

在线固相萃取-二维液相色谱测定食品中维生素A、D、E及异构体含量

史华进 刘兴国 刘晓达 金燕

赛默飞世尔科技（中国）有限公司色谱质谱部

关键词

在线固相萃取，二维液相，维生素A，维生素D₂，维生素D₃，维生素E，生育酚

摘要

本文采用赛默飞Vanquish Core液相色谱平台，先将样品皂化液通过在线固相萃取净化，建立了二维液相色谱同时测定维生素A、维生素D₂、维生素D₃及维生素E的四个同分异构体的方法。本方法灵敏度高、重复性好，可用于含有上述几种维生素食品中维生素含量同时测定。

1. 前言

维生素是人类维持正常代谢和调节机能至关重要的营养成分之一。按照化学特征可分为脂溶性维生素和水溶性维生素。维生素A又称为视黄醇，常用于促进机体生长、维持表皮完整。维生素D主要包括维生素D₂（麦角钙化醇）和维生素D₃（胆钙化醇），对哺乳动物具有促进钙磷代谢及成骨作用。维生素E又称为生育酚，具有抗氧化、抗衰老等作用，包括 α 、 β 、 γ 、 δ -生育酚，其中 α -生育酚活性最高^[1]，以上几种维生素是乳粉及保健品中重要的组成部分，其含量的准确测定，对于食品营养及安全控制有重要意义。

针对食品中维生素ADE的测定，现行标准GB5009.82-2016中规定了四种不同方法测定相应维生素^[2]。其中介绍操作步骤中对于脂溶性维生素基本都要经过皂化、提取、洗涤、浓缩等复杂的前处理步骤，并且无法实现一个方法完成以上几种维生素的同时测定。赛默飞液相团队2010年左右开始尝试利用特色的双三元液相系统，二维色谱分离实现维生素ADE的同时测定，前后共推出六代方法对该方案进行优化，本文在前述研究^[3]基础上，通过优化模块配置、流动相组成、色谱柱型号、方法梯度等，提高了方法稳定性以及几种维生素的分离度，利用一套仪器实现维生素A、维生素D₂、维生素D₃及维生素E的四个同分异构体同时分离和测定。本方法中皂化后

的样品用乙醇水溶液稀释后直接进样，经Online-SPE富集净化后，柱温箱下阀切换，样品被转移到一维色谱柱，双三元左泵作为一维泵，可实现维生素A和维生素E的四个同分异构体的分离和测定。根据维生素D一维色谱出峰时间设置上阀切换窗口，将组分收集到loop环后，双三元右泵作为二维泵，将loop环中样品转移到二维液相色谱柱，实现维生素D₂和D₃的分离和测定。本方法将传统的人工液液萃取、洗涤和干燥浓缩等步骤转移到仪器，减少实验员接触危害试剂的时间，节省前处理步骤及试剂，大幅提高了测试的效率以及实验室空间利用率。

2. 实验方法

2.1 仪器

Thermo Fisher Vanquish Core高效液相色谱仪

SPE泵: Vanquish Quaternary Pump (VC-P20-A-01)

一维、二维泵: Vanquish Dual Pump (VC-P33-A-01)

自动进样器: Vanquish sampler CT (VC-A12-A-02, 100 μ L定量环)

柱温箱: Vanquish Column Compartment C (VC-C10-A-03, 含两个2p-6p切换阀及一个500 μ L样品收集环)

检测器: Variable Wavelength Detector C (VC-D40-A-01, 含11 μ L流通池)

Vanquish Diode Array Detector HL (VH-D10-A, 含60mm流通池)

2.2 软件

Chromleon 7.3

2.3 试剂

乙腈、甲醇、乙醇（色谱级，Fisher）

甲基叔丁基醚（色谱级，Acros）

磷酸（色谱级，CNW）

去离子水（18.2 MΩ@25°C，Millipore纯水机）氢氧化钾、抗坏血酸和2,6-二叔丁基对甲酚（BHT）（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）。

2.4 标准品和样品

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（α-tocopherol，98.0%，Sigma-Aldrich）

β-生育酚（β-tocopherol，98.0%，Tauto）

γ、δ-生育酚（≥96%，Sigma-Aldrich）

市售营养面条和配方奶粉样品由客户提供

2.5 样品溶液制备

2.5.1 对照品溶液

分别精密称取维生素A、D₂、D₃和α、β、γ和δ-生育酚标准品适量，至10 mL棕色容量瓶中，加乙醇溶解并定容至刻度，配制成浓

度分别为1.0mg/mL的标准品储备溶液。

标准混合溶液制备为分别精密量取上述维生素A、D₂、D₃和α、β、γ与δ-生育酚标准品储备溶液适量，至10 mL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 标准曲线浓度

