

# 通过 LC/MS/MS 三重四极杆系统同时 检测和定量 14 种脂溶性维生素和类胡 萝卜素

## 作者

Hui Zhao  
安捷伦科技有限公司

## 摘要

本应用简报介绍了一种使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪与 Agilent 6470 三重四极杆 LC/MS 的联用系统通过 Agilent MassHunter Workstation 软件测定膳食补充剂中 14 种脂溶性维生素和类胡萝卜素的方法。该方法用于定量高度复杂的复合维生素片基质中的脂溶性维生素和选定的类胡萝卜素。检测的所有成分均符合标称浓度要求。可以得出结论，该方法可用于脂溶性维生素和选定含类胡萝卜素补充剂产品的质量控制和营养标签的建立。

## 前言

脂溶性维生素和类胡萝卜素具有清除自由基的特性，可作为抗氧化剂发挥作用<sup>[1,2]</sup>。众所周知，脂溶性维生素（A、D、E 和 K）和类胡萝卜素具有极高的营养价值。经常食用含脂溶性维生素的补充剂可确保摄入足够的维生素，这些补充剂以各种形式提供，如片剂、胶囊、软糖、软胶囊和饮料。出于各种原因，需要对脂溶性维生素和类胡萝卜素进行准确的定量测量，其中包括确保产品质量、确定是否符合法规要求、鉴定可能的降解（通过处理补充剂封装）以及评估成分是否符合标签声明的含量。

脂溶性维生素可以游离形式及其酯形式存在。由于维生素 A 和维生素 E 的酯类具有更强的稳定性，因此通常添加在补充剂中。在本研究中，采用一种方法分析脂溶性维生素——维生素 A（视黄醇、视黄醇乙酸酯和视黄醇棕榈酸酯）、维生素 D（胆钙化醇 (D3) 和麦角钙化醇 (D2)）、维生素 E（ $\alpha$ -生育酚、 $\alpha$ -生育酚乙酸酯和  $\alpha$ -生育酚琥珀酸酯）、维生素 K（植物甲萘醌 (K1)、甲基萘醌 (K2-4) 和甲基萘醌 (K2-7)）以及选定的类胡萝卜素（包括  $\beta$ -胡萝卜素、叶黄素和番茄红素）。脂溶性维生素和类胡萝卜素的结构见图 1。

