

LC-MS/MS 法测定婴幼儿配方奶粉中维生素 D

LCMSMS-652

摘要： 本文使用岛津超高效液相色谱串联质谱联用仪建立了测定婴幼儿配方奶粉中维生素 D₂/D₃ 的方法。婴幼儿配方奶粉样品进行皂化处理，使用 SHIMSEN Styra HLB 通过固相萃取 (SPE) 进行萃取和净化，LC-MS/MS 上机分析。2 种组分在 13 min 时间内分析完成，各组分在 1 ~ 1000 ng/mL 浓度范围内线性关系良好。加标回收和精密度实验测试表明，方法重现性好 (RSD < 10%)，回收率高 (> 80%)，是用于测定脂溶性维生素的一种简便、低成本、高效且易于操作的技术。

关键词： LC-MS/MS 婴幼儿奶粉 维生素 D

维生素 D (简称 VD) 是一种脂溶性维生素，最主要两种存在形式是维生素 D₂ 与 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。但维生素 D 并不是越多越好，研究人员指出，它的益处可能存在一个“上限效应”，在突破某一个点之后，益处就会消失。因此，出于安全考虑，准确定量婴幼儿配方奶粉中的维生素 D 含量至关重要。

基于婴幼儿奶粉基质组成复杂，脂肪含量高，且

维生素 D 的添加浓度通常较低，采用 LC-MS/MS 可以有效检测痕量 (ppb) 的维生素 D₂ 和 D₃，且无需进行 D₂、D₃ 的基线分离。

本文参照 2021 年 10 月公布的国家食品安全标准《食品中维生素 D 的测定》(征求意见稿)，并将前处理流程进行了改进，首先对婴幼儿配方奶粉样品进行皂化反应，随后无需进行提取，直接使用耐碱环境的 SHIMSEN Styra HLB 萃取小柱对皂化液直接进行萃取和净化，通过 LC-MS/MS 对维生素 D₂/D₃ 进行定量，结果表明，所有目标维生素的回收率均 > 80 % 且 RSD < 10 %，该方法快速、准确，可以很好地应对婴幼儿配方奶粉中维生素 D₂/D₃ 定量分析。

■ 实验部分

1.1 试剂与标准品信息

所有试剂和溶剂均为 HPLC 或分析纯级。

抗坏血酸和 2,6-二叔丁基对甲酚 (BHT) 均购自于 CNW。氢氧化钾购自于阿拉丁。

维生素标准品及内标购置于天津阿尔塔科技有限公司，用乙醇配制，置于 -20°C 下储存。

1.2 仪器

本实验采用岛津超高效液相色谱仪 LC-40 与 LCMS-8045 联用系统，具体配置为：

系统控制器：CBM-40	脱气机：DGU-20A ₅
输液泵：LC-40D XR×2	自动进样器：SIL-40C XR
柱温箱：CTO-40C	质谱检测器：LCMS-8045
色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.97	

1.3 分析条件

液相条件：

色谱柱：Shim-pack Scepter C18 (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, PN:227-31012-05)

流动相：A 相 -0.1% 甲酸 2 mM 甲酸铵水溶液；B 相 -0.1% 甲酸 2 mM 甲酸铵甲醇

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 88%，洗脱程序见表 1

流速：0.4 mL/min 进样量：5 μL

柱温：40°C

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
4.00	泵	B.Conc	90
5.00	泵	B.Conc	94
6.10	泵	B.Conc	100
8.00	泵	B.Conc	100
8.10	泵	B.Conc	88
13.00	Controller	Stop	

质谱条件:

离子源: ESI+

接口电压: 4.0 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 10 L/min

加热气: 空气 10 L/min

碰撞气: 氩气

DL 管温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

接口温度: 300°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

No.	化合物	英文名称	CAS 号	ESI+/ESI-	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	VD2	Vitamin D2	50-14-6	+	397.20	379.35*	-19	-12	-14
						271.25	-18	-13	-29
2	VD2-d3 (内标)	Vitamin D2- (6,19,19-d3)	1217448-46-8	+	400.25	382.20*	-19	-12	-14
3	VD3	Vitamin D3	67-97-0	+	385.15	367.35*	-18	-12	-18
						259.2	-18	-16	-28
4	VD3-d3 (内标)	Vitamin D2- (6,19,19-d3)	80666-48-4	+	388.20	370.25*	-18	-12	-18

注: * 表示定量离子

1.4 标准品的配制

用 EtOH (乙醇) 配制 10 µg/mL 维生素 D2、D3 溶液及相应的内标。

混合标准中间液: 准确移取适量储备液于 10 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇定容, 得到浓度为 2000 ng/mL 的混合标准中间溶液。

校准曲线配制: 以甲醇为溶剂, 将混合标准中间液逐级稀释至浓度为 1、5、10、20、50、100、200、500、1000 ng/mL (内标 100 ng/mL) 的标准点, 上机分析。

