

## 固相支撑液液萃取 (SLE) 结合 LC-MS/MS 法定量测定婴儿配方奶粉中脂溶性维生素

Lai Kit Yee<sup>1</sup>, Xin Jie<sup>1</sup>, Zhaoqi Zhan<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> 岛津新加坡

### 特点描述

- ◆ 建立了固相支撑液液萃取 (SLE) 的样品制备方法, 采用 LCMS-8045 定量测定婴儿配方奶粉中的脂溶性维生素 (A1、D3、E 和 K1)。
- ◆ 通过分析 FAPAS QC 质控样品中的脂溶性维生素, 验证并确认了此方法的可靠性。分析结果表明该方法的准确度和精密度均在可接受范围。

### 简介

脂溶性维生素分为四类: 维生素 A、D、E 和 K, 它们在人体具有重要作用, 如视觉功能 (维生素 A)、钙吸收 (维生素 D)、细胞膜抗氧化 (维生素 E)、凝血功能 (维生素 K) 等方面。婴儿配方奶粉作为婴儿的主要食物来源, 必须能够提供足够的维生素。由于萃取过程中脂溶性维生素的复杂性和不稳定性, 其定量仍然具有挑战性。因此, 萃取是测定牛奶样品中脂溶性维生素的关键步骤。[1] 在本应用报告中, 采用固相支撑液液萃取 (SLE) 技术, 结合 MRM 定量的方法, 采用 LCMS-8045 (配置 APCI 离子源) 定量测定婴儿配方奶粉中的脂溶性维生素。

\*FAPAS: “判定食品检测分析实验室能力的评估体系”, 由英国食品和环境研究机构组织的食品和水检测的能力验证。

### 实验部分

#### 试剂和标准品

视黄醇、邻苯三酚、氢氧化钾和丁羟甲苯购自 Sigma-Aldrich。脂溶性维生素试剂盒 (含维生素 D3、维生素 E 和维生素 K1) 购自 AccuStandard。己烷和乙醇使用 HPLC 级试剂。在由 LCMS 级甲醇和 Milli-Q 水制备的流动相中, 使用 LCMS 级甲酸作为添加剂。

#### LC-MS/MS 条件

LCMS-8045 的分析条件见表 1。

4 种化合物的 MRM 参数 (定量离子和参比离子) 及优化的碰撞能 (CE) 见表 2。

表 1 LCMS-8045 的分析条件

LC 条件 (Nexera)	
色谱柱	Shim-pack™ GIST C18 column (2.1 x 100 mm, 3 μm) P/N: 227-30008-05
流速	0.4 mL/min
流动相	A: 0.1% 甲酸的 Milli-Q 水溶液 B: 0.1% 甲酸甲醇溶液
LC 程序	梯度洗脱, 15 min
柱箱温度	40°C
进样量	10 μL
梯度程序	B%: 80% (0.5 min) → 100% (5-12 min) → 80% (12.01-15 min)
MS 条件 (LCMS-8045)	
接口	APCI
接口温度	350°C
DL 温度	250°C
加热模块温度	200°C
雾化气	3 L/min
干燥气流量	5 L/min
模式	MRM, 正离子模式

表 2 MRM 参数和优化的 CE

名称	定量离子	CE (V)	参比离子	CE (V)
维生素 A1	269.3> 92.9	-24	269.3>107.2	-18
维生素 D3	385.4>259.1	-14	385.4>367.2	-11
维生素 E	431.5>165.2	-21	431.5>137.3	-43
维生素 K1	451.5>187.1	-25	451.5>57.2	-35

#### 样品处理

样品制备流程见图 1。按照流程制备质控样品。

将样品上样至 SLE 柱前，调节 pH 值很重要，因为其将影响脂溶性维生素在柱中的保留。实验结果表明，样品 pH 值在 6-7 左右时，脂溶性维生素有良好的回收率。

## 结果和讨论

### LC-MS/MS 条件优化

在 APCI 正离子模式下，对 4 种非极性脂溶性维生素进行 MRM 优化。使用 C18 色谱柱对脂溶性维生素进行分离。将流动相 B 的初始百分比设定为 80%，以缩短总分析时间并获得更尖锐的色谱峰。纯溶剂中 50 ng/mL 的混合标准溶液 MRM 色谱图见图 2。

