

高效液相色谱检测脂溶性维生素 解决方案



前言

脂溶性维生素主要包括维生素 A、维生素 D、维生素 E 和维生素 K，其对于人类的健康至关重要。其中维生素 A 的缺乏可导致夜盲症、生长发育缓慢等症状；维生素 D 的缺乏易导致小儿佝偻症和成人软骨病；维生素 E 具有抗氧化、抗癌、抗炎等生物活性；维生素 K 则在凝血方面起着重要作用。

食品和药品中脂溶性维生素的检测是最为常见的脂溶性维生素检测项目。目前，各检测机构通常是依据食品安全国家标准或者药典中的相关规定来进行此类检测。在药典和各 GB 标准推荐的检测方法中，高效液相色谱法是最常用的方法，尤其是食品这类基质比较复杂的样品，样品经过提取和净化（可除掉大部分基质）后，利用液相色谱的分离能力将目标物与干扰物质分开，再选择合适的检测器（紫外检测器、荧光检测器或者质谱检测器）检测其响应。

高效液相色谱可分为常规液相色谱和多维液相色谱，常规液相色谱分析基质比较复杂的食品或药品时，通常会有以下不便：（1）样品基质复杂，前处理过程较为繁琐且费时；（2）有时需要同时分析样品（如婴幼儿配方奶粉）中的维生素 ADE，而其无法满足。多维液相色谱可将样品经过不止一次分离，从而达到简化前处理过程，或实现多种脂溶性维生素同时检测的目的。

作为全球知名的实验室分析测试服务供应商，岛津一直致力于提供技术领先的仪器设备及全面可靠的综合方案。继 2018 年发布《食品中维生素 ADE 定量解决方案》后，我们收集整理了岛津使用高效液相色谱（包括常规液相色谱和多维液相色谱）检测食品和药品等基质中维生素 ADEK 的应用报告，汇编出本次的《高效液相色谱检测脂溶性维生素解决方案》，希望能对相关领域的检测工作有所帮助。

本文集仅供有关人员学习交流使用，不用于任何商业用途。

岛津企业管理（中国）有限公司
分析中心

目 录

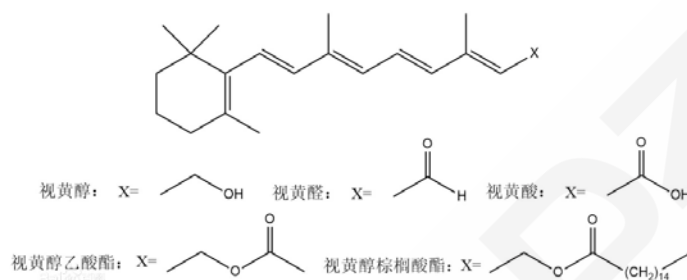
第 1 章 脂溶性维生素及其检测	1
1 脂溶性维生素简介	1
2 脂溶性维生素检测标准	3
3 多维液相色谱用于维生素 ADE 检测	4
第 2 章 高效液相色谱检测脂溶性维生素解决方案	6
2.1 常规液相色谱方法	7
高效液相色谱法检测婴幼儿配方奶粉中 VA 和 VE	8
正相高效液相色谱法测定植物油中维生素 E 的含量	14
高效液相色谱法测定维生素 K1 原料药中维生素 K1 及顺式异构体的含量	18
高效液相色谱法测定食品中维生素 K2 含量	21
2.2 多维液相色谱方法	25
OS-2DLC 系统及其在维生素 ADE 分析中的应用	26
OS-2DLC 测定婴幼儿配方奶粉中维生素 ADE	35
中心切割二维液相色谱测定婴幼儿配方奶粉中维生素 ADE	41
中心切割二维液相色谱测定乳制品中维生素 D2、D3 的含量	45
中心切割二维液相色谱测定婴幼儿奶粉中维生素 ADE	50
中心切割二维液相色谱测定米粉中的维生素 ADE	55
中心切割二维液相色谱用于维生素 D 制剂的含量测定	61
中心切割二维液相法测定药品中维生素 D 含量	65
在线 SPE-液相色谱联用快速检测人血清中维生素 A 含量	70
附录 分析应用案例快速索引	75

第 1 章 脂溶性维生素及其检测

1 脂溶性维生素简介

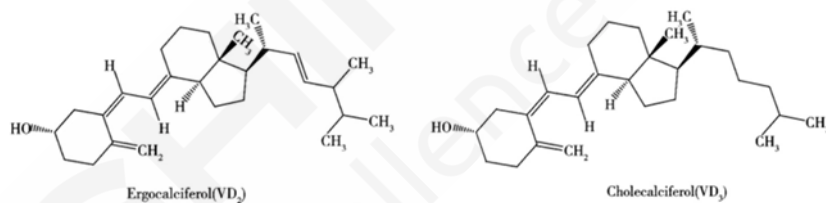
脂溶性维生素是人体必需的一类营养物质，其主要包括维生素 A、维生素 D、维生素 E 和维生素 K。

维生素 A 是人类最早发现的维生素，其具有促进生长、繁殖，维持骨骼、上皮组织、视力和粘膜上皮正常分泌等多种生理功能，缺乏时表现为生长迟缓、暗适应能力减退而形成夜盲症。维生素 A 并不是单一的化合物，而是一系列包括视黄醇以及视黄醛、视黄酸、视黄醇乙酸酯和视黄醇棕榈酸酯等在内的视黄醇衍生物。



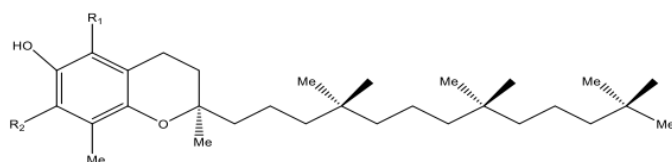
维生素 A 结构式

维生素 D 是具有抗佝偻病作用，结构类似的许多固醇类衍生物的总称，其中最主要的是维生素 D3（胆骨化醇、胆钙化醇）和维生素 D2（麦角骨化醇）。维生素 D 主要作用包括调节钙磷代谢、促进骨骼生长等，维生素 D 缺乏可引发成人软骨病和小儿佝偻病等疾病。

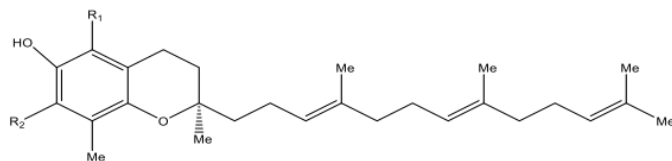


维生素 D2 和 D3 结构式

维生素 E 具有抗氧化、抗癌、抗炎等生物活性，特别是在清除机体自由基、阻断脂质氧化等方面作用尤为突出。根据其分子结构的不同，维生素 E 可分为生育酚和生育三烯酚两大类，每一类均有 α 、 β 、 γ 和 δ 等不同异构体。



生育酚

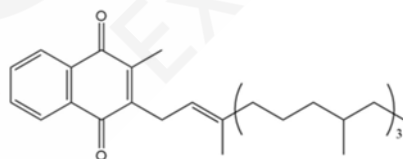


生育三烯酚

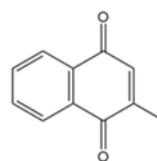
tocopherol	tocotrienol	R1	R2
α -生育酚(α -T)	α -生育三烯酚(α -T3)	Me	Me
(5, 7, 8-三甲基生育酚)	(5, 7, 8-三甲基生育三烯酚)		
β -生育酚(β -T)	β -生育三烯酚(β -T3)	Me	H
(5, 8-二甲基生育酚)	(5, 8-二甲基生育三烯酚)		
γ -生育酚(γ -T)	γ -生育三烯酚(γ -T3)	H	Me
(7, 8-二甲基生育酚)	(7, 8-二甲基生育三烯酚)		
δ -生育酚(δ -T)	δ -生育三烯酚(δ -T3)	H	H
(8-甲基生育酚)	(8-甲基生育三烯酚)		

维生素 E 结构式

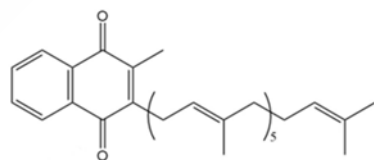
维生素 K 是具有异戊二烯类侧链的萘醌类化合物，包含维生素 K1、维生素 K2、维生素 K3 和维生素 K4 四种。其中，维生素 K1 和维生素 K2 是天然存在的，而维生素 K3 和 K4 属于人工合成产物。维生素 K 又叫凝血维生素，其具有防止新生婴儿出血疾病、预防内出血及痔疮、减少生理期大量出血、促进血液正常凝固等作用。



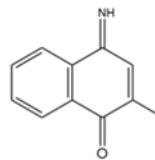
维生素K₁



维生素K₃



维生素K₂



维生素K₄

维生素 K 结构式

2 脂溶性维生素检测标准

脂溶性维生素在维持人体健康方面起着非常重要的作用，人体主要通过食物来获取足够的脂溶性维生素，当严重缺乏该类物质时，也会通过服用对应的药物来快速补充。因此，食品和药品中脂溶性维生素的检测是最为常见的脂溶性维生素检测项目。

目前，各检测机构通常是依据食品安全国家标准或者药典中的相关规定来进行此类检测。现行的食品安全国家标准和现行《中国药典》中涉及脂溶性维生素含量测定的方法分别如表 1 和表 2 所示。

表 1. 食品安全国家标准方法

No.	标准名称	标准号	检测方法/目标物	适用基质
1	食品中维生素 ADE 的测定	GB 5009.82-2016	第一法 食品中维生素 A 和维生素 E 的测定 反相高效液相色谱法	食品
2	食品中维生素 ADE 的测定	GB 5009.82-2016	第二法 食品中维生素 E 的测定 正相高效液相色谱法	食用油、坚果、豆类和辣椒粉等食物
3	食品中维生素 D 的测定	GB 5009.296-2023	第一法 正相色谱净化-反相色谱法	食品
4	食品中维生素 D 的测定	GB 5009.296-2023	第二法 在线柱切换-反相色谱法	食品
5	食品中维生素 D 的测定	GB 5009.296-2023	第三法 液相色谱-串联质谱法	食品
6	食品中维生素 K1 的测定	GB5009.158-2016	第一法 高效液相色谱-荧光检测法	配方食品、植物油、水果和蔬菜
7	食品中维生素 K1 的测定	GB5009.158-2016	第二法 液相色谱-串联质谱法	配方食品、植物油、水果和蔬菜
8	食品中维生素 K2 的测定	GB5009.290-2023	高效液相色谱-荧光检测法	乳及乳制品、特殊膳食食品、发酵豆制品、肉及肉制品

表 2. 药典标准方法

No.	方法名称	检测方法/目标物	适用品种
1	0721 维生素 A 测定法	第一法 紫外-可见分光光度法	原料药及其制剂
2	0721 维生素 A 测定法	第二法 高效液相色谱法	维生素 A 醋酸酯原料及其制剂
3	0722 维生素 D 测定法	第一法 正相液相色谱法	原料药及注射液
4	0722 维生素 D 测定法	第二法和第三法 反相色谱净化-正相液相色谱法	滴剂和软胶囊
4	0722 维生素 D 测定法	第四法 二维正相液相色谱法	滴剂和软胶囊
5	0521 气相色谱法	维生素 E	原料药及其制剂
6	0512 高效液相色谱法	维生素 K1	原料药及其制剂

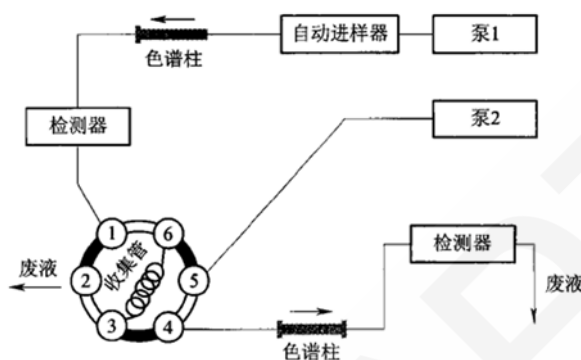
由以上表格可知，食品安全国家标准和中国药典关于脂溶性维生素含量测定的推荐方法，主要有高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法、气相色谱法和紫外-可见分光光度法。

高效液相色谱法是最常用的方法，尤其是食品这类基质比较复杂的样品，样品经过提取和净化（可除掉大部分基质）后，利用液相色谱的分离能力将目标物与干扰物质分开，再选择合适的检测器（紫外检测器、荧光检测器或者质谱检测器）检测其响应。

3 多维液相色谱用于维生素 ADE 检测

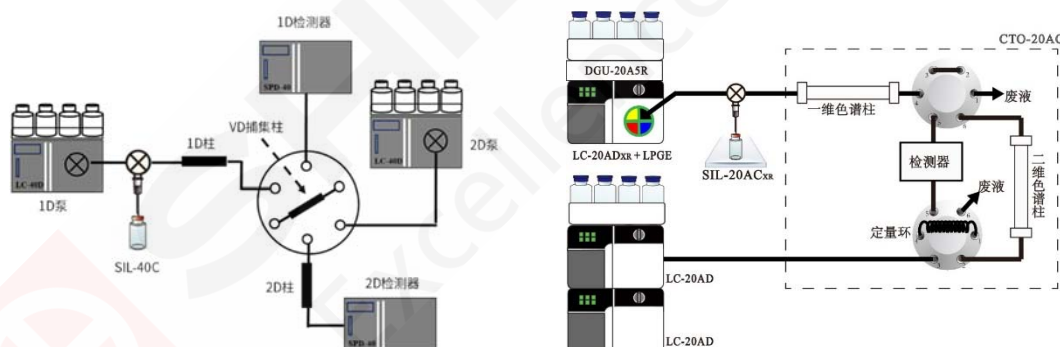
高效液相色谱可分为常规液相色谱和多维液相色谱，常规液相色谱分析基质比较复杂的食物或药品时，可能会有以下不便：（1）样品基质复杂，前处理过程较为繁琐且费时；（2）有时需要同时分析样品（如婴幼儿配方奶粉）中的维生素 ADE，而常规液相色谱方法无法满足。

针对第（1）个问题，可以使用二维液相色谱来解决，如现行《中国药典》通则“0722 维生素 D 测定法”推荐的第四法，其在分析“存在维生素 A 醇和其他成分干扰的供试品”（如维生素 AD 滴剂和软胶囊）时，样品仅需要溶解定容即可进样分析。



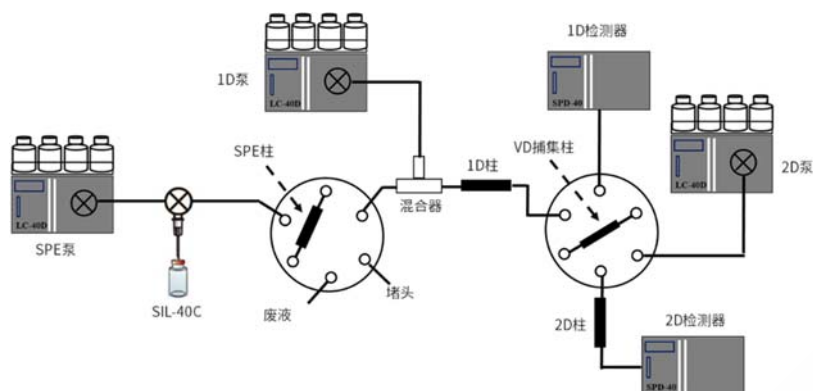
0722 维生素 D 测定法第四法推荐的二维液相色谱

而对于第（2）个问题，也可以使用二维液相色谱来解决，如后文部分介绍了两种可同时分析食品中维生素 ADE 的二维液相色谱系统，其工作原理均是利用 1D 分析柱将 VA、VE 和 VD（包含同时出峰的 VD2 和 VD3）分离后，使用捕集柱或 LOOP 环捕集 VD，再将其导入 2D 分析柱完成 VD2 和 VD3 的分离。



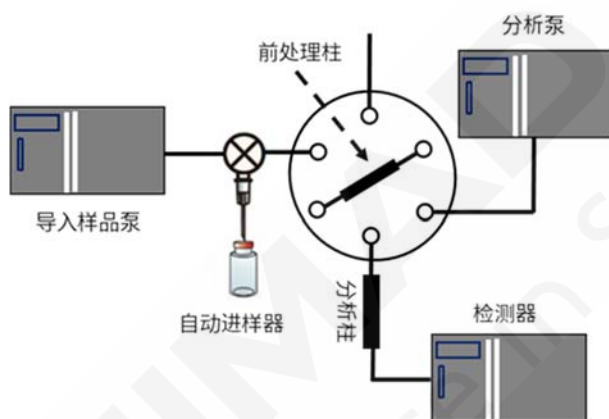
可同时检测维生素 ADE 的两种二维液相色谱

岛津开发的 OS-2DLC 系统，在二维液相色谱的基础上增加了在线 SPE 功能（可视为三维液相色谱），配方奶粉等样品皂化之后，不需要再做提取和净化等前处理，即可直接进样分析，极大的简化了前处理步骤，并可同时分析维生素 ADE，使得分析效率大大提高。目前，该系统已获得专利授权，专利名称：《一种三重四元梯度液相色谱系统》，专利号：ZL 202420207080.7。



OS-2DLC

此外, 岛津在线 SPE-液相色谱联用系统(Co-Sense for BA), 可利用在线 SPE 去除血液等样品中的蛋白, 实现蛋白沉淀等样品前处理步骤的自动化, 可以快速检测血清等生物样品中的维生素 A 等脂溶性维生素。



Co-Sense for BA 系统

本文集收录了岛津使用高效液相色谱（包括常规液相色谱和多维液相色谱）检测不同样品中脂溶性维生素的方法, 读者可根据自身需要和实验条件选择对应方法, 以便更好开展相关检测。

参考文献

- [1] 王琼杰等. 日常膳食营养的必须物质-脂溶性维生素[J]. 现代养生, 2014 (18): 298
- [2] 张博等. 脂溶性维生素的生物合成[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2552-2569

第 2 章 高效液相色谱检测脂溶性维生素解决方案

脂溶性维生素在维持人体健康方面起着非常重要的作用，人体主要通过食物来获取足够的脂溶性维生素，当严重缺乏该类物质时，也会通过服用对应的药物来快速补充。

常见的脂溶性维生素检测领域主要包括：（1）食品，通过检测乳制品、食用油等样品中的脂溶性维生素含量，以评估食品的营养价值和品质；（2）药品，检测药物中脂溶性维生素的含量是否符合标准；（3）生物样品，检测血液等样品中的脂溶性维生素或其代谢物含量，辅助诊断维生素缺乏症或过量中毒等。

高效液相色谱是检测脂溶性维生素最常用的方法，样品经过提取和净化（可除掉大部分基质）后，利用液相色谱的分离能力将目标物与干扰物质分开，再选择合适的检测器（紫外检测器、荧光检测器或者质谱检测器）采集信号得到色谱图，进行定性和定量分析。

高效液相色谱仪器主要构成部分包括：高压输液泵、混合器、脱气机、进样器、色谱柱、柱温箱和数据处理系统等。高效液相色谱可分为常规液相色谱和多维液相色谱，常规液相色谱通常使用一根色谱柱，即在一次进样过程中，样品仅经过一根色谱柱的分离。而多维液相色谱则使用两根或更多根色谱柱（包括在线 SPE 柱和捕集柱），这些色谱柱通过六通阀或十通阀和管路连接起来，在一次进样过程中，可使样品经过多次分离，从而起到简化样品前处理或多种脂溶性维生素同时分析的目的。

本解决方案收录的应用报告中，使用的仪器既有常规液相色谱，也有多维液相色谱，涉及到的样品既有乳制品、食用油等食品，也有药品和生物制品，具体内容将在后文一一展示。

2.1 常规液相色谱方法

本节展示的报告均是参照相关标准，使用常规液相色谱检测脂溶性维生素的方法，涉及到的样品包括食品和药品。具体包括：

(1) 参照拟代替 GB 5009.82-2016 第一法和第二法的新国标《食品中维生素 A 和 E 的测定（征求意见稿）》，液相色谱法检测婴幼儿配方奶粉中的 VA 和 VE 的 5 种异构体含量；

(2) 参照 GB 5009.82-2016 《食品中维生素 A、D、E 的测定》第二法，正相液相色谱法测定植物油中 4 种生育酚(VE)含量；

(3) 参照现行《中国药典》中“0512 高效液相色谱法”，检测维生素 K1 原料药中维生素 K1 及顺式异构体的含量；

(4) 参照 GB 5009.290-2023 《食品中维生素 K2 的测定》，液相色谱法测定食品中维生素 K2 的含量。



岛津高效液相色谱仪 Nexera LC-40

高效液相色谱法检测婴幼儿配方奶粉中 VA 和 VE

摘要： 本文使用岛津高效液相色谱仪开发并验证了一种高效、稳定的方法，用于分析婴幼儿配方奶粉中维生素 A 和维生素 E 的 5 种异构体（ α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚、 δ -生育酚、 α -生育三烯酚）。婴幼儿配方奶粉样品进行皂化处理，使用 SHIMSEN Styra HLB 柱进行净化后上机分析。结果表明：各组分在线性关系良好，重现性好，回收率高，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： HPLC 婴幼儿奶粉 维生素

技术特点：

- ❖ 优化了前处理，过程更高效，回收率更高。
- ❖ Shim-pack Velox PFPP 具有背压低，柱效高的特点，对异构体具有更好的分离效果，无需柱温箱冷却（25°C）即可完成包括 VE 异构体的目标物分离。

脂溶性维生素 A 和 E 对人体健康发挥着重要作用：维生素 A 有促进生长、繁殖，维持骨骼、上皮组织、视力和粘膜上皮正常分泌等多种生理功能；维生素 E 具有延缓衰老、抗氧化、预防多种慢性疾病等作用。因此在食品行业中，尤其是婴幼儿奶粉中添加维生素 A、E 具有重要意义，但过量服用也会引发疾病。因此，出于安全考虑，准确定量婴幼儿配方奶粉中的维生素 A 和 E 含量至关重要。

婴幼儿配方奶粉中添加的维生素 A 和 E 最常见形式是视黄醇醋酸酯、视黄醇棕榈酸酯和 α -生育酚醋酸酯，样品可通过皂化反应将所有酯转化为醇，对其总量进行测定。基于婴幼儿奶粉基质组成复杂，脂肪含量高，维生素 A 和 E 的添加浓度较高，前

处理通过固相萃取小柱进行净化，采用配备紫外检测器的 HPLC 可以进行分析。

本文参照新版国标《食品中维生素 A 和 E 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 萃取小柱对皂化液进行净化，通过 HPLC-SPD 对维生素 A 和 E 进行定量分析。结果表明，维生素 A 和维生素 E 的异构体均有效分离，无杂质干扰，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 A 和 E 定量分析。

1. 实验部分

1.1 试剂与标准品信息

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。

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（亲水亲脂共平衡小柱）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，并用甲醇/水（80/20）混合溶液洗去疏水性干扰物。样品净化后，用于 HPLC 分析。

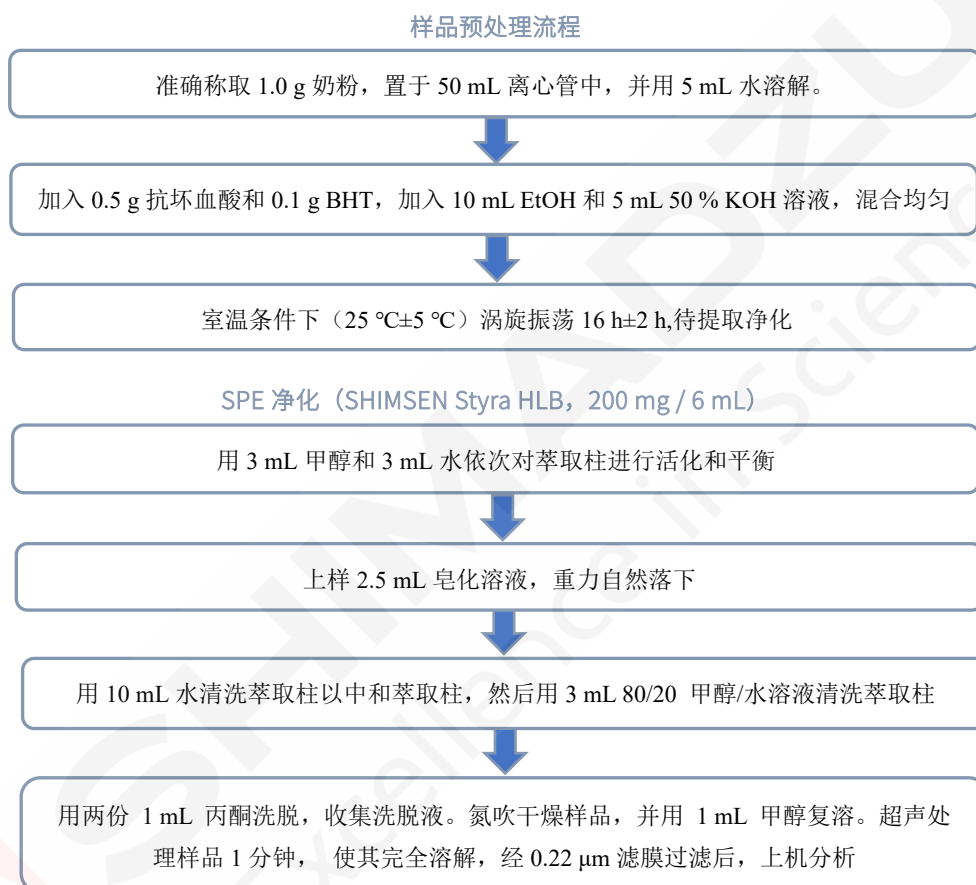


图 1. 样品前处理流程图

2. 结果与讨论

2.1 色谱柱的选择

新版维生素 A 和 E 测定标准中采用的色谱柱类型为 C30 (150 mm x 4.6 mm I.D., 3 μm)，此类型色谱柱可以有效分离维生素 E 异构体，检测过程中需注意：1、分析时间略长 (>40min)；2、柱温 25°C，柱温高于 25°C 会导致 D-β-生育酚、D-γ-生育酚不能有效分离，所以液相设备需要采用制冷型柱温箱。

