采用在线中心切割二维液相色谱法快速分析特医食品中维生素A、维生素D和维生素E四种异构体的含量

熊亮 冉良骥 金燕
赛默飞世尔科技（中国）有限公司色谱质谱部

关键词
特医食品，维生素A，维生素D，α-生育酚，β-生育酚，γ-生育酚，δ-生育酚， 二维液相色谱，中心切割

前言

维生素是人体生长发育所必需的营养元素，其中维生素A、维生素D和维生素E是机体维持正常代谢和机能的所必需的脂溶性维生素[1]。除了维生素A、维生素D2和D3，以及α-维生素E（α-生育酚）外，相关研究发现维生素E的其它生育酚异构体对人体也有一定生理作用，其中以β、γ、δ-生育酚形式较为常见[2]。

特医食品（即特殊医学用途配方食品），是为了满足进食受限、消化吸收屏障、代谢紊乱或特定疾病状态人群对营养素或膳食需求，专门加工配制而成的配方食品。该类产品必须在医生或临床营养师指导下，单独食用或与其他食品配合食用[3]。根据食品安全国家标准特殊医学用途配方食品通则GB29922-2013的规定，特医食品中维生素A、D、E的分析遵循食品安全国家标准食品中维生素A、D、E的测定规定[4]。食品中维生素D由于本身含量低、基质干扰严重，国家标准方法采用液质联用或半制备正相净化、反相分析的方式对其进行分离检测。但液质联用方法复杂，维护成本相对较高；而正相净化方法易受流动相等条件影响，极大影响样品的分析效率和方法重复性。

本文在前期已经建立的同时测定食品中维生素A、D和4种维生素E异构体含量在线二维液相色谱法基础上[5-6]，进一步优化色谱分析条件，建立了特医食品中VA、四种VE异构体及微量VD的中心切割快速分析方法，缩短了样品分析时间，进一步提高了方法分析效率，可以用于特医食品等多种食品基质中维生素A、D和E的常规快速检测。

实验方法

1、 仪器与试剂

1.1 仪器

Thermofisher UltiMate3000 双三元液相色谱系统：双三元梯度泵（包含两个独立的三元梯度泵）；自动进样器；带两个2位6通阀的柱温箱；二极管阵列检测器（配13μL流通池）；500μL样品收集环；Chromeleon 7.2.10变色龙色谱数据软件。

1.2 试剂

甲醇(色谱级，Fisher公司)，乙腈(色谱级，Fisher公司)，去离子水(18.2MΩ，Millipore纯水机)；

1.3 标准品

维生素A(all-trans retinol，≥95%，Sigma-Aldrich)，维生素D2(98.1%，Dr.Ehrenstorfer GmbH)，维生素D3(99.6%，Dr.Ehrenstorfer GmbH)，α-生育酚(98.0%，Sigma-Aldrich)，β、γ、δ-生育酚(≥96%，Sigma-Aldrich)。

2、 标准品溶液制备

分别精密称量维生素A、D2、D3，α、β、γ和δ-生育酚标准品适量，至10mL棕色容量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度，配制成浓度分别为0.5mg/mL的维生素A溶液，0.25 mg/mL的维生素D2和D3溶液，2.0mg/mL的α、β、γ-δ-

生育酚溶液。分别精密量取维生素A、D2、D3，α、β、γ和δ-生育酚标准品溶液适量，至10mL棕色容量瓶中，甲醇稀释定容成系列标准混合溶液，各标准品溶液浓度见表1。

表1 各维生素混合标准品工作溶液浓度

Vitamins μg/mL	Retention Time, min	Concentration Level 1	2	3	4	5	6	7
VA	3.770	0.2	0.5	1.0	2.0	4.0	6.0	10.0
α-VE	7.177	2.0	5.0	10.0	20.0	40.0	60.0	100.0
β-VE	7.627	2.0	5.0	10.0	20.0	40.0	60.0	100.0
γ-VE	7.790	2.0	5.0	10.0	20.0	40.0	60.0	100.0
δ-VE	8.140	2.0	5.0	10.0	20.0	40.0	60.0	100.0
VD2	12.760	0.02	0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	1.0
VD3	13.007	0.02	0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	1.0