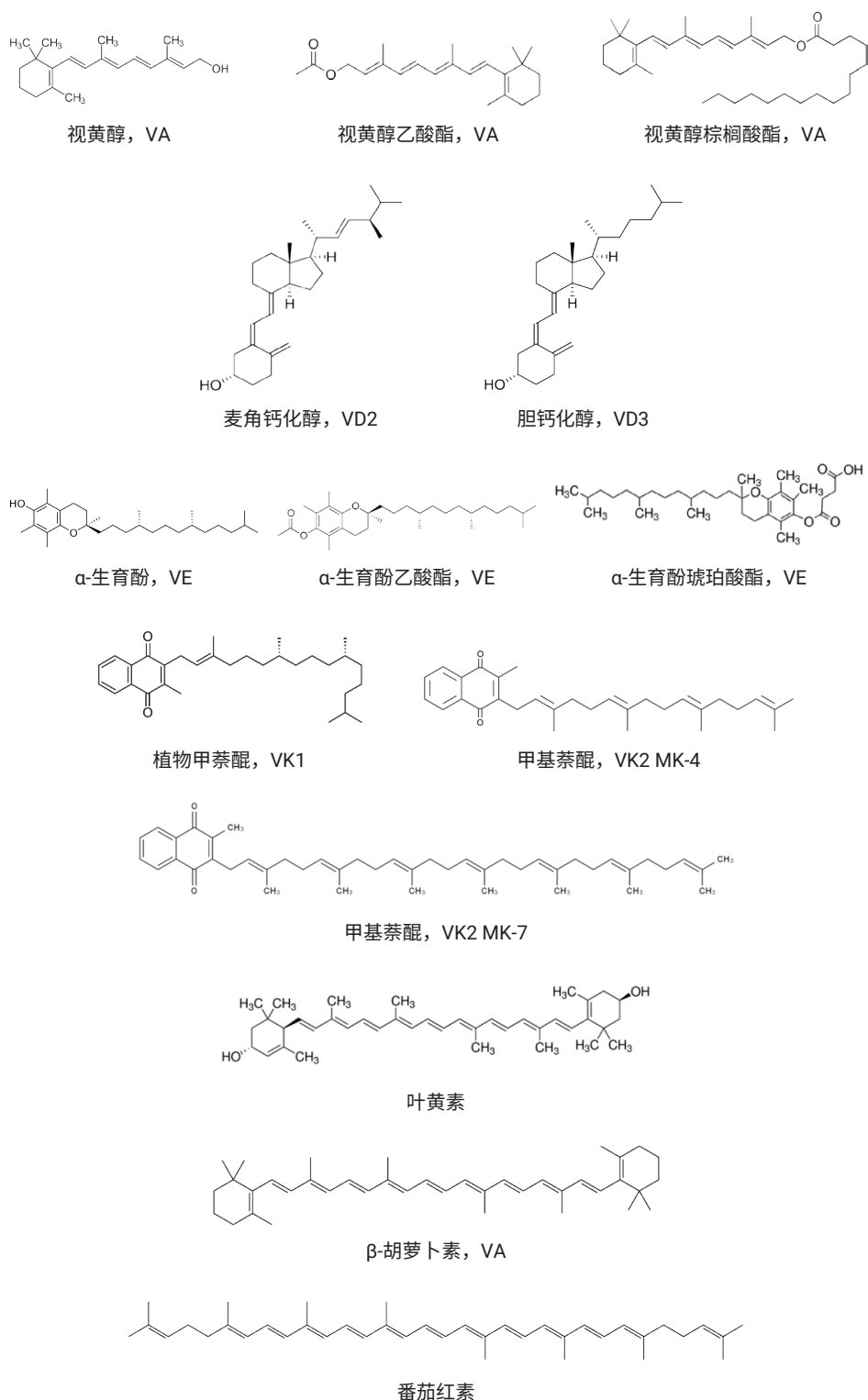


图 1. 脂溶性维生素的结构

传统方法包括微生物学方法，这类方法在准确度、特异性和通量方面存在明显不足；而 LC-UV 方法对低水平维生素（如维生素 D 和 K）灵敏度较差，在复杂基质中选择性差。这些方法通常采用多种检测来定量所有脂溶性维生素和类胡萝卜素。灵敏度、选择性和准确度的问题可以通过使用三重四极杆 MS 检测来解决。然而，很少有 LC/MS/MS 方法可用于同时分析补充剂中的类胡萝卜素和脂溶性维生素。

本研究开发并评估了一种独特的 LC/TQ 方法，以对复杂复合维生素片基质中脂溶性维生素和选定类胡萝卜素提供快速、灵敏的鉴定和准确定量。在单次运行中同时分析所有 14 种脂溶性维生素和类胡萝卜素。分析中还包括萃取后基质匹配标样，以补偿基质效应。建立了方法的数据可接受标准。

## 实验部分

### 设备

本研究的所有实验均使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪（包括 Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)、Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A) 和 Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)) 与 Agilent 6470 三重四极杆 LC/MS (G6470B) 的联用系统。系统由 Agilent MassHunter 采集软件 10.1 版控制。使用 MassHunter 定量分析软件 (10.2 版) 以及 MassHunter 定性分析软件 (10.0 版) 进行数据处理。

### 色谱条件

参数	设置			
分析柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 Stable Bond-Aqueous, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm (部件号 683775-914)			
柱温箱	45 ±2 °C			
进样量	1 μL			
运行时间	12 min			
自动进样器	5 ±2 °C			
流动相 A	0.1% 甲酸水溶液			
流动相 B	0.1% 甲酸的甲醇溶液			
进样针清洗	0.1% 甲酸的乙腈溶液			
梯度	时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B
	0	0.25	20	80
	7.0	0.25	0	100
	9.5	0.25	0	100
	10.0	0.25	20	80
12.0	0.25	20	80	

### 质谱参数

参数	设置
MS 采集	dMRM
离子源类型	安捷伦喷射流电喷雾离子源 (AJS ESI 正离子模式)
干燥气温度	250 °C
干燥气流速	11 L/min
雾化器	40 psi
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	4000 V
喷嘴电压	1000 V
母离子和子离子分辨率	单位
针对特定化合物的条件	见表 1