本方案采用了 Shim-pack Velox PFPP (250 mm x 4.6 mm I.D., 2.7 μm) 色谱柱，常规柱温即可满足维生素 E 异构体的分离，且可以缩短分析时长。

2.2 标准溶液色谱图

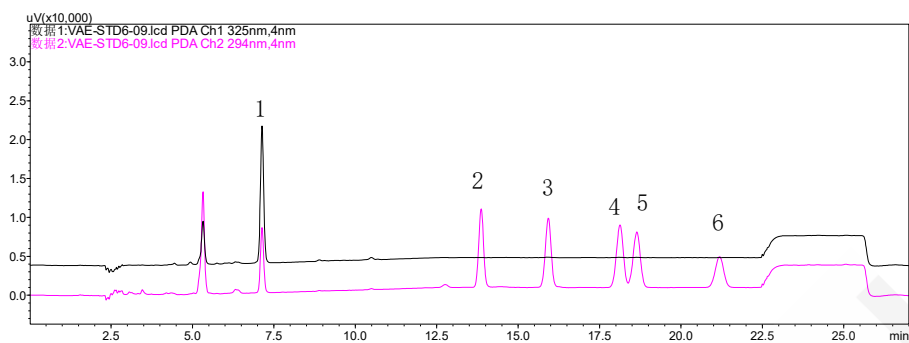


图 2. VA (325 nm、2 $\mu\text{g/mL}$)、VE(294 nm、10 $\mu\text{g/mL}$) HPLC 色谱图

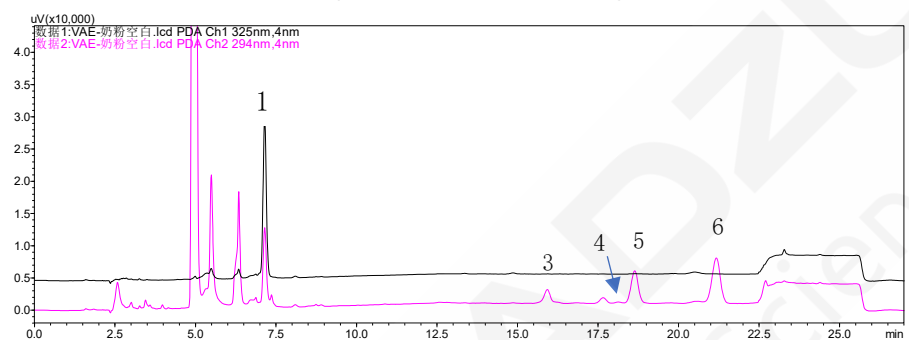


图 3. 婴幼儿配方奶粉基质色谱图

注：1. 维生素 A；2. α -生育三烯醇；3. D- δ -生育酚；4. D- β -生育酚；5. D- γ -生育酚；6. D- α -生育酚

2.3 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，5 种组分线性良好，相关系数均大于 0.995。以校准曲线浓度最低点使用 10 倍信噪比的方式计算检出限，定量限为 0.01~0.14 $\mu\text{g/mL}$ 。

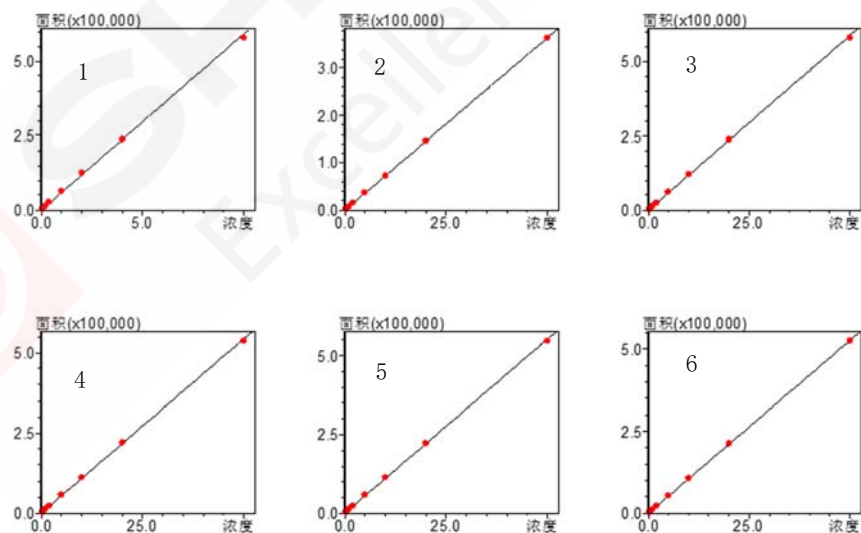


图 4 维生素 A 和 E 6 种组分校准曲线

表 3. 维生素 AE 校准曲线

序号	化合物	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	准确度 (%)	相关系数 r	定量限 ($\mu\text{g/mL}$)
1	维生素 A	0.02~10	93.3~104.8	0.9990	0.01
2	D- α -生育酚	0.2~50	93.1~105.4	0.9999	0.14
3	D- β -生育酚	0.2~50	88.8~105.3	0.9998	0.07
4	D- γ -生育酚	0.2~50	91.6~105.5	0.9997	0.06
5	D- δ -生育酚	0.2~50	89.0~104.0	0.9998	0.05
6	D- α -生育三烯醇	0.2~50	98.9~101.1	0.9999	0.05

2.4 重复性

对混合标准溶液连续分析 6 次, 计算重复性。结果见表 4。结果表明: 各组分保留时间的 RSD% 在 0.03%~0.06% 之间, 峰面积的 RSD% 在 1.68%~3.91% 之间, 方法重复性良好, 仪器精密度良好。

表 4. 重复性结果 (n=6)

序号	化合物	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
1	维生素 A	0.1	0.03	1.68
2	D- α -生育酚	0.5	0.06	3.91
3	D- β -生育酚	0.5	0.06	3.78
4	D- γ -生育酚	0.5	0.06	2.91
5	D- δ -生育酚	0.5	0.05	1.88
6	D- α -生育三烯醇	0.5	0.03	3.62

2.5 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, 对实际样品进行测试, 以评估准确度, 结果如表 5 所示。

向样品中添加一定浓度的目标物, 制备出两个水平的加标样品, 每个水平重复 3 次, 进行加标回收率和精密度试验。表 5 为实验结果, 平均回收率为 83.0%~108.4%, 相对标准偏差为 0.36%~3.38%。

表 5. 奶粉样品加标实验结果 (n=6)

No.	化合物名称	样品浓度 (mg/100g)	加标 1			加标 2		
			加标量 (mg/100g)	回收 率%	RSD %	加标量 (mg/100g)	回收 率%	RSD %
1	维生素 A	0.77	1.0	96.5	0.36	2.0	89.7	0.84
2	D- α -生育酚	14.86	10.0	108.4	1.18	20.0	83.0	1.78
3	D- β -生育酚	0.23	10.0	100.1	3.38	20.0	90.5	1.64
4	D- γ -生育酚	2.60	--	--	--	--	--	--
5	D- δ -生育酚	0.24	--	--	--	--	--	--
6	D- α -生育三烯醇	N.D.	10.0	101.8	1.68	20.0	86.4	0.56

注: 1、加标 1 中加标浓度根据奶粉基质中标识的浓度进行添加, 加标 2 中为奶粉基质中标识浓度的两倍

2、“N.D.”表示未检出; “--”表示加标实验中未添加该目标物。

3. 结论

本文参照新版国标《食品中维生素 A 和 E 的测定》（征求意见稿）建立了一种用于婴幼儿奶粉中维生素 A 和 E 测定的高效、稳定的液相色谱方法。方法验证表明该方法具有出色的回收率(>80%)和精密度 (RSD < 5%)，适用于婴幼儿奶粉中维生素 A 和 E 的定量分析。



正相高效液相色谱法测定植物油中维生素 E 的含量

摘要: 本文利用岛津高效液相色谱仪,建立了食用油中维生素 E 的含量的正相高效液相色谱法。本方法参照《食品安全国家标准 食品中维生素 A、D、E 的测定》(GB 5009.82-2016) 中第二法 食品中维生素 E 的测定 正相高效液相色谱法,酰胺基色谱柱(150 mm × 3.0 mm, I.D. 1.7 μm) 为分离色谱柱,采用荧光检测器进行检测,以外标法定量。与反相高效液相色谱法相比,该方法样品前处理操作简单,重复性好,满足相关标准的要求,可用于食用油中维生素 E 含量的检测。

关键词: 食用油 维生素E 正相高效液相色谱

技术特点:

- ❖ 该方法稳定性高,重复性好,实现维生素E四种异构体的有效分离。
- ❖ 灵敏度高,相较于标准中 10 μL 的进样体积,本方案仅需进样 1 μL 即可满足标准要求。

维生素 E 又称生育酚 (Tocopherol), 是一类具有生物活性的、化学结构相似的酚类化合物的总称。自然界中已知的维生素 E 有 8 种,分别为两类维生素 E 的四种即 α、β、γ、δ 类似物,主要是根据苯并一氢吡喃上甲基取代物所在的位置和数量来划分的,其中 α-生育酚含量最高,生理活性也最高。

天然的维生素 E 广泛存在于广泛存在于植物的绿色部分以及禾本科种子的胚芽里,尤其在植物油中含量丰富,具有改善脂质代谢、预防动脉粥样硬化、抗衰老和抗癌等功能。食用植物油是居民摄入生育酚的重要来源。油料和食用油中生育酚的分析

方法主要包括高效液相色谱法、气相色谱法、薄层色谱法、比色法、电化学测定法、色谱质谱联用法等。在以上方法中,液相色谱法作为国家标准方法应用范围最广,主要包括正相液相色谱法和反向液相色谱法。其中,正相液相色谱法操作简单,仅需提取油脂后正己烷溶解过膜后即可上机检测。

本方法参照《食品安全国家标准 食品中维生素 A、D、E 的测定》(GB 5009.82-2016) 中第二法 食品中维生素 E 的测定 正相高效液相色谱法,建立了食用油中维生素 E 的相关分析方法。

1. 实验部分

1.1 仪器

本文使用岛津 LC-20A 液相色谱仪,配置信息如下:

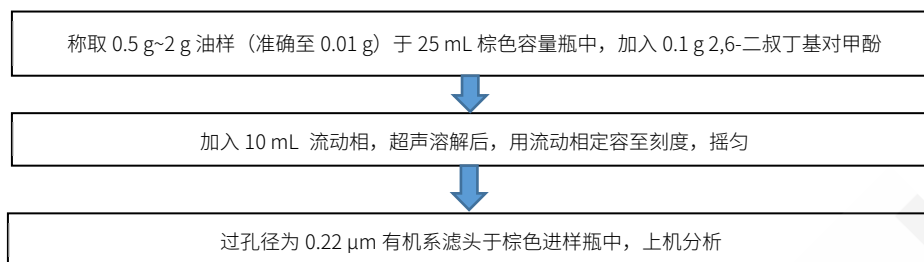
系统控制器 :	CBM-20Alite	自动进样器 :	SIL-20A
输液泵 A、B :	LC-20AT	柱温箱 :	CTO-20A
检测器 :	RF-20A	工作站 :	LabSolutions Version 5.111

1.2 分析条件

色谱柱 :	酰胺基色谱柱(150 mm × 3.0 mm I.D., 1.7 μm)		
流动相 :	A: 正己烷; B: 叔丁基甲基醚-四氢呋喃-甲醇混合液 (20/1/0.1, v/v/v)		
柱温 :	40°C	流速 :	0.5 mL/min
洗脱方式 :	等度洗脱, B 相比例 10%	进样体积 :	1 μL
分析时间 :	30 min	波长 :	Ex-294 nm, Em-328 nm

1.3 样品前处理

按照下图所示流程进行样品前处理。



2.结果讨论

2.1 标准色谱图

维生素 E 标准溶液色谱图见图 1, 化合物信息见表 1。

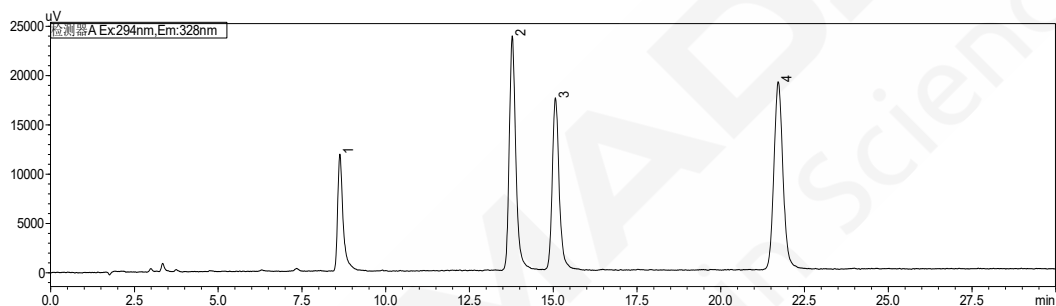


图 1. 维生素 E 标准溶液色谱图 (1.00 μg/mL)

表 1. 化合物信息

No.	化合物	英文名称	CAS 号	保留时间(min)
1	α-生育酚	Alpha-tocopherol	10191-41-0	8.631
2	β-生育酚	Beta-tocopherol	148-03-8	13.777
3	γ-生育酚	Gamma-tocopherol	54-28-4	15.064
4	δ-生育酚	Delta-tocopherol	119-13-1	21.715

2.2 校准曲线和检出限

按照标准配置标准溶液, 该标准系列中 4 种生育酚浓度分别为 0.20 μg/mL、0.50 μg/mL、1.00 μg/mL、2.00 μg/mL、4.00 μg/mL、6.00 μg/mL。本法采用外标法定量, 以峰面积为纵坐标, 标准溶液浓度为横坐标绘制校准曲线, 计算直线回归方程。以 0.20 μg/mL 标准溶液计算 4 种维生素 E (α-生育酚、β-生育酚、γ-生育酚、δ-生育酚) 的检出限, 按照 3.3 倍噪声计算, 4 种维生素 E 仪器检出限为 0.01~0.03 μg/mL, 结果见表 2, 优于标准要求。

表2. 线性方程、相关系数及检出限

No.	化合物	线性方程	相关系数	准确度 (%)	仪器检出限($\mu\text{g/mL}$)
1	α -生育酚	$Y = (159701)X + (-16487.5)$	0.9974	92.0-108	0.03
2	β -生育酚	$Y = (342154)X + (-11729.9)$	0.9996	97.3-103.5	0.01
3	γ -生育酚	$Y = (253004)X + (-28668.83)$	0.9996	96.8-102.9	0.01
4	δ -生育酚	$Y = (388242)X + (-9734.30)$	0.9981	93.8-107.7	0.01

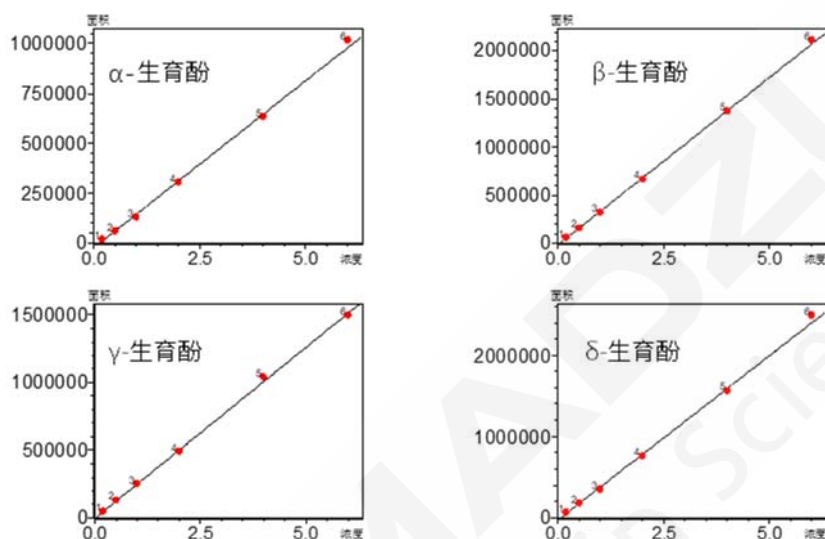


图 2. 4 种维生素 E 校准曲线

2.3 重复性实验

取4种维生素E浓度分别为3.00 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液平行测定6次，考察方法的精密度。结果表明保留时间RSD在0.14%~0.16%之间，峰面积RSD在2.01%~2.86%之间。结果如下表3所示。

表3. 重复性实验结果 (n=6)

No.	α -生育酚		β -生育酚		γ -生育酚		δ -生育酚	
	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积
1	8.637	480893	13.808	1029103	15.096	745,622	21.762	1188608
2	8.650	490927	13.826	1030636	15.116	735,325	21.782	1197898
3	8.644	491661	13.820	1053491	15.112	760,098	21.791	1217714
4	8.619	506676	13.783	1069419	15.071	760,388	21.721	1220261
5	8.624	515808	13.781	1099263	15.067	780,264	21.710	1244455
6	8.629	510151	13.801	1094086	15.089	774,805	21.770	1250418
平均值	8.634	499353	13.803	1062667	15.092	759,417	21.756	1219892
RSD(%)	0.14	2.71	0.14	2.86	0.14	2.24	0.16	2.01

2.4 实际样品中生育酚的含量及组成

分别称取紫苏油毛油和小麦胚芽油毛油按照样品前处理步骤进行样品前处理取后进行分析。紫苏油毛油、小麦胚芽油毛油中4种维生素E含量如表4所示。

表4. 实际样品中生育酚的含量及组成 单位: mg/100 g

样品	生育酚含量				生育酚总含量
	α -生育酚	β -生育酚	γ -生育酚	δ -生育酚	
紫苏油毛油	1.72	0.32	48.2	1.00	51.24
小麦胚芽油毛油	222.7	95.1	3.97	0.29	322.06

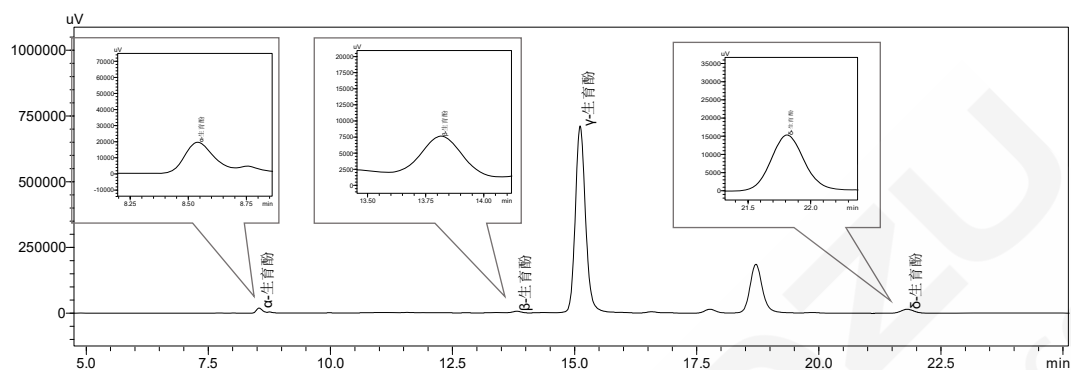


图 3. 紫苏油毛油样品色谱图

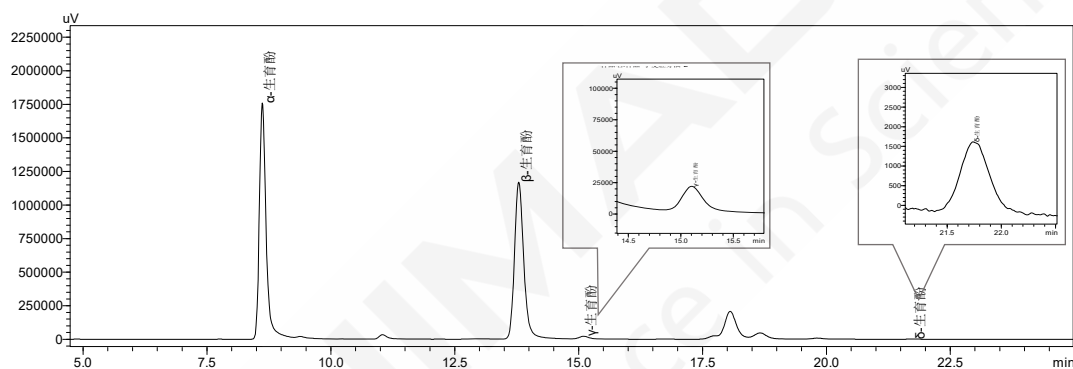


图 4. 小麦胚芽油毛油样品色谱图

3. 结论

本文参考《食品安全国家标准 食品中维生素A、D、E的测定》(GB 5009.82-2016)中第二法 食品中维生素E的测定 正相高效液相色谱法,建立了一种测定食用油中维生素E的检测方法。该方法检测灵敏度高,重复性好,该方法满足标准要求,可供相关行业参考。

高效液相色谱法测定原料药中维生素 K₁ 及顺式异构体的含量

摘要: 本文利用岛津高效液相色谱仪, 建立了一种维生素 K₁ 原料药中维生素 K₁ 顺式异构体含量的正相高效液相色谱法。本方法参照《中国药典》中维生素 K₁ 的含量测定方法, 使用硅胶柱为分离色谱柱, 体积比 2000:1.5 的石油醚 (沸程 60 °C~90 °C) 正戊醇为流动相, 等度洗脱, 用紫外检测器在 254 nm 处进行检测, 按内标法以顺、反式异构体峰面积的和计算维生素 K₁ 含量; 按峰面积归一化法计算维生素 K₁ 顺式异构体含量。该分析方法操作简单, 重复性好, 满足相关标准的要求, 可用于维生素 K₁ 原料药中维生素 K₁ 及顺式异构体含量的检测。

关键词: 正相 高效液相色谱 维生素K₁ 异构体

技术特点:

- ❖ 满足《中国药典》中维生素 K₁ 的含量测定方法的相关要求。
- ❖ 操作简单, 重复性好。

维生素 K₁ 属维生素类药物, 是肝脏合成因子 II、VII、IX、X 所必须的物质, 主要用于各种维生素 K 缺乏引起的出血性疾病的治疗。维生素 K₁, 又名植物甲萘醌、叶绿基甲萘醌、叶绿醌, 化学名称为 2-甲基-3-(3,7,11,15-四甲基-2-十六碳烯基)-1,4-萘二酮, 其分子侧链上有一个双键, 因而存在顺反异构体。天然维生素 K₁ 是 2,3-反式构型, 化学合成品多为顺式和反式异构体的混合物, 而顺式异构体几乎没有

生理活性。因此 20 世纪 80 年代以后, 各国药典均对维生素 K₁ 的顺式异构体规定了限量 (顺式异构体 ≤21%)。

本方法参照《中国药典》中维生素 K₁ 的含量测定方法, 建立了相关分析方法。该分析方法操作简单, 重复性好, 满足相关标准的要求, 可用于维生素 K₁ 原料药中维生素 K₁ 及顺式异构体含量的检测。

1. 实验部分

1.1 仪器

本文使用岛津 LC-16 液相色谱仪, 配置信息如下:

系统控制器:	CBM-20Alite	输液泵:	LC-16
自动进样器:	SIL-16	柱温箱:	CTO-16L
脱气机:	DGU-20A	检测器:	SPD-16

1.2 分析条件

色谱柱:	硅胶色谱柱, 250 mm × 4.6 mmID., 5 μm	流速:	1.0 mL/min
流动相:	石油醚 (沸程 60 °C~90 °C) : 正戊醇=2000:1.5 (V/V)	进样体积:	10 μL
柱温:	40°C	检测波长:	254 nm
洗脱方式:	等度洗脱		
分析时间:	20 min		