3、 样品溶液制备

参考GB 5009.82-2016的方法，精密称取固体特医食品样品约5g（精确到0.01g）于150mL平底烧瓶中，固体试样需用约20mL 45 ℃～50 ℃温水使其溶解，混匀。

3.1 皂化

于上述处理的试样溶液中加入1.0g抗坏血酸和0.1gBHT，混匀，加入30mL无水乙醇，充分混匀后加入约20mL 0.5g/g的氢氧化钾水溶液混匀，在80℃恒温水浴条件下，磁力搅拌皂化约30min后，取出立刻用冷水冷却到室温。

3.2 液液萃取

将上述皂化液转移入250 mL分液漏斗中，加入50mL石油醚-乙醚混合液（1:1，V:V），振荡萃取5min，将下层溶液转移至另一个250mL分液漏斗，加入50mL石油醚-乙醚混合液再次萃取，合并醚液，用约100mL水洗涤醚液，重复3次，至醚液洗至中性。醚液通过无水硫酸钠脱水过滤，滤液收入250mL圆底烧瓶中，于旋转蒸发仪上在40℃左右水浴旋蒸至约2mL，立即氮气吹干，准确加入1mL甲醇复溶后，上机分析。

4、色谱条件

色谱条件见表2，一维和二维梯度程序以及阀切换时间见表3，仪器连接图见图1。

表2 色谱条件

一维色谱柱	Accucore PFP 4.6×100 mm，2.6 μm；P/N：17426-104630
二维色谱柱	FOODKIT1& 2 ADE 4.6×100 mm，2.6 μm；P/N：VITADE-004K1
柱温	25℃
流动相	A：水；B：甲醇；C：乙腈
流速	一维分析泵：1.0 mL/min；二维分析泵：0.8 mL/min
检测器	DAD：264 nm（VD2, VD3），294 nm（VE），325 nm（VA）
进样量	10 μL

表3 一维和二维梯度程序及阀切换时间

一维分析泵				二维分析泵				阀切换时间		
时间（分钟）	A%	B%	C%	时间（分钟）	A%	B%	C%	时间（分钟）	左阀	右阀
0	20	80	0	0	0	40	60	0	6_1	1_2
9	0	100	0	1	0	40	60	5.9	6_1	6_1
10	0	100	0	2	60	0	40	6.2	6_1	1_2
11	20	80	0	6.5	60	0	40	9	1_2	6_1
15	20	80	0	7	0	40	60			
				15	0	40	60			

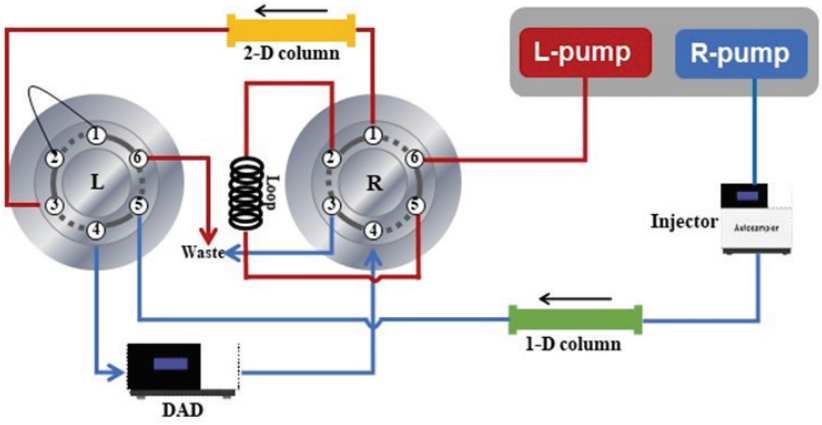

图1 仪器连接图

实验结果和讨论

1、色谱条件优化

本文在前期已经建立的同时测定食品中维生素A、D和4种维生素E异构体含量在线二维液相色谱法基础上，进一步优化色谱分析条件，建立了特医食品中VA、四种VE异构体及微量VD的中心切割快速分析方法。整个分析方法从原来的24 min缩短至15min，大大缩短了样品分析时间，进一步提高了方法分析效率。混合标准品溶液分析谱图及典型特医食品样品分析谱图分别见图2和图3。从图中可见，在缩短了分析时间的同时，依然可以保证一维色谱柱对维生素A、四种维生素E异构体以及杂质的良好分离，二维色谱柱对两种维生素D异构体和杂质的良好分离。