### 样品和标样

研究基质是一种复杂的复合维生素片，含有食品类混合物。视黄醇、视黄醇乙酸酯、视黄醇棕榈酸酯、胆钙化醇、麦角钙化醇、α-生育酚、α-生育酚乙酸酯、α-生育酚琥珀酸酯、植物甲萘醌、甲基萘醌 (K2-4)、甲基萘醌 (K2-7) 和 β-胡萝卜素的标样购自 Millipore Sigma, Inc. (St. Louis, MO, USA)；叶黄素和番茄红素购自 Chromadex, Inc. (Los Angeles, CA, USA)；胆钙化醇-D<sub>6</sub> 和麦角钙化醇-D<sub>3</sub> 溶液 (100 μg/mL) 购自 IsoSciences (West Chester, PA, USA)。

在乙醇中制得浓度为 100 μg/mL 的各种分析物和内标储备溶液，同时考虑了纯度。样品和标样均于 -20 °C 保存。

## 方法

### 样品前处理

以下是本研究遵循的优化样品前处理方案的详细说明。表 1 列出了针对特定分析物的 LC/MS/MS 条件。

1. 使用分析天平确定片剂的平均重量。将样品研磨成细粉，形成均匀的混合物
2. 称取 1 g 样品置于 20 mL 玻璃闪烁计数瓶中
3. 将 5 mL DMSO 加入计数瓶中，涡旋混合 1-2 分钟
4. 在水浴中将计数瓶加热至 50-60 °C，5 分钟
5. 加入 15 mL 乙醇并振荡 15 分钟
6. 将至少 1.5 mL 样品萃取物加入 2 mL 微量离心管中
7. 以 13000 rpm 的转速离心样品萃取物 5 分钟
8. 根据需要用乙醇稀释上清液
9. 配制加标后的样品和稀释样品
10. 使用正 ESI 模式进样至 LC/MS/MS 进行分析

### 方法评估流程

通过分析复杂的复合维生素片样品来评估方法性能。使用 1/x 加权的同位素标记内部校准曲线或 1/x 加权和单点后基质加标校正的外部校准曲线进行定量。

表 1. 针对特定分析物的 LC/MS 条件：母离子/子离子离子对、碎裂电压、碰撞能量 (CE)、碰撞池加速器电压 (CAV) 和保留时间 (RT)

化合物组	化合物名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	RT (min)	Δ RT (min)	碎裂电压 (V)	CE (V)	CAV (V)
类胡萝卜素, VA	β-胡萝卜素	537.5	445.1	8.60	1.5	144	12	5
类胡萝卜素, VA	β-胡萝卜素	537.5	104.8	8.60	1.5	144	68	5
类胡萝卜素, VA	β-胡萝卜素	537.5	91.0	8.60	1.5	144	80	5
类胡萝卜素, VA	β-胡萝卜素	537.5	119.2	8.59	1.5	144	52	5
类胡萝卜素	叶黄素	569.2	171.0	6.80	1	160	40	5
类胡萝卜素	叶黄素	569.2	339.1	6.80	1	160	20	5
类胡萝卜素	叶黄素	569.2	477.2	6.80	1	160	15	5
类胡萝卜素	番茄红素	537.5	69.1	9.25	1.5	140	45	5
类胡萝卜素	番茄红素	537.5	144.8	9.25	1.5	140	35	5
类胡萝卜素	番茄红素	537.5	334.0	9.25	1.5	140	10	5
VA	视黄醇	287.2	41.2	3.03	1.5	104	60	5
VA	视黄醇	287.2	69.1	3.04	1.5	104	28	5
VA	视黄醇	287.2	81.1	3.03	1.5	104	24	5
VA	视黄醇	287.2	55.1	3.03	1.5	104	48	5
VA	视黄醇乙酸酯	329.2	269.2	3.83	1.5	104	8	5
VA	视黄醇乙酸酯	329.2	121.1	3.84	1.5	104	28	5
VA	视黄醇乙酸酯	329.2	202.9	3.83	1.5	104	48	5
VA	视黄醇乙酸酯	329.2	191.7	3.83	1.5	104	56	5
VA	视黄醇棕榈酸酯	525.5	269.1	7.74	1	128	12	5
VA	视黄醇棕榈酸酯	525.5	145.0	7.74	1	128	20	5
VA	视黄醇棕榈酸酯	525.5	105.1	7.72	1	128	56	5
VA	视黄醇棕榈酸酯	525.5	144.1	7.75	1	128	20	5
VD	胆钙化醇	385.1	107.1	5.33	1	104	28	5
VD	胆钙化醇	385.1	105.1	5.33	1	104	56	5
VD	胆钙化醇	385.1	81.1	5.33	1	104	44	5
VD	胆钙化醇	385.1	159.1	5.33	1	104	25	5
VD	胆钙化醇	385.1	259.1	5.33	1	104	25	5
VD	麦角钙化醇	397.1	69.1	5.43	1	104	36	5
VD	麦角钙化醇	397.1	107.1	5.43	1	104	28	5
VD	麦角钙化醇	397.1	105.1	5.43	1	104	56	5
VD	麦角钙化醇	397.1	41.2	5.43	1	104	60	5
VD	VD2 IS	400.1	69.1	5.43	1	104	40	5
VD	VD3 IS	391.1	105.0	5.32	1	128	48	5
VE	α-生育酚	431.4	165.1	5.60	1	128	24	5
VE	α-生育酚	431.4	55.1	5.60	1	128	60	5
VE	α-生育酚	431.4	69.1	5.60	1	128	44	5
VE	α-生育酚	431.4	57.1	5.60	1	128	48	5
VE	α-生育酚琥珀酸酯	531.4	265.0	5.87	1.5	176	20	5
VE	α-生育酚琥珀酸酯	531.4	165.0	5.87	1.5	176	48	5