1.3 溶液配制

1.3.1 试剂

正戊醇，色谱纯；石油醚（沸程 60 °C~90 °C），色谱纯；维生素 K₁对照品，99.7%；内标苯甲酸胆甾酯；维生素 K₁原料药，某实验室合成产品。

1.3.2 内标溶液、供试品溶液、对照品溶液的配制

按照中国药典维生素 K₁ 项目下含量测定中内标溶液、供试品溶液、对照品溶液的配制要求进行溶液配制，得到内标溶液： $\rho_{\text{苯甲酸胆甾酯}} = 1.5176 \text{ mg/mL}$ ；供试品溶液： $\rho_{\text{供试品}} = 200.8 \text{ mg/L}$ ， $\rho_{\text{苯甲酸胆甾酯}} = 151.76 \text{ mg/L}$ ；对照品溶液： $\rho_{\text{维生素 K}_1} = 207.53 \text{ mg/L}$ ， $\rho_{\text{苯甲酸胆甾酯}} = 151.76 \text{ mg/L}$ 。

2.结果讨论

2.1 色谱图结果

维生素 K₁ 对照品溶液及供试品溶液色谱图见图 1，化合物信息见表 1。

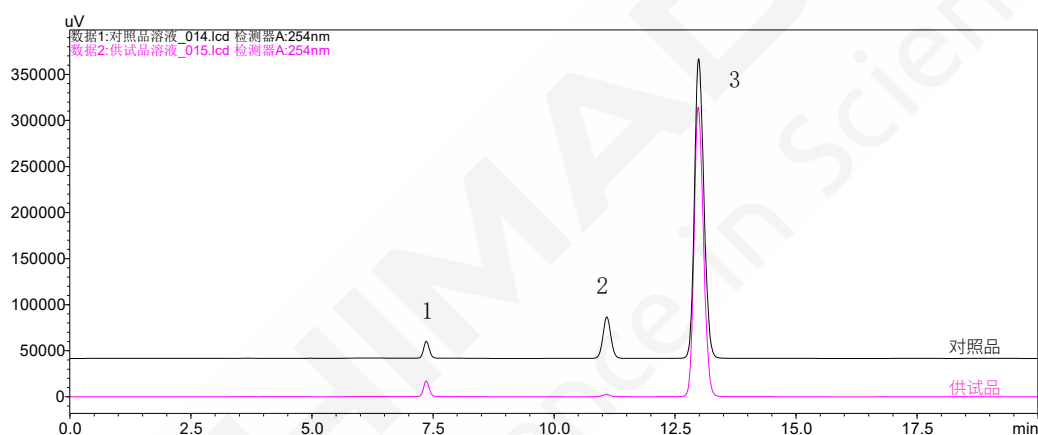


图 1. 对照品溶液及供试品溶液色谱图

表 1. 化合物信息

No.	化合物	英文名称	CAS 号	保留时间(min)
1	内标苯甲酸胆甾酯	Cholesteryl benzoate	604-32-0	7.362
2	维生素 K ₁ 顺式异构体	cis-Vitamin K ₁	16033-41-3	11.090
3	维生素 K ₁ 反式异构体	Vitamin K ₁	84-80-0	12.987

2.2 重复性实验

将对照品溶液进样6次，考察方法的精密度，对照品溶液的重复性结果如表2所示。结果表明：对照品溶液中内标和目标物的保留时间重复性RSD均小于0.2%，峰面积重复性RSD小于1.5%。

表2. 对照品溶液重复性实验结果 (n=6)

No.	内标苯甲酸胆甾酯		维生素 K ₁ 顺式异构体		维生素 K ₁ 反式异构体	
	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积
1	7.390	145975	11.138	502695	13.045	4289086
2	7.379	146548	11.118	504559	13.019	4305423
3	7.373	147153	11.110	506552	13.011	4322623
4	7.370	147779	11.104	508927	13.003	4341533
5	7.365	148343	11.097	510848	12.995	4358022
6	7.362	149003	11.090	513193	12.987	4376883
平均值	7.373	147467	11.109	507796	13.010	4332262
RSD (%)	0.140	0.767	0.153	0.777	0.159	0.760

2.3 供试品中维生素 K₁ 和顺式异构体含量的计算

将供试品溶液进样6次, 按照方法要求计算供试品中维生素K₁及顺式异构体含量, 各组分色谱峰的保留时间和峰面积结果见表3, 维生素K₁及维生素K₁的顺式异构体含量见表4。

表3. 供试品溶液重复性实验结果 (n=6)

No.	内标苯甲酸胆甾酯		维生素 K ₁ 顺式异构体		维生素 K ₁ 反式异构体	
	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积
1	7.360	136771	11.084	28214	12.979	4208001
2	7.356	137051	11.075	28266	12.968	4214464
3	7.351	137684	11.065	28606	12.954	4234241
4	7.354	138516	11.071	28735	12.963	4257517
5	7.357	139021	11.076	29049	12.968	4278806
6	7.361	140028	11.084	29269	12.978	4305937
平均值	7.357	138178	11.076	28690	12.968	4249828
RSD (%)	0.049	0.900	0.066	1.462	0.071	0.898

表4. 供试品维生素K₁及维生素K₁的顺式异构体含量结果

含量	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD (%)
VK ₁ (%)	97.53	97.48	97.49	97.44	97.57	97.49	97.5	0.042
VK ₁ 顺式异构体 (%)	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.68	0.67	0.555

3. 结论

本文利用岛津LC-16高效液相色谱仪, 建立了一种维生素K₁原料药中维生素K₁及其顺式异构体含量的正相高效液相色谱法。其中对照品溶液和供试品溶液各分析6次, 对照品溶液和供试品溶液的内标苯甲酸胆甾酯、维生素K₁顺式异构体和反式异构体的分离度R均大于1.5, 保留时间重复性RSD均小于0.2%, 峰面积重复性RSD小于1.5%。该分析方法操作简单, 重复性好, 满足药典要求, 可用于维生素K₁原料药中维生素K₁含量及顺式异构体的含量的检测。

高效液相色谱法测定食品中维生素 K2 含量

摘要: 本文参照 GB 5009.290-2023《食品安全国家标准 食品中维生素 K2 的测定》，建立了食品中维生素 K2 含量测定的方法。结果表明：MK-4 和 MK-7 在 0.025~2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内，MK-9 在 0.050~2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内线性关系均良好，所得校准曲线相关系数均在 0.9993 以上，各校准点准确度在 95.72%~103.19% 之间。MK-4、MK-7 和 MK-9 保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.26%和 0.92%以内，加标回收率在 70.50%~97.93%之间。

关键词: 高效液相色谱法 食品 维生素K2

技术特色:

- ❖ 满足《食品安全国家标准 食品中维生素K2的测定》标准要求，并具更宽线性范围。
- ❖ 荧光检测器灵敏度高，进样体积10 μL 即可满足要求。

维生素K2又称甲基萘醌 (Menaquinone)，是一种脂溶性维生素，也是人体不可缺少的重要维生素之一。根据化学结构侧链的差异，有四烯甲萘醌 (MK-4, CAS号: 863-61-6)、七烯甲萘醌 (MK-7, CAS号: 2124-57-4) 和九烯甲萘醌 (MK-9, CAS号: 523-39-7) 等多种形式。在人体中，维生素K2主要由肠道细菌合成，也存在于一些动物肉制品和发酵产品中，比如动物肝脏、发酵乳制品和奶酪等。维生

素K2是维生素K唯一具有生物活性的形式，多用于加速凝血、维持凝血时间、治疗维生素K缺乏引起的出血症等。

本文采用岛津高效液相色谱仪，参照 GB 5009.290-2023《食品安全国家标准 食品中维生素 K2 的测定》，对食品中的维生素K2进行测定，本方法灵敏度高、重现性好，可为食品行业相关人员提供参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津高效液相色谱仪。配置信息如下:

系统控制器	: CBM-40lite	输液泵	: LC-40D XS
自动进样器	: SIL-40C XS	柱温箱	: CTO-40S
检测器	: RF-20A	工作站	: Labsolutions Ver. 5.106

1.2 分析条件

色谱柱	: Inertsil ODS-3 (150 mm×4.6 mm I.D., 5 μm)
还原柱	: 锌还原柱 50 mm×4.6 mm
流动相	: 甲醇溶液 (含 1.5 g/L 氯化锌+0.5 g/L 无水乙酸钠+0.03%冰乙酸+10%二氯甲烷)
波长	: 激发波长 326 nm, 发射波长 410 nm
流速	: 0.8 mL/min

进样量：10 μL

柱温：35 $^{\circ}\text{C}$

1.3 混合标准工作溶液的制备

参照 GB 5009.290-2023《食品安全国家标准 食品中维生素 K2 的测定》，采用甲醇-二氯甲烷溶液 (90:10, v:v) 将 MK-4、MK-7 和 MK-9 标准品先后溶解、稀释，然后用流动相将其混合、定容。混合标准工作溶液中各组分的浓度见表 1。

表 1. 混合标准工作溶液中各组分浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

目标物	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5	Conc.6	Conc.7
MK-4	0.025	0.05	0.10	0.30	0.50	1.0	2.0
MK-7	0.025	0.05	0.10	0.30	0.50	1.0	2.0
MK-9	0.050	0.10	0.20	0.30	0.50	1.0	2.0

2. 样品前处理

样品前处理参照 GB 5009.290-2023《食品安全国家标准 食品中维生素 K2 的测定》。

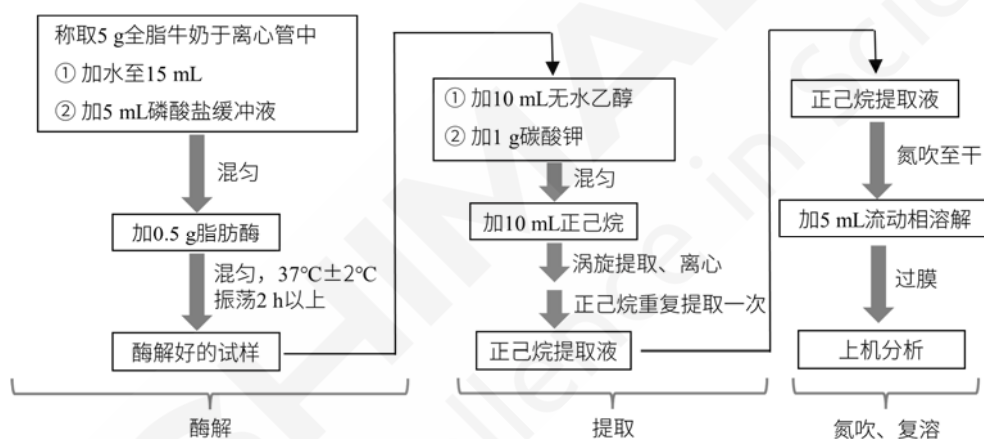


图 1. 全脂牛奶样品提取流程图

3. 结果与讨论

3.1 色谱图

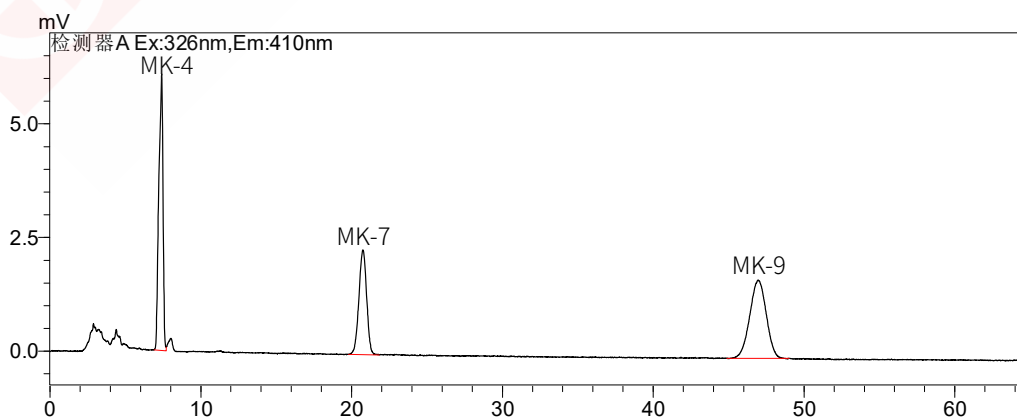


图 2. 标准溶液色谱图 (MK-4、MK-7: 0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$, MK-9: 0.050 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

3.2 校准曲线、检出限及定量限

将“1.3 混合标准工作溶液”按“1.2 分析条件”进行测定。以目标物峰面积为纵坐标，对应的浓度为横坐标，绘制校准曲线，如图3所示。所得校准曲线相关系数大于0.9993，准确度在95.72%~103.19%之间，Labsolutions软件依据信噪比自动计算检出限 (S/N=3) 及定量限 (S/N=10)。线性方程、检出限及定量限结果见表2。

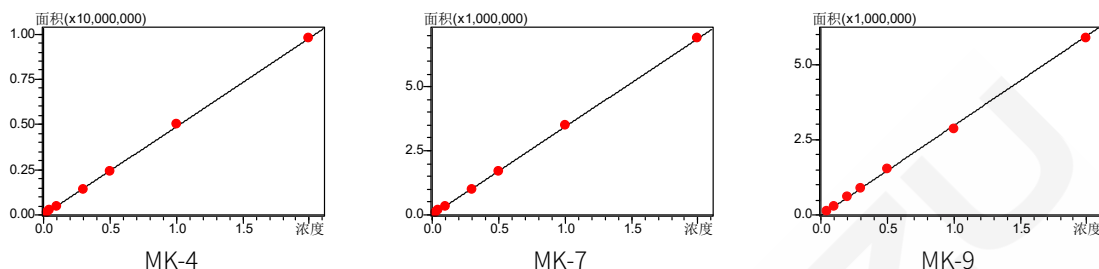


图 3. 校准曲线

表 2. 线性方程及定量限

目标物	校准曲线	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	相关系数 R	准确度%	定量限 ($\mu\text{g/mL}$)
MK-4	$Y = 4887543.66X - 4727.59$	0.025~2.0	0.9996	96.95~103.17	0.001
MK-7	$Y = 3439915.17X - 2963.75$	0.025~2.0	0.9996	96.86~103.19	0.002
MK-9	$Y = 2986670.32X - 18625.58$	0.050~2.0	0.9993	95.72~102.91	0.020

3.3 精密度结果

采用定量下限的标准工作溶液连续测定 6 次，考察仪器的精密度。结果如表 3 所示，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.26%和 0.92%以内，显示仪器精密度良好。

表 3. 精密度结果(n=6)

目标物	理论浓度($\mu\text{g/mL}$)	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)
MK-4	0.025	0.05	0.63
MK-7	0.025	0.06	0.45
MK-9	0.050	0.26	0.92

3.4 加标回收率

准确称取某品牌全脂牛奶样品 5 g，向样品中加入低、中和高三个浓度的MK-4、MK-7和MK-9的混合标准中间溶液，按照“2. 样品前处理”方法处理后上机分析，加标回收率结果见表4。结果显示：不同加标浓度下，MK-4、MK-7和MK-9的加标回收率在70.50%~97.93%之间。

表 4. 加标回收率结果 (n=3)

目标物	样品浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	添加浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	实测浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	平均回收率 (%)	RSD (%)
MK-4	<LLOQ ¹	50.00	48.96	97.93	0.14
		300.0	266.0	88.67	1.48
		500.0	404.7	80.94	0.33
MK-7	N.D. ²	50.00	40.96	81.91	0.47

		300.0	256.8	85.60	1.68
		500.0	394.1	78.82	0.35
		100.0	70.50	70.50	0.41
MK-9	N.D.	300.0	219.0	72.98	2.88
		500.0	380.3	76.06	2.00

注：1、<LLOQ 表示检出，但低于定量下限；2、N.D.表示未检出。

3.5 样品测定结果

取市售某品牌全脂牛奶样品5g，每批次6样品，按照“2. 样品前处理”方法处理及“1.2 分析条件”进行测定，样品中MK-4检出，但低于定量下限，MK-7和MK-9均未检出。

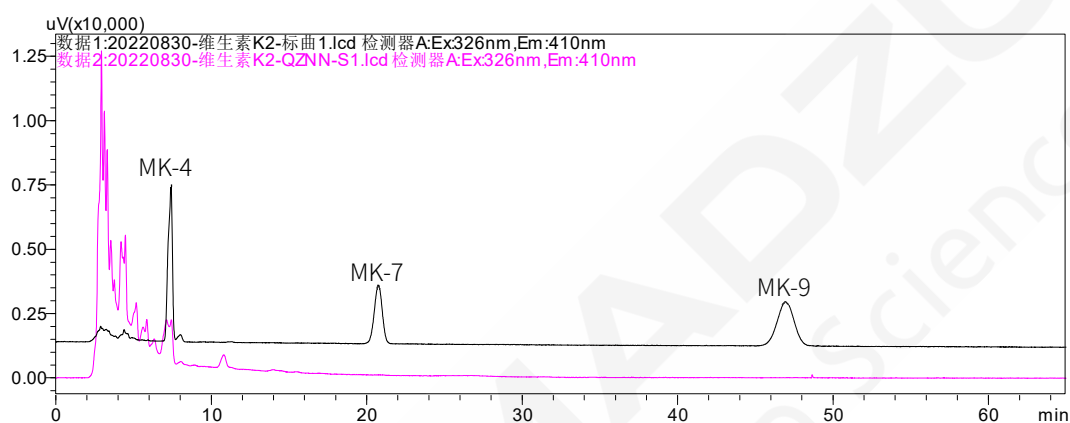


图 4. 样品色谱图

4. 结论

本应用采用岛津高效液相色谱仪，参照 GB 5009.290-2023《食品安全国家标准 食品中维生素 K2 的测定》，建立了食品中维生素 K2 含量测定的方法，本方法灵敏度较高、重现性较好，可为食品行业相关人员提供参考。

2.2 多维液相色谱方法

常规液相色谱分析基质比较复杂的食品或药品时，可能会有以下不便：（1）样品基质复杂，前处理过程较为繁琐且费时；（2）有时需要同时分析样品（如婴幼儿配方奶粉）中的维生素 ADE，而常规液相色谱方法无法满足。

针对第（1）个问题，可以使用二维液相色谱来解决，应用例包括：（1）使用现行《中国药典》通则“0722 维生素 D 测定法”推荐的第四法，分析“存在维生素 A 醇和其他成分干扰的供试品（如维生素 AD 滴剂和软胶囊）”，样品仅需要溶解定容即可进样分析；（2）使用岛津 Co-Sense for BA 系统，利用在线 SPE 自动去除血液等样品中的蛋白，快速检测血清等生物样品中的维生素 A 等脂溶性维生素。

而对于第（2）个问题，也可以使用二维液相色谱来解决，如本节后文部分介绍了两种可同时分析食品中维生素 ADE 的二维液相色谱系统，其工作原理均是利用 1D 分析柱将 VA、VE 和 VD（包含同时出峰的 VD2 和 VD3）分离后，使用捕集柱或 LOOP 环捕集 VD，再将其导入 2D 分析柱完成 VD2 和 VD3 的分离。

岛津开发的 OS-2DLC 系统，可同时解决上述两个问题，其是在二维液相色谱的基础上增加了在线 SPE 功能（可视为三维液相色谱），配方奶粉等样品皂化之后，不需要再做提取和净化等前处理，即可直接进样分析，极大的简化了前处理步骤，并可同时分析维生素 ADE，使得分析效率大大提高。目前，该系统已获得专利授权，专利名称：《一种三重四元梯度液相色谱系统》，专利号：ZL 202420207080.7。

以上示例将在本节一一展示。



岛津 OS-2DLC 系统

OS-2DLC 系统及其在维生素 ADE 分析中的应用

摘要: 本文介绍了基于岛津 LC-40 系列液相色谱搭建的多维液相色谱分析系统, 该系统可以工作在二维液相色谱(2DLC)和在线 SPE-二维液相色谱(OS-2DLC)方式下, 具体内容包括仪器构成、连接方式及工作流程、参数设置及系统验证结果等, 同时介绍了使用该分析系统进行维生素 ADE 分析的应用案例。

关键词: LC-40 在线SPE 二维液相色谱 维生素ADE

技术特点:

- ❖ 基于 LC-40 系列液相色谱而搭建, 可根据分析需求选择 2DLC 或 OS-2DLC;
- ❖ 可同时分析 VA-视黄醇、VD2 和 VD3 及 VE-生育酚的 4 种异构体;
- ❖ OS-2DLC 包含在线 SPE, 奶粉等样品的皂化液可直接大体积进样分析。

中心切割二维液相色谱(2DLC)是将第一维液相色谱和第二维液相色谱通过切换阀连接起来, 通过阀切换时间程序将一维分析时难以分离的部分切入捕集环或捕集柱进行捕集, 再导入第二维色谱柱进行二次分离, 从而得到更好的分离效果。

基质较为复杂的样品, 在进样前需要经过复杂的前处理步骤以达到除杂的目的, 以分析奶粉样品中的维生素 ADE 为例, 其前处理过程包括溶解、皂化、有机溶剂提取、吹干复溶、净化等多个步骤, 费事费力。固相萃取(SPE)是常用的样品净化的方式,

SPE 与 2DLC 在线联用的多维液相色谱系统(OS-2DLC)可以极大的简化复杂样品的前处理过程, 奶粉样品的皂化液(或不需皂化样品的提取液)直接进样, 在线自动完成 SPE 净化过程, 可极大的简化前处理步骤, 缩短前处理时间, 提高分析效率。

本文介绍了基于LC-40液相色谱搭建的中心切割二维液相色谱(2DLC)和在线SPE-中心切割二维液相色谱(OS-2DLC), 并详细介绍了仪器构成、连接方式及工作流程、参数设置及系统验证结果等。

1. 在线SPE-二维液相色谱(OS-2DLC)

1.1 系统简介

OS-2DLC 硬件组成主要包括 3 个输液泵 (LC-40 系列, 均内含 LPGE, 分别用于在线 SPE、1D 和 2D 分离过程的流动相输送)、2 个二位六通阀 (其上分别装有 SPE 柱和捕集柱)、2 个 UV 或 PDA 检测器 (分别用于 1D 和 2D 检测)、柱温箱、3 个脱气机、系统控制器、管路及色谱柱等。

1.2 连接方式及工作流程

仪器的连接方式示意图如图 1 所示, 其完整的工作流程包括 SPE 上样 (图 2A)、SPE 解吸 (图 2B)、VA 分离 (图 2A)、1D 柱 VD 分离与捕集柱捕集 (图 2C)、1D 柱 VE 分离与 2D 柱 VD 分离 (图 2A), 具体连接流路如图 2 所示。整个分析过程中流路切换通过设置阀切换时间程序完成。

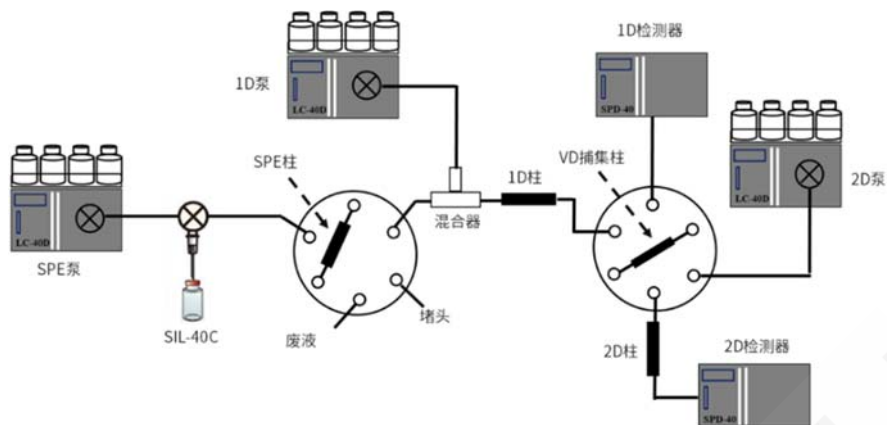


图 1. 仪器连接方式示意图

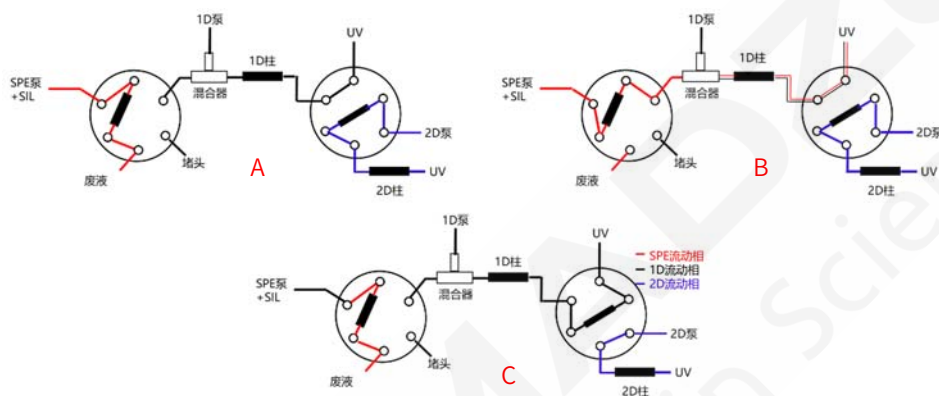


图 2. 工作流程图 (阀位: 图 A-左 0 右 0; 图 B-左 1 右 0; 图 C: 左 0 右 1)

