

# 固相萃取-在线二维液相色谱同时测定婴幼儿配方奶粉中维生素A、D和四种维生素E生育酚异构体含量

沈国滨, 金燕, Giorgia Greco, Dennis Koehler, Sabrina Patzelt

赛默飞世尔科技(中国)有限公司

## 关键词

固相萃取, 二维色谱, 维生素A, 维生素D, 维生素E, 生育酚, 婴幼儿配方奶粉, 高效液相色谱

## 摘要

本文基于赛默飞Vanquish Core全新液相色谱系统, 针对婴幼儿配方奶粉中维生素A、D和E检测, 建立了离线固相萃取和在线二维液相色谱结合的快速分析定量方法。通过优化色谱条件, 使用固相萃取替代原国标方法中液液萃取前处理方法, 在实现维生素A、维生素D2和D3以及维生素E的四种生育酚异构体同时分析的基础上, 简化样品前处理过程, 缩短样品分析时间, 进一步提高了检测灵敏度和样品分析效率, 为产品质量控制、日常奶粉样品检测以及后续相关检测标准提高提供方法指导。

## 1.引言

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是婴幼儿配方奶粉有关营养成分中必须强化的维生素指标<sup>[1]</sup>。除了常规关注的维生素A、维生素D2和D3, 以及 $\alpha$ -维生素E( $\alpha$ -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 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -生育酚形式较为常见。

因此, 除了关注维生素A、维生素D含量外, 亦有必要对维生素E及其常见异构体含量进行检测和控制<sup>[2]</sup>。

液相色谱法作为目前维生素A、D和E分析检测的主要手段<sup>[3-8]</sup>, 针对奶粉样品基质复杂的特点, 现行国标方法采用较为繁琐的前处理方法以实现净化和浓缩的目的<sup>[9]</sup>。此类前处理方法通常需要经过皂化、液液萃取、洗涤、浓缩及复溶等多个步骤, 尤以液液萃取过程, 除了需要使用大量有毒有机萃取溶剂, 整个过程需要经过多次



萃取和洗涤, 耗时耗力的同时, 还极易造成目标物的降解和损失, 极大影响了样品分析效率和方法重现性<sup>[4]</sup>。

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<sup>[4-6]</sup>, 采用固相萃取方法替代液液萃取方法<sup>[9]</sup>, 通过优化固相萃取条件和色谱分析条件, 简化样品前处理过程, 缩短样品分析时间, 进一步提高了方法整体分析效率。

## 2. 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

2.1.1 Thermo Fisher Vanquish Core高效液相色谱仪, 泵: Vanquish Dual Pump (含两个独立三元梯度泵), 自动进样器: Vanquish Autosampler (250  $\mu$ L Sample Loop), 柱温箱: Vanquish Column Compartment (含两个Viper Only 2p-6p切换阀), 检测器: Vanquish Diode Array Detector (含13  $\mu$ L流通池), Vanquish Fluorescence Detector (含8  $\mu$ L流通池), 样品环: 500  $\mu$ L Volume, 色谱软件: 变色龙Chromeleon 7.2.10

2.1.2 固相萃取柱: Thermo Fisher HyperSep Retain PFP (200 mg, 6 mL, PN: 60107-212)

2.1.3 试剂: 乙腈、甲醇、乙醇、石油醚、乙醚、丙酮、乙酸乙酯、正己烷、二氯甲烷 (色谱级, Fisher公司), 去离子水 (18.2 M $\Omega$ , Millipore纯水机), 氢氧化钾、抗坏血酸、2,6-二叔丁基对甲酚 (BHT) 和无水硫酸钠 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)

2.1.4 标准品: 维生素A (all-trans retinol,  $\geq$ 95%, Sigma-Aldrich), 维生素D2 (98.1%, Dr.Ehrenstorfer GmbH), 维生素D3 (99.6%, Dr.Ehrenstorfer GmbH),  $\alpha$ -生育酚 ( $\alpha$ -tocopherol, 98.0%, Sigma-Aldrich),  $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -生育酚 ( $\geq$ 96%, Sigma-Aldrich)