1.5 样品前处理方法

婴幼儿配方奶粉购自本地超市。

前处理流程参照 2021 年 10 月公布的安全国家标准《食品中维生素 D 的测定》(征求意见稿), 并做了适当改进。

图 1 展示了样品前处理流程, 其主要包括: 试样制备、皂化和 SPE 净化。试样制备过程中注意样品充分混合均匀, 可使用温水 (约 40°C~50°C) 加速溶解。抗坏血酸和 BHT 的加入, 主要为在样品前处理和检测过程中防止维生素的降解。加入 EtOH 是为了增加维生素溶解度, 改善脂肪样品与 KOH 溶液发生皂化反应的均匀性。皂化处理后, 样品颜色由黄绿色变为棕红色。

SPE净化采用 SHIMSEN Styra HLB(亲水亲酯共平衡小柱)进行,萃取小柱采用先进的亲水亲脂共平衡聚合物,对非极性化合物有较好的保留作用,对极性化合物也有一定的保留。即使在皂化反应的极强碱性条件下,该性能仍然保持稳定。在样品清洗过程中,使用约 10 mL 水清洗萃取柱,并用 80/20 甲醇 / 水混合溶液洗去疏水性干扰物。样品净化后,用于 LC-MS/MS 分析维生素 D2 和 D3。

注:目标化合物见光易分解,前处理过程尽量避光,采用棕色样品瓶进样分析。

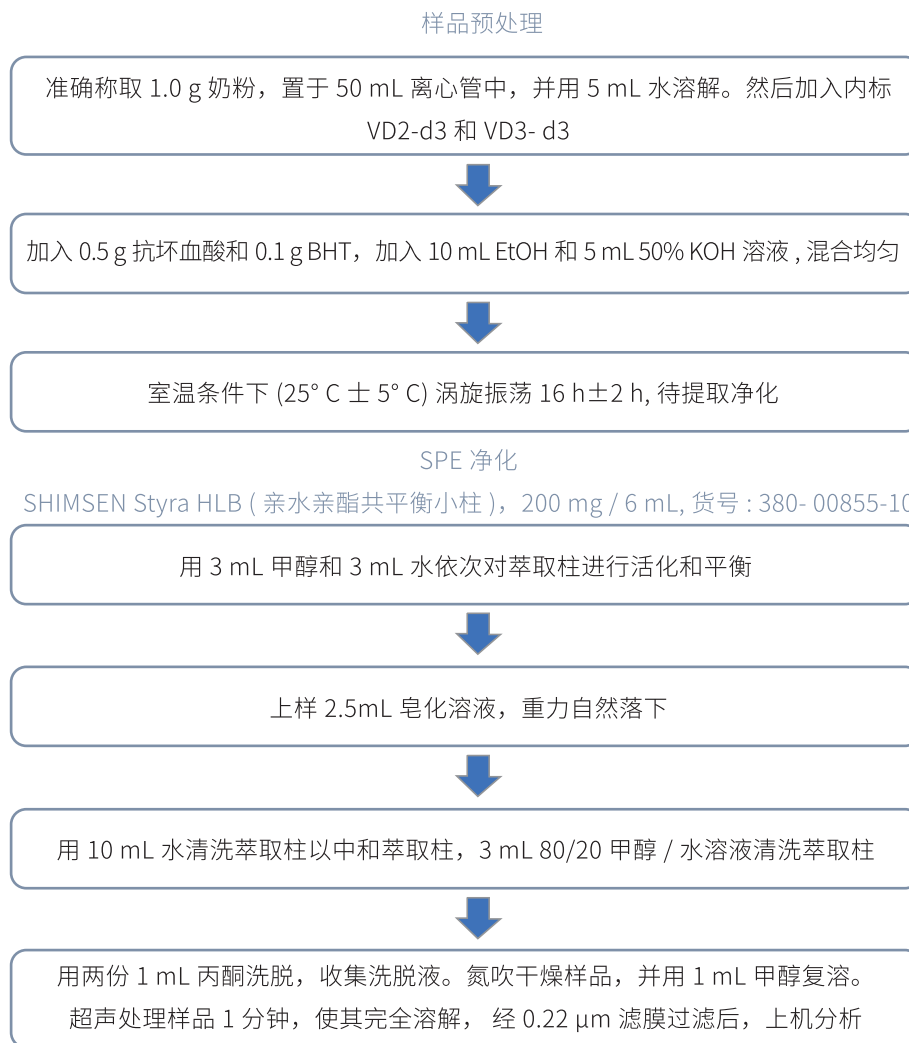
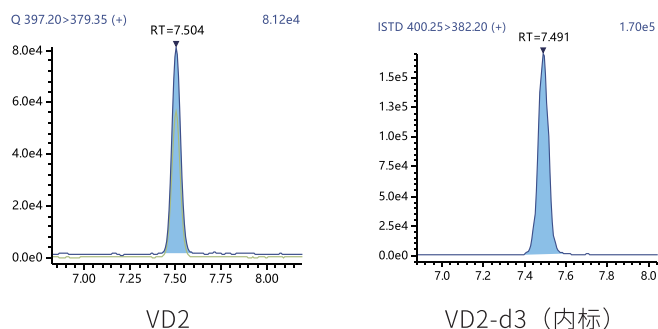


