

# 在线固相萃取 - 二维液相色谱法测定婴幼儿配方奶粉中维生素 A、D 和 E

LC-411

**摘要：** 本文建立了一种采用在线固相萃取 - 二维液相色谱法同时测定配方奶粉中维生素 A、D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub> 和维生素 E 的 5 种异构体 ( $\alpha$ -生育酚、 $\beta$ -生育酚、 $\gamma$ -生育酚、 $\delta$ -生育酚、 $\alpha$ -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 ( $\alpha$ -生育酚、 $\beta$ -生育酚、 $\gamma$ -生育酚、 $\delta$ -生育酚、 $\alpha$ -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。

## 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
脱气机：	DGU-405×3	检测器：	SPD-40×2
输液泵：	四元泵 ×3 (SPE 泵：LC-40D，一维、二维泵：LC-40D XR×2)		
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.118		

### 1.3 分析条件

液相色谱条件:

固相萃取柱 : Oasis HLB Direct Connect HP (2.1 mm I.D. × 30 mm L., 20 μm)

一维色谱柱 : Hypersil GOLD PFP(250 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm)

二维色谱柱 : Shim-pack Velox SP-C18(150 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm, P/N:227-32006-03, 岛津(上海)实验器材有限公司)

二维捕集柱 : Shim-pack GIST AQ-C18 (10 mm × 4 mm I.D., 5 μm, P/N:227-30763-02, 岛津(上海)实验器材有限公司)

SPE 流动相 : A 相 - 水; B 相 - 甲醇

一维流动相 : A 相 - 水; B 相 - 甲醇

二维流动相 : A 相 - 水; B 相 - 乙腈

柱 温 : 35°C

进 样 量 : 40 μL

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, 洗脱程序见表 2、表 3

检 测 波 长 : 维生素 A 325 nm; 维生素 E 294 nm; 维生素 D 264 nm

表 1 在线固相萃取程序

时间 (min)	流速 (mL/min)	萃取液 A (%)	萃取液 B (%)
0.00	0.3	70	30
0.01	1.2	70	30
2.00	1.2	70	30
2.50	1.2	50	50
4.00	1.2	50	50
4.01	0.4	10	90
10.00	0.4	10	90
11.00	0.3	5	95
20.00	0.3	5	95
21.00	0.3	70	30

表 2 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 (%)
0.00	0.8	80	20
10.00	0.8	80	20
10.01	1.0	20	80
26.00	1.0	10	90
29.00	1.0	10	90
29.10	1.0	0	100
32.50	1.0	0	100
32.60	1.0	80	20

表 3 二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 (%)
0.00	0.3	6	94

24.00	0.3	6	94
24.50	1.0	6	94
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  $\text{mg}/\text{mL}$  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。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 标准溶液色谱图

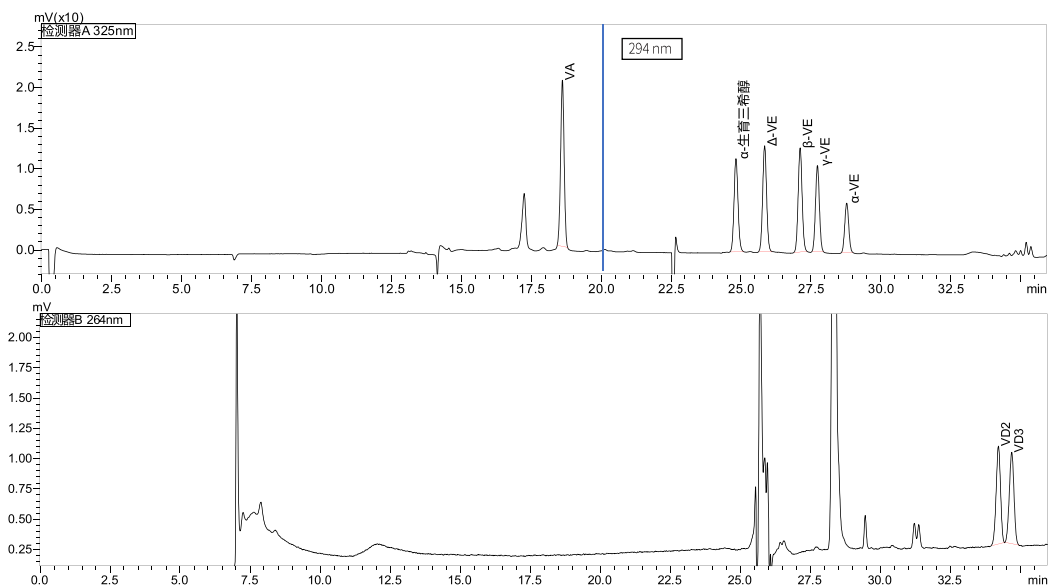


图 1 VA (325 nm、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、VE(294 nm、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、VD (264 nm、100  $\text{ng}/\text{mL}$ ) HPLC 色谱图