No.	Vitamins ng/mL	Concentration Level						
		1	2	3	4	5	6	7
1	VA	-	16	32	80	160	400	800
2	α-VE	400	800	1600	4000	8000	20000	40000
3	β-VE	400	800	1600	4000	8000	20000	40000
4	γ-VE	400	800	1600	4000	8000	20000	40000
5	δ-VE	400	800	1600	4000	8000	20000	40000
6	D ₂	2	4	8	20	40	100	200
7	D ₃	2	4	8	20	40	100	200

2.5.2 样品溶液

参考GB 5009.82-2016的方法^[2]，精密称取固体奶粉试样约5 g（精确到0.01 g）于150 mL平底烧瓶中，用约30 mL 45 °C ~ 50 °C温水使其溶解，混匀。于上述处理的试样溶液中加入1.0 g抗坏血酸和0.1 g BHT，混匀，加入30 mL无水乙醇，充分混匀后加入约20 mL 0.5 g/g的氢氧化钾水溶液混匀，在80 °C恒温水浴振荡皂化约30 min后，取出立刻用冷水冷却到室温，用50%乙醇水溶液转移并定容到100mL量瓶中。皂化液高速离心5 ~ 10min（>5000rpm）后用0.22μm尼龙材质针式过滤器过滤后上机分析。

2.6 色谱条件

系统连接图见图1。色谱条件见表2。

表2 色谱条件

色谱柱	SPE柱：PLRP-S (12.5 mm×4.6 mm)											
	一维色谱柱：PFP (100 mm×4.6 mm, 4.0 μm)											
	二维色谱柱：VITADE-004K1 (100 mm×4.6 mm, 2.6 μm)											
柱温	30°C											
流动相	SPE泵 A：水，B：乙腈，C：甲醇，D：甲基叔丁基醚											
	一维泵 A：水相，B：甲醇											
	二维泵 A：乙腈，B：甲醇											
梯度	SPE pump					1D pump			2D pump			
	Time, min	Flow rate	B%	C%	D%	Time, min	Flow rate	B%	Time, min	Flow rate	B%	C%
	0.0	1.0	0	80	0	0.0	0.5	30	0.0	0.6	100	0
	4.0	1.0	0	80	0	6.0	0.5	30	5.0	0.6	100	0
	4.5	1.0	70	0	0	6.5	1.0	75	6.0	0.6	10	0
	8.0	1.0	70	0	0	16.5	1.0	90	23.0	0.6	10	0
	8.5	1.0	100	0	0	21.0	1.0	100	23.5	0.6	100	0
	15.0	1.0	100	0	0	23.0	1.0	100	30.0			
	16.0	1.0	90	0	10	23.5	1.0	30				
	20.0	1.0	90	0	10	30.0	1.0	30				
	21.0	1.0	0	80	0							
30	1.0	0	80	0								

阀切换程序			
时间 (min)	上阀	下阀	
0.0	6_1	1_2	
4.5	6_1	6_1	
5.9	6_1	1_2	
15.3	1_2	1_2	
15.9	6_1	1_2	