图 1 样品前处理流程图

■ 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图



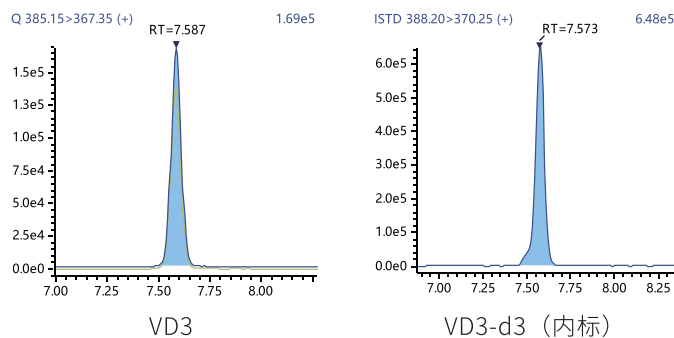


图 2 VD (20 ng/mL) MRM 色谱图

2.2 线性范围

按照 1.4 项下配制方法，配制校准曲线。以化合物浓度 X 为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归分析，2 种组分在 1 ~ 1000 ng/mL 浓度内线性良好，相关系数均大于 0.995。以校准曲线浓度最低点使用 3 倍信噪比的方式计算检出限，检出限分别为 0.33 ng/mL (VD2)、0.15 ng/mL (VD3)。

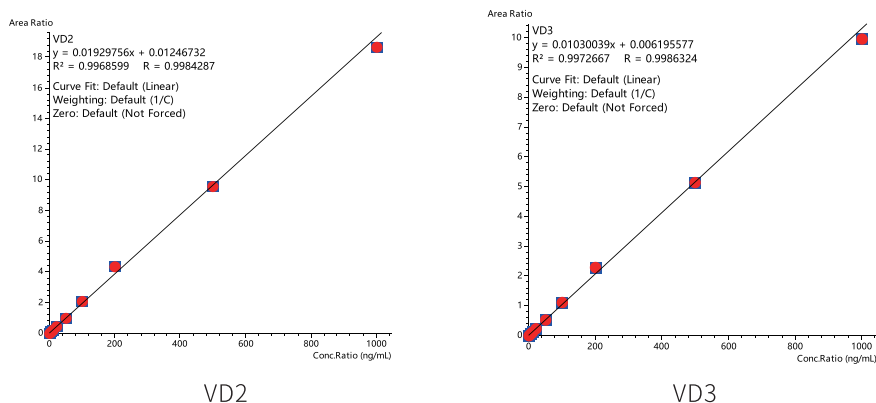


图 3 VD 校准曲线

表 3 维生素 D 校准曲线参数

No.	化合物	线性范围 (ng/mL)	相关系数 r	加权系数	检出限 (ng/mL)
1	VD2	1~1000	0.9984	1/C	0.33
2	VD3	1~1000	0.9986	1/C	0.15

2.3 重复性

对 20 ng/mL 混合标准溶液连续分析 6 次，计算重复性。2 种化合物的保留时间 RSD 均为 0.09 %，峰面积 RSD 分别为 0.90 %、1.06 %，重复性良好。

2.4 方法准确性和精密度

取某婴幼儿品牌奶粉，按照 1.5 前处理方式进行处理，对实际样品进行三次重复测试，以评估准确度和精密度，结果如表 4 所示。由于婴幼儿配方奶粉中普遍含有营养添加剂，无法获得真正的基质空白。因此，根据纯溶剂（甲醇）标准品校准曲线来对分析物进行定量，基质效应通过使用稳定标记的氘代内标来进行校正。

两种目标化合物在样品中均有检出。向样品中添加浓度为 20.0 μg/100 g 的加标量，每个水平重复 3 次，进行加标回收率和精密度试验。2 种化合物的平均回收率为 83.1 %~95.6%，相对标准偏差为 0.59 %~0.99 %。

表 4 VD2、VD3 加标回收和精密度结果 (n=3)

No.	化合物	基质样品		添加浓度 ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	质控加标样品	
		样品浓度 ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	相对标准偏差 RSD %		平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD%
1	VD2	2.02	3.80	20	95.6	0.99
2	VD3	20.46	1.20	20	83.1	0.59

■ 结论

本文参照 2021 年 10 月公布的安全国家标准《食品中维生素 D 的测定》（征求意见稿），建立了一种用于婴幼儿奶粉中维生素 D 测定的高效、稳定的 LC-MS/MS 方法。婴幼儿配方奶粉样品进行皂化处理，使用 SHIMSEN Styra HLB 通过固相萃取 (SPE) 进行萃取和净化，LC-MS/MS 上机分析。方法验证表明该方法具有出色的回收率 (>80%) 和精密度 (RSD < 10 %)，适用于婴幼儿奶粉中维生素 D 的定量分析。

岛津应用云