化合物组	化合物名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	RT (min)	Δ RT (min)	碎裂电压 (V)	CE (V)	CAV (V)
VE	α-生育酚琥珀酸酯	531.4	149.0	5.87	1.5	176	36	5
VE	α-生育酚乙酸酯	473.4	207.1	6.47	1	172	16	5
VE	α-生育酚乙酸酯	473.4	165.0	6.47	1	172	40	5
VE	α-生育酚乙酸酯	473.4	137.0	6.47	1	172	60	5
VE	α-生育酚乙酸酯	473.4	55.2	6.47	1	172	76	5
VK	甲萘醌, VK3	173.1	77.0	1.89	1	104	36	5
VK	甲萘醌, VK3	173.1	105.1	1.89	1	104	30	5
VK	甲萘醌, VK3	173.1	145.0	1.89	1	104	15	5
VK	甲萘醌, VK3	173.1	50.9	1.89	1	104	60	5
VK	甲基萘醌, VK2 MK-4	445.3	69.1	5.36	1	128	44	5
VK	甲基萘醌, VK2 MK-4	445.3	81.1	5.36	1	128	56	5
VK	甲基萘醌, VK2 MK-4	445.3	187.0	5.36	1	128	24	5
VK	甲基萘醌, VK2 MK-4	445.3	95.1	5.36	1	128	40	5
VK	甲基萘醌, VK2 MK-7	649.5	187.0	8.02	1	104	32	5
VK	甲基萘醌, VK2 MK-7	649.5	95.0	8.02	1	104	32	5
VK	甲基萘醌, VK2 MK-7	649.5	81.0	8.02	1	104	32	5
VK	植物甲萘醌, VK1	451.4	187.0	6.45	1	128	28	5
VK	植物甲萘醌, VK1	451.4	57.1	6.45	1	128	40	5
VK	植物甲萘醌, VK1	451.4	43.2	6.45	1	128	60	5
VK	植物甲萘醌, VK1	451.4	71.1	6.45	1	128	28	5

## 方法评估标准

### 特异性:

- 每个分析物峰的保留时间与标样峰的平均值之差在 ±0.2 min 以内
- 离子比处于 30% 的允差范围内

### 线性和范围:

- 校准曲线的  $R^2 > 0.99$
- 计算得出的工作标样值应在理论值的 ±30% 以内
- 校准标样应涵盖分析物的浓度范围

### 准确度:

- 每种脂溶性维生素或类胡萝卜素的检测结果均符合产品标签上 ≥ 100% 的要求 (见表 3)
- 加标后回收率在 70%-130% 之间 (由于方法和仪器性能的差异, 应由每个实验室确定标准)