检测器	VWD : 325nm, 296nm; DAD: 264nm
进样量	100 μ L

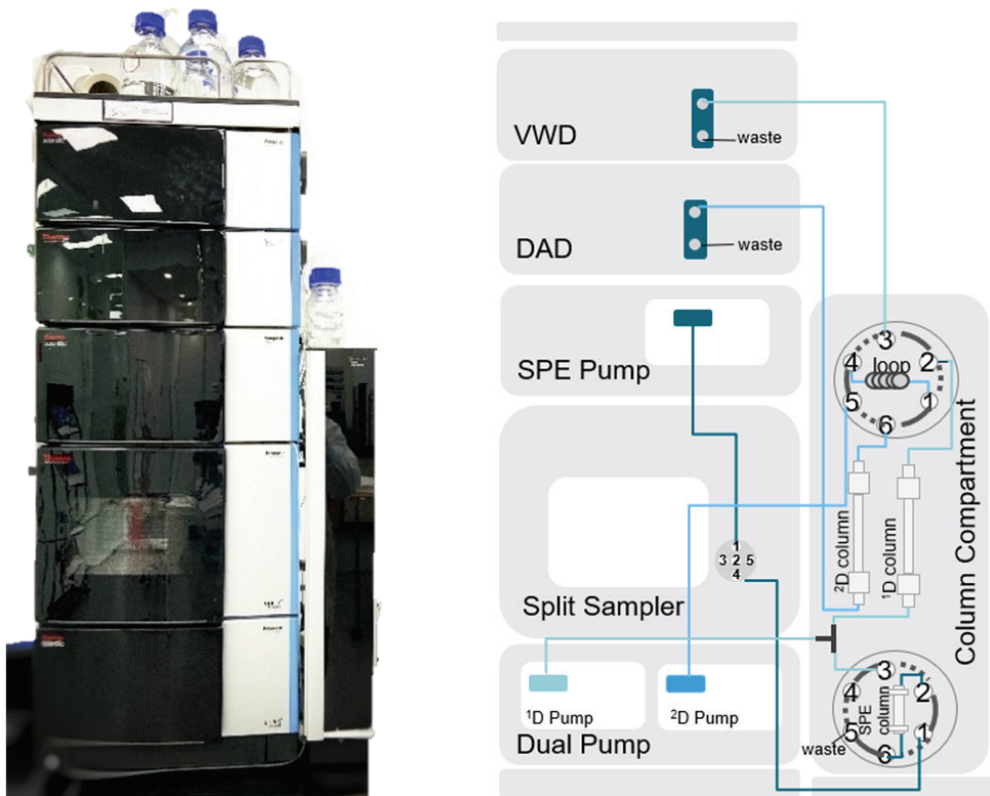


图1 Vanquish Core液相系统连接示意图

3. 实验结果和讨论

3.1 对照品和样品溶液谱图

维生素A、维生素D₂、D₃和维生素E四个同分异构体对照品和样品溶液一维和二维分析谱图见图2和图3

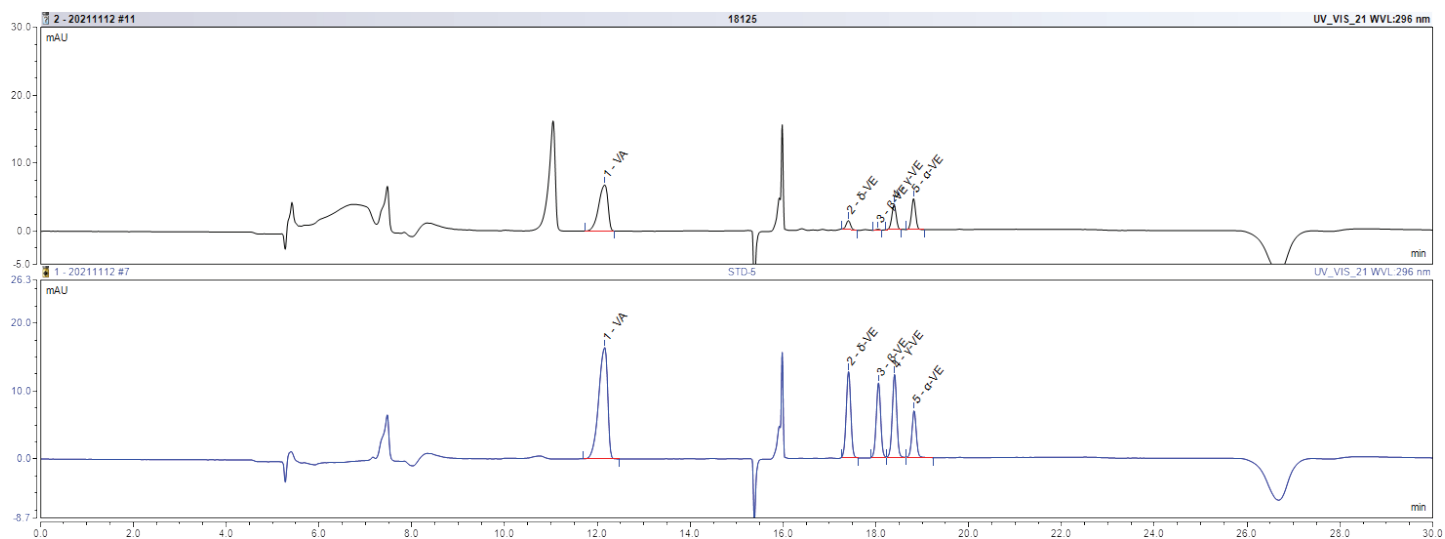


图2a 维生素对照品及样品一维296nm谱图（上图为样品，下图为对照品）

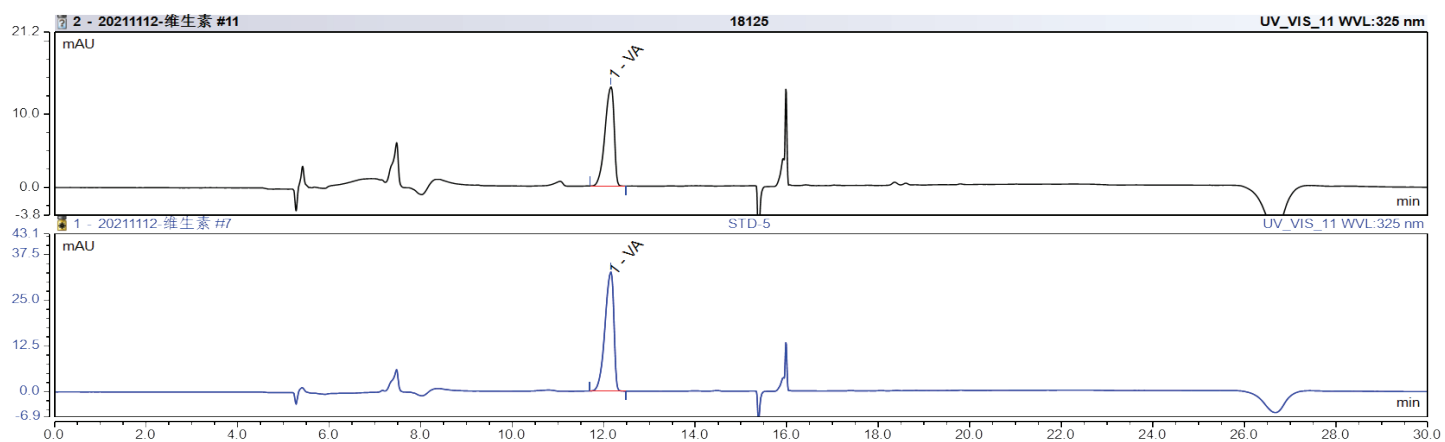


图2b 维生素对照品及样品一维325nm谱图（上图为样品，下图为对照品）

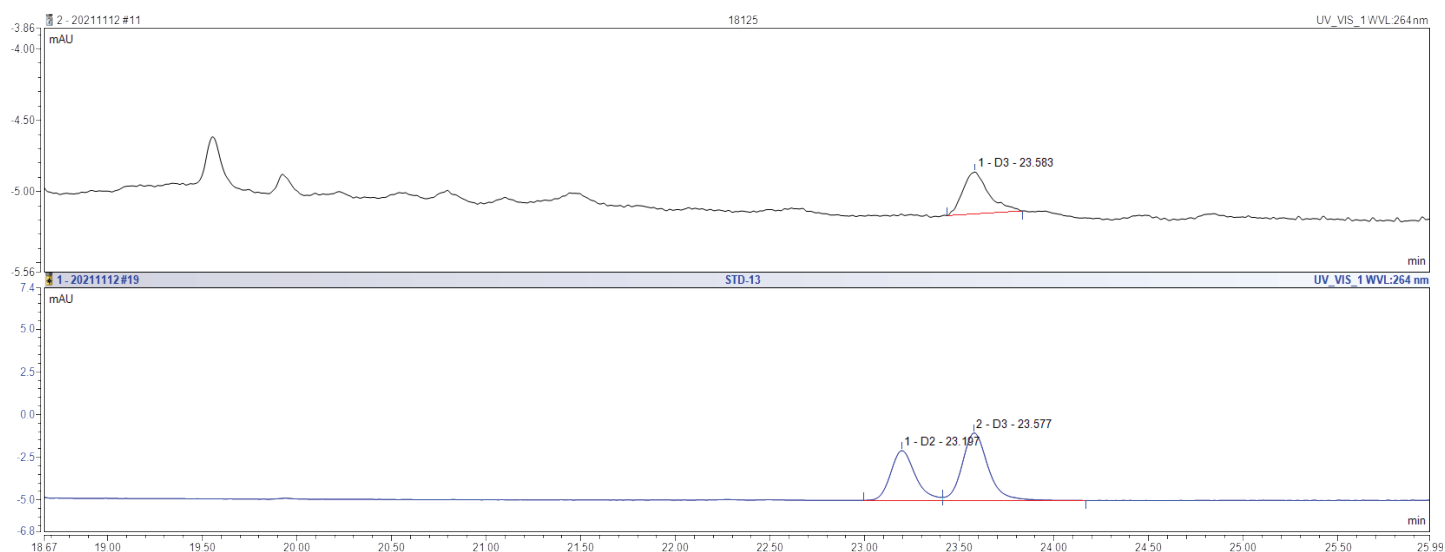


图3 维生素对照品及样品二维谱图（上图为样品，下图为对照品）

3.2 精密度

采用5#浓度标准品混合溶液连续进样5针考察精密度。结果如表3所示，5针样品各峰的保留时间和峰面积RSD分别小于0.10%和1.13%，满足方法要求，体现Vanquish Core液相色谱良好的稳定性和重现性。

表3 5#浓度标准品混合溶液连续进样结果 (n=5)

Peak No.	Peak Name	Ret.Time min	Ret.Time RSD, %	Area RSD, %
1	VA	12.16	0.10%	1.13%
2	δ -VE	17.43	0.10%	0.50%
3	β -VE	18.07	0.10%	0.34%
4	γ -VE	18.42	0.10%	0.49%
5	α -VE	18.84	0.09%	0.86%
