

中心切割液相色谱定量婴幼儿奶粉中维生素 A、D 和 E

LC-165

摘要： 本实验使用岛津 LC-20AD_{XR} 和 LC-20AD 组成中心切割液相系统，建立了维生素 A、D、E 的同时定量方法，并用于婴幼儿奶粉中 VA、VD₃ 和 VE 的含量检测。奶粉样品经过皂化、提取和过滤后，直接进入中心切割系统定量分析。一维分离后得到 VA 和 VE 的含量；VD₂ 和 VD₃ 在一维无法实现分离且受基质干扰较大，切入二维色谱柱做进一步分离，从而实现 VD₃ 与基质及 VD₂ 的分离，最终实现微量 VD₃ 的含量测定。本方法具有较好的重复性 (0.14%-0.4%)、较好的回收率 (91%-98%) 和较高的检测灵敏度。其中，VA、VD₃ 和 VE 的 LOD 分 0.030, 0.015, 0.071 μg/mL。除可准确定量奶粉中 VA、VD₃ 和 VE，本系统还具有以下优势：第一，轻松实现维生素系统与普通一维液相的切换（无须任何系统改建和调试）；第二，只需一个检测器即可实现 VA、VD₃ 和 VE 的一维和二维检测；第三，无须捕集柱捕集馏分，减少了捕集柱更换成本，同时减小阀切换带来的压力波动和对色谱柱的损伤。

关键词： 中心切割 维生素 A 维生素 D₃ 维生素 E 奶粉

维生素 D₂(麦角钙化醇) 和维生素 D₃(胆钙化醇) 是哺乳动物重要的营养成分，具有促进哺乳动物钙磷代谢和成骨的作用。因此，维生素 D(主要是维生素 D₃) 是婴幼儿奶粉营养成分的检测指标之一。由于奶粉基质复杂，且维生素 D₃ 含量较低、紫外吸收不强、易受基质干扰，难以通过一维色谱实现其与基质的分离和准确定量。正相色谱制备、反相色谱分析(中国和欧洲标准) 可以解决这个问题，但该方法工作量较大、过程繁琐、较难应对大量样品分析需求。

本文采用中心切割方法，利用一维色谱柱定量 VA 和 VE，同时净化 VD。Loop 环收集 VD 组分，并由二维液相泵引入第二维色谱柱，利用二维色谱柱进一步分离能力和不同的分离选择性实现 VD₃ 与基质和 VD₂ 的分离，最终实现 VD₃ 的定量。综上所述，本方法只需一次进样，即可实现 VA、VD₃ 和 VE 的同时定量，节约了大量样品制备时间、避免正相溶剂对分析人员的伤害，同时具有稳定性好，准确度高的特点，可用于婴幼儿奶粉中 VA、VD₃ 和 VE 的含量检测。

实验部分

1.1 仪器

LC-20AD_{XR}(高压二元泵)，LC-20AD(高压二元泵)，SIL-20AC_{XR}(自动进样器)，CTO-20AC(柱温箱)，CBM-20A(系统控制器)，SPD-M30A(二极管阵列检测器)，LabSolutions(色谱工作站)，两个二位六通阀，500 μL 定量环 (loop 环)。仪器连接和阀切换如图 1 所示。

