

# 在线二维柱切换-高效液相色谱法同时测定 婴幼儿强化奶粉中维生素A、D<sub>3</sub>、E的含量

张艳海 金燕  
赛默飞（中国）有限公司

**关键词：**高效液相色谱，维生素D，维生素A，维生素E，二维色谱，婴幼儿配方奶粉

**Key words:** Two-dimensional separation, vitamin D, vitamin A, vitamin E, high performance liquid chromatography, dual gradient system, Fortified Infant formulae

## 引言

婴幼儿配方奶粉又称为母乳化奶粉，是一种以牛乳（或其他动物乳）为主要原料，通过调整成分模拟母乳，可供婴幼儿生长和发育所需要的一种人工食品。根据国家标准中奶粉营养成分有关规定，维生素指标中必须强化的包括维生素A、维生素D和维生素E及其他水溶性维生素等；其中维生素D在实际母乳中含量极低，约为4-40 IU（国际单位）/L（0.1-1.0 $\mu$ g/L），主要对应形式为维生素D<sub>3</sub>和25-OH维生素D<sub>3</sub>，因此通常将维生素D<sub>3</sub>制成水可分散性的微粒形式，添加到婴幼儿强化奶粉中。关于奶粉中维生素A、D和E的测定方法，文献报道较多，其中高效液相色谱法是常用的分析方法。由于样品基质复杂，三种维生素对温度、光照、氧气和极端的pH值较敏感，且多数经过包被后再添加到食品基质中，因此分析方法常包括皂化破壁、有机溶剂萃取，浓缩和净化等步骤，在现行标准分析方法中需采用正相制备色谱、反相分析色谱两套仪器，分别进行净化制备和分析，前处理过程极其繁琐，大大影响样品分析效率。

本文首次采用在线二维柱切换-高效液相色谱紫外检测法，样品经过皂化、萃取后，直接进样，同时完成维生素A、D和E的分析测定，提高了方法的准确性和样品分析效率。

## 测试条件

仪器：UltiMate DGP 3600系列，包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵；带有两个六通阀的柱温箱；紫外检测器。连接图见图1。

一维分析柱：Acclaim 120 C18  
(3.0mm $\times$ 150mm $\times$ 3 $\mu$ m)

二维分析柱：Acclaim 120 PA II C18  
(4.6mm $\times$ 150mm $\times$ 3 $\mu$ m)

柱温：30 $^{\circ}$ C

检测波长：0-5min, 325nm；5-12min, 296nm；  
12-30min, 263nm

进样量：50 $\mu$ L

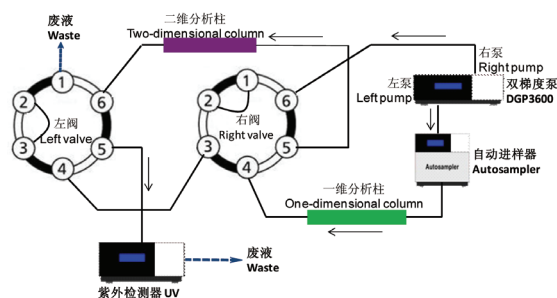


图1 仪器连接图

流速：0.8mL/min

流动相组成：

一维分析泵：A，乙腈；B，甲醇；C，甲醇-四氢呋喃（80：20）

二维分析泵：A，乙腈；B，异丙醇

流速：0.8mL/min

梯度洗脱程序：见表1。

## 样品前处理

精密称取奶粉10g（液态奶50mL），于250mL锥形瓶中，加入30mL热水使溶解（液态奶不需加入），再加入15g/L的维生素C乙醇溶液100mL，再加入55%的氢氧化钾水溶液25mL，磁力搅拌45min，温度53 $^{\circ}$ C。将皂化液移至500mL分液漏斗中，以石油醚萃取3次，每次100mL，合并萃取液，萃取液以水洗涤3-5次，至中性（pH试纸测试），收集石油醚层，经过无水硫酸钠脱水。低温减压回收石油醚，至1-2mL时转移至10mL棕色瓶中，氮气吹干，再以3-5mL甲醇使溶解并转移至10mL量瓶中，甲醇稀释至刻度，摇匀，待用。未用完溶液放入4 $^{\circ}$ C冰箱保存。

表1 一维分离和二维分离梯度程序

Table 1 Gradient programs of one-dimensional and two-dimensional separation

一维分析泵 One-dimension analytical pump				二维分析泵 Two-dimension analytical pump		
时间 (min) Time (min)	A%	B%	C%	时间 (min) Time (min)	A%	B%
0	60	40	0	0	100	0
15	60	40	0	9	100	0
15.1	0	0	100	25	80	20
25	0	0	100	28	80	20
25.1	60	40	0	28.1	100	0
30	60	40	0	30	100	0