1.3 参数设置

Nexera LC-40 系统支持四个独立的低压梯度系统协同工作，为多维多元液相色谱系统的搭建提供硬件基础。在本例中，实际使用到三路四元低压梯度系统，相关设置时，关于“泵”的部分需要注意的地方如图 3 所示：SPE 泵洗脱模式需设置为“LPGE”，1D 泵和 2D 泵洗脱模式分别为“ISO2”和“ISO3”，并选择“使用” LPGE。其他参数设置方式同常规 LC-40 液相色谱。



图 3. 泵参数设置界面

1.4 系统验证

以 7 种维生素 ADE 作为目标物对系统进行验证, 具体包括 VA-视黄醇、VD2 和 VD3 及 4 种 VE-生育酚。

选择的流动相和固定相如表 1 所示, 其中 SPE 和 1D 分离使用梯度模式, 2D 分离使用等度模式, 泵具体参数以及阀切换和波长切换时间程序分别如表 2 和表 3 所示。

表 1. 流动相和固定相

No.	名称	流动相	固定相	固定相选择理由
1	SPE	水、甲醇和异丙醇	Oasis HLB(20 × 3.9mm I.D., 15 μm)	可耐受强碱性皂化液的在线 SPE 柱
2	1D	水和甲醇	Poroshell PFP(150 × 4.6mm I.D., 4 μm)	可分离 4 种生育酚的色谱柱
3	2D	乙腈和异丙醇	捕集柱: InertSustain AQ-C18(10 × 4.0mm I.D., 5 μm) 分析柱: ShimNex S-C18-PAH(150 × 4.6mm I.D., 3 μm)	可捕集和分离 VD2 和 VD3 的色谱柱

表 2. 泵具体参数

时间 (min)	SPE 泵			1D 泵		2D 泵	
	流速 (mL/min)	B 相比例(%)	C 相比例(%)	流速 (mL/min)	B 相比例(%)	流速 (mL/min)	B 相比例(%)
Init.	1.2	60	0	1.2	45	0.3	12
1.30	1.2	60	0	1.2	45		
1.31	0.35	60	40	0.85	45		
8.00	0.35	60	40	0.85	45		
8.01	0.3	100	0	1.0	78		
9.00				1.0	82		
17.20						0.3	12
17.40						1.0	12
20.00	0.3	100	0				
20.10	0.3	60	0				
24.00				1.0	90		
24.10				1.0	100		
27.00				1.0	100		
27.10				1.2	45		
30.00	0.3	60	0	1.2	45	1.0	12

注: SPE 流动相: A, B 和 C 分别为水、甲醇和异丙醇; 1D 流动相: A 和 B 分别为水和甲醇; 2D 流动相: A 和 B 分别为乙腈和异丙醇

表 3. 阀切换和波长切换时间程序

时间 (min)	控制单元	阀 1/L	阀 2/R	1D 检测器波长 (nm)	2D 检测器波长 (nm)
Init.	阀	0	0	325	
1.31	阀	1	0	325	
8.01	阀	0	0	325	
15.00	检测器	0	0	294	264
16.40	阀	0	1	294	
17.60	阀	0	0	294	

标准溶液色谱图如图 4 所示，在选定的条件下，4 种 VE-生育酚在 1D 柱上可以实现良好分离，分离难度最高的 β -VE 和 γ -VE 的分离度大于 2；VD₂ 和 VD₃ 在 2D 柱上的分离度大于 3。

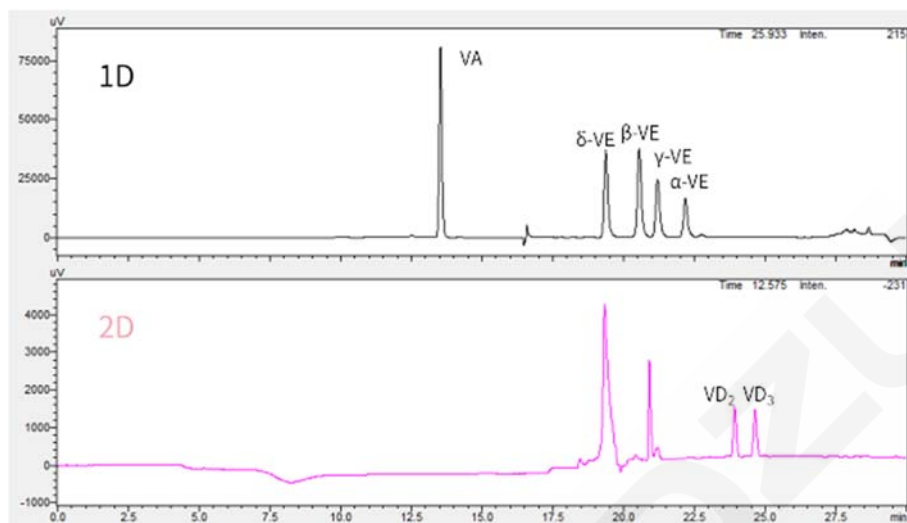


图 4. 标准溶液色谱图

目标组分的校准曲线和具体信息如图 5 和表 4 所示，7 个目标组分在各自的线性范围内，校准曲线线性良好。

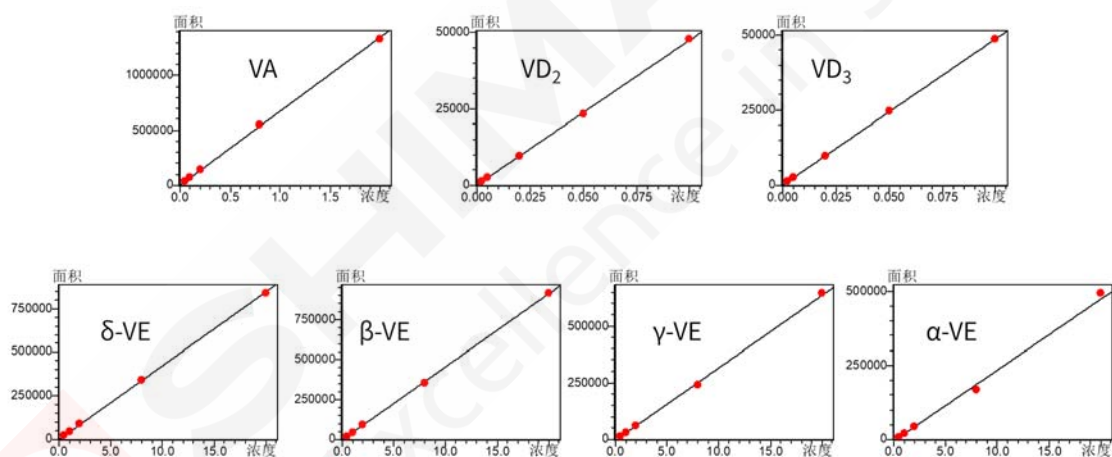


图 5. 校准曲线

表 4. 校准曲线信息

编号	化合物	线性方程	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	线性相关系数 R	精确度 (%)
1	VA	$Y = (673827)X + (402.4)$	0.05~2	0.9997	91.6~104.5
2	VD ₂	$Y = (474511)X + (76.2)$	0.0025~0.1	0.9998	96.5~103.5
3	VD ₃	$Y = (486447)X + (72.3)$	0.0025~0.1	0.9999	98.3~102.6
4	α -VE	$Y = (23838)X - (4914.3)$	0.5~20	0.9977	90.4~104.3
5	β -VE	$Y = (45651)X - (2096.5)$	0.5~20	0.9998	95.0~104.2
6	γ -VE	$Y = (31919)X - (3908.4)$	0.5~20	0.9997	95.9~101.6
7	δ -VE	$Y = (42248)X + (356.3)$	0.5~20	0.9996	91.2~105.3

目标组分的定量限和标准样品重复 5 次进样的保留时间和峰面积 RSD 结果如表 5 所示，其灵敏度和精密度可以满足分析要求。

表 5. 各目标物定量限和重复性结果

编号	化合物	定量限 (ng/mL)	重复进样标准品浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)
1	VA	0.8	0.4	0.14	0.77
2	VD ₂	1.1	0.01	0.04	0.60
3	VD ₃	1.2	0.01	0.03	0.28
4	α -VE	49.0	4	0.08	4.07
5	β -VE	17.3	4	0.09	1.14
6	γ -VE	28.9	4	0.08	1.36
7	δ -VE	16.9	4	0.09	0.44

1.5 实际样品分析

样品前处理参照 GB 5009.82-2016《食品中维生素 ADE 的测定》中样品皂化部分，皂化液过滤后直接进样分析，进样体积 100 μL ，奶粉加标样品色谱图如图 6 所示，各目标组分之间分离度良好，且出峰位置均无明显干扰峰。

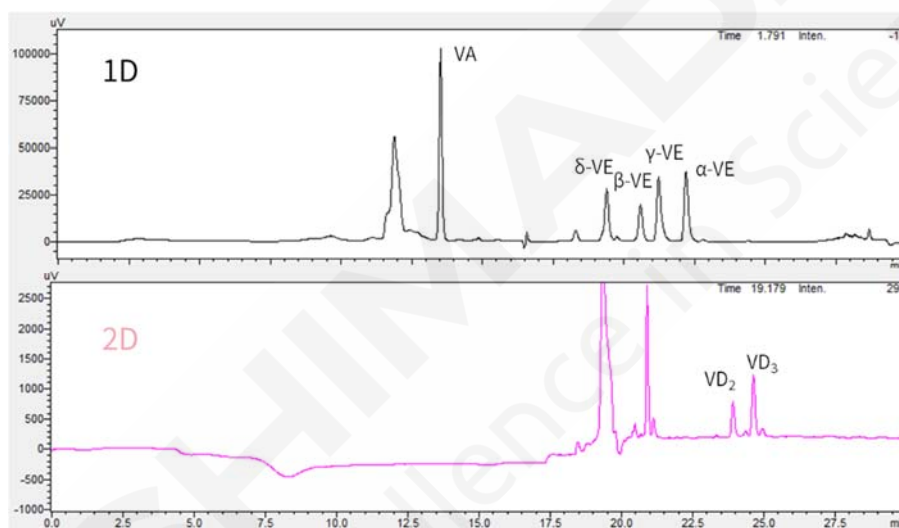


图 6. 奶粉加标样品色谱图

2. 二维液相色谱(2DLC)

2.1 系统简介

2DLC 硬件组成主要包括 2 个输液泵 (LC-40 系列，均内含 LPGE，分别用于 1D 和 2D 分离过程的流动相输送)、1 个二位六通阀 (其上装有捕集柱)、2 个 UV 或 PDA 检测器 (分别用于 1D 和 2D 检测)、柱温箱、2 个脱气机、系统控制器、管路及色谱柱等。

2.2 连接方式及工作流程

仪器的连接方式示意图如图 7 所示，其工作流程包括：(1) VA 分离，此阶段阀位为 0；(2) 阀位切换为 1，VD 自 1D 柱洗脱并被捕集柱捕集；(3) 阀位切换为 0，VE 在 1D 柱上分离，VD₂ 和 VD₃ 在 2D 柱上分离。具体的流路工作过程如图 8 所示。

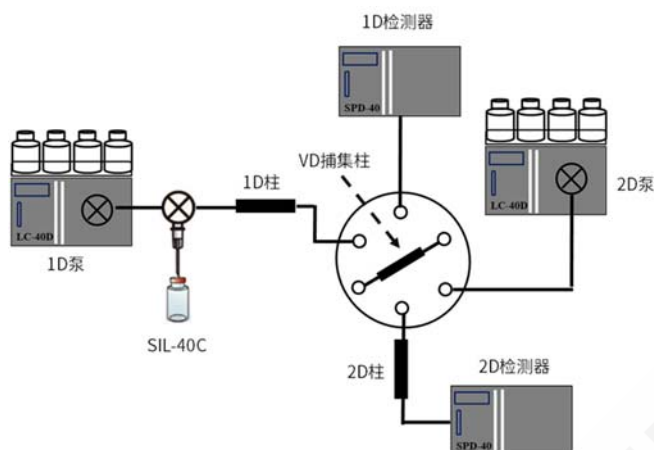


图 7. 2DLC 连接方式

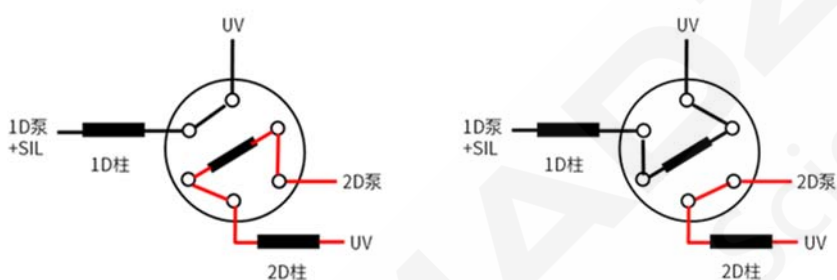


图 8. 2DLC 工作过程流路图 (左: 阀位 0; 右: 阀位 1)

2.3 参数设置

Nexera LC-40 系统支持四个独立的低压梯度系统协同工作，为多维多元液相色谱系统的搭建提供硬件基础。在本例中，实际使用到两路四元低压梯度系统，相关设置时，关于“泵”的部分需要注意的地方类似于图 4 所示：1D 泵洗脱模式需设置为“LPGE”，2D 泵洗脱模式分别为“ISO2”，并选择“使用”LPGE。其他参数设置方式同常规 LC-40 液相色谱。

2.4 系统验证

以 7 种维生素 ADE 作为目标物对系统进行验证，具体包括 VA-视黄醇、VD2 和 VD3 及 4 种 VE-生育酚。

选择的流动相和固定相如表 6 所示，其中 1D 分离使用梯度模式，2D 分离使用等度模式，泵具体参数以及阀切换和波长切换时间程序如表 7 所示。

表 6. 流动相和固定相

No.	名称	流动相	固定相	固定相选择理由
1	1D	水和甲醇	Poroshell PFP(150 × 4.6mm I.D., 4 μm)	可分离 4 种生育酚的色谱柱
2	2D	水和乙腈	捕集柱: InertSustain AQ-C18(10×4.0mm I.D., 5 μm) 分析柱: ShimNex S-C18-PAH(150 × 4.6mm I.D., 3 μm)	可捕集和分离 VD2 和 VD3 的色谱柱

表 7. 时间程序

时间 (min)	阀位	1D 检测器波 长(nm)	2D 检测器波 长(nm)	1D 泵		2D 泵	
				流速 (mL/min)	B 相比例 (%)	流速 (mL/min)	B 相比例 (%)
Init.	0	325	264	1.0	78	0.3	10
2.00				1.0	82		
7.00	0	294	264				
8.50	1	294	264				
9.00						0.3	10
9.30						1.0	10
9.50	0	294	264				
15.00				1.0	90		
15.10				1.0	100		
17.00				1.0	100		
17.10				1.0	78		
21.00	0	294	264	1.0	78	1.0	10

注： 1D 流动相： A 和 B 分别为水和甲醇； 2D 流动相： A 和 B 分别为乙腈和异丙醇

标准溶液色谱图如图 9 所示，在选定的条件下，VE-生育酚的 4 种异构体在 1D 柱上可以实现良好分离，分离难度最高的 β -VE 和 γ -VE 的分离度大于 2；VD₂ 和 VD₃ 在 2D 柱上的分离度大于 3。

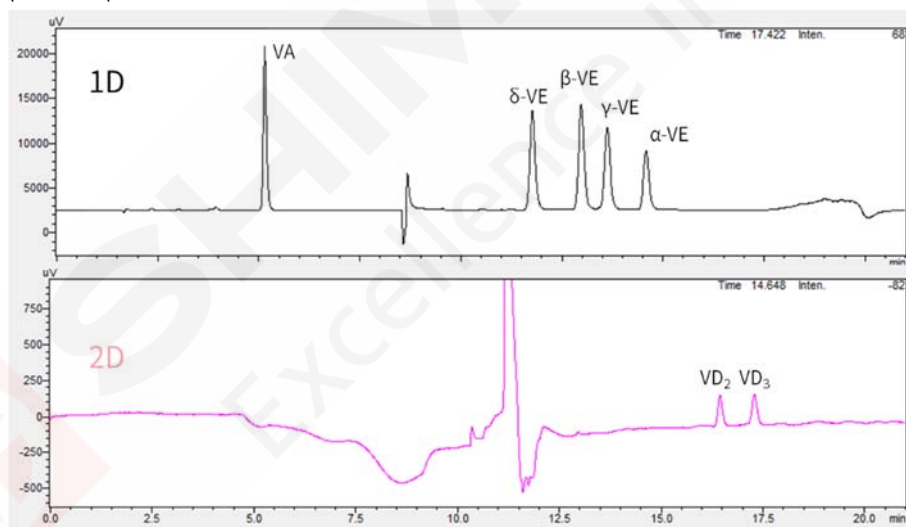


图 9. 标准溶液色谱图

目标组分的校准曲线和具体信息如图 10 和表 8 所示，7 个目标组分在各自的线性范围内，校准曲线线性良好。

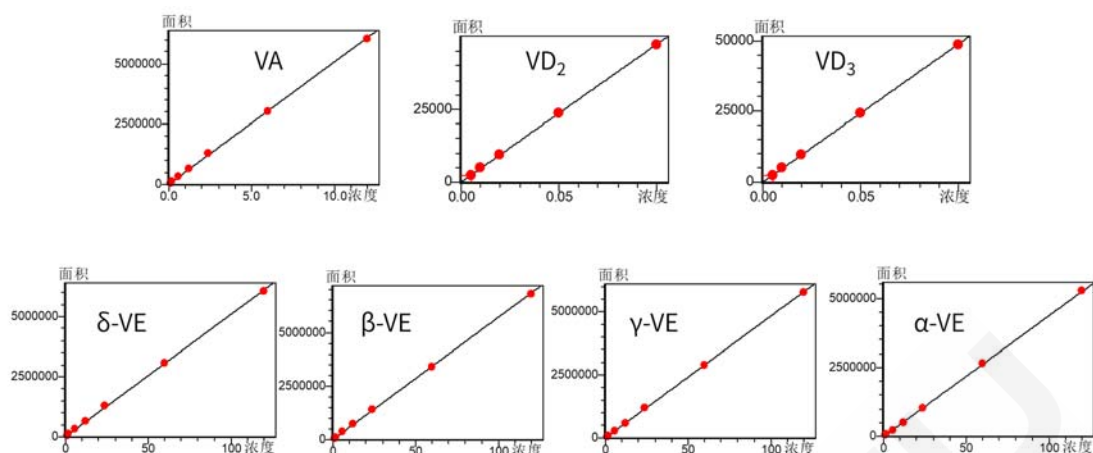


图 10. 校准曲线

表 8. 校准曲线具体信息

编号	化合物	线性方程	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	线性相关系数 R	精确度 (%)
1	VA	$Y = (507528)X + (6604.9)$	0.1~12	0.9998	93.9~103.8
2	VD2	$Y = (64039.6)X + (-176.8)$	0.005~0.1	0.9998	96.3~105.2
3	VD3	$Y = (64270.7)X + (-105.96)$	0.005~0.1	0.9999	96.9~103.3
4	α -VE	$Y = (43854)X - (20010.5)$	1~120	0.9998	91.6~111.5
5	β -VE	$Y = (57116)X + (1850.6)$	1~120	0.9998	95.9~103.7
6	γ -VE	$Y = (48410)X - (1754.3)$	1~120	0.9999	96.7~102.8
7	δ -VE	$Y = (50858)X + (3824.4)$	1~120	0.9998	95.3~103.9

目标组分的定量限和标准样品重复 5 次进样的保留时间和峰面积 RSD 结果如表 9 所示，其灵敏度和精密度可以满足分析要求。

表 9. 各目标物定量限和重复性结果

编号	化合物	定量限 (ng/mL)	重复进样标准品浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)
1	VA	0.7	0.5	0.08	0.31
2	VD2	1.0	0.05	0.02	0.24
3	VD3	1.1	0.05	0.02	0.33
4	α -VE	34.2	5	0.08	0.23
5	β -VE	16.7	5	0.08	0.27
6	γ -VE	19.8	5	0.08	0.20
7	δ -VE	16.2	5	0.08	0.09

2.5 实际样品分析

样品前处理参照 GB 5009.82-2016《食品中维生素 ADE 的测定》，样品皂化、提取、洗涤、浓缩吹干、复溶过滤后进样分析，进样体积 100 μL ，奶粉加标样品色谱图如图 11 所示，各目标组分之间分离度良好，且出峰位置均无明显干扰峰。

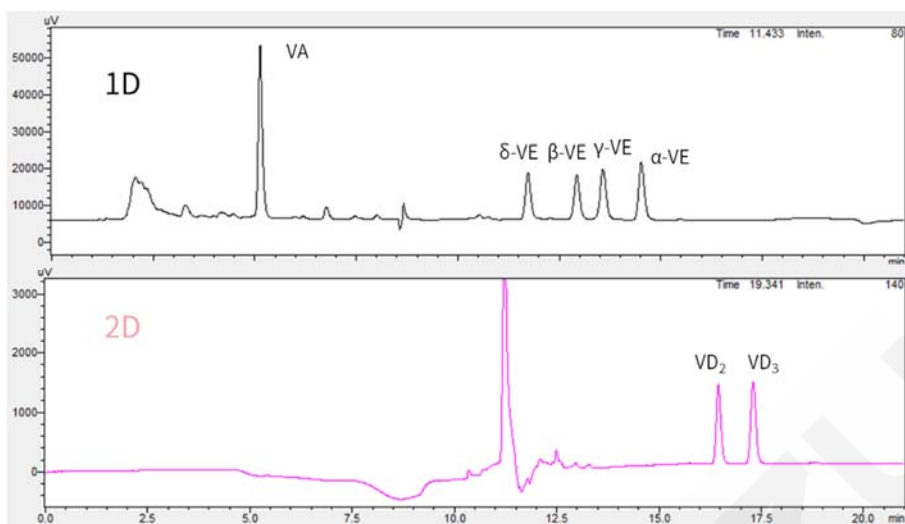


图 11.奶粉加标样品色谱图

3. 结论

本文介绍了基于 LC-40 液相色谱搭建的二维液相色谱(2DLC)和在线 SPE-二维液相色谱(OS-2DLC)，并详细介绍了仪器构成、连接方式及工作流程、参数设置及系统验证结果等。

两种系统均可同时分析 VA-视黄醇、VD2 和 VD3 及 VE-生育酚的 4 种异构体；OS-2DLC 可直接皂化液大体积进样分析；系统验证结果表明，两者在同时分析维生素 ADE 时，在选定的条件下，VE-生育酚的 4 种异构体在 1D 柱上均可以实现良好分离，分离难度最高的 β -VE 和 γ -VE 的分离度均大于 2，VD2 和 VD3 在 2D 柱上的分离度均大于 3；校准曲线线性良好，精确度高；目标组分灵敏度高，重复进样分析的重复性好。

OS-2DLC 测定婴幼儿配方奶粉中维生素 ADE

摘要： 本文建立了一种采用多维液相色谱（在线固相萃取与二维液相色谱联用）同时测定配方奶粉中维生素 A、D₂、D₃ 和维生素 E 的 5 种异构体（ α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚、 δ -生育酚、 α -生育三烯酚）含量的方法。样品经皂化后直接上机进样，仪器自动完成样品的富集、SPE 净化、目标组分的分离及测定过程，并通过对该方法的线性、重现性和加标回收率等性能指标进行了测试。结果表明：各组分线性关系良好，重现性好，回收率高，满足测定要求，适用于奶粉中维生素 A、D 和 E 的含量测定。

关键词： 在线固相萃取 二维液相色谱 婴幼儿奶粉 维生素

技术特点：

- ❖ 在线 SPE 净化，大大简化前处理流程。
- ❖ 采用在线固相萃取-二维液相色谱法，实现维生素 A、D、和 5 种维生素 E 的异构体同时分析，满足法规要求。

维生素 A、D、E 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婴幼儿奶粉基质复杂，几种组分添加量差异大，维生素 E 的异构体分离困难等因素，导致前处理复杂、费时费力，重复性差。