皂化
<ul style="list-style-type: none"> <li>取 0.1 g 奶粉，加入 1.5 mL Mili-Q 水，超声处理。</li> <li>加入 2 mL 2% 邻苯三酚乙醇溶液和 1 mL 50%KOH。</li> <li>混合过夜。</li> </ul>
pH 值调节 (目标 pH 值约为 6-7)
<ul style="list-style-type: none"> <li>加入 250 <math>\mu</math>L 甲酸，混匀。</li> <li>将样品溶液的 pH 值调节至约 6-7。</li> </ul>
萃取
<ul style="list-style-type: none"> <li>将所有样品溶液上样至 SLE 柱中，等待 5 min。</li> <li>加入 8 mL 含 0.1%BHT 的己烷溶液，使其在重力作用下流出。</li> <li>加入 8 mL x 2 己烷。</li> <li>将洗脱液收集在玻璃管中。</li> <li>抽真空 10-30 秒以完成洗脱。</li> <li>在温和的氮气流下吹干洗脱液。</li> </ul>
复溶和过滤
<ul style="list-style-type: none"> <li>用 0.5 mL 甲醇复溶。</li> <li>用 0.22 <math>\mu</math>m 尼龙滤膜过滤至 1.5 mL 棕色小瓶中。</li> <li>采用 LC-MS/MS 进行分析。</li> </ul>

图1 采用固相支撑液萃取 (SLE) 法制备婴儿配方奶粉样品流程图

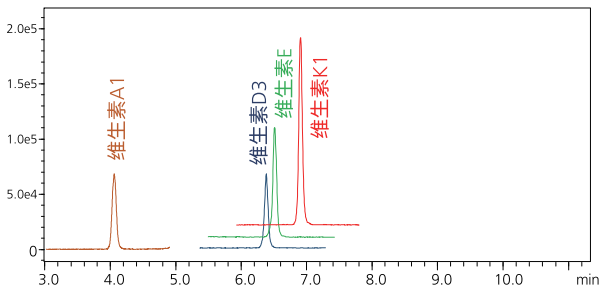


图2 50 ng/mL 混合标准溶液的 MRM 色谱图

### 校准曲线和灵敏度

使用 10-400 ng/mL 的混合标准溶液建立校准曲线 (图 3)。所有维生素均获得良好的线性关系， $R^2$  值大于 0.999。通过连续 6 次进样 50 ng/mL 混合标准溶液来评价重复性。线性、LOD、LOQ 和 %RSD 结果见表 3。

表 3 脂溶性维生素的线性、LOD、LOQ 和 %RSD

维生素	RT (min)	$R^2$	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	%RSD 峰面积 (n=6)	%RSD RT (n=6)
A1	4.090	0.9998	2.8	8.5	0.44	0.22
D3	6.499	0.9997	2.1	6.3	3.41	0.06
E	7.025	0.9998	1.6	4.8	0.73	0.03
K1	8.561	0.9998	2.5	7.4	2.05	0.02

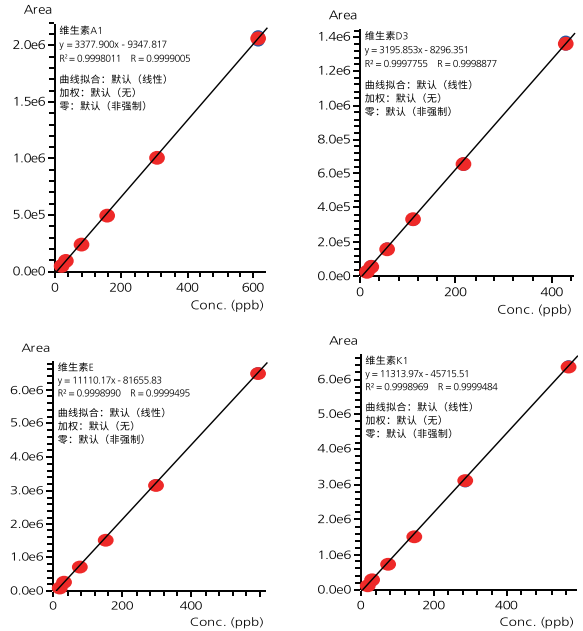


图3 维生素 A1、D3、E 和 K1 在 10-600 ng/mL 范围内的校准曲线

### 质控样品 (QCM) 的测定

应用所建立的方法对 FAPAS 质控样品 (T21125QC) 进行分析 [3]，以确定方法的可靠性。对 QC 样品进行了 6 次独立分析。QC 样品的分析结果总结见表 4。6 次分析结果的 %RSD 小于 10%，表明此方法的精密度可接受。