6	D ₂	23.20	0.02%	1.04%
7	D ₃	23.58	0.02%	0.97%
Maximum			0.10%	1.13%

3.3 线性及灵敏度

按照表1标准曲线浓度配置溶液，分别进样100μL，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，考察方法的线性范围及定量限。结果显示，各维生素在其浓度范围内线性良好，相关系数均>0.9991。方法灵敏度较高，满足标准要求，方法线性及检测限 (S/N > 3) 结果见表4。

表4 方法线性及灵敏度

No.	Name	Cal. Range ng/mL	Cal. Type	R ²	Cal. Curve	LOD (ng/mL)
1	VA	16-800	Quad, WithOffset	0.9998	y=2.1587x-0.012	4
2	δ -VE	400-40000	Quad, WithOffset	0.9996	y=0.0728x-0.0058	20
3	β -VE	400-40000	Quad, WithOffset	0.9994	y=0.0789x-0.0181	20
4	γ -VE	400-40000	Quad, WithOffset	0.9997	y=0.0658x-0.011	20
5	α -VE	400-40000	Quad, WithOffset	0.9997	y=0.0402x-0.0108	30
6	D ₂	2-200	Quad, WithOffset	0.9993	y=0.0566x-0.1320	0.2
7	D ₃	2-200	Quad, WithOffset	0.9991	y=0.0375x-0.199	0.1

3.4 样品测试结果