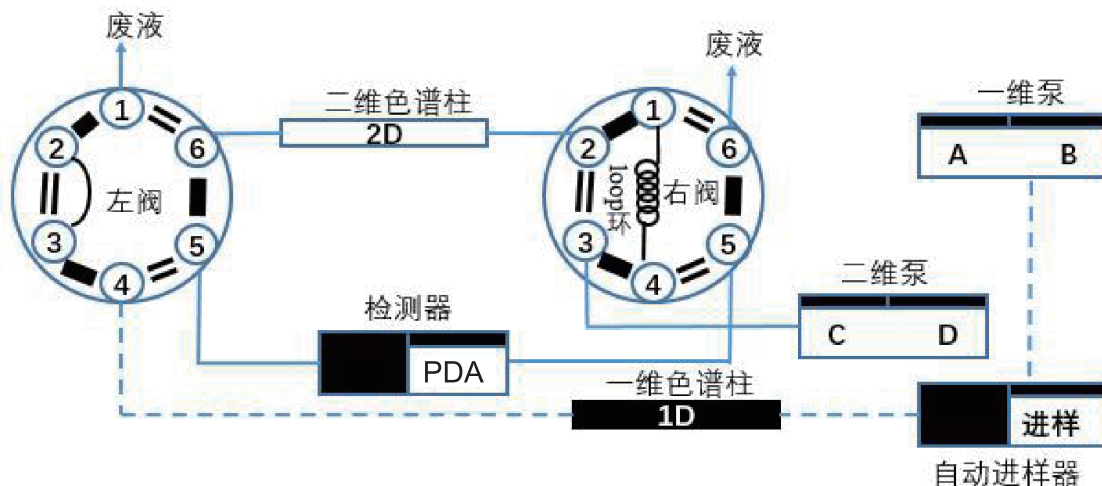


图1 中心切割液相系统切换图

1.2 样品信息

标准溶液配制方法如下：分别称取 VA(Vitamin A, 购自 Sigma, CAS #: 68-26-8)、VD₂(Vitamin D₂, 购自 Dr.Ehrenstorfer, CAS #: 50-14-6)、VD₃(Vitamin D₃, 购自 Dr.Ehrenstorfer, CAS #: 67-97-0) 和 VE(Vitamin E, 购自 Sigma, CAS #: 218-197-9) 对照品, 用甲醇配制成浓度分别为 250、130、150 和 145 μg/mL 的混合溶液备用。取混合溶液适量, 用甲醇逐级稀释配制浓度 VA(0.98-15.63 μg/mL)、VD₂(0.53 μg/mL)、VD₃(0.059-1.88 μg/mL) 和 VE(11.52-368.80 μg/mL) 的对照品溶液。

实际样品测试：客户按国标方法 GB 5009.82-2016 方法皂化好的奶粉样品, 直接测试。

加标回收：取对照品母液 100 μL, 用甲醇稀释到 1 mL(对照)；取 900 μL 样品, 加入 100 μL 甲醇(样品)；取 900 μL 样品, 加入 100 μL 对应浓度对照品(加标样品)。回收率 = ((A 加标样品 - A 样品) / A 对照) × 100%。加标浓度为待测样品中对应化合物浓度。

1.3 分析条件

色谱条件

一维色谱柱：Inertsil ODS-4(3.0x 50 mm, 2 μm)

二维色谱柱：Spolar (4.6x 250 mm, 5 μm)

柱温：35℃

流动相：见表 1

进样体积：20 μL

一维流速：0.5 mL/min

二维流速：1.0 mL/min

检测波长：VA：325 nm；VD₂ 和 VD₃：265 nm；

VE：291 nm

表1 液相条件和阀切换条件

时间 (min)	一维		二维		左阀	右阀
	A: 水	B: 甲醇	C: 乙腈	D: 甲醇		
0.0	10	90	90	10	1-6	1-2
3.0	0	100				
3.45						1-6
3.75						1-2
4.8			90	10		
5.0					1-2	1-6
7.0			50	50		
15.0	0	100				
15.1	10	90				
18.0			50	50		
18.1			0	100		
21.0			0	100	1-6	1-2
21.1			90	10		
28.0	10	90	90	10		

结果与讨论

2.1 一维色谱柱优化

维生素 A、D 和 E 差异较大, 以 C18 为固定相容易分离。一维色谱柱的选择和梯度优化应考虑以下几个因素：1. 基质不干扰维生素 A 和 E 的检测；2. 维生素 D₂ 和 D₃ 尽可能共洗脱, 以减少一维馏分体积, 从而减少溶剂效应对二维分离的影响；3. 选择 3.0 内径的色谱柱, 既可以兼容低流速(降低一维体积)、又具有适中的柱容量, 延长色谱柱的使用寿命；4. 在不影响维生素 A 和 E 定量的前提下, 尽可能减少一维分离时间, 从而减少方法运行时间；5. 由于皂化后的样品以甲醇为溶剂, 为了减少溶剂效应, 尽可能选择兼容高比例甲醇的色谱柱。基于上述考虑, 最终选择 Inertsil ODS-4 (3.0 x 50 mm, 2 μm) 为一维色谱柱, 甲醇：水 (9:1, v/v) 为一维起始流动相。

2.2 阀切换时间

本实验共包含 2 个二位六通阀：左阀用于检测器切换，1-6 位置检测器与第一维色谱柱 (¹D) 相连，1-2 位置检测器与第二维色谱柱 (²D) 相连；右阀用于切换定量环与色谱柱的连接，1-6 位置定量环收集 PDA 流出组分，1-2 位置定量环中组分转移到 ²D 色谱柱。具体解析如下：

1) 左阀 1-6, 右阀 1-2: 检测器与 ¹D 色谱柱连接, 检测一维洗脱馏分, loop 与 ²D 色谱柱相连, 使 loop 环充满二维流动相;

2) 左阀 1-6, 右阀 1-6: 检测器继续与 ¹D 色谱柱相连, loop 环与检测器和 ¹D 色谱柱相连, 开始收集 ¹D 色谱柱洗脱的维生素 D。该时间为维生素 D 的峰起始时间;

3) 左阀 1-6, 右阀 1-2: 检测器继续与 ¹D 色谱柱相连, loop 与检测器和 ²D 色谱柱相连, 定量环结束收集一维馏分, 切换到与二维泵和 ²D 色谱柱相连, 将一维馏分引入 2D 色谱柱。该时间为维生素 D 的峰结束时间;

4) 左阀 1-2, 右阀 1-6: 检测器完成一维维生素 A、D、E 的检测, 切换到与 ²D 色谱柱相连, 检测维生素 D₂ 和 D₃; loop 完成一维馏分转移, 切换到与 ¹D 色谱柱相连, 以减少二维液相系统梯度延迟时间;

5) 左阀 1-6, 右阀 1-2: 切回到初始状态。

2.3 二维条件优化

第二维方法优化目的：分离 VD₂、VD₃ 并排除基质干扰。第二维以 Spolar 柱为固定相，乙腈：甲醇 (90:10, V/V) 为初始流动相，并保持 1 min，以实现 VD 馏分在二维色谱柱柱头的富集，减少溶剂效应；在 VD 组分切入二维色谱柱的第 2-5 min，采用陡梯度实现干扰基质的快速洗脱、VD₂ 和 VD₃ 的分离。

2.4 检测器的选择

如果不需要获得待测物特征吸收谱图，可选用紫外可见检测器，采用波长切换完成 VA、VD 和 VE 的检测；如果需要获得待测物特征吸收谱图，可选用二极管阵列检测器。

2.5 方法学数据考察

1.2 所述各浓度标准溶液，按照 1.3 所述分析条件进行测定 (如图 2)。以 LOD 浓度 S/N 不小于 3，LOQ 浓度 S/N 不小于 10 为标准，测得本方法中 VA、VD₂、VD₃ 和 VE 的 LOD、LOQ 如表 2 所示。根据国标要求，用外标法定量 VA 和 VE，内标法定量 VD₃ (以浓度为 0.05 μg/mL 左右的 VD₂ 为内标)，所得标准曲线见图 3。各组分线性回归方程及相关系数见表 2。结果表明各组分在考察浓度范围内线性关系良好，R² 大于 0.999，各标准点准确度在 95-106% 之间。

表2 各组分工作曲线及相关系数

No.	名称	线性范围 ^a	线性方程	相关系数	LOD ^a (S/N)	LOQ ^a (S/N)
1	VA	0.98-15.63	A=350618C-44928	0.9993	0.030 (5)	0.061 (10)
2	VD ₃	0.059-1.87	A=0.8489 C -0.04670	0.9996	0.015 (4)	0.059 (12)
4	VE	11.52-368.75	A=105143 C-33810	0.9996	0.071 (5)	0.14 (10)

a: 单位均为 μg/mL。

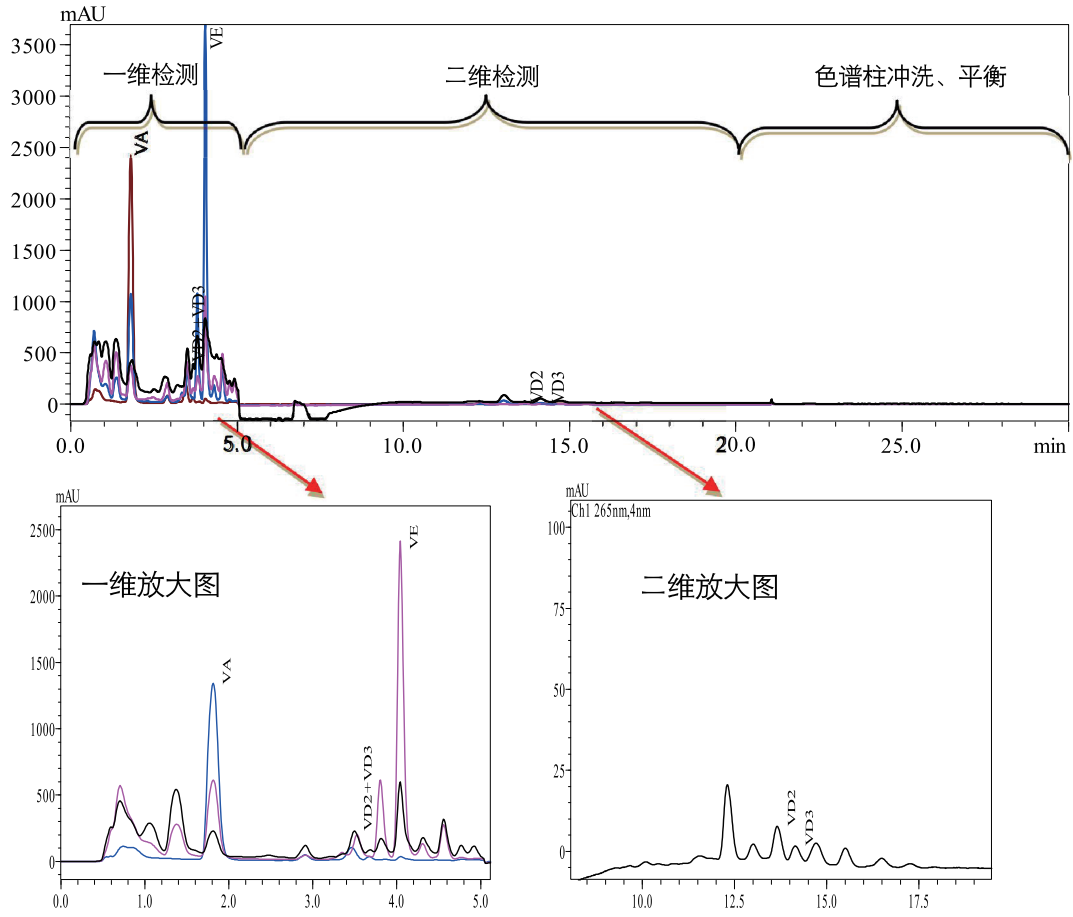


图2 中心切割二维用于婴幼儿奶粉中VA、VD₃和VE的同时检测(多通道重叠图)

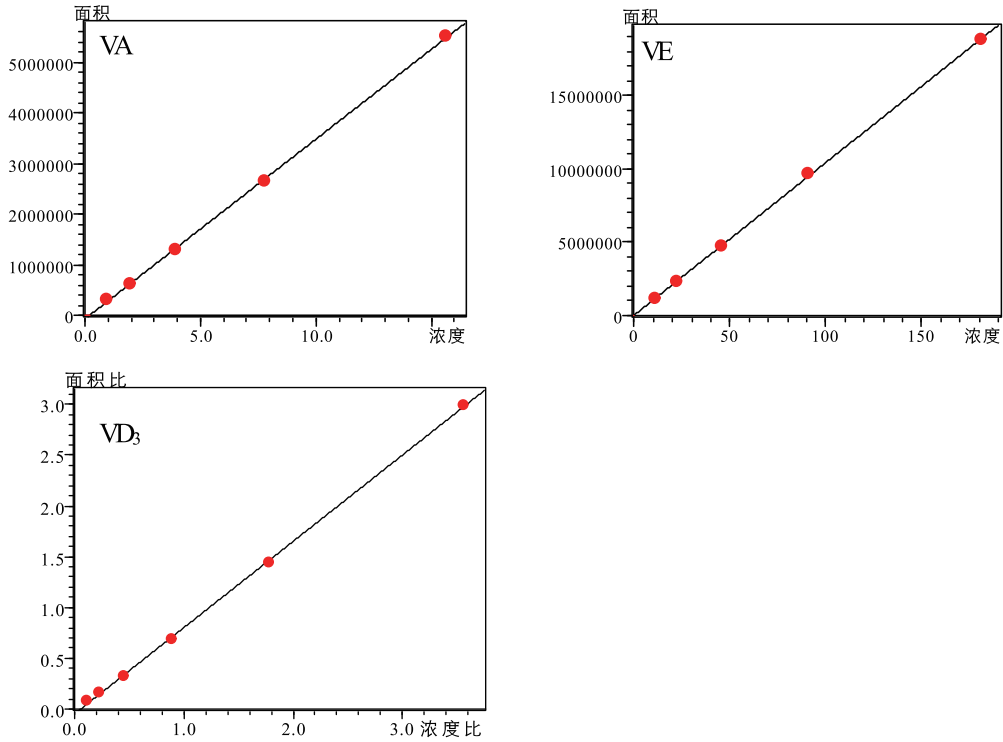


图3 VA、VE和VD₃工作曲线

2.6 重复性

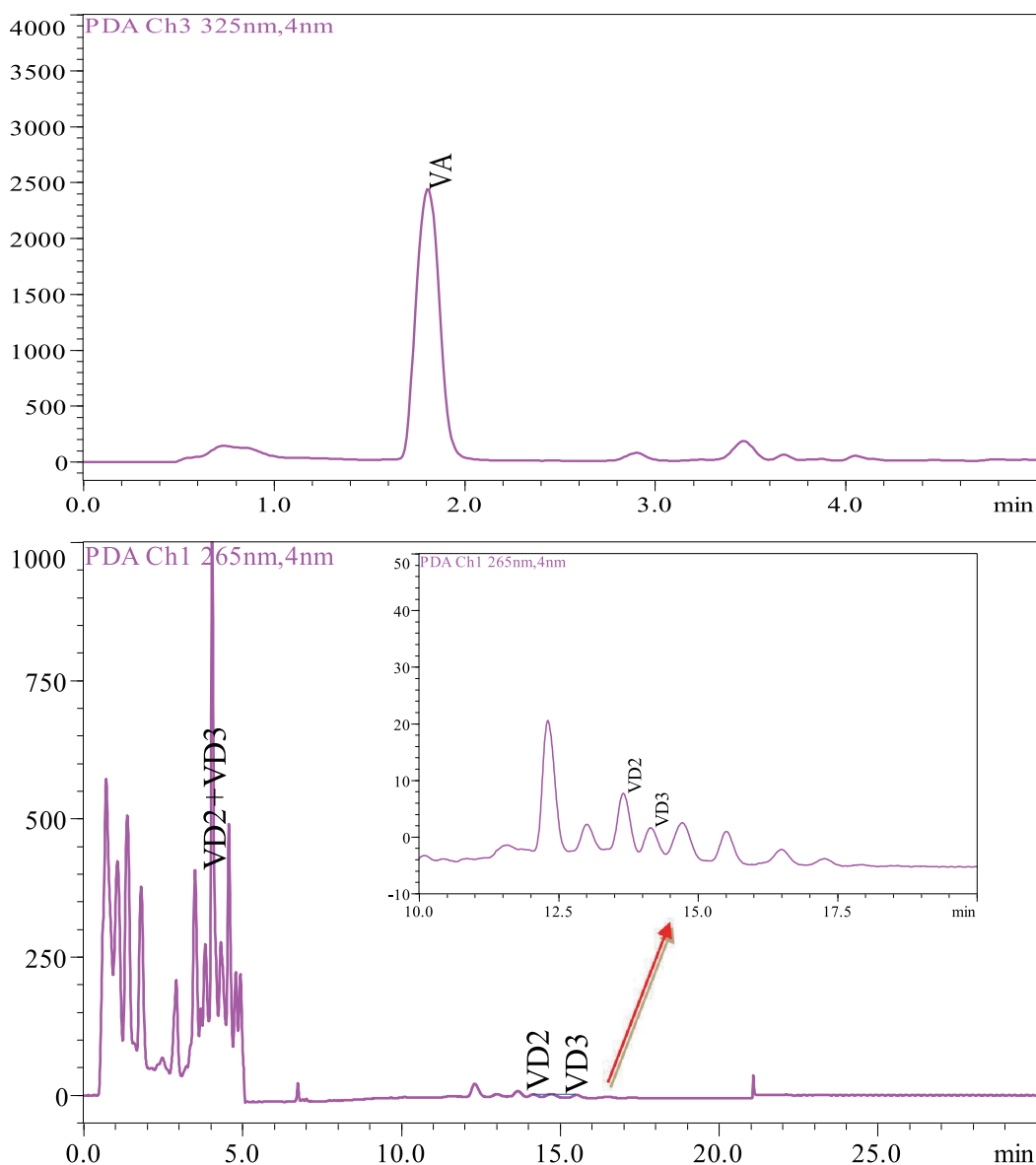
如 1.2 节所述, 取对照品混合溶液平行进样 5 针, 峰面积和保留时间相对标准偏差 (RSD%) 如表 3 所示。分析结果表明, 3 种目标化合物的保留时间和峰面积相对标准偏差均在 0.03~0.17% 和 0.13~0.38% 之间, 可以满足定量分析的需求。

表3 各组分的仪器重复性考察结果(n=5)

No.	化合物名称	英文名称	CAS No.	保留时间%	峰面积%
1	VA	Vitamin A	68-26-8	0.17	0.38
2	VD ₃	Vitamin D ₃	67-97-0	0.030	0.19
3	VE	Vitamin E	218-197-9	0.14	0.14

2.7 样品测试和加标回收率考察

采用本文方法定量奶粉中 VD₃, 可排除样品基质对 VD₃ 的干扰, 专属性较高 (含量测定和回收率如表 4)。图 4 为奶粉中 VA、VD 和 VE 在各自定量通道下的色谱图。从色谱图可知, 该方法可实现奶粉中目标化合物与干扰物质的分离, 可用于奶粉中 VA、VD₃ 和 VE 的含量测定。此外, 本方法还可实现 VD₂ 和 VD₃ 及其降解化合物的分离 (附图 1)。



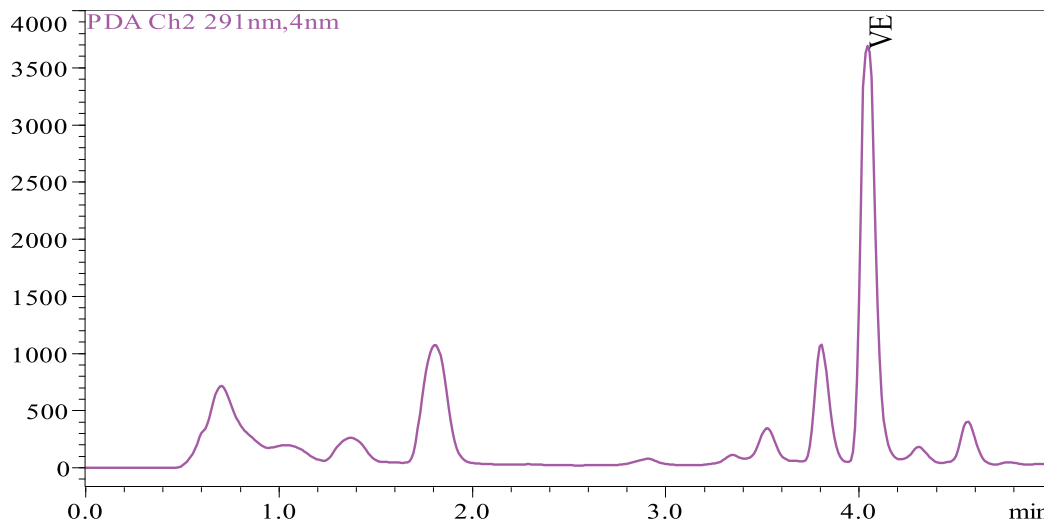


图4 奶粉样品中VA、VD₃和VE的定量

表4 实际样品测试结果及加标回收率

奶粉编号	化合物名称	定量通道	定量结果	奶粉中化合物含量 ^a	加标回收率
		nm	μg/mL		%
1	VA	325	5.93	515.65	95.0
	VD ₃	265	0.341	29.65	91.4
	VE	291	190	16.52	98.5
2	VA	325	3.27	284.35	96.1
	VD ₃	265	0.324	28.17	95.6
	VE	291	114L	9.91	98.1

a 根据 GB 5009.82-2016，奶粉中 VA 和 VD 含量单位为 μg/100 g，计算公式：含量(μg/100 g)

$$= \frac{\text{测得浓度}(\mu\text{g/mL}) \times \text{定容体积}(\text{mL})}{\text{皂化所用奶粉质量}(\text{g})} \times 100 ; \text{奶粉中 VE 的含量单位为 mg/100 g, 计算公式: 含量}(\text{mg}/100 \text{ g})$$

$$= \frac{\text{测得浓度}(\mu\text{g/mL}) \times \text{定容体积}(\text{mL})}{\text{皂化所用奶粉质量}(\text{g})} \times 0.1$$

结论

本方法具有自动化程度高、操作简单和成本低等特点。尤其是维生素 VD₃ 的含量测定,该方法灵敏度高、专属性强,可用于婴幼儿奶粉中 VA、VD 和 VE 的同时测定。此外,本文发展的中心切割方法还具有以下优势:

- 第一, 轻松实现维生素系统与普通一维液相系统的切换 (无须任何系统改建、调试和系统重新验证);
- 第二, 只需一个检测器即可实现 VA、VD 和 VE 的一维和二维检测;
- 第三, 无须捕集柱捕集馏分, 较少捕集柱更换成本, 同时减小阀切换带来的压力波动和对色谱柱的损伤;
- 第四, VD 的一维谱图和二维谱图在同一张谱图上, 减小数据处理任务。

附图 1