### 2.2 标准品溶液制备

分别精密称量维生素A、D2、D3,  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 和 $\delta$ -生育酚标准品适量, 至10 mL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0.41 mg/mL的维生素A溶液, 0.16 mg/mL的维生素D2溶液, 0.28 mg/mL的维生素D3溶液, 4.25 mg/mL的 $\alpha$ -生育酚溶液, 2.50 mg/mL的 $\beta$ 、 $\gamma$ -生育酚溶液和4.00 mg/mL的 $\delta$ -生育酚溶液。

分别精密量取维生素A、D2、D3,  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 和 $\delta$ -生育酚标准品溶液适量, 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。

### 2.3 样品溶液制备

参考GB 5009.82-2016的方法<sup>[9]</sup>, 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, 固体试样需用约20 mL 45  $^{\circ}$ C ~ 50  $^{\circ}$ C温水使其溶解, 混匀。

2.3.1 皂化: 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  $^{\circ}$ C恒温水浴条件下, 磁力搅拌皂化约30 min后, 取出立刻用冷水冷却到室温。

2.3.2 液液萃取: 将上述皂化液转移入250 mL分液漏斗中, 加入50 mL石油醚-乙醚混合液 (1:1, V:V), 振荡萃取5 min, 将下层溶液转移至另一个250 mL分液漏斗, 加入50 mL石油醚-乙醚混合液再次萃取, 合并醚液, 用约100 mL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250 mL圆底烧瓶中, 于旋转蒸发仪上在40  $^{\circ}$ C左右水浴旋蒸至约2 mL, 立即氮气吹干, 用甲醇复溶转移至10 mL容量瓶后定容, 上机分析。

表1. 各维生素混合标准工作溶液制备

Vitamins, $\mu$ g/mL	Retention Time, min	Concentration level							
		1	2	3	4	5	6	7	8
A	5.54	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10	50
$\alpha$ -VE	14.98	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10	50
$\beta$ -VE	13.43	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10	50
$\gamma$ -VE	13.92	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10	50
$\delta$ -VE	12.15	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10	50
VD2	19.98	0.02	0.05	0.1	0.2	0.5	1	2	5
VD3	20.33	0.02	0.05	0.1	0.2	0.5	1	2	5

2.3.3 固相萃取: 用6 mL甲醇活化、3 mL超纯水平衡固相萃取柱, 然后准确吸取6 mL皂化液上样。待液面降至柱床时, 用约10 mL甲醇/水溶液 (60/40, V/V) 淋洗, 至流出液呈中性, 并弃去流出液。移取6 mL丙酮洗脱固相萃取柱并收集净化液, 氮气吹干, 用1 mL甲醇复溶后上机分析。