新版国标将食品中维生素 A、D、E 的测定拆分为两个标准《食品中维生素 A 和 E 的测定》（征求意见稿）、GB 5009.296-2023《食品中维生素 D 的测定》（2024-03-06 实施），其中 GB 5009.296-2023《食品中维生素 D 的测定》首次将在线柱切换-反相液相色谱法纳入标准方法中，为维生素 D 的测定提供了更好的参考依据，二维液相可以显著减少维生素 D 分析步骤，且可同时实现维生素 A、D、E 的测

定，但样品皂化后仍需净化等步骤，依然存在耗时耗力，重复性差等问题。

本研究采用在线固相萃取-二维液相色谱法同时测定配方奶粉中维生素 A、D 和维生素 E 的 5 种异构体（ α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚、 δ -生育酚、 α -生育三烯酚），利用在线固相萃取简化样品前处理过程，且可以起到样品富集作用，通过提高进样量进一步提升检测灵敏度。样品经过皂化后可直接进样分析，一次进样即可完成包含异构体在内的 8 种维生素组分的定量分析，显著提高检测效率，可以更好地应对婴幼儿配方奶粉中脂溶性维生素维生素 A、D、E 的定量分析。

1. 实验部分

1.1 试剂与标准品信息

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。维生素标准品购置于天津阿尔塔科技有限公司，用乙醇配制。

1.2 仪器

本实验采用岛津 Online SPE-二维液相色谱(OS-2DLC)系统，具体配置为：

系统控制器：SCL-40

自动进样器：SIL-40C XR

柱温箱：CTO-40C

切换阀：FCV-0206H3×2

30.00	1.0	0	100
35.50	1.0	0	100
35.60	1.0	6	94

表 4 切阀时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
4.00	柱温箱	Oven Valve 1	1
10.00	柱温箱	Oven Valve 1	0
22.50	柱温箱	Oven Valve 2	1
24.30	柱温箱	Oven Valve 2	0

注：阀 2 切阀时间以 VD 出峰时间为准。

1.4 标准品的配制

储备液的配制：用 EtOH（乙醇）配制 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 维生素 A、D、E 溶液（含 1 mg/mL BHT，防止标准品过快降解）。

混合标准系列工作溶液的配制：以甲醇为溶剂，进行混合标准储备液配置，维生素 A 浓度分别为 0.02、0.04、0.1、0.2、0.5、1、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，维生素 E 浓度分别为：0.1、0.2、0.5、1、2.5、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，维生素 D 浓度分别为 0.002、0.004、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列标准溶液，待上机分析。

1.5 样品前处理方法

样品前处理参照 GB 5009.82-2016《食品中维生素 A、D、E 的测定》。样品完成制备及皂化步骤后，直接定容、离心过滤，待测。

2. 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

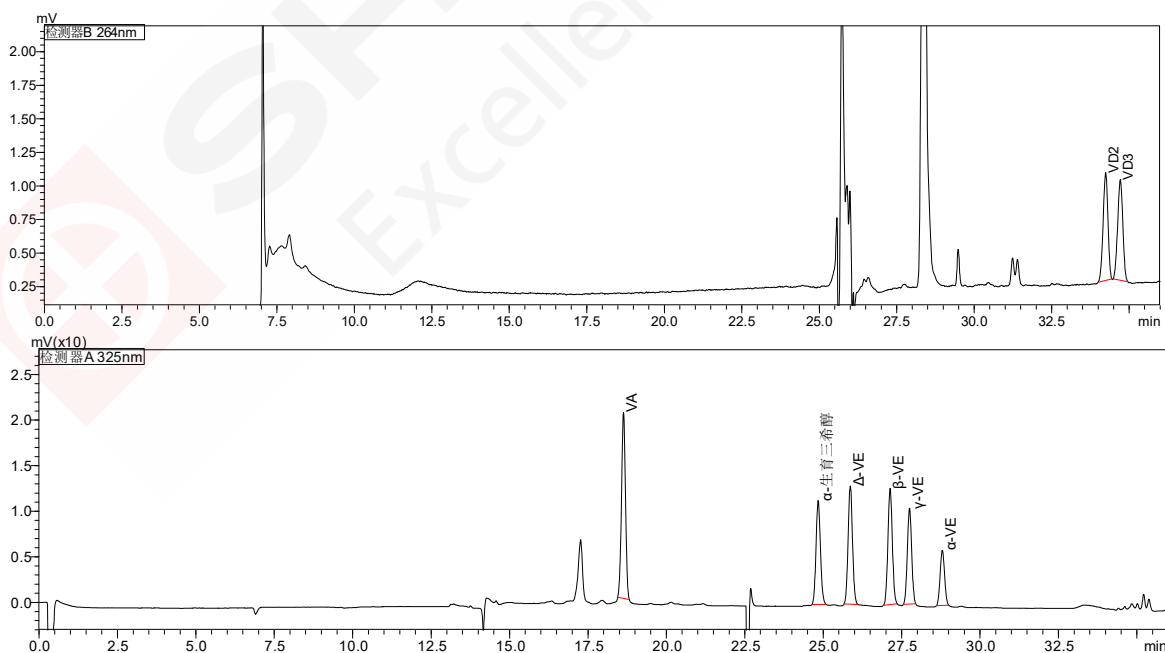


图 1. VA (325 nm、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、VE(294 nm、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、VD (264 nm、100 ng/mL) HPLC 色谱图

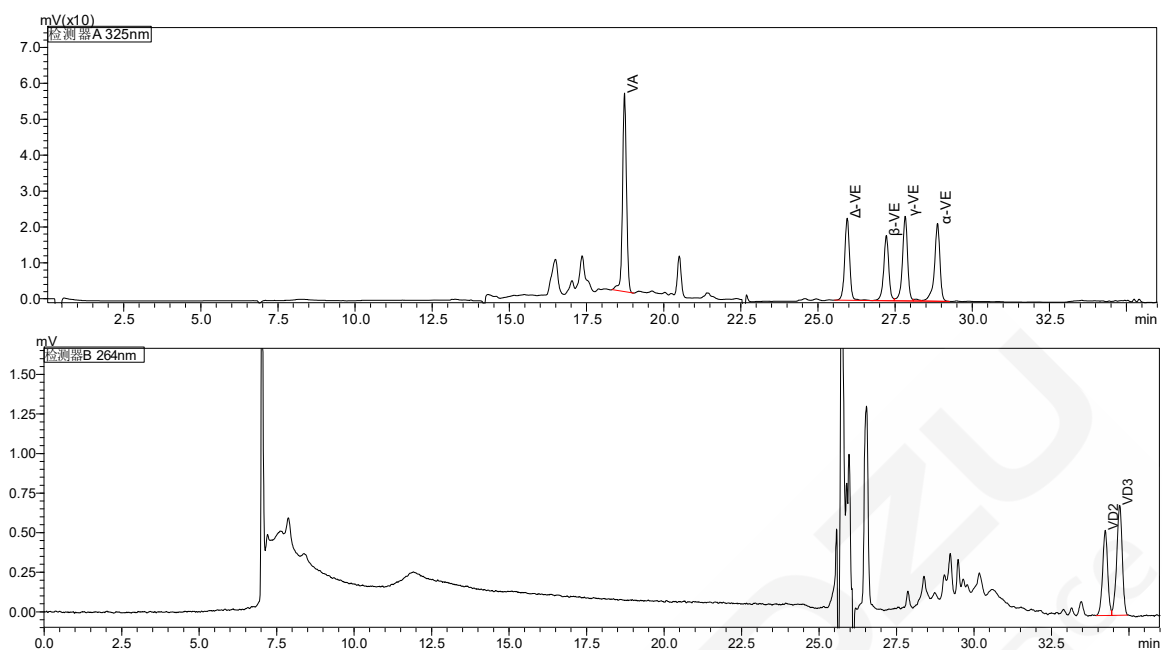
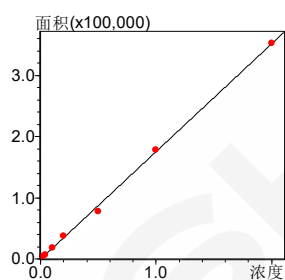


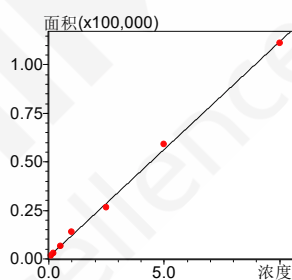
图 2. 婴幼儿配方奶粉基质色谱图

2.2 线性范围

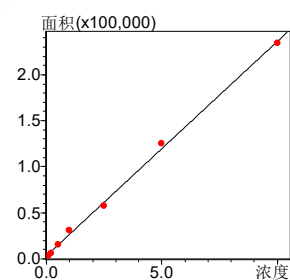
按照 1.4 项下配制方法，配制校准曲线。以化合物浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归分析，8 种组分线性良好，相关系数均大于 0.995。以校准曲线浓度最低点使用 10 倍信噪比的方式计算定量限，定量限为 0.001~0.053 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。



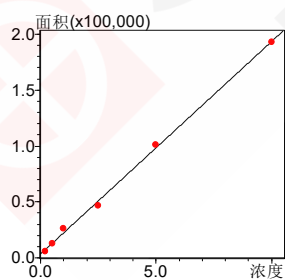
维生素 A



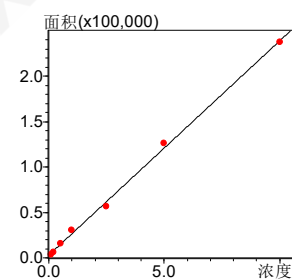
α -生育酚



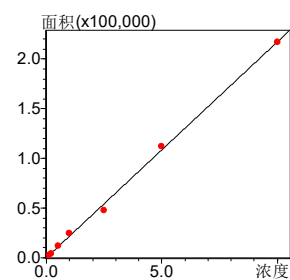
β -生育酚



γ -生育酚



δ -生育酚



α -生育三烯醇

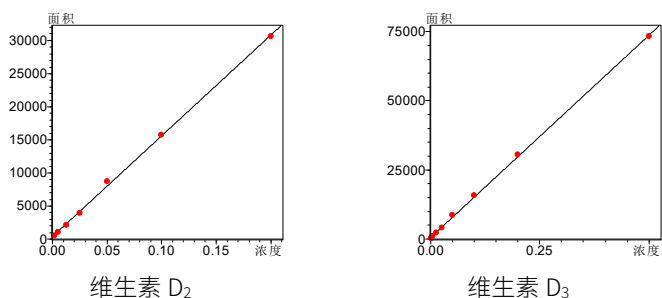


图3 维生素 A 等 8 种组分校准曲线

表 5.校准曲线参数

序号	化合物	线性范围($\mu\text{g/mL}$)	相关系数 r	定量限($\mu\text{g/mL}$)
1	维生素 A	0.02~2	0.9993	0.007
2	α -生育酚	0.1~10	0.9991	0.053
3	β -生育酚	0.1~10	0.9990	0.021
4	γ -生育酚	0.1~10	0.9991	0.024
5	δ -生育酚	0.1~10	0.9990	0.020
6	α -生育三烯醇	0.1~10	0.9990	0.031
7	维生素 D ₂	0.002~0.2	0.9994	0.001
8	维生素 D ₃	0.002~0.2	0.9997	0.001

2.3 重复性

对混合标准溶液连续分析 5 次,计算重复性。结果见表 6。结果表明:各组分保留时间的 RSD%在 0.03%-0.16 %之间,峰面积的 RSD%在 0.45 %-2.96 %之间,方法重复性良好,仪器精密度良好。

表 6. 重复性结果 (n=6)

序号	化合物	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
1	维生素 A	0.2	0.16	0.45
2	α -生育酚	1.0	0.10	2.75
3	β -生育酚	1.0	0.11	0.70
4	γ -生育酚	1.0	0.10	1.19
5	δ -生育酚	1.0	0.11	0.43
6	α -生育三烯醇	1.0	0.11	2.35
7	维生素 D ₂	0.02	0.03	2.24
8	维生素 D ₃	0.02	0.03	2.96

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,对实际样品进行测试,以评估准确度,结果如表 7 所示。

向样品中添加一定浓度的目标物,制备出两个水平的加标样品,每个水平重复 3 次,进行加标回收率和精密度试验。平均回收率为 86.1%~100.1%,相对标准偏差为 1.28%~3.10 %。

表 7. 奶粉样品加标实验结果 (n=6)

No.	化合物名称	样品浓度 (mg/100g)	加标 1			加标 2		
			加标量 (mg/100g)	回收率%	RSD%	加标量 (mg/100g)	回收率%	RSD%
1	维生素 A	0.52	0.5	94.6	1.36	1.0	92.1	1.84
2	α -生育酚	13.4	5.0	98.1	1.29	10.0	99.2	1.78
3	β -生育酚	N.D.	5.0	100.1	3.10	10.0	90.5	1.64
4	γ -生育酚	2.60	5.0	92.3	1.54	10.0	95.1	2.35
5	δ -生育酚	0.702	5.0	95.1	1.89	10.0	96.2	1.28
6	α -生育三烯醇	N.D.	--	--	--	--	--	--
7	维生素 D ₂	N.D.	0.02	86.1	1.92	0.04	90.2	2.30
8	维生素 D ₃	0.013	0.02	87.5	2.61	0.04	92.3	1.98

注：1、加标 1 中加标浓度根据奶粉基质中标识的浓度进行添加，加标 2 中为加标 1 浓度的两倍

2、“N.D.”表示未检出；“--”表示加标实验中未添加该目标物。

3. 结论

本文开发出一种用于同时测定婴幼儿奶粉中维生素 ADE 高效稳定的在线固相萃取-二维液相色谱方法。该方法具有出色的回收率(>80%)和精密度 (RSD < 5%)，满足实验室快速、高效的检测需求。

中心切割二维液相色谱测定婴幼儿配方奶粉中维生素 ADE

摘要： 本文建立了一种二维液相色谱法同时测定配方奶粉中维生素 A、D 和维生素 E (α -生育酚) 含量的方法。样品经制备、皂化、液液萃取后进行上机分析，通过对该方法的线性、重现性和加标回收率等性能指标进行了测试。结果表明：各组分线性关系良好，重现性好，回收率高，满足法规测定要求，适用于奶粉中维生素 A、D 和 E 的含量测定。

关键词： 二维液相色谱 婴幼儿奶粉 维生素

技术特点：

- ❖ 该方法操作简单，耗时少，准确度高且灵敏度高。
- ❖ 采用二维液相色谱法，实现维生素 A、D、E 同时分析，满足法规要求。

GB 5009.296-2023《食品中维生素 D 的测定》首次将在线柱切换-反相液相色谱法纳入标准方法中，为维生素 D 的测定提供了更好的参考依据，该方法可以显著减少维生素 D 分析步骤，提升检测灵敏度，且可同时实现维生素 A、D、E 的测定。

本研究采用在线柱切换-反相液相色谱法同时测定配方奶粉中维生素 A、D 和维生素 E (α -生育酚)，一次进样即可完成 3 种维生素组分的定量分析，显著提高检测效率，可以更好地应对婴幼儿配方奶粉中脂溶性维生素维生素 A、D、E 的定量分析。

1. 实验部分

1.1 试剂与标准品信息

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。维生素标准品购置于天津阿尔塔科技有限公司，用乙醇配制。

1.2 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：SCL-40	自动进样器：SIL-40C XR
柱温箱：CTO-40C	切换阀：FCV-0206H3
脱气机：DGU-405×2	检测器：SPD-40×2
输液泵：LC-40D XR×2 (均内置 LPGE)	
色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.118	

1.3 分析条件

液相色谱条件：

一维色谱柱	: ShimNex HE C8(150mm×4.6 mm I.D., 5 μ m) P/N: 380-01241-08, 岛津 (上海) 实验器材有限公司
二维色谱柱	: ShimNex S-C18-PAH(150 mm×4.6 mm I.D., 3 μ m) P/N: 380-01247-14, 岛津 (上海) 实验器材有限公司
捕集柱	: Shim-pack GIST AQ-C18 (10 mm×4 mm I.D., 5 μ m) P/N:227-30763-02, 岛津 (上海) 实验器材有限公司
一维流动相	: A相-水; B相-甲醇; C相-乙腈

二维流动相：A相-乙腈；B相-异丙醇
 进样量：100 μL
 柱温：35°C
 洗脱方式：一维梯度洗脱，二维等度洗脱，洗脱程序见表1、表2
 检测波长：维生素 A-325 nm；维生素 E-294 nm；维生素 D-264 nm

表 1. 一维色谱梯度洗脱时间程序

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)	流动相 C (%)
0.00	1.0	20.0	20.0	60.0
16.00	1.0	0.0	25.0	75.0
19.00	1.0	0.0	25.0	75.0
19.50	1.0	20.0	20.0	60.0

表 2. 二维色谱等度洗脱时间程序

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0.00	0.3	90	10
15.9	0.3	90	10
16.1	1.0	90	10

表 3. 时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
15.50	柱温箱	Oven Valve 1	1
16.40	柱温箱	Oven Valve 1	0
27.00	控制器	Stop	

注：切阀时间以 VD 出峰时间为准。

1.4 标准品的配制

混合标准系列工作溶液的配制：以初始流动相为溶剂，进行混合标准储备液配置，维生素 A 浓度分别为 0.04、0.1、0.2、0.4、1.0、2.0、4.0 μg/mL，维生素 E (α-生育酚) 浓度分别为：0.4、1.0、2.0、4.0、10.0、20.0、40.0 μg/mL，维生素 D₃ 浓度分别为 0.001、0.0025、0.005、0.01、0.025、0.05、0.1 μg/mL 的系列标准溶液，维生素 D₂ 作为维生素 D 测定的内标浓度为 0.02 μg/mL。

1.5 样品前处理方法

样品前处理参照食品安全国家标准 GB 5009.296-2023《食品中维生素 D 的测定》第二法。样品完成制备、皂化、液液萃取后，定容、过 0.45μm 微孔滤膜，待测。

2. 结果与讨论

2.2 色谱图

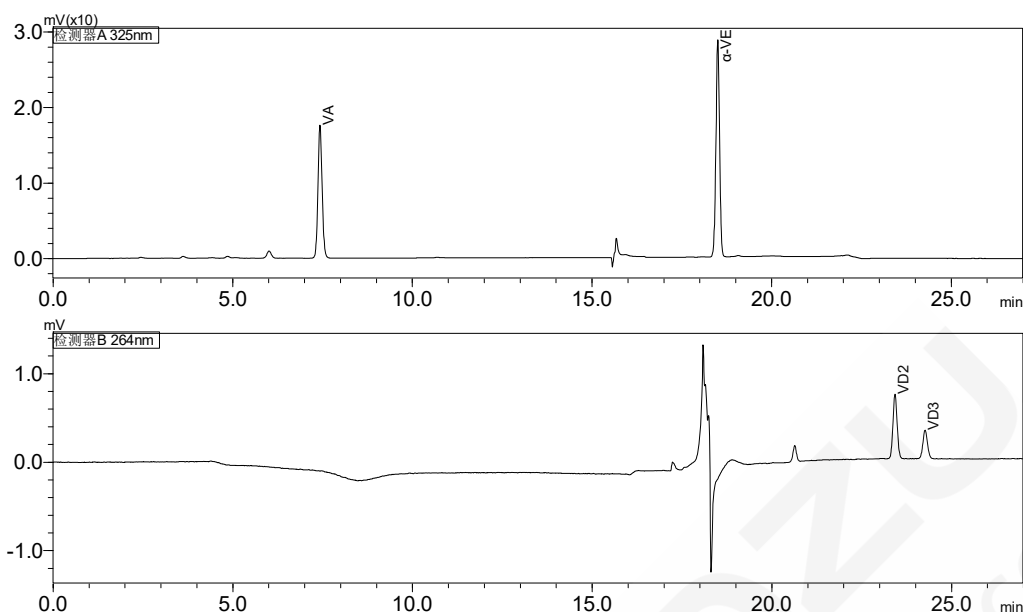


图 1. 标准品溶液 HPLC 色谱图

VA (325 nm、0.4 $\mu\text{g/mL}$)、VE(294 nm、4 $\mu\text{g/mL}$)、VD₃ (264 nm、10 ng/mL) VD₂ (264 nm、20 ng/mL)

2.2 线性范围

按照 1.4 项下配制方法，配制校准曲线。维生素 A、E 以外标法、维生素 D₃ 以内标法建立工作曲线，进行线性回归分析，3 种组分线性良好，相关系数均大于 0.999。以校准曲线浓度最低点使用 10 倍信噪比的方式计算定量限，定量限为 0.009~0.0086 $\mu\text{g/mL}$ 。

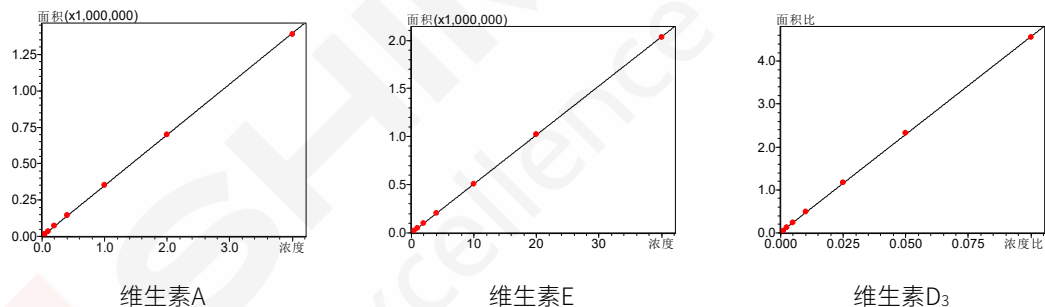


图 2. 维生素 ADE 校准曲线

表 4. 校准曲线参数

序号	化合物	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	相关系数 r	定量限 ($\mu\text{g/mL}$)	准确度 (%)
1	维生素 A	0.04~4	0.9999	0.0014	96.8~101.3
2	维生素 E	0.4~40	0.9999	0.0086	99.2~100.5
3	维生素 D ₃	0.001~0.1	0.9998	0.0009	96.3~105.0

2.3 重复性

对混合标准溶液连续分析 6 次，计算重复性。结果见表 5。结果表明：各组分保留时间的 RSD%在 0.013%~0.026%之间，峰面积的 RSD%在 0.13%~0.66%之间，方法重复性良好，仪器精密度良好。

表 5. 重复性结果 (n=6)

序号	化合物	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
1	维生素 A	0.4	0.026	0.13
2	维生素 E	4.0	0.014	0.13
3	维生素 D ₃	0.01	0.013	0.66

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，对实际样品进行测试，以评估准确度，结果如图 2 所示。向样品中添加一定浓度的目标物，制备出高、低两个水平的加标样品，每个水平重复 3 次，进行加标回收率和精密度试验。平均回收率为 82.1%~98.1%，相对标准偏差为 0.16%~1.18%，结果见表 6。

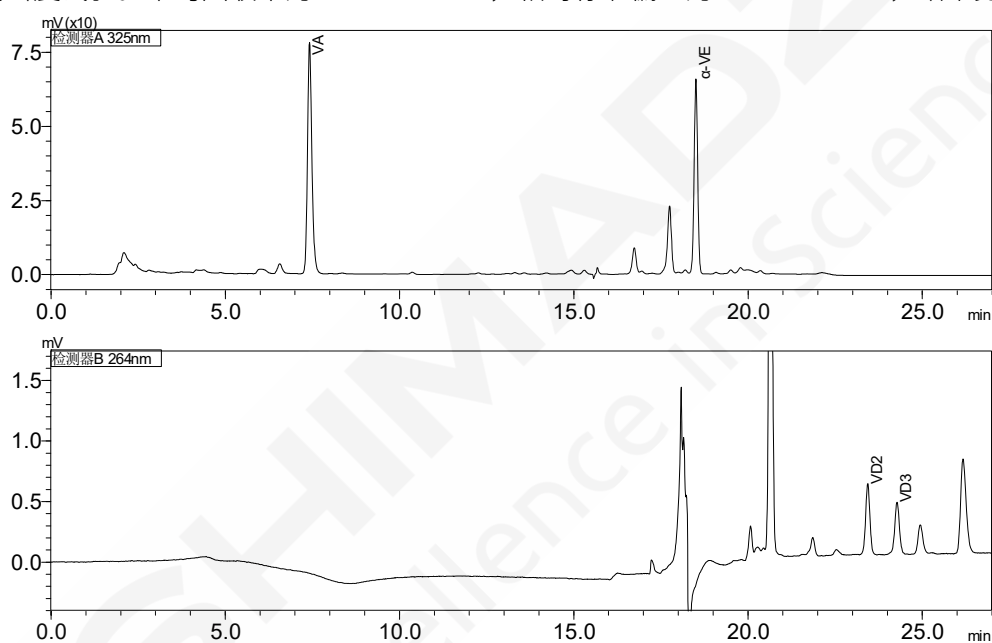


图 3. 某婴幼儿配方奶粉基质色谱图

表 6. 奶粉样品加标实验结果 (n=3)