表 4 QC 样品 (T21125QC) 6 次分析结果

样品	A1 ( $\mu$ g/100g)	D3 ( $\mu$ g/100g)	E ( $\mu$ g/100g)	K1 ( $\mu$ g/100g)
QC1	436.8	10.2	22.1	31.4
QC2	450.0	9.7	22.1	33.0
QC3	444.1	9.1	21.3	39.4
QC4	436.7	8.9	21.6	36.0
QC5	468.3	9.3	22.6	37.4
QC6	455.7	8.7	21.9	36.0
%RSD	<b>2.3</b>	<b>4.8</b>	<b>1.7</b>	<b>6.9</b>

6 次分析的定量结果均在 QC 样品的可接受范围内。6 次分析的平均浓度、赋值及其可接受范围见表 5。

表 5 QC 样品 T21125QC 中维生素 A1、D3、E 和 K1 的定量结果、赋值及可接受范围 (单位: ug/100 g)

维生素	平均浓度值 (n=6)	赋值	% 回收率	可接受范围
A1	448.6	443	101.3	355-532
D3	9.3	10.6	87.8	7.7-13.5
E	22.0	21.6	101.8	17.3-25.9
K1	35.5	40.6	87.4	25.7-55.5

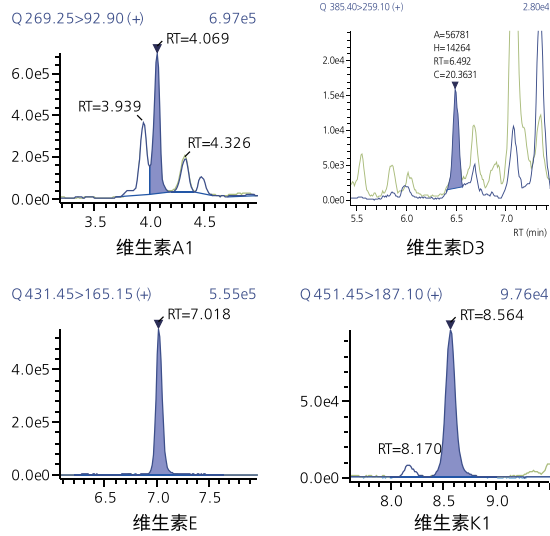


图4 QC样品中维生素A1、D3、E和K1的MRM色谱图

评价了方法的日间重复性。保留时间和浓度的 %RSD 见表 6。维生素 A1 和维生素 E 浓度的日间重复性小于 10%，维生素 D3 和维生素 K1 浓度的日间重复性小于 15%。

表 6 QC 样品 T21125QC (n = 6x2 天) 中维生素 A1、D3、E 和 K1 的 RT 和浓度的日间 %RSD

维生素	平均浓度, μg/100g	%RSD, RT	%RSD, 浓度
A1	437.9	0.33	3.5
D3	10.0	0.09	10.8
E	21.8	0.09	3.6
K1	38.0	0.11	14.9

## 结论

建立了 LC-MS/MS 法定量测定婴儿配方奶粉中脂溶性维生素 (维生素 A1、D3、E 和 K1) 的方法。采用固相支撑液萃取 (SLE) 法制备样品。在 10-400 ng/mL 范围内,  $R^2 > 0.999$ , 线性良好。QC 样品 (FAPAS) 的分析结果证实, 在不使用内标物的情况下, 此方法的准确度和精密度也均在可接受的范围。

## 参考文献

1. E. Karrar, Isam A.Mohamed Ahmed, M. F. Manzoor,W.W., F.Sarpong, X.Wang, Food Chemistry 373 (2022) 131436
2. Y.L Chew, Shimadzu Appl. News AD-0208
3. FAPAS QC Material Data Sheet (T21125QC)

## 致谢

我们要感谢 Teh Bo Yan 在岛津实习期间参与了这项工作。

岛津应用云



Nexera 和 Shim-pack 是株式会社岛津制作所在日本和其他国家的商标。



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>

用户服务热线电话: 800-810-0439  
400-650-0439

免责声明:

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;  
\* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。  
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2022 年 4 月