### 2.4 色谱条件

色谱条件见表2, 一维和二维梯度程序及阀切换时间见表3。

系统连接图见图1。

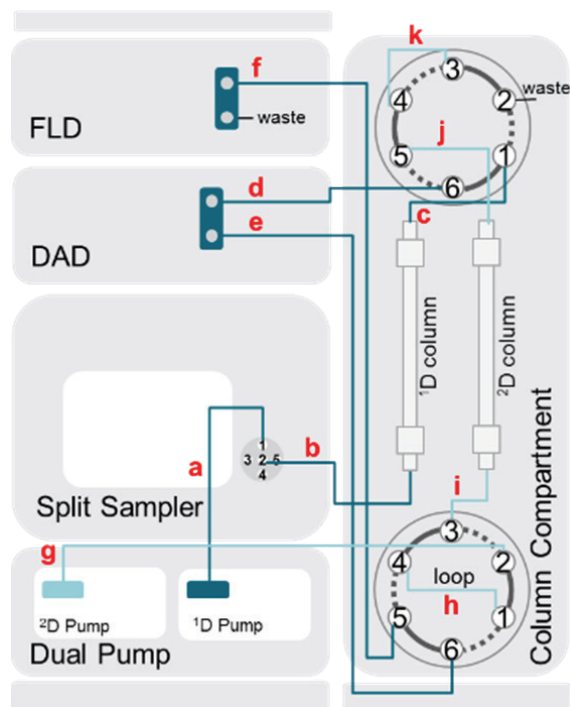


图1. 系统连接图

表2. 色谱条件

一维色谱柱	Accucore PFP 4.6 $\times$ 150 mm, 2.6 $\mu$ m P/N: 17426-154630
二维色谱柱	FOODKIT1& 2 ADE 4.6 $\times$ 100 mm, 2.6 $\mu$ m P/N: VITADE-004K1
柱温	25 $^{\circ}$ C
流动相	A: 乙腈; B: 甲醇; C: 水
流速	一维分析泵: 0.5 mL/min; 二维分析泵: 0.8 mL/min
检测器	DAD: 264 nm (VD2, VD3), 296 nm (VE), 325 nm (VA); FLD: 激发波长: 295 nm, 发射 波长: 330 nm (VE)
进样量	10 $\mu$ L

表3. 一维和二维梯度程序及阀切换时间

一维分析泵 (VA, VE)			二维分析泵 (VD)			阀切换				
Time, min	A%	B%	C%	Time, min	A%	B%	C%	Time, min	LowerValve	UpperValve
0	0	88	12	0	60	40	0	0	1_2	6_1
2	0	88	12	1	60	40	0	8.93	6_1	6_1
15	0	97	3	2	40	0	60	9.45	1_2	6_1
16	0	100	0	10	40	0	60	16	1_2	1_2
19	0	100	0	12.5	100	0	0			
19.5	0	88	12	20.5	60	40	0			
24	0	88	12	24	60	40	0			