No.	化合物 名称	样品浓度 (mg/100g)	RSD %	加标1			加标2		
				加标量 (mg/100g)	回收率 %	RSD %	加标量 (mg/100g)	回收率 %	RSD %
1	VA	1.97	0.05	1	98.1	0.16	2	97.5	1.18
2	VE	9.07	0.25	8	90.1	0.35	16	95.8	0.27
3	VD ₃	0.017	0.90	0.02	87.5	0.55	0.08	82.1	0.31

3. 结论

本文开发出一种用于同时测定婴幼儿奶粉中维生素 A、D、E 的高效、稳定的在线柱切换-反相液相色谱方法。该方法具有出色的回收率(>80%)和精密度 (RSD < 5%)，满足实验室快速、高效的检测需求。

中心切割二维液相色谱测定乳制品中维生素 D₂、D₃ 的含量

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。

1. 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	自动进样器：SIL-20AC
柱温箱：CTO-20AC	切换阀：FCV-20AH2
脱气机：DGU-20A5R×2	检测器：SPD-20A×2
一维输液泵：LC-20ADXR (含 LPGE)	
二维输液泵：LC-20ADXR×2	
色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.118	

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。

2. 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。

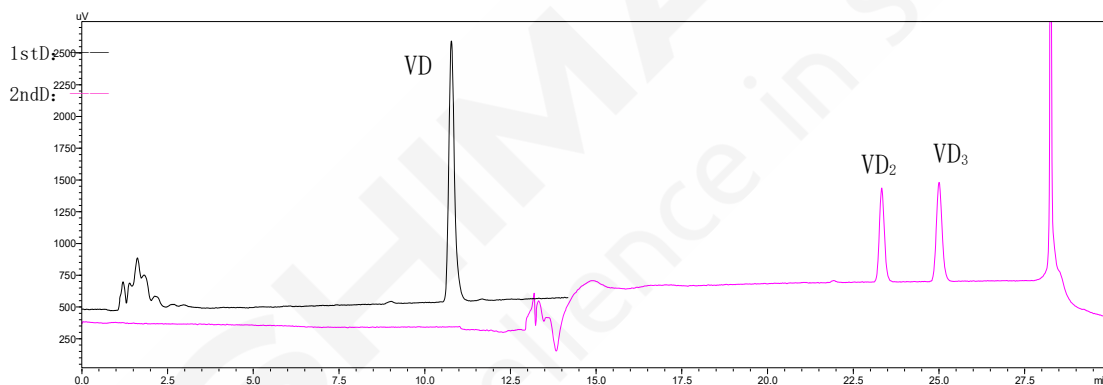


图 2. 一维、二维色谱图 (50 μg/L)

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。

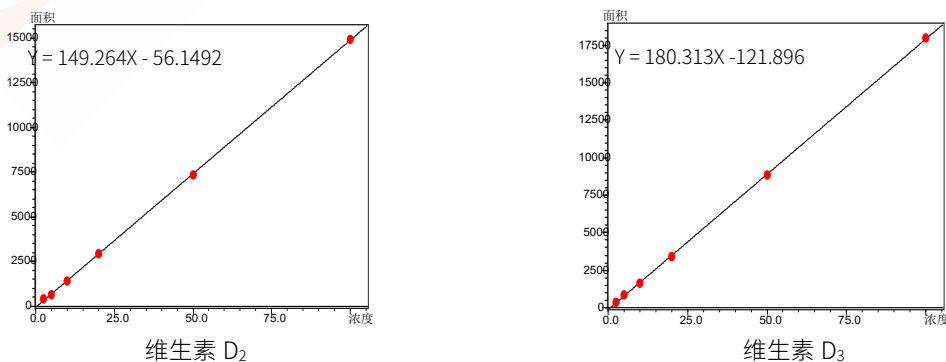


图 3. 维生素 D₂、D₃ 校准曲线

表 4. 校准曲线参数

序号	化合物	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 r	定量限 ($\mu\text{g/L}$)	检出限 ($\mu\text{g/L}$)
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 $\mu\text{g/L}$		50 $\mu\text{g/L}$		100 $\mu\text{g/L}$	
		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

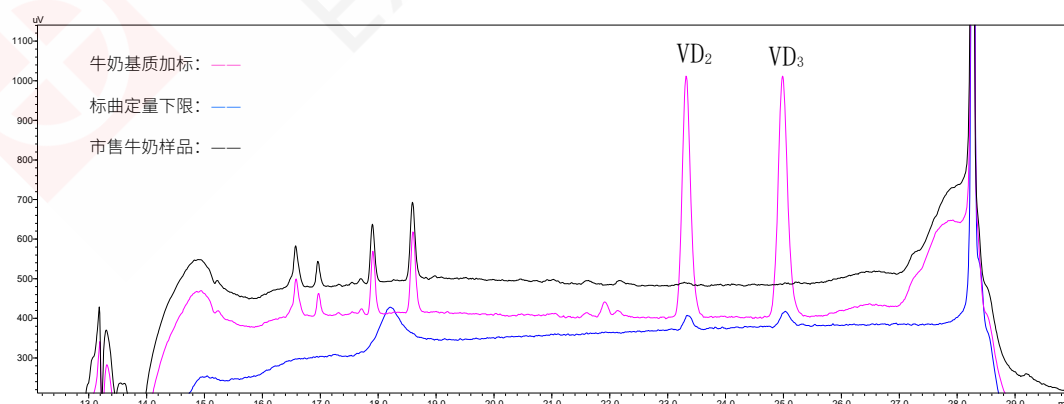
2.4 方法准确性和精密度

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 4 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 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 和 5.0 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 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 ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	加标 1			加标 2		
			加标量 ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	回收率%	RSD%	加标量 ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	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 4. 牛奶基质加标 (5.0 $\mu\text{g}/100\text{g}$)、标曲定量下限 (0.25 $\mu\text{g}/100\text{g}$) 及市售牛奶样品色谱图

3. 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。



中心切割二维液相色谱测定婴幼儿奶粉中维生素 ADE

摘要：本实验使用岛津 LC-20ADXR 和 LC-20AD 组成中心切割二维液相色谱系统，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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。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，无须捕集柱捕集组分，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。

本文采用中心切割二维液相色谱系统，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。

1. 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	自动进样器：SIL-20ACXR
柱温箱：CTO-20AC	切换阀：FCV-20AH2×2
脱气机：DGU-20A _{5R} ×2	检测器：SPD-M30A
一维输液泵：LC-20ADXR×2	二维输液泵：LC-20AD×2
捕集环：500 μL 定量环	

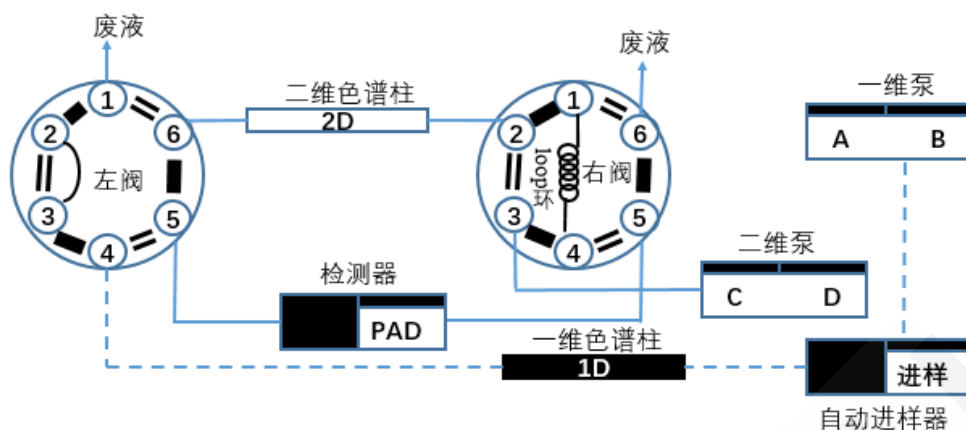


图 1. 中心切割液相系统切换图

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。

1.3 分析条件

色谱条件

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

二维色谱柱 : Spolar (4.6 x 250 mm, 5 μm)

柱温 : 35°C

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		

2. 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 μ m）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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左右的 VD2 为内标），所得标准曲线见图 3。各组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。

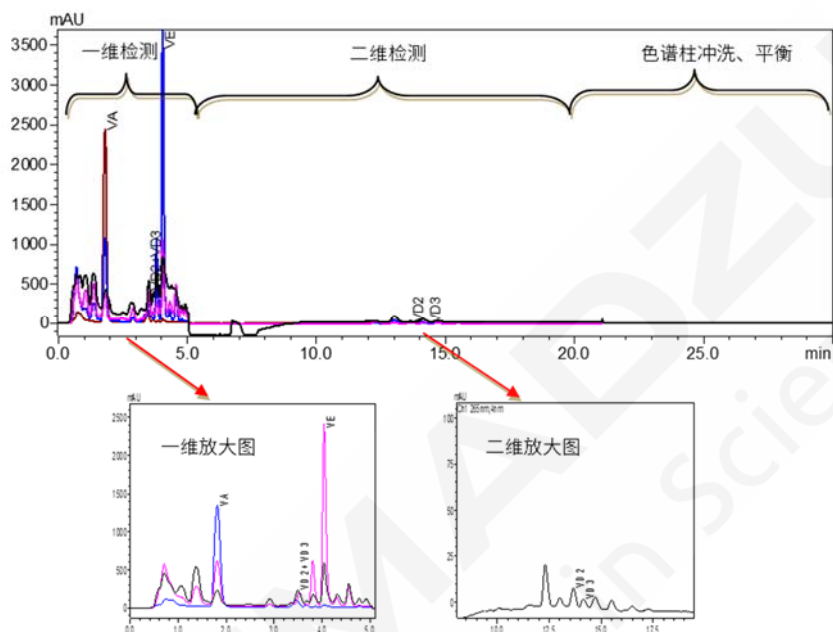


图 2 中心切割二维用于婴幼儿奶粉中 VA、VD3 和 VE 的同时检测（多通道重叠图）

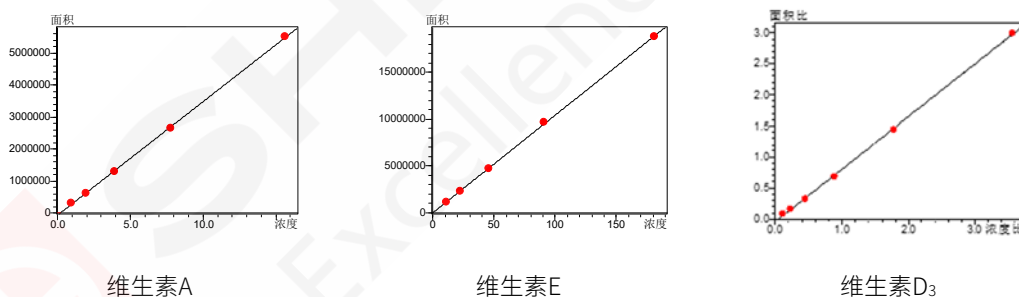


图 3 VA、VE 和 VD3 工作曲线

表 2 各组分工作曲线及相关系数

编号	化合物	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	线性方程	相关系数	LOD(S/N)
1	VA	0.98-15.63	$Y=350618X-44928$	0.9993	0.030(5)
2	VD3	0.059-1.87	$Y=0.8489X-0.04670$	0.9996	0.015(4)
3	VE	11.52-368.75	$Y=105143X-33810$	0.9996	0.071(5)

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)

编号	化合物	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)
1	VA	0.17	0.38
2	VD3	0.03	0.19
3	VE	0.14	0.14

2.7 样品测试和加标回收率考察

实际样品测试结果及加标回收率如表 4 所示。

表 4. 实际样品测试结果及加标回收率

奶粉 编号	化合物	波长 (nm)	定量结果 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	奶粉含量(VE: $\text{mg}/100\text{g}$, 其他: $\mu\text{g}/100\text{g}$)	加标回收率 (%)
1	VA	325	5.93	515.65	95.0
	VD3	265	0.34	29.65	91.4
	VE	291	190	16.52	98.5
2	VA	325	3.27	284.35	96.1
	VD3	265	0.324	28.17	95.6
	VE	291	114	9.91	98.1

3. 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维生素 ADE 的同时测定。本方法还具有以下优势：

- (1) 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)；
- (2) 只需一个检测器即可实现 VA、VD 和 VE 的一维和二维检测；
- (3) 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；
- (4) 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。

中心切割二维液相色谱测定米粉中的维生素 ADE

摘要：本实验使用岛津 LC-20ADX_R 和 LC-20AD 组成中心切割液相系统，并配备紫外检测器 SPD-20A（半微量流通池）建立同时测定婴幼儿辅食米粉中维生素 A、D、E 的分析方法。经过一维分离，得到 VA 和 VE 含量，而 VD₂ 和 VD₃ 在一维中无法分离，切入二维做进一步分离，最终实现 VD₂ 和 VD₃ 分离。该方法在线性范围为 VA 0.2-50.0 mg/L、VE 2.0-500.0 mg/L、VD₃ 0.05-5.0 mg/L，相关系数均大于 0.999，线性良好。维生素 ADE 的仪器检出限和测定下限范围分别为：检出限 0.0014-0.0085 mg/L；测定下限 0.0048-0.026 mg/L。精密度实验中，维生素 ADE 的保留时间相对标准偏差范围为 0.03-0.43%；峰面积的相对标准偏差范围为 0.08-1.41%。维生素 A、D、E 的加标回收率在 89.0-114.0%之间。

关键词：中心切割液相色谱 维生素 A 维生素 D 维生素 E 婴幼儿辅食 米粉

维生素 A 又称视黄醇或抗干眼病因子，是一个具有脂环的不饱和一元醇，是构成视觉细胞中感受弱光的视紫红质的组成成分，人体缺乏维生素 A，会出现皮肤干燥、脱屑和脱发等症状。维生素 D 家族成员中最重要的成员是 VD₂（麦角钙化醇）和 VD₃（胆钙化醇），维生素 D 缺乏会导致少儿佝偻病和成年人的软骨病。维生素 E 其水解产物为生育酚，是最主要的抗氧化剂之一，其能促进性激素分泌，提高生育能力，预防流产，还可用于改善血液循环，预防近视眼发生和发展。

在国标《GB 5009.82-2016 食品安全国家标准

食品中维生素 A、D、E 的测定》中，维生素 D 需通过正相色谱制备、反相色谱分析进行含量测定，且不能实现维生素 ADE 同时测定，操作繁琐，难以应对大量样品分析。

本实验使用岛津中心切割液相系统，建立同时测定婴幼儿辅食米粉中维生素 A、D、E 的分析方法，节省样品制备和分析时间，避免正相溶剂对分析人员造成伤害。同时系统具有高稳定性、高准确度的特点，适用于婴幼儿辅食产品中维生素 A、D、E 的检测。

1. 实验条件

1.1 仪器

本实验采用岛津中心切割二维液相色谱系统，具体配置为：

系统控制器：CBM-20A	自动进样器：SIL-20ACXR
柱温箱：CTO-20AC	切换阀：FCV-20AH2×2
脱气机：DGU-20A _{5R}	检测器：SPD-20A
一维输液泵：LC-20ADX _R + LPGE	二维输液泵：LC-20AD×2
捕集环：500 μL 定量环	

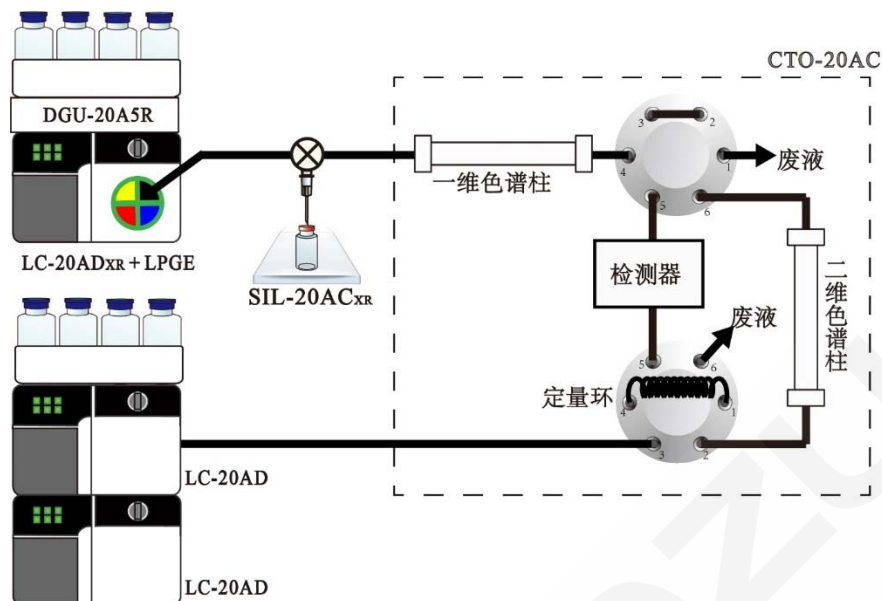


图1 中心切割液相系统硬件配置与流路图

1.2 分析条件

- 一维色谱柱 : Acclaim C8 (3.0 mm I.D.×150 mm L., 3 μm)
- 二维色谱柱 : Spolar C18 (4.6 mm I.D.×250 mm L., 5 μm)
- 柱温 : 35°C
- 进样体积 : 20 μL
- 一维流速 : 0.7 mL/min
- 二维流速 : 0.5 mL/min
- 洗脱方式 : 梯度洗脱, B相起始比例10%, 时间程序见表1
- 检测波长 : VA-325 nm; VD-265 nm; VE-291 nm

表1. 时间程序表

时间	单元	处理命令	值
5	SPD-20A(检测器 A)	Wavelength Ch1	291
6.6	柱温箱	CTO.RVR	0
7.3	柱温箱	CTO.RVR	1
9	柱温箱	CTO.RVL	1
9	柱温箱	CTO.RVR	0
10	SPD-20A(检测器 A)	Wavelength Ch1	265
20	泵	B.Flow	0.5
20	泵	C.Flow	0.5
20.1	泵	B.Flow	0
20.1	泵	C.Flow	1
24	柱温箱	CTO.RVL	0

24	柱温箱	CTO.RVR	1
25	泵	B.Flow	0
25	泵	C.Flow	1
25	SPD-20A(检测器 A)	Wavelength Ch1	325
25.1	泵	B.Flow	0.5
28	控制器	Stop	

1.3 标准溶液配制

分别取 VA、VD₂、VD₃、VE 标准品适量，用甲醇稀释分别配制成 VA 浓度 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、25.0 和 50.0 mg/L；VE 浓度 2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、250.0 和 500.0 mg/L；VD₃ 浓度 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.5 和 5.0 mg/L 的混合标准工作溶液，于 4℃冰箱中避光存放。

1.4 供试品溶液制备

按照国标 GB 5009.82-2016 样品前处理方法对样品进行前处理。

2. 结果与讨论

2.1 标准品的色谱图

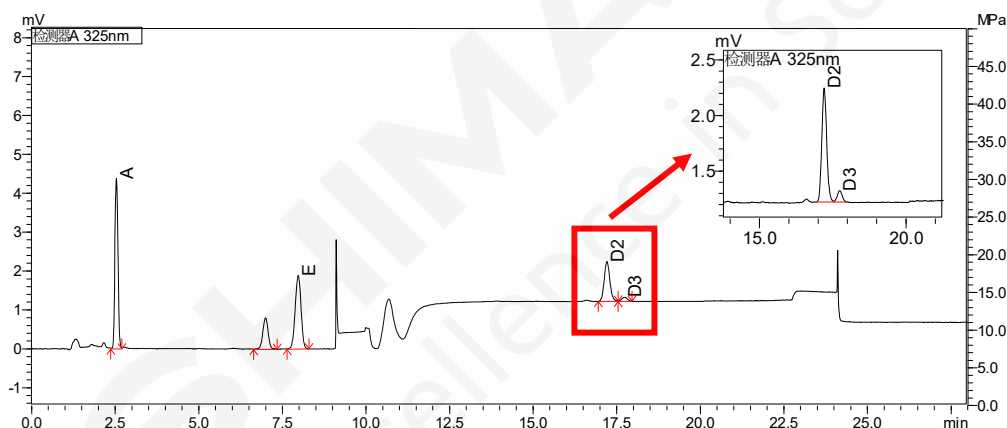


图 2. 混合标准溶液色谱图 (SPD-20A)

(VA=0.5 mg/L, VE=5 mg/L, VD₃=0.05 mg/L, VD₂=0.5 mg/L)

2.2 标准曲线

按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积比为纵坐标，采用外标法建立标准曲线，结果如图 3 所示，VA、VE、VD₃ 在线性范围为 VA 0.2-50.0 mg/L、VE 2.0-500.0 mg/L、VD₃ 0.05-5.0 mg/L，线性相关性良好，相关系数均大于 0.999，具体结果见表 2。

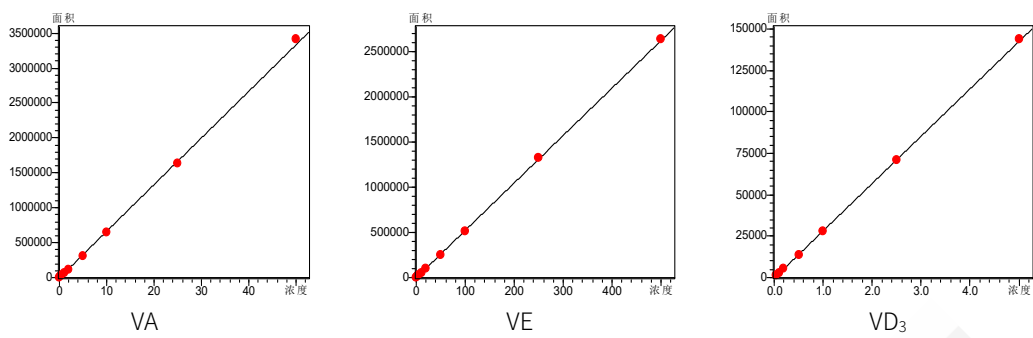


图 3. VA、VE、VD₃ 标准曲线

表 2. 标准曲线参数

名称	线性范围 (mg/L)	线性方程	相关系数	准确度%
VA	0.2-50.0	$Y = (66739.2)X + (-2922.20)$	0.9994	90.8-106.3
VE	2.0-500.0	$Y = (5236.19)X + (-1593.31)$	0.9997	92.0-104.2
VD ₃	0.05-5.0	$Y = (28456.8)X + (-105.089)$	0.9998	91.7-110.0

注：由于加标样品里面没有 VD₂，因此评价方法时使用了 VA、VE、VD₃ 外标法。

2.3 精密度实验

按照 1.2 分析条件测定，选择低、中、高浓度混合标准溶液依次连续进样测定 6 次，低浓度混合标准溶液 VA、VE、VD₃ 浓度分别为：1.0、10.0、0.1 mg/L；中浓度混合标准溶液 VA、VE、VD₃ 浓度分别为：5.0、50.0、0.5 mg/L；高浓度混合标准溶液 VA、VE、VD₃ 浓度分别为：25.0、250.0、2.5 mg/L。具体结果见表 3，结果表明该仪器具有良好精密度。

表 3. 精密度的结果 (n=6)

浓度级别	VA		VE		VD ₃	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
低浓度 RSD%	0.07	0.27	0.04	0.21	0.06	1.41
中浓度 RSD%	0.22	0.13	0.43	0.12	0.20	0.50
高浓度 RSD%	0.20	0.08	0.21	0.48	0.03	0.24

2.4 灵敏度实验

按照 1.2 分析条件测定，标准曲线中浓度最低点计算仪器灵敏度，通过 LabSolutions 软件计算仪器检测限及定量限，结果见表 4。

表 4. VA、VE、VD₃ 灵敏度实验结果

编号	化合物	检测限 (mg/L)	定量限 (mg/L)
1	VA	0.0014	0.0046
2	VE	0.0034	0.011
3	VD ₃	0.0085	0.028