采用上述方法对市售配方奶粉和营养面条样品进行测试，结果如表5显示，两种样品基质对目标维生素测试无干扰，表明方法适合不同食品中维生素A、D、E含量的测定。

表5 样品测试结果

Sample	Content (μg/100 g for VA,VD; mg/100 g for VE)					
	VA	VD3	α -VE	β -VE	γ -VE	δ -VE
配方奶粉	349.89	7.36	3.41	ND	0.72	0.53
营养面条	240.49	11.45	0.61	0.16	0.13	0.38

结论

本文采用赛默飞Vanquish Core液相色谱，在前期数代二维液相色谱同时测定食品中维生素A、D、E方案基础上，优化了方法硬件配置及方法参数，建立了一种皂化液直接稀释上样，测定维生素A、维生素D₂、D₃以及维生素E四种同分异构体的方法。方法灵敏度、线性、重现性及准确度均良好。实验简化样品前处理过程，缩短样品分析周期，大幅提高了分析效率及测试的便捷性，利用赛默飞独特的双三元液相，模块搭建更紧凑，一套液相的台面占地可以完成多套液相的测试工作，为企业节省了空间及成本。

参考文献

- [1] 张艳海,其布勒哈斯,金燕,王佳,马文丽. 在线二维液相色谱法同时测定婴幼儿和成人配方营养品中的维生素A、D₃和E^[J]. 色谱, 2015, 33(3): 291-297.
- [2] GB 5009.82-2016,食品中维生素A、D、E的测定. 食品安全国家标准.
- [3] AN_20071_HPLC. 在线固相萃取-二维液相色谱法分析配方奶粉中的维生素A、D和E异构体含量.



赛默飞
官方微信

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