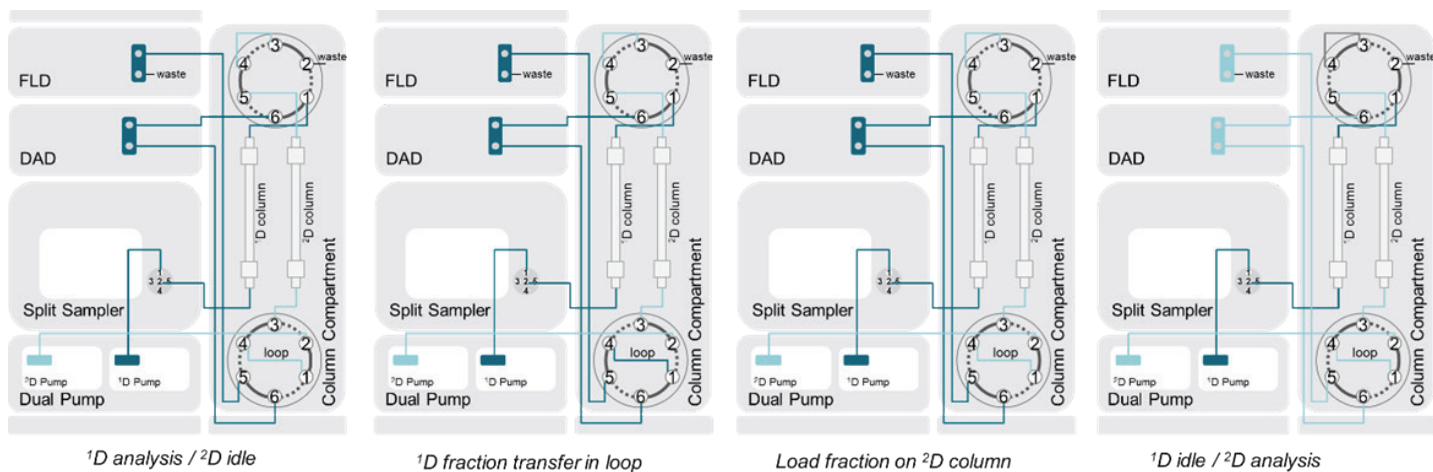


图2. 二维分离及阀切换步骤

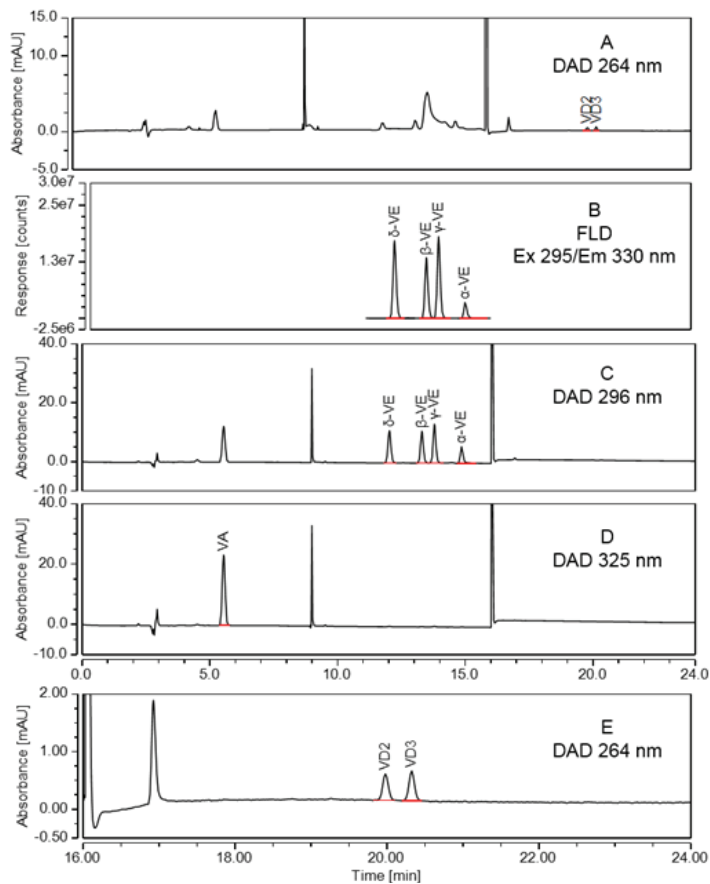


图3. 维生素A、D和E混合标准溶液分析谱图

(A~D, 0~16 min为一维谱图, 16~24 min为二维谱图, 一维和二维共用检测器; E, 二维放大图)

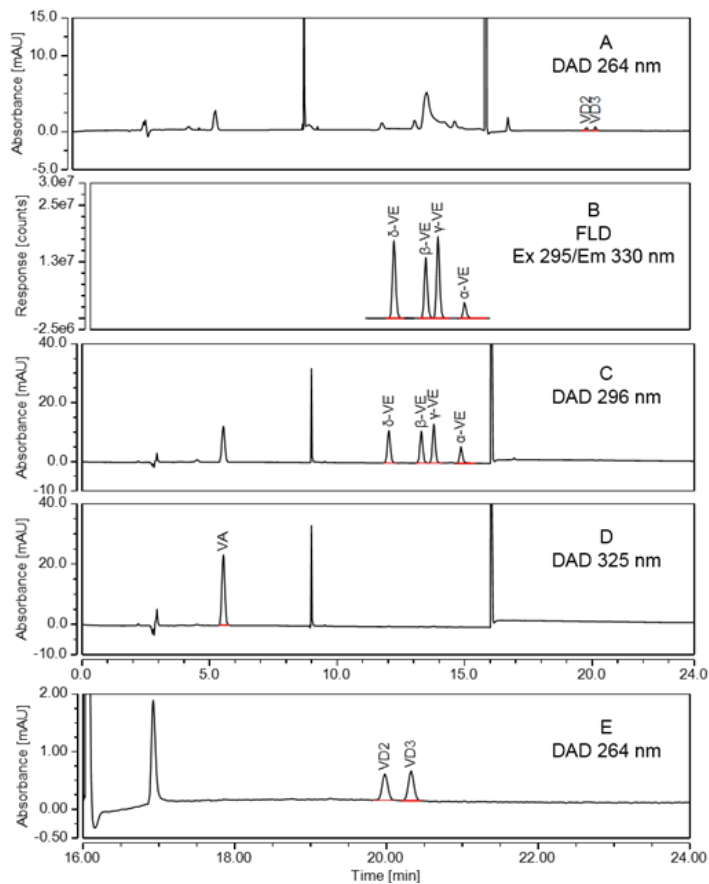


图4. 婴幼儿配方奶粉样品分析谱图

(A~D, 0~16 min为一维谱图, 16~24 min为二维谱图, 一维和二维共用检测器; E, 二维放大图)