## 结果和讨论

### 标准品和样品色谱图

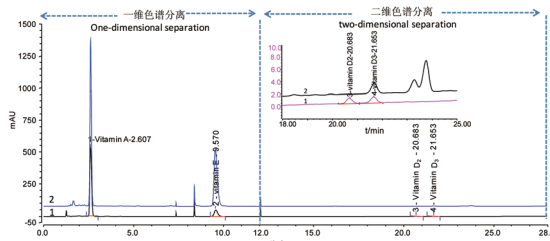


图2 采用二维柱切换法测定维生素A、D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub>和E的分离谱图 (1 标准品, 2 样品)

### 方法学考察

#### 方法线性范围、定量限、精密度考察

分别精密量取维生素D<sub>3</sub>、维生素A和E的标准工作溶液适量, 至10 mL棕色量瓶中, 制成系列混合标准品溶液, 再分别精密加入等量的浓度为10 mg/L的维生素D<sub>2</sub>的内标溶液0.5 mL, 甲醇稀释至刻度, 进样50 μL, 以浓度为横坐标, 维生素D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>峰面积比值为纵坐标, 做线性回归, 结果维生素D<sub>3</sub>在20~2000 μg/L的范围内, 相关系数r为0.9995; 维生素A在1.71~855 mg/L的范围内, r为0.9979; 维生素E在4.12~1030 mg/L范围内, r为0.9998。其中维生素D<sub>3</sub>最低定量限为20 μg/Kg, 相当于800 IU/Kg。

取已知混合标准品溶液, 连续进样6次, 结果维生素D<sub>2</sub>, 维生素D<sub>3</sub>的峰面积的RSD分别为1.94%和2.82%, 维生素E峰面积的RSD为0.44%, 维生素A峰面积的RSD为0.43%, 表明方法的精密度较好。

### 回收率实验

分别取某品牌婴幼儿配方奶粉样品3份, 每份10g, 精密称定, 分别精密加入浓度为10 mg/L的维生素D<sub>2</sub>的内标溶液0.5 mL, 再分别加入维生素A、D<sub>3</sub>、E的标准品适量, 按照2.4项下处理样品并测定维生素A、D<sub>3</sub>、E的总量, 计算回收率。结果维生素A、D<sub>3</sub>、E的平均回收率分别为114%、100.68%和93.98%, 其相应的RSD分别为0.16%, 2.9%和0.58%。

### 样品含量测定结果

分别取各品牌婴幼儿和儿童配方奶粉10 g, 精密称定, 按照2.4项下的样品溶液制备方法制备样品溶液, 测定维生素A、D<sub>3</sub>和E的含量, 结果见表3。

## 讨论

### 二维色谱流路构建和阀切换时间的确定

维生素A、E在配方奶粉中含量较高, 样品经过皂化萃取后, 可直接在一维色谱柱中实现分离。维生素D含量较低, 且样品基质干扰较大, 原标准方法需经过正相制备色谱的净化, 再将含有维生素D的馏分蒸干定容后, 再在反相色谱上进行分析。本文采用二维色谱分离的中心切割法, 样品在一维色谱柱实现初步分离后, 将含有维

表3 样品含量测定结果

Table 3 Contents of vitamins A, E and D3 in samples

样品名称 Sample name	维生素A (mg/Kg)		维生素E (mg/Kg)		维生素D3 (μg/Kg)	
	标示量 Marked value	测得量 Found value	标示量 Marked value	测得量 Found value	标示量 Marked value	测得量 Found value
奶粉-1	5.70	6.16	40	40.9	79	84
奶粉-2	5.91	6.49	87	83	84	76
奶粉-3	4.50	5.04	150	132	80	70
AD钙奶	0.06	0.065	-	-	17	14.5

生素D的馏分切割至二维色谱柱中进行分离。系统连接图见图1。由于外界因素影响,维生素D在一维色谱分离中的保留时间会有微小波动,因此切割的时间窗太窄容易造成目标物的损失,时间窗太宽,会使切换到二维分离柱的溶剂体积过大,对二维分离产生溶剂效应,本实验通过连续进样,考察了保留时间波动范围,确定了最终的切换时间。在一维色谱分离中,维生素A、E在12 min内即可完成分离过程,而在二维色谱分离中维生素D的保留时间约为21~22 min,因此方法采用两位置六通阀实现了色谱柱后的紫外检测器共用。左侧阀的切换时间定在12 min,在12 min之前,一维色谱柱与检测器连接;在12 min之后,二维色谱柱与检测器连接,从而实现维生素A、D和E的同时检测。