## 结果与讨论

### 有机流动相选择

在本研究中，使用相同的液相色谱条件对两种有机流动相乙腈和甲醇进行评估。使用甲醇时，所有化合物均达到了同等或更

高的灵敏度。此外，甲醇比乙腈便宜，因此选择甲醇作为最终溶剂。有关两种溶剂之间的灵敏度比较，请参见图 2。甲醇具有增强的电离作用，可提高化合物的灵敏度。

### 特异性

使用动态多反应监测 (dMRM) 采集方法进行维生素定量。在定量分析中，通过评估 MS/MS 离子对的相对强度比率和分析物峰的 RT 对 MS/MS 离子对进行监测，

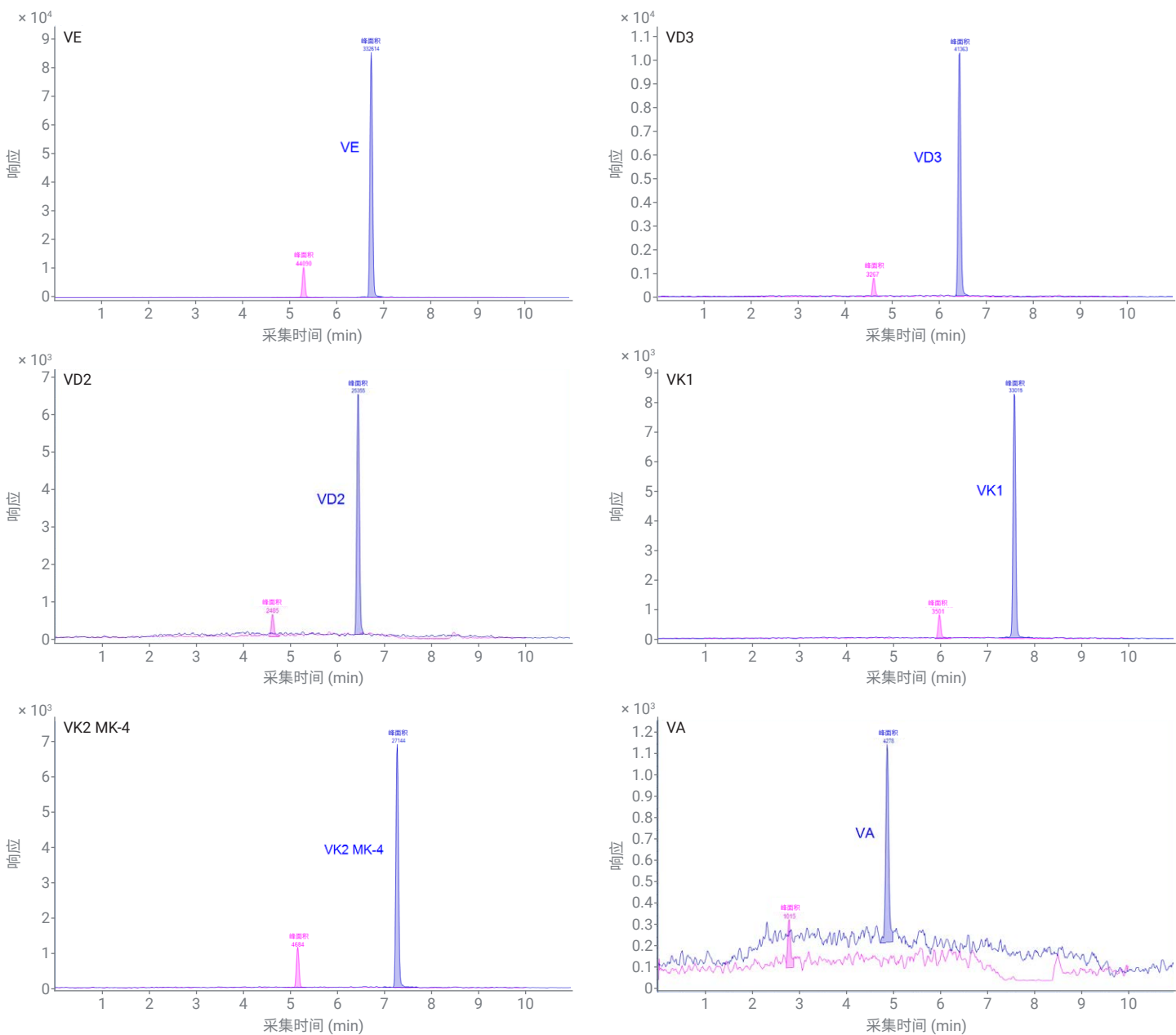


图 2. 乙腈和甲醇作为有机流动相的灵敏度比较。蓝色峰是以 0.1% 甲酸甲醇溶液作为流动相 B。粉红色的峰是以 0.1% 甲酸乙腈溶液作为流动相 B。流动相 A 是 0.1% 甲酸水溶液