表4. 方法线性及检出限结果

Vitamins	Detection wavelength, nm	Range, $\mu\text{g/mL}$	Linearity equation	R <sup>2</sup>	LOD, ng/mL
VA	DAD, 325 FLD, Ex 295, Em 330	0.01-50	$Y=3.2362x-0.0098$	0.9999	1.8
$\alpha$ -VE		0.05-50	$Y=84078.5x-3463.5$	0.9996	2.7
$\beta$ -VE		0.05-50	$Y=196839.8x+5479.7$	0.9995	1.9
$\gamma$ -VE		0.05-50	$Y=257541.1x+3773.2$	0.9996	1.6
$\delta$ -VE		0.05-50	$Y=261596.9x+13364.2$	0.9993	1.4
VD2	DAD, 264	0.02-5	$Y=0.4084x-0.0013$	0.9999	4.0
VD3	DAD, 264	0.02-5	$Y=0.4585x-0.0036$	0.9999	3.5

表4. 方法线性及检出限结果

Sample	Pretreatment method	Content ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ for VA, VD; $\text{mg}/100\text{ g}$ for VE)					
		VA	VD3	$\alpha$ -VE	$\beta$ -VE	$\gamma$ -VE	$\delta$ -VE
1	固相萃取	538.55	5.76	12.14	0.30	0.45	0.86
	液液萃取	475.38	5.53	10.19	0.31	0.44	0.67
2	固相萃取	446.11	6.53	10.82	0.22	2.47	0.30
	液液萃取	533.55	6.84	10.51	0.23	2.35	0.21

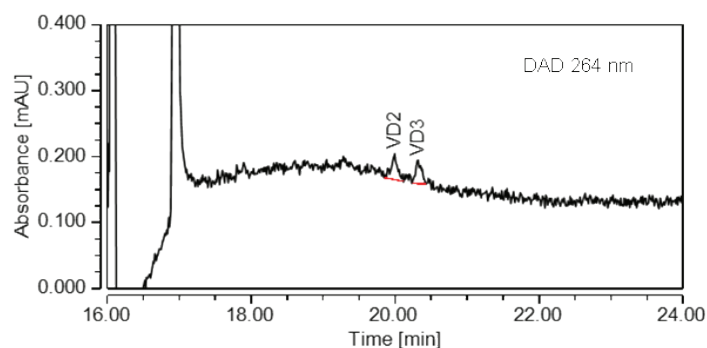


图5. 维生素D3检出限水平二维分析谱图 (S/N=4.3)

### 3. 实验结果与讨论

#### 3.1 色谱条件优化

本方法能够实现维生素A、D2和D3以及维生素E的四种生育酚异构体的同时分析,在前期方法基础上<sup>[6]</sup>,本文将方法转移至Vanquish超高效液相色谱平台上,同时进一步优化梯度洗脱程序,缩短分析时间,整个方法从原来的35 min缩短至24 min,在保证维生素E的四种生育酚异构体在一维色谱柱上实现基线分离与准确定量,兼顾维生素D净化效果及D2、D3在二维色谱柱上的分离效果等前提下,进一步提高分析效率和检测灵敏度。同时考虑提高维生素E及其异构体的灵敏度,减少基质干扰对含量测定的影响,在一维串联荧光检测器对维生素E进行测定。方法分离及阀切换步骤见图2,混合标准品溶液及典型的样品分析谱图分别见图3和4。

#### 3.2 前处理条件优化

针对奶粉样品基质复杂的特点,同时考虑维生素D对光热敏感,在奶粉中含量较低的特点,国标方法需要经过一系列繁琐的前处理步骤以实现样品净化和目标物浓缩的目的。仅液液萃取过程,除了需要使用大量有机萃取溶剂,整个过程需经过多次萃取和洗涤,极易造成目标物的降解和损失,极大影响了样品分析效率和方法重现

表6. 加标回收率结果比较

Pretreatment method	加标回收率, %		
	VA	VD3	$\alpha$ -VE
固相萃取	100.4	101.2	112.1
液液萃取	106.4	118.9	117.3