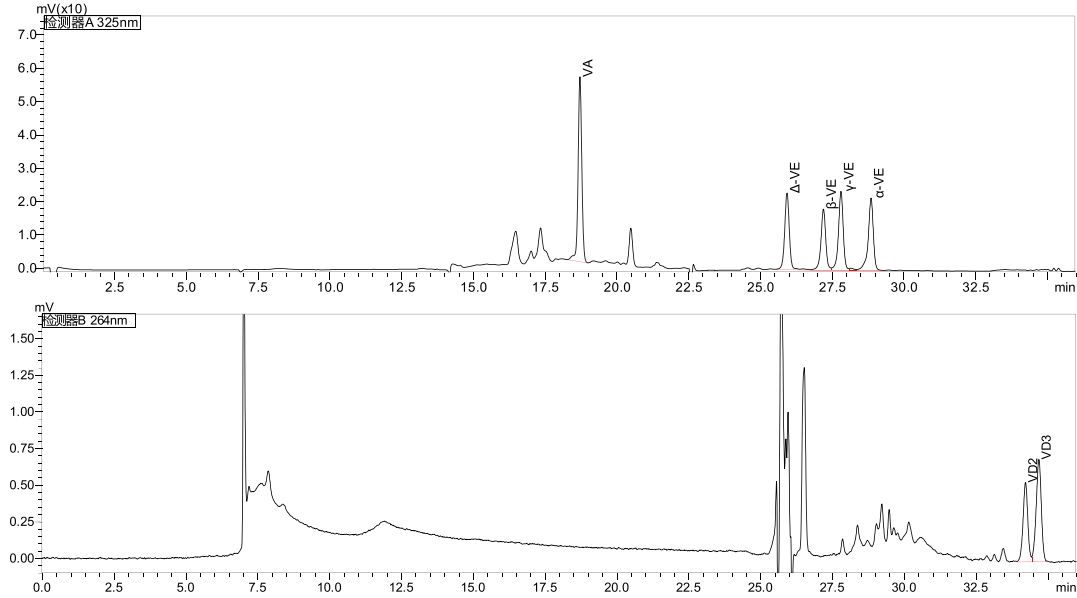
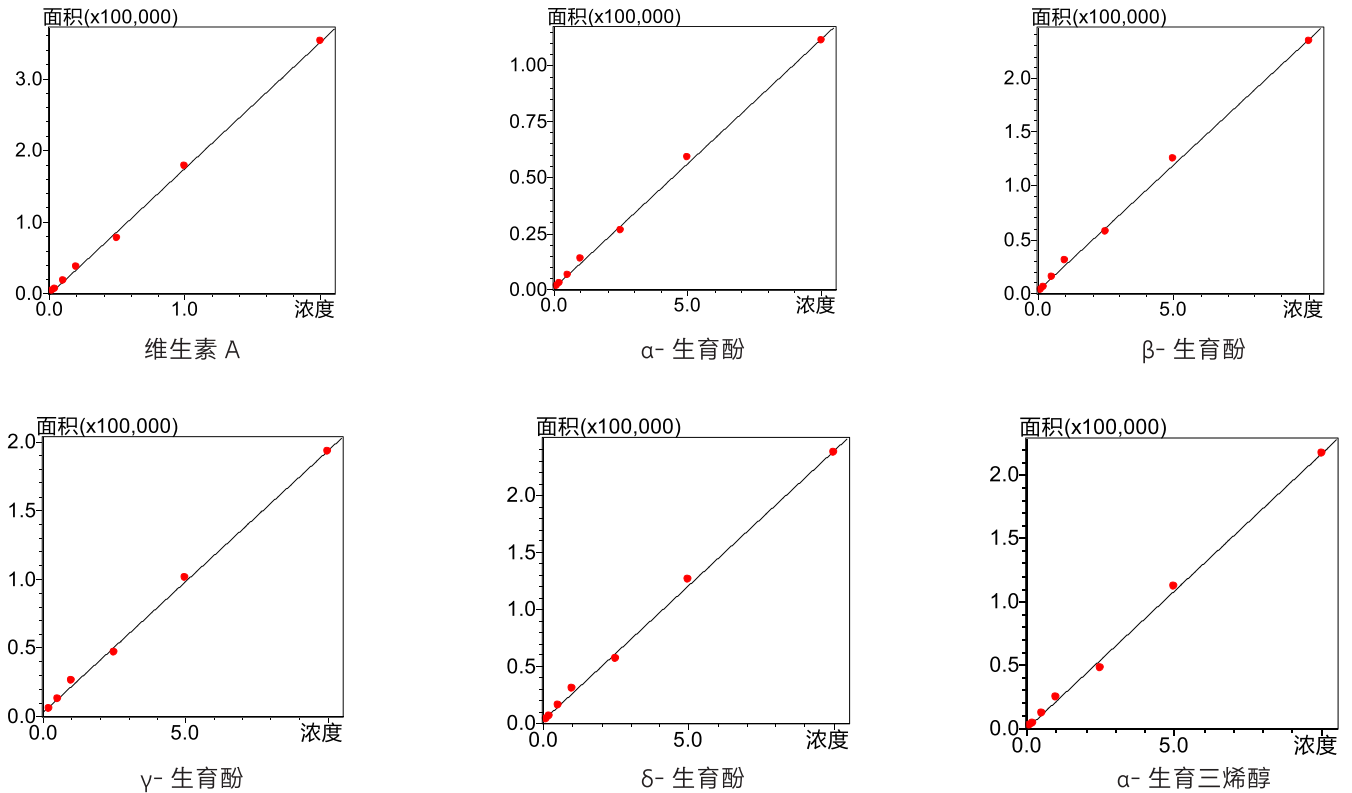


图 2 婴幼儿配方奶粉基质色谱图

## 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。



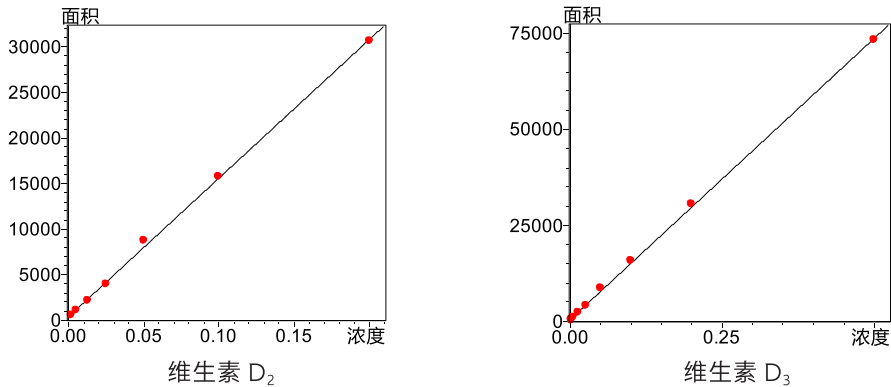


图3 维生素A等8种组分校准曲线

表5 校准曲线参数

序号	化合物	线性范围 (μg/mL)	相关系数 r	定量限 (μg/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 <sub>2</sub>	0.002~0.2	0.9994	0.001
8	维生素 D <sub>3</sub>	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 (μg/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 <sub>2</sub>	0.02	0.03	2.24
8	维生素 D <sub>3</sub>	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	$\alpha$ -生育酚	13.4	5.0	98.1	1.29	10.0	99.2	1.78
3	$\beta$ -生育酚	N.D.	5.0	100.1	3.10	10.0	90.5	1.64
4	$\gamma$ -生育酚	2.60	5.0	92.3	1.54	10.0	95.1	2.35
5	$\delta$ -生育酚	0.702	5.0	95.1	1.89	10.0	96.2	1.28
6	$\alpha$ -生育三烯醇	N.D.	--	--	--	--	--	--
7	维生素 D <sub>2</sub>	N.D.	0.02	86.1	1.92	0.04	90.2	2.30
8	维生素 D <sub>3</sub>	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。

## ■ 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、稳定的在线固相萃取 - 二维液相色谱方法。方法验证表明该方法具有出色的回收率 (>80%) 和精密度 (RSD < 5%)，满足实验室快速、高效的检测需求。

岛津应用云

