

二维液相色谱法测定乳制品中维生素 D₂、D₃ 的含量

LC-415

摘要： 本文参照国标 GB 5009.296-2023《食品中维生素 D 的测定》，采用二维液相色谱系统，建立了测定乳制品中维生素 D₂、D₃ 含量的分析方法。样品经皂化和液液萃取后进样分析，对该方法的线性、重现性和加标回收率等性能指标进行了测试。维生素 D₂、D₃ 线性关系良好，相关系数大于 0.999。重复性实验中，维生素 D₂、D₃ 保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.01-0.04% 之间和 0.20-3.67% 之间，重复性良好。方法精确度实验中，维生素 D₂、D₃ 平均回收率分别在 81.0~88.3% 之间，相对标准偏差在 1.65~3.96% 之间。

关键词： 二维液相色谱 维生素 D₂、D₃ 乳制品

技术特点：

- ❖ 满足国标 GB 5009.296-2023《食品中维生素 D 的测定》检测要求。
- ❖ 方法学指标优秀，二维液相系统稳定性良好。

维生素 D（简称 VD）是一种脂溶性维生素，与健康关系较密切的是维生素 D₂ 和维生素 D₃。维生素 D 的主要功能是促进小肠粘膜细胞对钙和磷的吸收，同时，还有促进皮肤细胞生长、分化及调节免疫功能作用。维生素 D 缺乏症在世界范围内的成人和儿童中普遍存在，除了造成佝偻病、骨质疏松症和骨软化症等常见病症外，还会增加癌症患病风险。

维生素 D₂、D₃ 的测定，目前主要采用液液萃取

或固相萃取结合 HPLC 或 LC-MS 的方法。实际测定过程中由于乳制品基质复杂，添加量差异大，诸多因素导致前处理复杂，重复性差。

本文参照国标 GB 5009.296-2023《食品中维生素 D 的测定》（2024-03-06 实施）中的在线柱切换 - 反相液相色谱法，采用二维液相系统实现维生素 D₂、D₃ 的分离及测定。

实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津二维液相色谱系统，具体配置为：

系统控制器：CBM-20A

柱温箱：CTO-20AC

脱气机：DGU-20A5R×2

一维输液泵：LC-20ADXR (LPGE)

二维输液泵：LC-20ADXR×2

自动进样器：SIL-20AC

切换阀：FCV-20AH2

检测器：SPD-20A×2

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.118

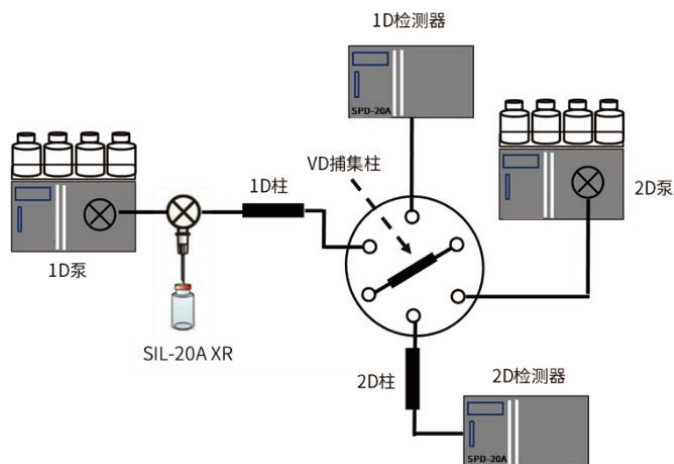


图 1 二维液相色谱系统的原理图

1.2 分析条件

- 一维色谱柱：Thermo Acclaim 120 C8(150 mm x 3.0 mm I.D., 3 μm)
- 二维色谱柱：ShimNex S-C18-PAH (150 mm x 4.6 mm I.D., 3 μm), 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N 380-01247-14
- 捕集柱：Shimpack GIST AQ-C18 (10 mm x 4.0 mm I.D., 5 μm), 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N 227-30763-02
- 一维流动相：A相: 水; B相: 乙腈-甲醇(3:1,v/v) 一维流速：0.7 mL/min
- 二维流动相：A相: 水; B相: 乙腈-甲醇(9:1,v/v) 一维流速：1.0 mL/min
- 进样体积：50 μL 检测波长：264 nm
- 柱温：35°C
- 洗脱方式：梯度洗脱, 洗脱程序及切阀程序见表 1、表 2 及表 3

表 1 一维色谱梯度洗脱时间程序

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0.00	20	80
16.00	0	100
19.00	0	100
19.50	20	80
30.00	20	80

表 2 二维色谱梯度洗脱时间程序

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0.00	20	80
11.5	20	80
12.7	0	100
26.0	0	100
26.1	20	80
30.0	20	80

表3 切阀时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
Int.	柱温箱	CTO.RVL	1
10.20	柱温箱	CTO.RVL	0
11.50	柱温箱	CTO.RVL	1

1.3 标准品的配制

标准溶液的配制：参照新版国标 GB 5009.296-2023《食品中维生素 D 的测定》方法，使用无水乙醇配制 1000 mg/L 维生素 D₂、D₃ 标准储备液，再用无水乙醇稀释标准储备液，配制成 10.0 mg/L 维生素 D₂、D₃ 标准中间液。

混合标准系列工作溶液的配制：以一维初始流动相为溶剂，配制混合标准系列工作液，溶液中维生素 D₂、D₃ 浓度分别为 2.5、5.0、10、20、50、100 μg/L，待上机分析。

1.4 样品前处理方法

样品前处理参照国标 GB 5009.296-2023《食品中维生素 D 的测定》中第二法 在线柱切换 - 反相液相色谱法中液液萃取法对样品进行提取净化。

■ 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

如图 2 所示，维生素 D₂、D₃ 在一维色谱图（1stD）合并为一个色谱峰，切入二维液相色谱（2ndD）中实现基线分离，分离度为 5.75。

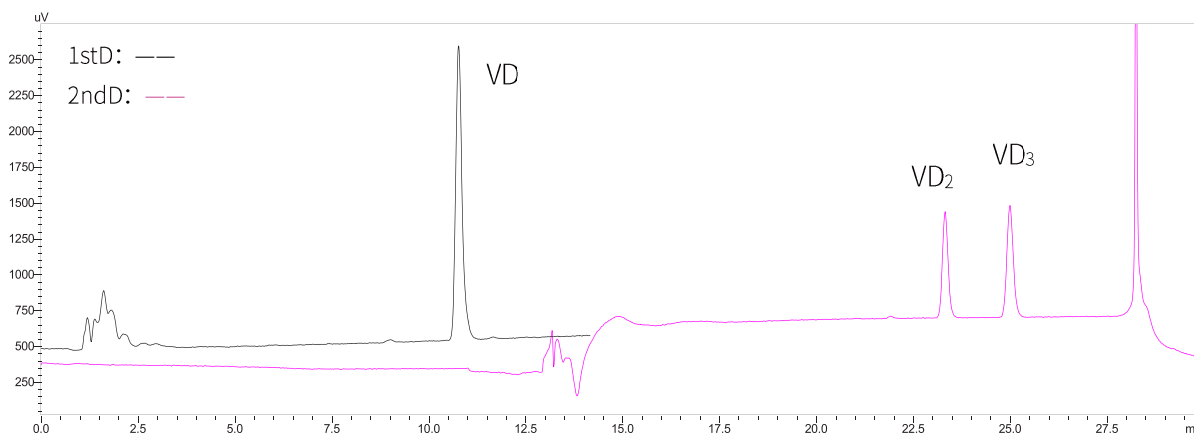


图 2 一维、二维色谱图 (50 μg/L)

2.2 线性范围和灵敏度

按照 1.3 项下配制方法，配制校准曲线。以化合物浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归分析，维生素 D₂、D₃ 线性良好，相关系数均大于 0.999。以校准曲线浓度最低点计算信噪比 (S/N)，计算得到定量限 (S/N=10) 和检出限 (S/N=3)，具体结果见表 4。