性。本文采用固相萃取方法替代液液萃取方法,将原耗时近3小时的前处理过程缩短至近1小时。由于样品皂化液呈强碱性,故本实验重点考察了两款聚合物基质的固相萃取柱,同时比较了五种不同洗脱溶剂(丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷、甲醇、正己烷)对目标物的洗脱效果,最终选择HyperSep Retain PFP作为优化的固相萃取柱,选择丙酮作为优化的洗脱溶剂。

#### 3.3 方法线性、灵敏度及精密度结果

分别精密量取维生素A、D2、D3,  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -生育酚标准品溶液适量,至10 mL棕色容量瓶中,甲醇稀释容成系列标准混合溶液,进样10  $\mu\text{L}$ ,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,考察方法的线性范围及检测限。结果显示,各化合物在其浓度范围内线性良好,相关系数均 $>0.9993$ 。方法灵敏度较高,维生素D3检出限可达3.5 ng/mL,见图5。方法线性及其检出限结果见表4。

取Level 5混合标准品溶液,连续进样6次,结果维生素A峰面积的RSD为0.15%,维生素D2和D3的峰面积RSD分别为0.40%和0.99%, $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -生育酚的峰面积RSD分别为0.10%, 0.13%, 0.05%和0.14%,表明方法精密度较好。

### 3.4 样品分析结果

取市售两种不同品牌婴幼儿配方奶粉样品，按本文2.3样品制备方法，分别采用固相萃取方法和国标液液萃取方法制备样品溶液，测定各维生素含量，结果见表5。以2号样品为例，对维生素A， $\alpha$ -生育酚和维生素D3进行一定浓度的加标实验，两种前处理方法的回收率结果见表6。

对比固相萃取和液液萃取两种前处理方法，样品中典型维生素的回收率普遍在可接受范围之内，实际测得样品中各维生素含量能基本趋于一致。样品中除主要的 $\alpha$ -生育酚外， $\gamma$ -生育酚含量也较高，而 $\beta$ 和 $\delta$ -生育酚含量相对较低，且不同品牌配方奶粉中各维生素E生育酚异构体含量也有一定差异。因此对样品中维生素E及其异构体的分析和定量，对评价和控制产品质量具有一定参考意义。

### 4. 结论

本文结合赛默飞Vanquish液相色谱平台和二维液相色谱方法，优化了针对婴幼儿配方奶粉中维生素A、D和四种维生素E异构体同时分析的快速二维检测方法，采用固相萃取方法替代液液萃取方法，简化样品前处理过程，缩短样品分析时间，进一步提高了检测灵敏度和样品分析效率，对企业产品质量控制、日常奶粉检测与评价和检测标准更新具有重要意义。

### 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 tocopherols and tocotrienols. Comparison of different chromatographic columns [J]. Journal of Chromatography A, 2000, 881:217-227.
- [3] Chen JB, Rapid detection of vitamins A, D and E in food by on-line purification two-dimensional high performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2019, 10(6):1726:1733.
- [4] Zhang YH, Zhu XY, Yang XL, Jin Y, Simultaneous qualification of vitamins A, D3 and E in fortified infant formulae by liquid chromatography coupled with fully automated online two-dimensional column switching method [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2013, 5: 771-775.
- [5] Zhang YH, Jin Y, Simultaneous determination of vitamins A, D3, and E in infant formula and adult nutrition by online two-dimensional liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2015, 33(3): 291-297.
- [6] Zhang YH, Zhang DW, Cao Y, Simultaneous determination of vitamins A, D in vitamin A and D pharmaceutical by online two-dimensional reverse-phase liquid chromatography [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2016, 35(1): 28-34.
- [7] Woollard DC, Bensch A, Determination of vitamin A and vitamin E esters in infant formulae and fortified milk powders by HPLC: Use of Internal Standardization [J]. Food Chemistry, 2016, 197(A): 457-465.
- [8] GB 5009.82-2016, Determination of vitamins A, D, E in foods. National food safety standard[S].
- [9] Aurea A, Victor C, Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review. Part II [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016, 80: 655-667.



赛默飞  
官方微信

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

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC