

在线柱切换-反相液相色谱法测定婴幼儿配方奶粉中维生素A、D和E

LC-413

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。

■ 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 (LPGEx2)		
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(150 x 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 x 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 x 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 μ L
 柱温：35 $^{\circ}$ 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 μ g/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 μ g/mL，维生素D₃浓度分别为0.001、0.0025、0.005、0.01、0.025、0.05、0.1 μ g/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 μ g/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0.45 μ m微孔滤膜，待测。

■ 结果与讨论

2.1 标准溶液色

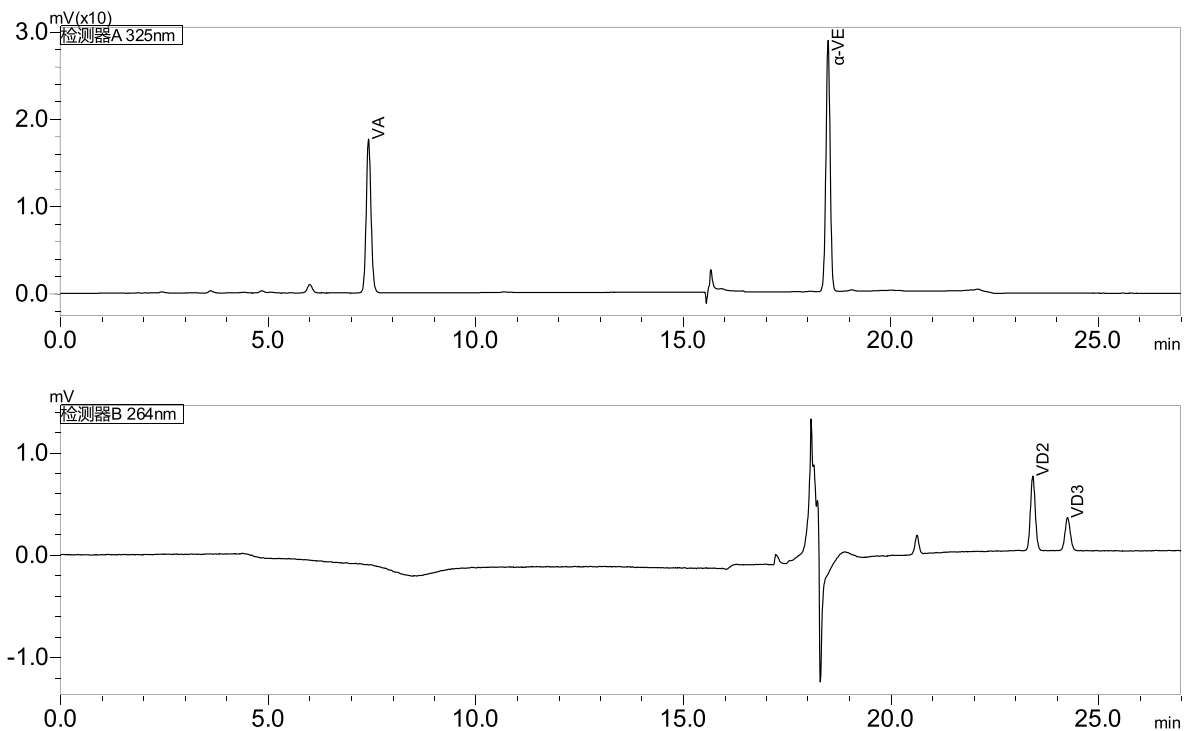


图1 标准品溶液 HPLC 色谱图

VA (325 nm、0.4 μg/mL)、VE(294 nm、4 μg/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 μg/mL。

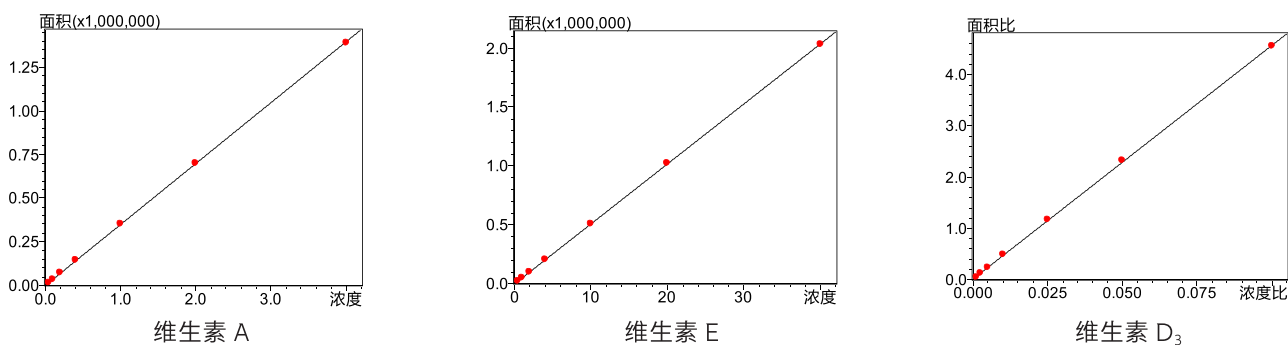


图2 维生素 ADE 校准曲线

表4 校准曲线参数

序号	化合物	线性范围 (μg/mL)	相关系数 r	定量限 (μg/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 (μg/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 3 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。

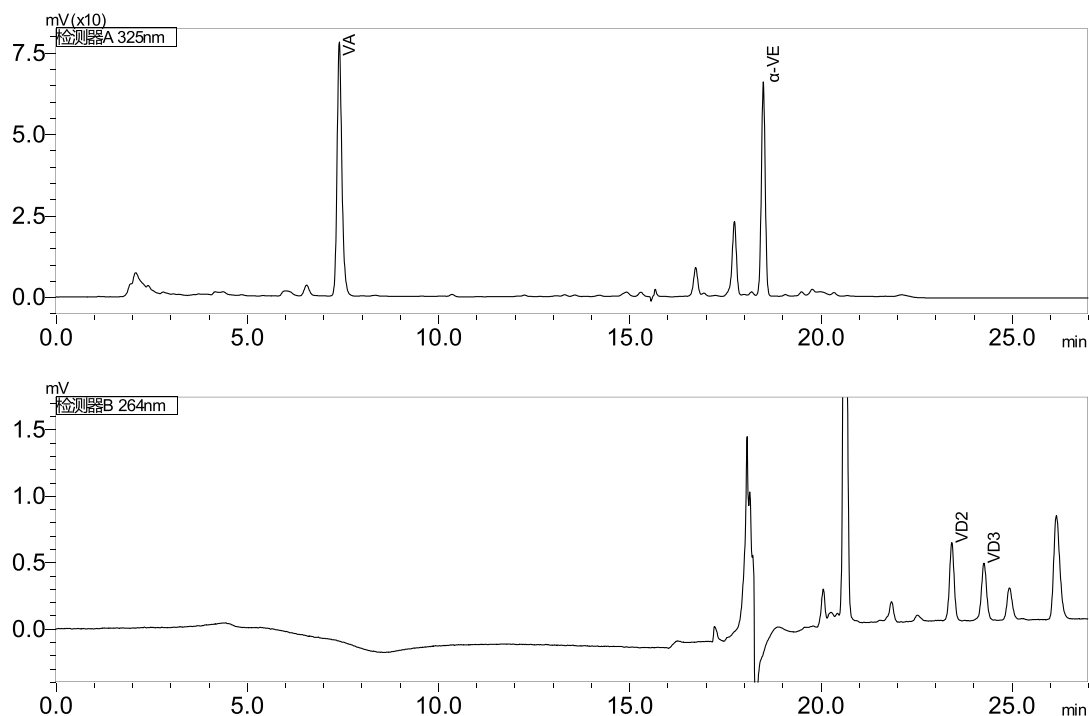


图 3 某婴幼儿配方奶粉基质色谱图

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/100 g)	RSD %	加标 1			加标 2		
				加标量 (mg/100 g)	回收率 %	RSD %	加标量 (mg/100 g)	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

■ 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。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