### 色谱分离条件选择

在色谱分离模式选择上,文献中一般采用正相色谱或反相色谱法进行分析。反相色谱法的优势是可以将维生素D<sub>2</sub>、维生素D<sub>3</sub>以及维生素D前体和非活性的异构体分开,因此可以选择维生素D<sub>2</sub>作为内标,以补偿在前处理过程中维生素D<sub>3</sub>的损失,提高测定结果的准确性和可靠性,另外考虑到流动相的兼容性,本实验在一维色谱和二维色谱分离中均采用反相色谱法。在色谱柱选择上,二维分离选择性的变化能够改善样品的2个或更多色谱峰的分度,能使色谱图中被大峰掩盖的小峰分离出来,减少色谱峰重叠,因此实验中采用C18作为一维分析柱,采用PA II C18 (Embedded-polar-group C18)作为二维分析柱。在流动相选择上,甲醇、乙腈、乙醇、异丙醇以及水是常用溶剂,由于样品溶液中含有大量低极性的物质,因此本实验采用了非水反相系统,以增加低极性物质的溶剂度。在一维色谱分离中,为减少强保留、低极性成分的干扰,在维生素A、E分离结束后,加入了四氢呋喃-甲醇的混合溶剂清洗色谱柱的过程。本实验对比了一维常规分离谱图(见图3)和二维柱切换法的分离谱图(图2),可以看出后者分离结果较好。

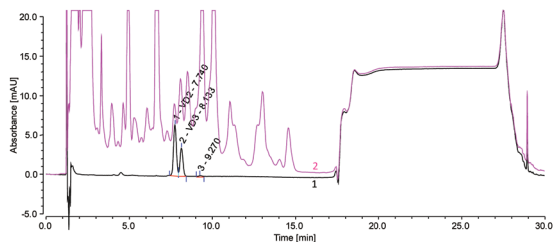


图3常规分离谱图

(1 维生素D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub>标准品溶液; 2 加VD<sub>2</sub>的样品)

Fig. 3 Separation chromatogram of vitamins D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> by using routine method (1 D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> standard, 2 infant formula sample spiked vitamin D<sub>2</sub>.)

## 结论

本文建立了在线二维柱切换-紫外检测法测定婴幼儿配方奶粉和乳品中维生素A、D<sub>3</sub>和E的含量测定方法,本方法具有以下特点:

(1) 二维分离方法可以减少色谱峰重叠现象。在维生素D<sub>3</sub>测定中,利用一维和二维色谱柱分离选择性差异,可以更好的降低复杂基质成分对维生素D<sub>3</sub>测定的干扰。

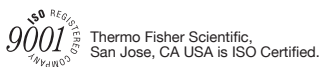
(2) 与国标方法比较,本方法可减少正相色谱的净化过程,一次进样同时测定脂溶性维生素A、E和D<sub>3</sub>的含量,大大提高了样品的分析效率。

(3) 在检测方法选择上,紫外检测器和电化学检测器是应用较多的两种检测器。质谱检测器在复杂基质样品中对痕量组分的定性和定量上具有优势,在婴幼儿奶粉检测中应用也越来越多。本文立足于方法的普适性,选择紫外检测器,利用其波长切换方式,同时分析维生素A、E和D<sub>3</sub>,通过一个六通切换阀,实现检测器的共用,所有过程在软件支持下,可以实现全自动化控制。

作为二维分离方法,相对于常规分析,仍较复杂,影响测定结果的因素较多。今后本实验将继续扩大样品分析范围,考察方法耐用性,并开展联合实验室的验证工作,以完成对方法的综合评价。

## 参考文献

- ZHAO Rong, XUE Ying, WU Guo-Hua, ZHAO Hai-Yan, LUO Ren-Cai. Chinese J. Chromatogr., 2008, 26(1): 113~115  
赵榕, 薛颖, 吴国华, 赵海燕, 罗仁才. 色谱, 2008, 26(1): 113~115
- AOAC Official Method 995.05. Vitamin D in Infant Formulas and Enteral Products (Liquid Chromatographic Method). 1995
- GB 5413.9-2010, Determination of vitamins A, D, E in foods for infants and young children. National food safety standard.  
GB 5413.9-2010, 婴幼儿食品和乳品中维生素A、D、E的测定, 食品安全国家标准
- Ball G.F.M. Determination of the fat-soluble vitamins in foods by high-performance liquid chromatography. In: Nollet M.L., Dekker M. (eds), Handbook of Food Analysis. New York: Leo Pub., 1996:601~647
- HUANG Fang, WU Hui-Qin, HANG Yi-Ping. PTCA (PART B: CHEM. ANA L. (理化检测-化学分册)). 2010, 47(5): 577~582.  
黄芳, 吴惠勤, 杭义萍. 理化检测-化学分册. 2010, 47(5): 577~582.
- Olivier Heudi, Marie-José Trisconi, Christopher-John Blake. Journal of Chromatography A, 2004, 1022 (1-2) :115~123.



[thermoscientific.com](http://thermoscientific.com)

© 2012 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries. Specifications, terms and pricing are subject to change. Not all products are available in all countries. Please consult your local sales representative for details.

**上海**  
上海浦东新金桥路27号6号楼  
邮编: 201206  
电话: 021-68654588  
传真: 021-64457830

**北京**  
北京东城区安定门东大街28号  
雍和大厦西楼F座7层702-715室  
邮编: 100007  
电话: 010-84193588  
传真: 010-88370548

**免费服务热线:**  
800 810 5118  
400 650 5118

**ThermoFisher**  
S C I E N T I F I C