内市场的需求和国外先进技术，研发适合中国的技术和产品；我们拥有遍布全国的维修服务网点和特别成立的中国技术培训团队，在全国有超过 2000 名工程师提供售后服务。我们致力于帮助客户使世界更健康、更清洁、更安全。欲了解更多信息，请登录 www.thermofisher.com

赛默飞世尔科技(中国)有限公司



欢迎扫描关注官方微信

免费服务热线：800 810 5118
400 650 5118 (支持手机用户)

Thermo
SCIENTIFIC

Part of Thermo Fisher Scientific