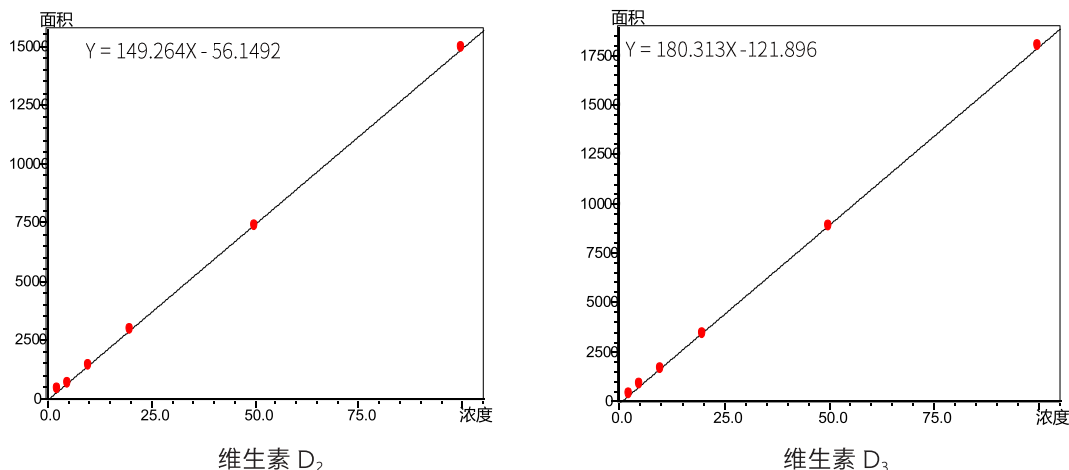


图4 维生素 D₂、D₃ 校准曲线

表4 校准曲线参数

序号	化合物	线性范围 (µg/L)	相关系数 r	定量限 (µg/L)	检出限 (µg/L)
1	维生素 D ₂	2.5~100.0	0.9999	1.40	0.42
2	维生素 D ₃	2.5~100.0	0.9999	1.37	0.41

2.3 重复性

分别对低、中、高浓度混合标准溶液连续进样分析6次，计算重复性，结果见表5。维生素 D₂、D₃ 保留时间的相对标准偏差 (RSD%) 在 0.01~0.04% 之间，峰面积的 RSD% 在 0.20~3.67% 之间，重复性良好。

表5 重复性结果 (n=6)

序号	化合物	5 µg/L		50 µg/L		100 µg/L	
		保留时间 RSD%	峰面积 RSD%	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
1	维生素 D ₂	0.03	3.67	0.02	0.21	0.01	0.20
2	维生素 D ₃	0.04	3.08	0.02	0.41	0.01	0.20

2.4 方法准确性和精密度

取市售牛奶，按照 1.4 前处理方式分别进行处理，对处理后样品进行测试，如图 3 所示牛奶样品中未检出 VD₂ 和 VD₃。向空白牛奶样品中分别添加一定浓度的目标物，添加浓度分别为 2.0 µg/100 g 和 5.0 µg/100 g，制备两个水平的加标样品，每个水平重复 6 次，进行加标回收率和精密度实验。结果见表 6，维生素 D₂、D₃ 平均回收率分别在 81.0%~88.3% 之间，相对标准偏差在 1.65%~3.96% 之间。

表6 牛奶样品加标实验结果 (n=6)

No.	化合物名称	样品含量 (µg/100 g)	加标 1			加标 2		
			加标量 (µg/100 g)	回收率 %	RSD%	加标量 (µg/100 g)	回收率 %	RSD%
1	维生素 D ₂	N.D.	2.0	88.3	3.96	5.0	85.9	1.65
2	维生素 D ₃	N.D.	2.0	83.8	3.83	5.0	81.0	2.20

注：“N.D.”表示未检出。

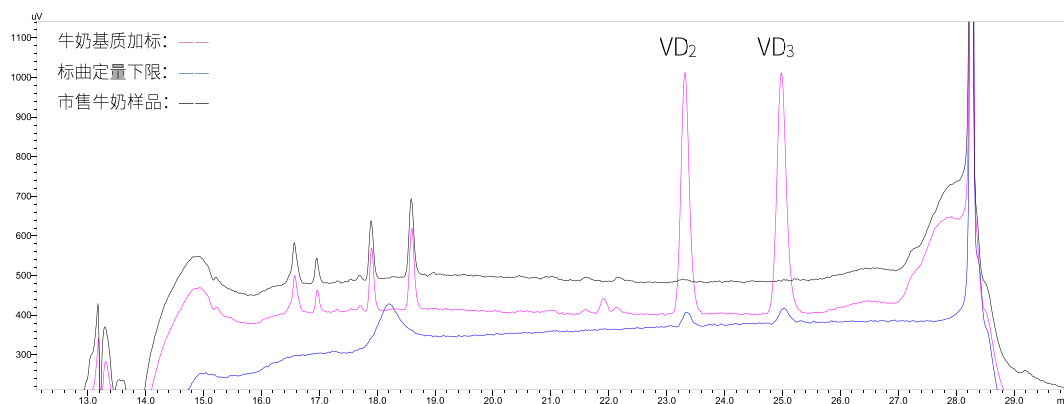


图3 牛奶基质加标 (5.0 µg/100 g)、标曲定量下限 (0.25 µg/100 g) 及市售牛奶样品色谱图

■ 结论

本文参考国标 GB 5009.296-2023《食品中维生素 D 的测定》中的在线柱切换 - 反相液相色谱法, 使用岛津二维液相色谱系统, 建立食品中维生素 D 的检测方法。维生素 D₂、D₃ 线性关系良好, 重现性好, 回收率高, 满足新版国标测试测定要求, 适用于乳制品中维生素 D₂、D₃ 的含量测定。

岛津应用云