2.5 样品含量测定

按 1.2 中分析条件对米粉样品进行测定，样品溶液色谱图见图 4，其结果见表 5。

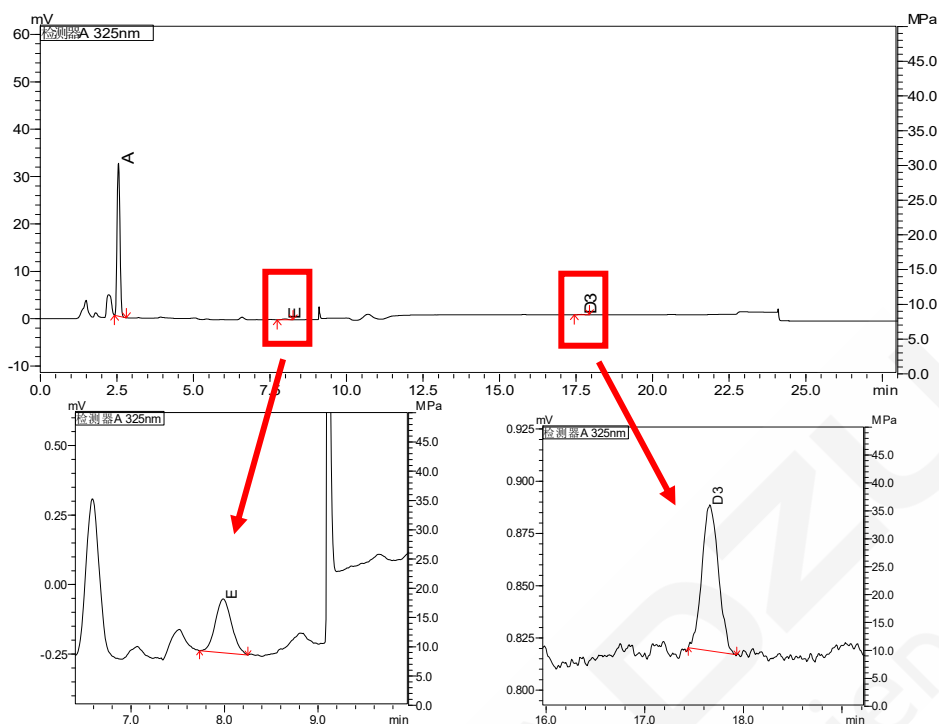


图 4. 米粉样品 3# 色谱图

表 5. 不同米粉样品含量测定结果 (mg/L)

样品编号	VA	VE	VD ₃
1#	3.597	1.700	0.031
2#	3.349	1.694	0.031
3#	3.723	1.685	0.032
4#	3.204	1.809	0.031
5#	2.784	----	0.027
6#	3.279	----	0.028
7#	2.681	----	0.023
8#	3.547	----	0.028
9#	2.989	----	0.027
10#	2.912	----	0.025

2.6 加标回收率

取样品 3#, 分别配制成低浓度混合标准溶液 VA、VE、VD₃ 浓度分别为: 5.0、10.0、0.1 mg/L; 中浓度混合标准溶液 VA、VE、VD₃ 浓度分别为: 10.0、50.0、0.5 mg/L; 高浓度混合标准溶液 VA、VE、VD₃ 浓度分别为: 20.0、200.0、2.0 mg/L 的样品加标溶液, 考察加标回收率。样品加标色谱图见图 5, 加标回收率结果如表 6 所示。由表 6 可知, 样品中的 VA、VE、VD₃ 回收率为 89.0-114.0%。加标样品在定量限以上有良好响应, 能够满足样品定量分析要求。

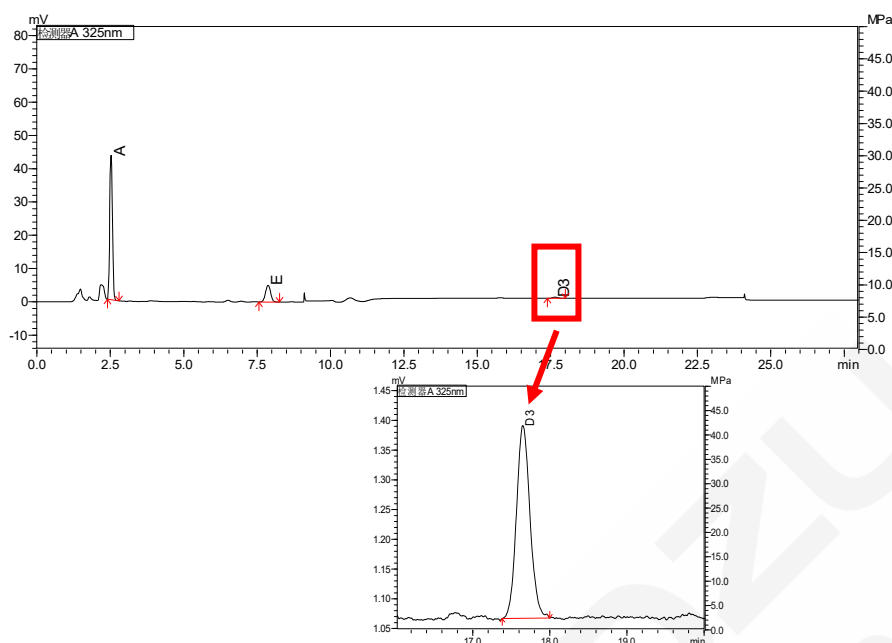


图 5. 样品 3#低浓度加标色谱图

表 6. 加标回收率结果

浓度级别	VA	VE	VD ₃
低浓度回收率%	91	114	108
中浓度回收率%	89	99	95
高浓度回收率%	91	104	98

3. 结论

本实验使用岛津中心切割液相系统，参考国标《GB 5009.82-2016 食品安全国家标准 食品中维生素 A、D、E 的测定》，建立同时测定婴幼儿辅食米粉中维生素 A、D、E 的分析方法。该方法在线性范围为 VA 0.2-50.0 mg/L、VE 2.0-500.0 mg/L、VD₃ 0.05-5.0 mg/L，相关系数均大于 0.999，线性良好。维生素 A、D、E 的仪器检出限和测定下限范围分别为：检出限 0.0014-0.0085 mg/L；测定下限 0.0048-0.026 mg/L。精密度实验中，维生素 ADE 的保留时间相对标准偏差范围为 0.03-0.43%；峰面积的相对标准偏差范围为 0.08-1.41%。维生素 A、D、E 的加标回收率在 89.0-114.0%之间。

使用岛津中心切割液相系统，配备紫外检测器 SPD-20A（半微量流通池）分析米粉样品中的维生素 A、D、E，结果显示线性范围广，灵敏度高，重复性好等优点该系统适用于食品行业对维生素 A、D、E 的检测分析。

中心切割二维液相色谱用于维生素 D 制剂的含量测定

摘要: 本文参照《中华人民共和国药典（2020 年版）》四部通则“0722 维生素 D 测定法 第四法”，使用基于 LC-40 搭建的中心切割二维液相色谱系统，建立了维生素 D 制剂中维生素 D 的测定方法。系统适应性溶液连续分析结果显示：第一维液相色谱中维生素 D 理论塔板数为 5815~5948，前维生素 D 和维生素 D 的分离度为 7.54~7.81，第二维色谱图中维生素 D 和前维生素 D 与附近峰的分离度均大于 1.5，满足药典系统适用性要求；对照品溶液重复进样测试结果显示：前维生素 D 和维生素 D 保留时间 RSD 为 0.04%~0.14%，峰面积 RSD 为 1.28%~1.85%。结果表明，该方法有效、可靠，可应对相关分析需要。

关键词: 维生素 D 中心切割二维液相色谱 LC-40 中国药典

技术特点:

- ❖ 基于 LC-40 系列液相色谱而搭建的二维液相系统，具有更高的理论塔板数和分离度而优于药典系统适用性要求；
- ❖ 系统稳定，方法重复性好，主要化合物保留时间 RSD 不大于 0.15%，峰面积 RSD 在 1.9% 以内。

维生素 D 是脂溶性维生素家族的一员，它对维持人体钙、磷代谢平衡起着重要作用，缺乏维生素 D 会导致钙吸收障碍，从而引发骨质疏松、肌肉无力、骨折等健康问题。维生素 D 除了从食物中摄取外，还可以通过服用维生素 D 制剂等药物加以补充。

《中国药典》四部通则“0722 维生素 D 测定法”规定了高效液相色谱法（通则 0512）测定维生素 D（包括维生素 D₂ 和维生素 D₃）及其制剂、维生素 AD 制剂或鱼肝油中所含维生素 D 的方法。其中，第四法由中心切割二维液相色谱系统完成，该

系统由第一维分离柱和第二维分离柱串联组成，两柱之间通过二位六通阀作为连接，通过阀位切换改变流动相流路，将部分一维分离柱流出的组分导入二维分离柱进行二次分离，从而起到净化目标化合物，提高系统分离能力的作用。

本文参照“0722 维生素 D 测定法”，使用基于 LC-40 搭建的中心切割二维液相色谱，建立了维生素制剂中维生素 D 含量的分析方法，供相关人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用基于 LC-40 的中心切割二维液相色谱，具体配置为：

一维泵	: LC-40D (内置 LPGE)	二维泵	: LC-40D
系统控制器	: SCL-40	脱气机	: DGU-405×2
自动进样器	: SIL-40C XR	柱温箱	: CTO-40C(内置 2 位 6 通阀)
一维检测器	: SPD-40	二维检测器	: SPD-40

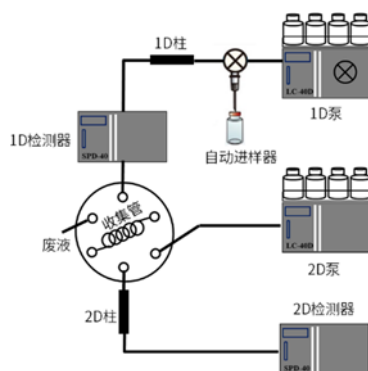


图 1. 基于 LC-40 的中心切割二维液相色谱流路

1.2 分析条件

- 一维色谱柱 : ChromCore VD-ChP4 (150 mm x 2.1 mm I.D., 3 μ m)
- 二维色谱柱 : SHIMSEN Anklo Amide(100 mm \times 2.1 mm I.D., 3 μ m)
(岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 380-01200-51)
- 一维流动相 : A相: 正己烷; B相: 正己烷-正戊烷-异丙醇(98:1:1, v/v/v)
- 一维洗脱方式 : 梯度洗脱, B相初始浓度为5%, 洗脱程序见表1
- 二维流动相 : 正己烷-正戊醇-异丙醇(996:2:2, v/v/v), 等度洗脱
- 流速 : 0.5 mL/min (一维和二维) 柱温 : 40°C
- 波长 : 265nm 进样体积 : 100 μ L
- 收集管 : 聚醚醚酮(PEEK)管, 内径0.0762 cm (0.03英寸), 20 m, 容积约9 mL

表 1. 一维梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value	备注
16.30	柱温箱	CTO.RVR	1	阀位切换, 使一维洗脱液中前 VD 保留时间前后 1.5min
19.30	柱温箱	CTO.RVR	0	的部分收集至 PEEK 管
24.40	柱温箱	CTO.RVR	1	阀位切换, 使一维洗脱液中 VD 出峰开始前 1.5min 和出
31.00	柱温箱	CTO.RVR	0	峰结束后 1.5min 的部分收集至 PEEK 管
30.00	泵	B.Conc	5	
35.00	泵	B.Conc	100	
60.00	泵	B.Conc	100	
65.00	泵	B.Conc	5	
80.00	控制器	STOP		

1.3 对照品溶液、供试品溶液和系统适应性溶液

按照《中国药典》四部“0722 维生素 D 测定法”第四法制备。

2. 结果与讨论

2.1 对照品溶液色谱图和切阀时间确认

维生素 D 总量为 2.5 μ g/mL 的 f2 混合对照品溶液进样分析, 一维色谱图中前维生素 D 和维生素 D 的保留时间分别为 17.81min 和 26.95min (药典要求该保留时间需在 25min 左右), 维生素 D 峰开始时间和结束时间分别为 25.98min 和 29.47min。根据药典要求-“第一维液相色谱中前维生素 D 切换时间设为保留时间的

前后各约 1.5 分钟；第一维液相色谱中维生素 D 切换时间设为维生素 D 出峰开始时间前和出峰完毕时间后各约 1.5 分钟”，设置 2 位 6 通阀的切换时间，具体如表 1 所示。

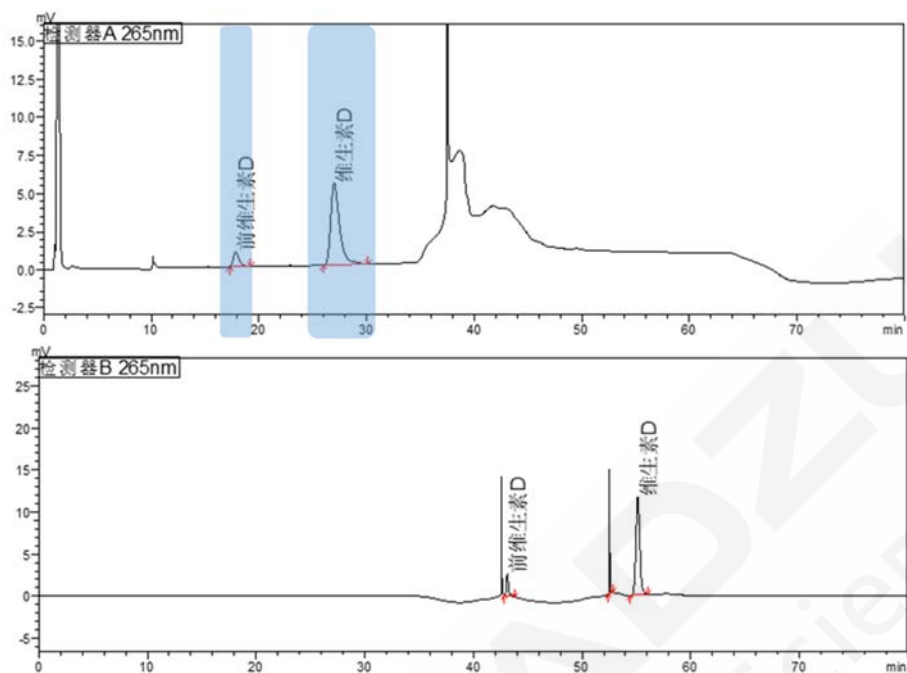


图 2. f2 混合对照品溶液色谱图

2.2 系统适应性考察

按照药典规定，制备系统适应性溶液。进样分析，结果优于药典的要求。

表 2. 系统适应性结果

系统适应性要求项目	标准要求	检测结果 (5 次重复分析)
理论塔板数：第一维液相色谱，按维生素 D 峰计算	应不低于 2300	5815-5948
分离度：第一维液相色谱，前维生素 D 峰与维生素 D 的分离度	应不小于 5	7.54~7.81
分离度：第二维液相色谱，维生素 D 峰与相邻峰的分离度以及前维生素 D 峰和相邻峰的分离度	应大于 1.5	均大于 1.5

2.3 重复性

取维生素 D 总量为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 f2 混合对照品溶液连续进样 5 次，前维生素 D 和维生素 D 保留时间 RSD 为 0.04%~0.14%，峰面积 RSD 为 1.28%~1.85%。重复性结果说明，该系统具有良好的稳定性。

表 3. 重复性结果

化合物	保留时间 (min)	峰面积	化合物	保留时间 (min)	峰面积
前维生素 D (第一维)	17.81	36,284.31	维生素 D (第一维)	26.95	311,882.79
	17.83	35,370.02		26.95	316,116.40
	17.88	35,451.38		27.04	315,085.04
	17.84	35,088.58		26.99	308,911.28
	17.85	35,088.25		27.00	306,705.32
RSD/%	0.14	1.38	RSD/%	0.14	1.28

	43.09	34,146.77		55.10	303,274.66
前维生素 D (第二维)	43.08	33,702.30	维生素 D (第二维)	55.11	304,852.25
	43.12	32,606.78		55.13	300,071.50
	43.14	33,370.54		55.15	295,195.45
	43.13	33,134.32		55.14	291,601.60
RSD/%	0.06	1.74	RSD/%	0.04	1.85

2.4 供试品测试

取市售某维生素 D 制剂，平行制备 2 份样品，进样测试，色谱图如图 3 所示。其中第一维色谱图中前维生素 D 出峰处有基质干扰，切阀至第二维色谱分离后，前维生素 D 和维生素 D 无其它峰干扰。

表 4. 供试品溶液平行测定结果

编号	样品	产品标识量 (IU)	实测量 (IU)	平行样相对相差 (%)
1	平行样 1	500	525.23	1.51
2	平行样 2	500	541.48	

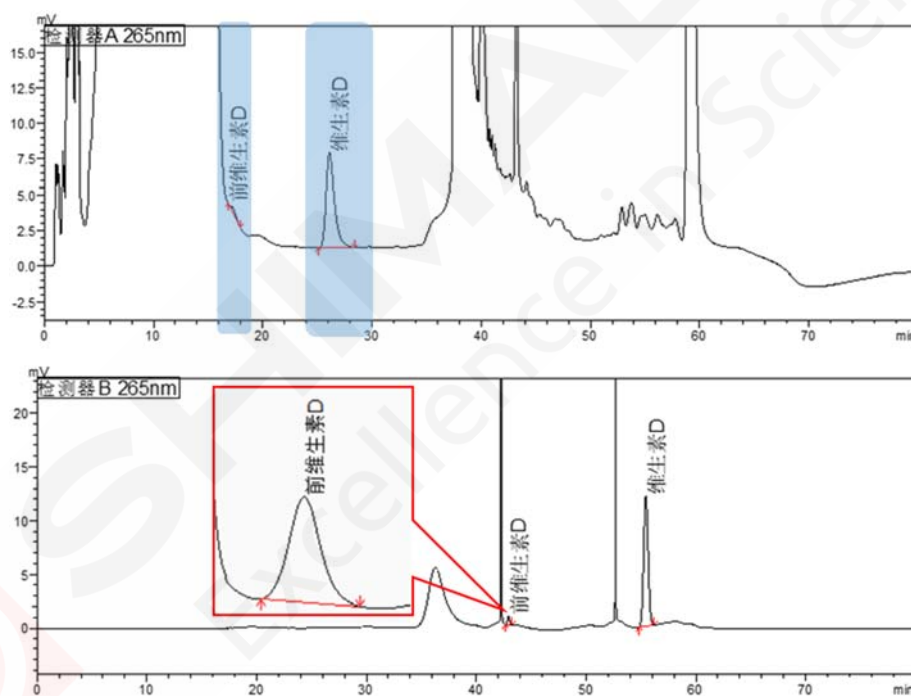


图 3. 供试品溶液色谱图

3. 结论

本文参照《中华人民共和国药典》四部通则“0722 维生素 D 测定法 第四法”，使用基于 LC-40 搭建的中心切割二维液相色谱系统，建立了维生素 D 制剂中维生素 D 的测定方法。系统适应性结果和重复性测试结果均满足药典要求，可有效应对相关分析需要。

中心切割二维液相色谱测定药品中维生素 D 含量

摘要：本文建立了符合《中国药典》四部通则《0722 维生素D测定法》中第四法维生素D含量测定的方法。为了解决前维生素D受杂质干扰的问题，采用岛津中心切割二维液相色谱系统进行测试；在指定的二维液相色谱条件下，对照品前维生素D和维生素D在第一维液相和第二维液相中出峰良好，分离度满足要求。取对照品重复进样测试，保留时间RSD为0.26%~0.71%，峰面积RSD为0.76%~1.46%；虽然维生素D制剂供试品溶液前维生素D在第一维色谱中受杂质干扰，但在第二维色谱中成功将前维生素D与杂质分离；第一维液相色谱中维生素D理论塔板数为2511~2706，前维生素D和维生素D的分离度均大于5，第二维液相色谱中前维生素D和维生素D附近均无明显干扰峰，以上结果均符合药典系统适用性要求。结果表明，该方法有效、可靠，可以应对《中国药典》四部通则《0722 维生素D测定法》中第四法中维生素D含量的测定。

关键词：维生素D 中心切割二维液相色谱 中国药典

维生素 D 是一种脂溶性维生素，其具有促进生长和骨骼钙化，促进牙齿健全、用于治疗佝偻病、骨软化症等功能作用。维生素 D 实际上是一种激素原，本身无活性，需先在肝脏和肾脏中经过代谢后才具有活性。《中国药典》四部通则《0722 维生素 D 测定法》包含四法，用于测定维生素 D（包括维生素 D₂ 和维生素 D₃）及其制剂、维生素 AD 制剂或鱼肝油中所含维生素 D 及前维生素 D 经折算成维生素 D 的总量。当待测药品中无维生素 A 及其他杂质干扰可用第一法测定，否则应按第二法处理后测定；如果按第二法处理后，前维生素 D 峰仍受杂质干扰，仅有维生素 D 峰可以分离时，则应按第三法测定；或不经前处理按第四法测定。

其中，《0722 维生素 D 测定法》中维生素 D 测定法新增的第四法为柱切换液相色谱法。柱切换液相色谱法是将同种色谱不同选择性分离柱组合，构成联用系统的技术。柱切换液相色谱系统通常由第一维分离柱和第二维分离柱串联组成，两柱之间通过切换阀作为接口，以改变流动相流路，将部分或全部第一维柱流出的组分，导入第二维柱进行二次分离，从而起到净化目标化合物，提高系统分离能力的作用。

本文采用岛津中心切割二维液相色谱仪，参照中国药典给出的柱切换色谱法建立了相对应的检测方法。

1. 实验部分

1.1 仪器

使用岛津中心切割二维液相系统，具体配制如下。

一 维 泵	: LC-20ADXR×2	二 维 泵	: LC-20AD+LPGE
系 统 控 制 器	: CBM-20A	脱 气 机	: DGU-20A
自 动 进 样 器	: SIL-20AC XR	柱 温 箱	: CTO-20AC(内置2位6通阀)
一 维 检 测 器	: SPD-M20A	二 维 检 测 器	: SPD-20A

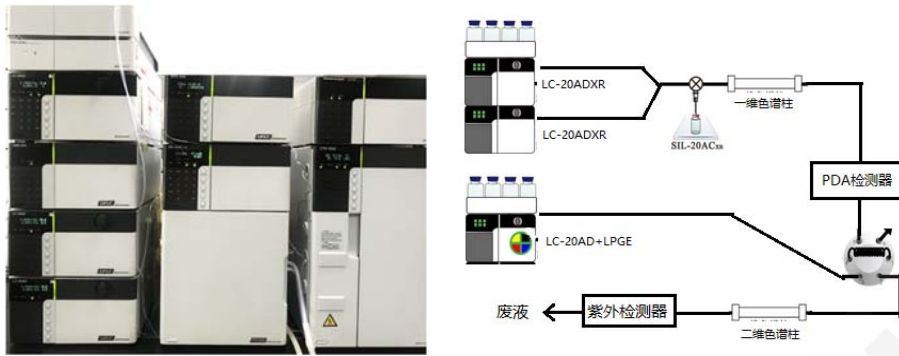


图 1. 岛津二维液相（中心切割）系统

1.2 分析条件

- 一维色谱柱 : AcclaimTM HILIC-10 (2.1x150 mm, 3 μm)
- 二维色谱柱 : ZORBAX RX-SIL (3.0x100 mm, 1.8 μm)
- 一维流动相 : A相: 正己烷; B相: 正己烷-正戊烷-异丙醇(98:1:1, v/v/v)
- 一维洗脱方式 : 梯度洗脱, B相初始浓度为5%, 洗脱程序见表1
- 二维流动相 : 正己烷-正戊醇-异丙醇(996:2:2, v/v/v), 等度洗脱
- 流速 : 0.5 mL/min (一维和二维) 柱温 : 40°C
- 波长 : 265nm 进样体积 : 100 μL
- 收集管 : 聚醚醚酮(PEEK)管, 内径0.0762 cm (0.03英寸), 20 m, 容积约9 mL

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.00	泵	Pump B.Conc	5
15.30	柱温箱	CTO.RVR	0
18.30	柱温箱	CTO.RVR	1
21.50	柱温箱	CTO.RVR	0
27.50	柱温箱	CTO.RVR	1
30.00	泵	Pump B.Conc	5
35.00	泵	Pump B.Conc	100
60.00	泵	Pump B.Conc	100
65.00	泵	Pump B.Conc	5
80.00	泵	Pump B.Conc	5