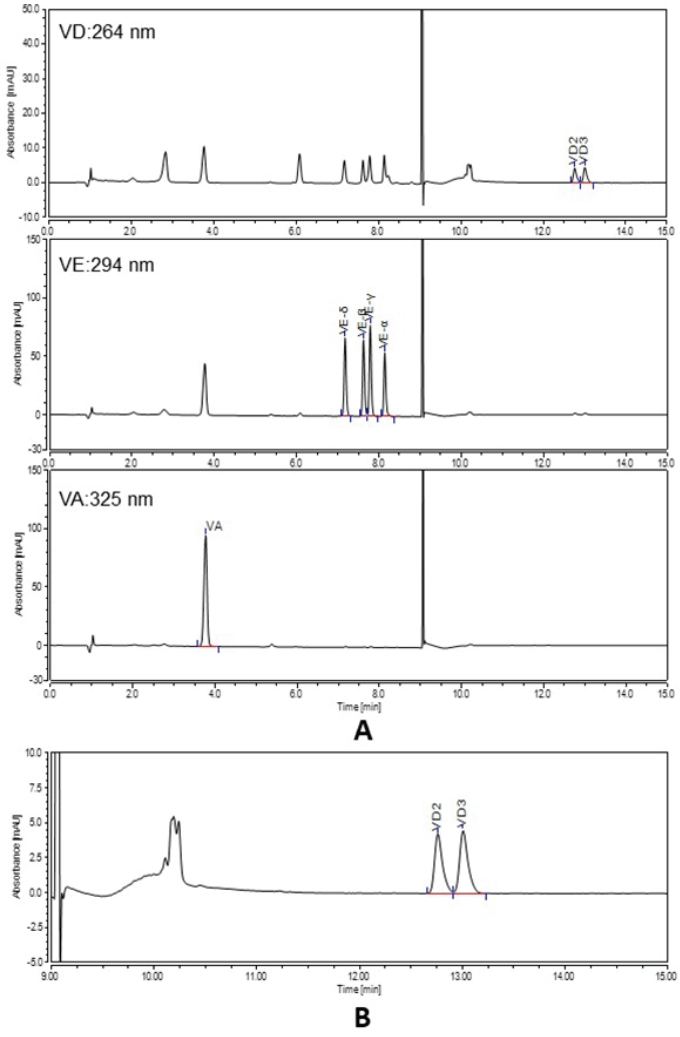

图2 维生素A、D和E混合标准溶液分析谱图

（A，其中0～9min 为一维谱图，9～15min 为二维谱图；B，二维放大图谱）

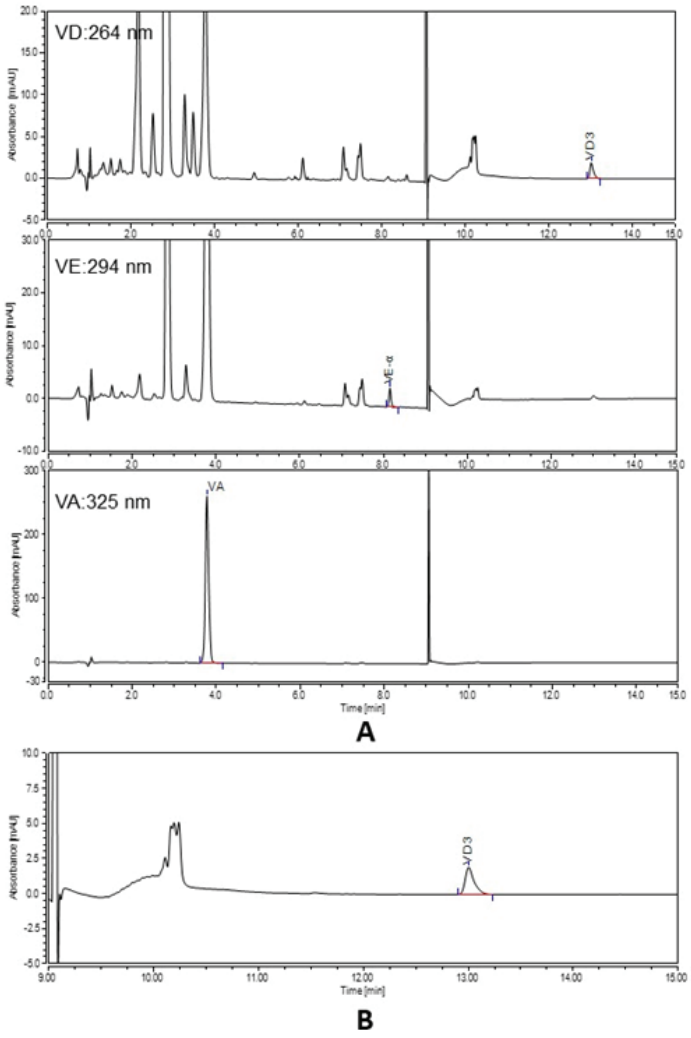

图3 典型特医食品样品分析谱图

（A，其中0～9min为一维谱图，9～15min 为二维谱图；B，二维放大图谱）

2、方法线性、灵敏度及精密度结果

本文按照食品国标要求，考察了维生素A、维生素D2和D3以及维生素E的4个异构体的线性及检测限。结果如表4所示，不同维生素在不同的线性范围内均保持良好线性关系，相关系数R^2大于0.9996。方法灵敏度较高，维生素D3的检测限可达3.0 ng/mL。

取0.1μg/mL混合标准品溶液，连续进样6次，结果维生素A、维生素D2和D3以及维生素E的4个异构体的保留时间RSD均小于0.5%，峰面积RSD均小于1%，表明方法精密度较好。

表4 方法线性及检测限结果

Vitamins	Detection wavelength, nm	Range, μg/mL	Linearity equation	R^2	LOD, ng/mL
A	325	0.2-10	Y=1.3997X+0.0013	0.9999	5.3
D2	264	0.02-1	Y=0.6316X+0.0004	0.9998	3.4
D3	264	0.02-1	Y=0.7011X+0.0004	0.9999	3.0
α -VE	294	2-100	Y=0.0530X-0.0339	0.9999	74
β -VE	294	2-100	Y=0.0620X-0.0069	0.9996	50
γ -VE	294	2-100	Y=0.0746X-0.0072	0.9998	41
δ -VE	294	2-100	Y=0.0663X-0.0023	0.9998	47

结论

本文基于二维液相色谱技术，利用赛默飞双三元液相色谱系统，在前期已经建立的同时测定食品中维生素A、D和4种维生素E异构体含量在线二维液相色谱法基础上，进一步优化了色谱分析条件，实现了特医食品中VA、四种VE异构体及微量VD的快速分析。本方法简便快速，自动化程度高，可以用于特医食品等多种食品基质中维生素A、D和E的常规快速检测。

参考文献

[1] Stillwell W, An introduction to biological membranes (second edition) [M]. Amsterdam: Elsevier Science, 2016.

[2] Kamal-Eldin A., Gorgen S, Lampi A, Normal phase high performance liquid chromatography of tecopherols and tocotrienols. Comparison of different chromatographic columns [J]. Journal of Chromatography A, 2000, 881:217-227.

[3] GB 29922-2013，食品安全国家标准 特殊医学用途配方食品通则

[4] GB 5009.82-2016，食品安全国家标准食品中维生素A、D、E的测定

[5] Zhang YH, Zhang DW, Cao Y, Simultaneous determination of vitamins A, D in vitamin A and D pharmaceutical by online two-dimensional reversephase liquid chromatography [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2016, 35(1): 28-34.

[6] Guobin Shen, Yan Jin, Giorgia Greco, Dennis Koehler, Sabrina Patzelt, Simultaneous determination of vitamin A, D and four vitamin E isomers in infant formula by offline solid phase extraction and online two-dimensional liquid chromatography, Application note 73351.

赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

Thermo Fisher SCIENTIFIC

仅用于研究目的。不可用于诊断目的。 © 2020 Thermo Fisher Scientific Inc. 保留所有权利。
所有商标均为 Thermo Fisher Scientific Inc. 及其子公司的资产，除非另有指明。