1.3 对照品溶液和样品溶液的制备

按照《中国药典》四部通则 0722 维生素 D 测定法第四法要求进行制备。

2. 实验结果

2.1 维生素 D 分析色谱图

采用 1.2 项分析条件, 取 0.5 μg/mL 对照品溶液进样分析; 图 2 和图 3 分别展示了维生素 D 和前维生素 D 的第一维和第二维色谱图。

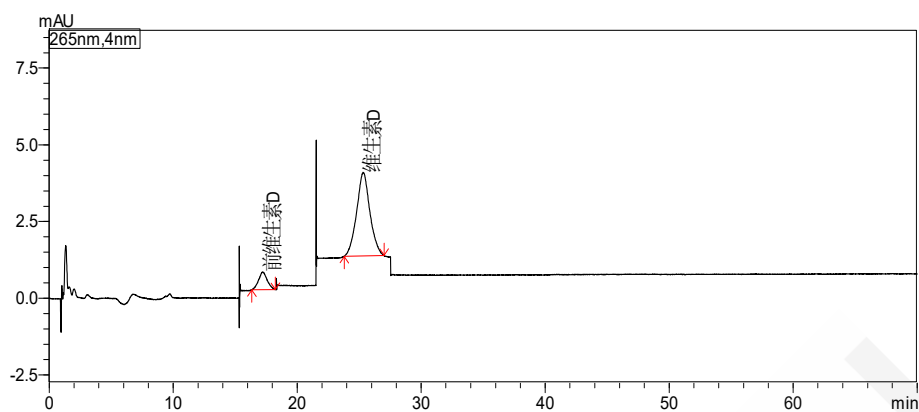


图 2. 前维生素 D 和维生素 D 校正因子 f2 对照品溶液第一维色谱图

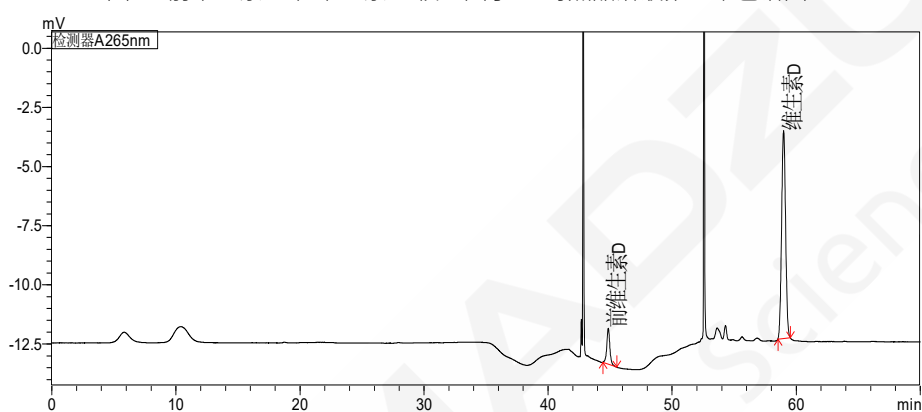


图 3. 前维生素 D 和维生素 D 校正因子 f2 对照品溶液第二维色谱图

2.2 重复性结果

按照中国药典的要求，对照品重复进样峰面积 RSD 应低于 2%。取对照品溶液 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 重复进样 5 次，得到的保留时间和峰面积 RSD 如表 2 所示。各化合物保留时间 RSD 为 0.26%~0.71%，峰面积 RSD 为 0.76%~1.46%，均符合药典的要求。

表 2. 重复性考察结果(n=5)

化合物	保留时间 (min)	峰面积	化合物	保留时间 (min)	峰面积
前维生素 D (第一维)	17.129	28,468	维生素 D (第一维)	25.126	204869
	17.169	28,630		25.248	208488
	16.927	27,790		24.881	202582
	17.172	28,092		25.278	200455
	17.225	28,005		25.326	203986
RSD/%	0.67	1.22	RSD/%	0.71	1.46
前维生素 D (第二维)	44.715	25,079	维生素 D (第二维)	58.858	197946
	44.802	25,023		58.822	197713
	44.533	25,477		58.627	202929
	44.791	25,346		58.646	195464
	44.855	25,338		58.984	196356
RSD/%	0.28	0.76	RSD/%	0.26	1.46

2.3 供试品溶液结果考察

取某品牌维生素 D 制剂，平行两份，采用 1.3 方法制备成供试品溶液，上机分析，每份供试品重复进样两次，所得供试品溶液色谱图如图 4、图 5 所示。其中第一维色谱图中前维生素 D 峰被油脂包裹，切入至第二维色谱后，前维生素 D 和维生素 D 和杂质峰均得到有效分离。表 3 列出了供试品溶液的测试结果，峰面积重复性良好。

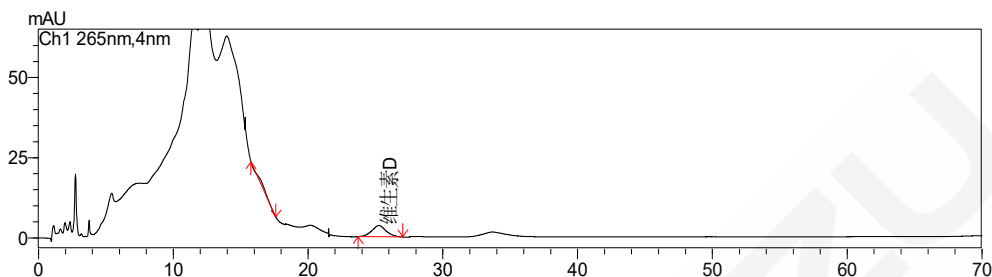


图 4. 前维生素 D 和维生素 D 供试品溶液第一维色谱图

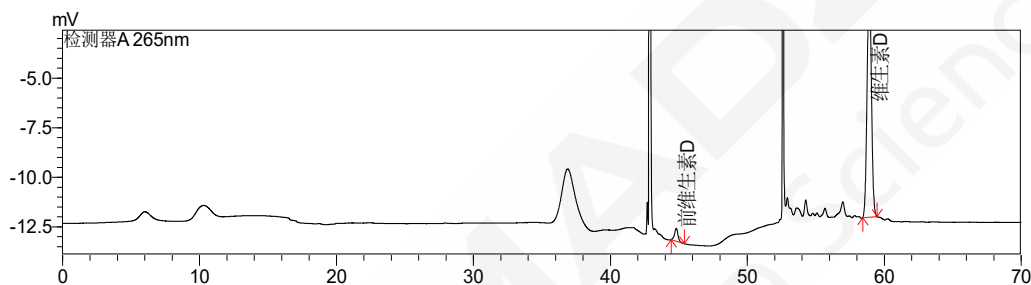


图 5. 前维生素 D 和维生素 D 供试品溶液第二维色谱图

表 3. 供试品溶液平行测定结果

重复次数	第一维色谱		第二维色谱	
	前维生素 D	维生素 D	前维生素 D	维生素 D
供试品溶液峰面积	1-1	-	11595	264553
	1-2	-	10785	268909
	2-1	-	10477	259241
	2-2	-	11446	260512

2.4 系统适用性结果考察

药典对前维生素 D、维生素 D 的分离度、理论塔板数等系统适用性参数作了要求。采用本方法对药典方法中的要求一一进行考察，结果见表 4。结果表明本方法实验结果符合药典标准要求。

表 4. 系统适用性考察结果

标准要求项目	标准要求	本方法结果
系统适用性-理论塔板数	第一维液相，理论板数按维生素 D 峰计算应不低于 2300	连续进样 5 针理论塔板数为 2511~2706，满足要求。
系统适用性-分离度	第一维液相色谱系统中前维生素 D 峰与维生素 D 的分离度应不小于 5	连续进样 5 针，采用 EP 方法计算，分离度为 5.122~5.239，满足要求。

系统适用性- 分离度	第二维液相色谱系统中维生素 D 峰与相邻峰的分离度以及前维生素 D 峰和相邻峰的分离度均应符合规定（一般大于 1.5）	对照品溶液和供试品溶液中第二维色谱图维生素 D 和前维生素 D 附近无明显干扰峰。
系统适用性- 重复性	0512 要求一般应小于 2.0%	第一维、第二维前维生素 D、维生素 D5 针重复进样 RSD 为 0.76%~1.46%，符合要求

3. 结论

采用岛津中心切割二维液相色谱系统，参考《中国药典》四部通则《0722 维生素 D 测定法》中第四法维生素 D 含量测定的方法，对维生素 D 含量进行检测，结果表明对照品溶液前维生素 D 和维生素 D 在第一维色谱和第二维色谱中均分离良好；配制 0.5 μg/mL 对照品溶液重复进样 5 次，前维生素 D 和维生素 D 在第一维和第二维系统中保留时间与峰面积 RSD 均低于 2%；维生素 D 制剂供试品溶液第一维色谱前维生素 D 与杂质难以分离，但切入第二维色谱后分离良好；其余系统适用性测试结果也均符合中国药典要求。结果表明，所建立的方法适用于应对《中国药典》四部通则《0722 维生素 D 测定法》中第四法中维生素 D 含量的测定。

在线 SPE-液相色谱联用快速检测人血清中维生素 A 含量

摘要: 本文使用岛津 On-line HPLC 生物样品分析系统 Co-Sense for BA, 建立了快速检测人血清中维生素 A 含量的测定方法。该方法在 5 min 内即可完成血清预处理样品在线净化、富集及检测, 维生素 A 采用内标法定量, 检出限可达 1 ng/mL; 在 10 - 1000 ng/mL 浓度范围内线性关系良好, 相关系数 r 大于 0.9998; 精密密度实验结果显示保留时间 RSD 小于 0.1%, 峰面积及测定浓度的 RSD 小于 0.9%, 仪器精密度优异; 低、中、高浓度加标样品回收率均在 95% - 105% 之间。实验结果表明, 该方法能快速稳定准确地测定人血清中维生素 A 的含量。

关键词: On-line SPE Co-Sense for BA 血清 维生素A 内标法

维生素A是维持人体正常代谢功能所必需的脂溶性维生素, 其缺乏或过量均可导致相应疾病。近年来的研究发现, 维生素A与儿童的生长发育及一些营养代谢疾病有密切关系。因此, 建立测定人血中维生素A含量对于与维生素相关疾病的临床预防、诊断、治疗具有重要的意义。

维生素A常用的检测方法是HPLC法, 其样品处理需采用蛋白沉淀结合液液萃取的方式进行, 所需样品量大、前处理复杂耗时, 成本较高, 且难以实现样品前处理自动化。

岛津On-line HPLC生物样品分析系统Co-Sense for BA是一套采用在线除蛋白及分析物捕集-分离-定量检测的二维液相色谱系统。本文使用上述分析系统, 建立了内标法快速检测人血清中维生素A含量的测定方法。该方法中, 血清样品仅需蛋白沉淀后即可进样检测, 在5 min内完成血清样品处理及检测, 所需样品量少, 样品预处理简单快速可自动化批量处理, 成本低廉, 操作简单, 适用于临床大规模样品检测需求。

1. 实验部分

1.1 仪器

生物样品分析系统 Co-Sense for BA, 配置信息及工作原理如下:

一 维 泵	: LC-20AT	二 维 泵	: LC-20AT
系统控制器	: CBM-20A	脱 气 机	: DGU-20A
自动进样器	: SIL-20A HT	柱 温 箱	: CTO-20A(内置2位6通阀)
检 测 器	: SPD-20A		

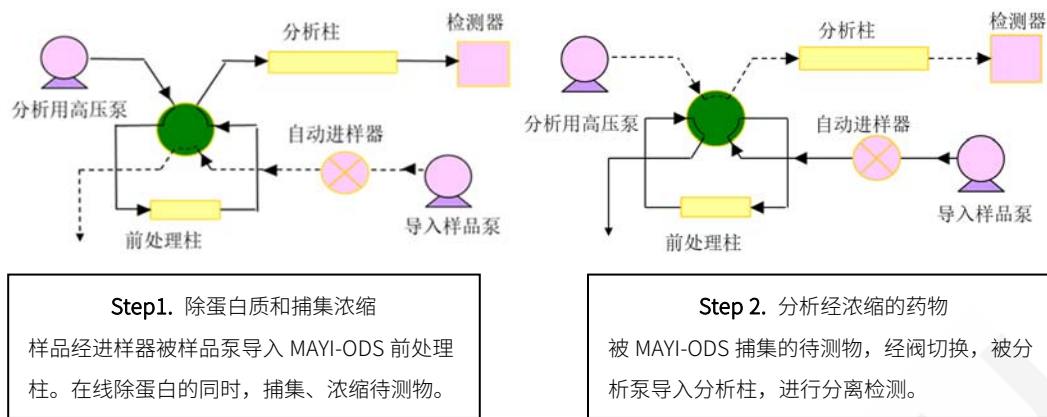


图 1. Co-Sense for BA 系统流路图及工作原理

1.2 分析条件

色 谱 柱	: Shim-pack GIST (100 mm × 3 mm I.D., 3 μm)		
	岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-30009-05		
SPE 前处理柱	: Shim-pack MAYI-ODS (10 mm × 4.6 mm I.D., 50 μm)		
	岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 228-40835-91		
流 动 相 A	: 50% 甲醇水	流 动 相 B	: 95% 甲醇水
流 速	: A-2 mL/min, B-0.8 mL/min	柱 温	: 40°C
波 长	: 325nm	进 样 体 积	: 50 μL
洗 脱 方 式	: 等度洗脱, 切换阀初始值为0, 时间程序如表1所示。		

表 1. 阀切换时间程序

时间(min)	单元	处理命令	值	操作状态
Initial	柱温箱	切换阀	0	除蛋白、捕集
1.00	柱温箱	切换阀	1	样品分析
4.00	柱温箱	切换阀	0	再平衡
5.00	控制器	Stop		

1.3 标准品溶液及加标血清样品配制

标准品中间液制备: 取 2000 μg/mL 维生素 A 母液, 用乙腈稀释至 50 μg/mL, 然后用乙腈逐级稀释制备浓度为 50, 125, 250, 500, 1250, 2500, 5000 ng/mL 的标准曲线中间溶液, 避光冷藏。

内标工作液制备: 取 2000 μg/mL 维生素 A 醋酸酯母液, 用乙腈逐级稀释至 200 ng/mL, 避光冷藏。

校准曲线工作液制备: 取上述标准曲线中间液 100 μL, 加 400 μL 内标工作液, 涡旋混匀, 制备浓度为 10, 25, 50, 125, 250, 500, 1000 ng/mL 校准曲线工作溶液, 避光冷藏。

加标工作液制备: 取 2000 μg/mL 维生素 A 母液, 用乙腈逐级稀释制备浓度为 2500, 5000, 10000 ng/mL 的加标工作溶液, 避光冷藏。

加标血清样品制备: 取 100 μL 血清样品, 各取上述加标工作液 10 μL, 涡旋 2 min 即得, 冷藏备用。

1.4 样品前处理方法

取血清及加标血清样品, 涡旋混匀, 精密吸取 100 μL, 置 1.5 mL 离心管中, 加入 400 μL 内标工作液, 涡旋混匀 2 min, 静置 1 min 后, 14000 rpm 离心 5 分钟, 取上清液进样分析。

2. 结果与讨论

2.1 检出限

配制 1 ng/mL 标准品溶液，进样检测，其色谱图如图 2 所示，以 ASTM 方式计算得到的 S/N 为 7.76，以此数据计算得到的检出限为 0.5 ng/mL。

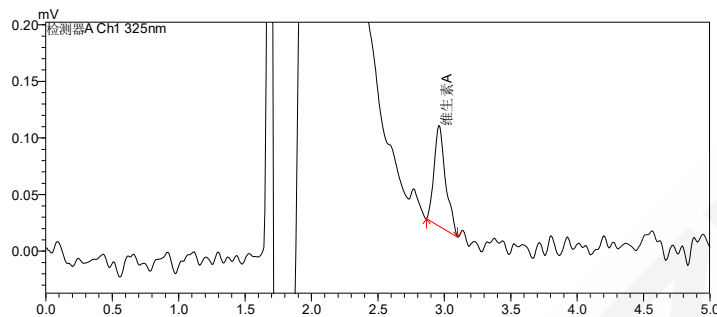


图 2. 1 ng/mL 标准品溶液色谱图

2.2 系统残留

进样 1000 ng/mL 标准品溶液后，进样空白甲醇溶剂，考察系统残留。结果显示，维生素 A 无明显系统残留。图 3 为甲醇溶剂与最低浓度校准品（10 ng/mL）对比图。

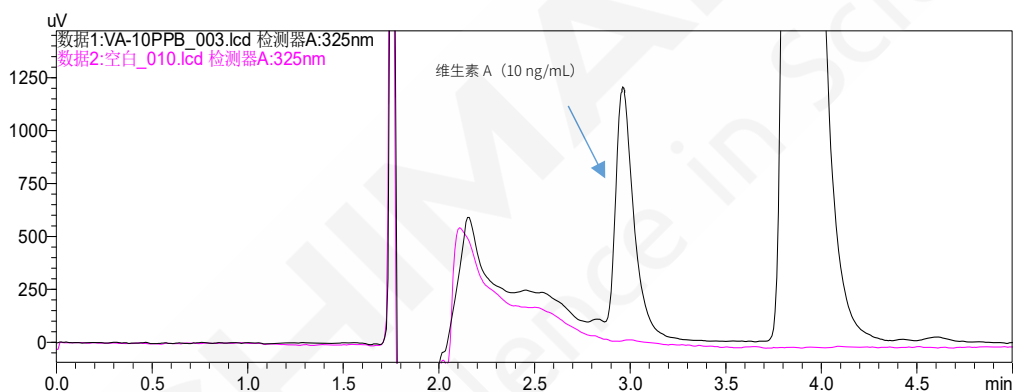


图 3. 甲醇溶剂与最低浓度校准品（10 ng/mL）对比图

2.3 线性关系

进样检测 10, 25, 50, 125, 250, 500, 1000 ng/mL 校准曲线溶液，结果如下所示。

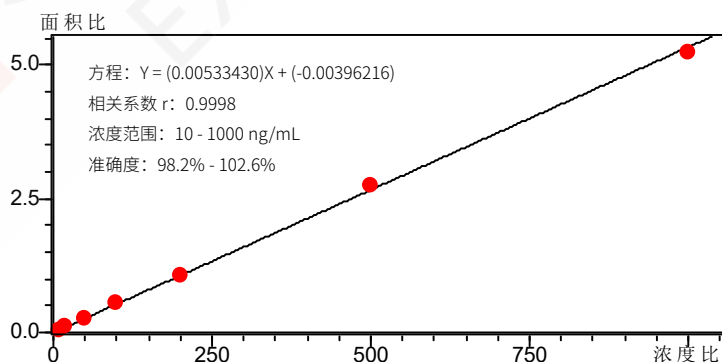


图 4. 标准曲线

2.4 精密度考察

使用血清样品，经前处理后，取上清液，重复进样 6 次，其结果如下表所示。

表 2 血清样品精密度实验结果 (n=6)

#	R.T.(min)	Area	Conc. (ng/mL)
1	2.956	63025	95.350
2	2.954	62873	95.762
3	2.953	62881	96.250
4	2.953	62193	94.310
5	2.954	61798	94.861
6	2.949	61821	95.337
平均值	2.953	62432	95.312
RSD(%)	0.08	0.90	0.71

2.5 加标回收率

使用血清样品及其配制的低、中、高浓度加标血清样品，经前处理后取上清液，重复进样 3 次，取平均值计算加标回收率，其结果如下表所示。

表 3. 加标回收率实验结果

#	血清	加标 50 ng/mL	加标 100 ng/mL	加标 200 ng/mL
测定浓度 (ng/mL)				
1	95.350	146.029	199.743	298.969
2	95.762	146.567	200.598	300.130
3	96.250	147.316	201.524	301.554
平均值 (ng/mL)	95.787	146.637	200.622	300.218
回收率 (%)	-	101.7	104.8	102.2
RSD (%)	0.47	0.44	0.44	0.43

2.6 样品测定

取人血清样品，按照1.4中样品前处理方法处理6份样品，上机检测，结果如下。

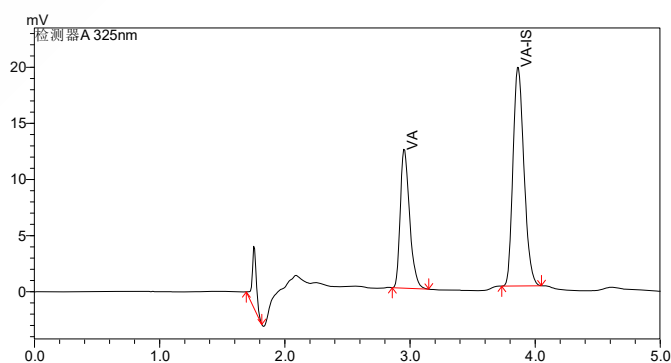


图 5. 血清样品维生素 A 及内标色谱图

表4 血清样品维生素A检测结果

样品	血样 1	血样 2	血样 3	血样 4	血样 5	血样 6	$\bar{x} \pm s$
含量 (ng/mL)	95.350	95.762	96.250	94.310	94.8610	95.3370	95.312±0.677

3. 结论

本文使用岛津生物样品分析系统Co-Sense for BA，建立了内标法快速检测人血清中维生素A含量的测定方法。该方法在5 min内即可完成血清样品处理及检测，方法验证结果表明，该方法灵敏度高、稳定性好，可以简便快速准确地测定人血清中维生素A的含量，可满足自动快速高通量检测的临床实际需求，适用于大规模临床样本的检测。

附录 分析应用案例快速索引

样品	检测项目	参考标准	使用仪器	页码
食品	婴幼儿配方奶粉中VA和VE	国标《食品中维生素A和E的测定》（征求意见稿）	HPLC	8~13
	植物油中维生素E	GB 5009.82-2016《食品中维生素A、D、E的测定》	HPLC	14~17
	食品中维生素K2	GB 5009.290-2023《食品中维生素K2的测定》	HPLC	21~24
	基于LC-40的中心切割二维液相色谱系统及其在维生素ADE分析中的应用	/	2DLC和OS-2DLC	26~34
	婴幼儿配方奶粉中维生素ADE	/	OS-2DLC	35~40
	婴幼儿配方奶粉中维生素ADE	/	2DLC	41~44
	乳制品中维生素D2和D3	GB 5009.296-2023《食品中维生素D的测定》	2DLC	45~49
	婴幼儿奶粉中维生素ADE	/	2DLC	50~54
	米粉中维生素ADE	/	2DLC	55~60
生物样品	人血清中维生素A	/	Co-Sense for BA	70~74
药品	原料药中维生素K1及顺式异构体	现行《中国药典》中“0512 高效液相色谱法”	HPLC	18~20
	维生素D制剂中VD	现行《中国药典》中“0722 维生素D测定法”	2DLC	61~64
	药品中维生素D	现行《中国药典》中“0722 维生素D测定法”	2DLC	65~69

分析测试仪器客服热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

本公司在此对中国地图标注信息的行为仅限于表明本公司在中国各地分支机构的区域分布状况, 不作为任何测绘、绘制或其他用途。

本产品资料所宣传的内容, 以本版本为准, 资料中的试验数据除注明外均为本公司的试验数据。本资料所有信息仅供参考, 如有变动恕不另行通知。

岛津企业管理(中国)有限公司 / 岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

北京

北京市朝阳区朝外大街16号中国人寿大厦14层
邮政编码: 100020
电话: (010)8525-2310/2312 传真: (010)8525-2531

沈阳

沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11层
邮政编码: 110016
电话: 024-23255577 传真: (024)2325-5577

西安

西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501
邮政编码: 710065
电话: 029-62737878 传真: (029) 6273-7879

乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14H座
邮政编码: 830002
电话: (0991)230-6271/6272 传真: (0991)230-6273

郑州

郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室
邮政编码: 450007
电话: (0371)8663-2981/2983 传真: (0371)8663-2982

上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫慧享城B2栋
邮政编码: 200233
电话: (021)3419-3888 传真: (021)3419-3666

成都

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞·创意成都写字楼
邮政编码: 610063 B座12层
电话: (028)8619-8421/8422 传真: (028)8619-8420

南京

南京市鼓楼区汉中路2号亚太商务楼27层B座
邮政编码: 210005
电话: (025)8689-0258 传真: (025)8689-0237

重庆

重庆市渝中区长滨路2号来福士A座601
邮政编码: 400011
电话: (023)6380-6057 传真: (023)6380-6551

武汉

武汉市武昌区临江大道96号武汉万达中心31层3112室
邮政编码: 430060
电话: (027) 5908-0488 传真: (027) 5908-0470

广州

广州市天河区高唐路230号广电智慧大厦
邮政编码: 510656
电话: (020) 3718-3888 传真: (020) 3718-3804

昆明

昆明市青年路432号天恒大酒店 908室
邮政编码: 650021
电话: (0871)6315-2986/2987 传真: (0871)6315-2991

深圳

深圳市南山区粤海街道高新南七道18号高新技术产业园区R3-B座一楼
邮政编码: 518057
电话: (0755)8340-2852 传真: (0755)8389-3100

长沙

湖南省长沙市芙蓉区解放西路188号国金中心T1大楼3115室
邮政编码: 410005

香港

香港九龙尖沙咀海洋中心1028室
SUITE 1028,OCEAN CENTRE,HARBOUR CITY,
TSIM SHA TSUI,KOWLOON,HONG KONG
电话: (00852)2375-4979 传真: (00852)2199-7438

株式会社 岛津制作所

604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1
电话: 81(75)823-1111 传真: 81(75)811-3188
URL: <http://www.shimadzu.com>

本书中所记载的公司名称、产品服务名称及商标均为株式会社岛津制作所
的注册商标或商标。本书中有未标明 TM 标志和 © 标志之处。
本书中所使用的其他公司的商号、商标的所有权非株式会社岛津制作所所有。