能够将目标分析物与潜在的干扰物质区分开。图 3A 显示了所有目标分析物的洗脱曲线，图 3B 显示了 5 ng/mL 工作标样乙醇溶液的提取离子色谱图示例。图 4 显示试剂空白乙醇溶液不含分析物。

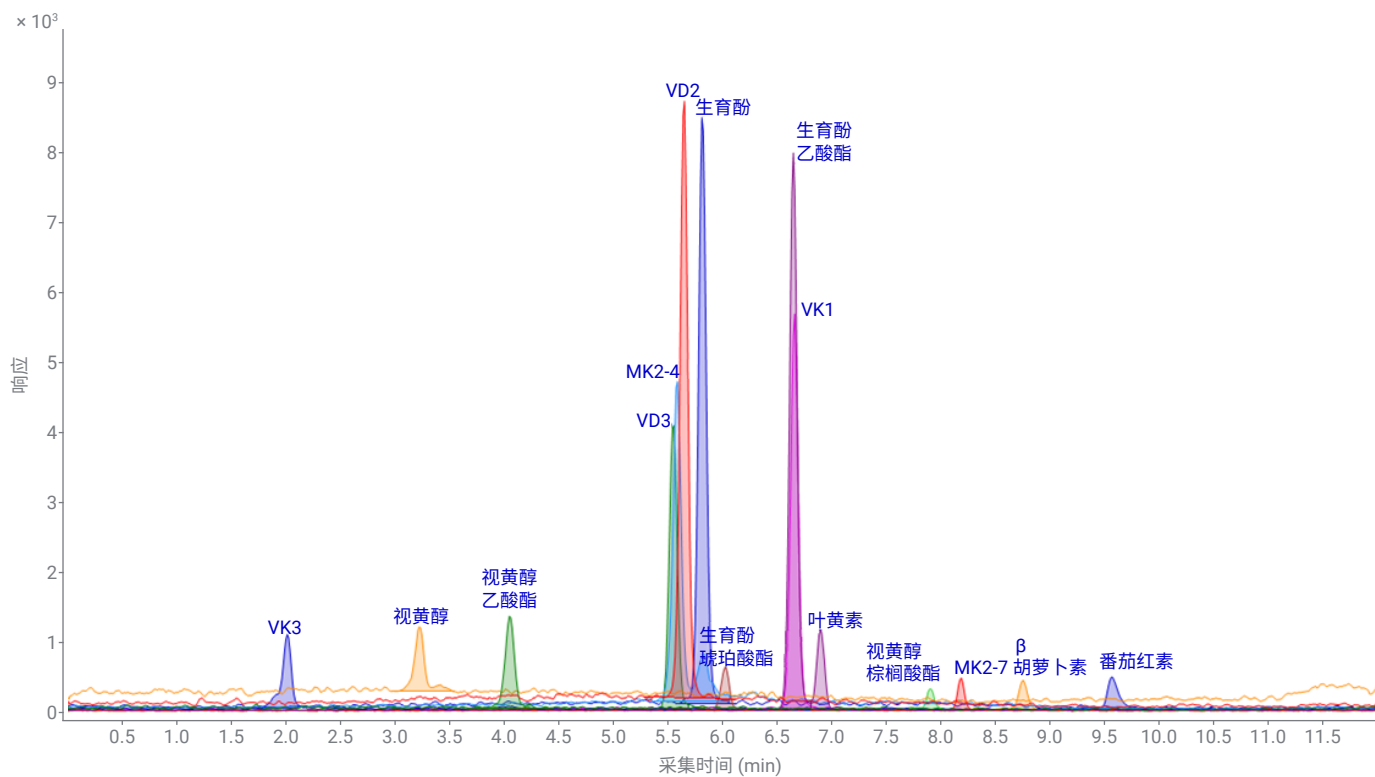


图 3A. 所有脂溶性维生素的洗脱曲线

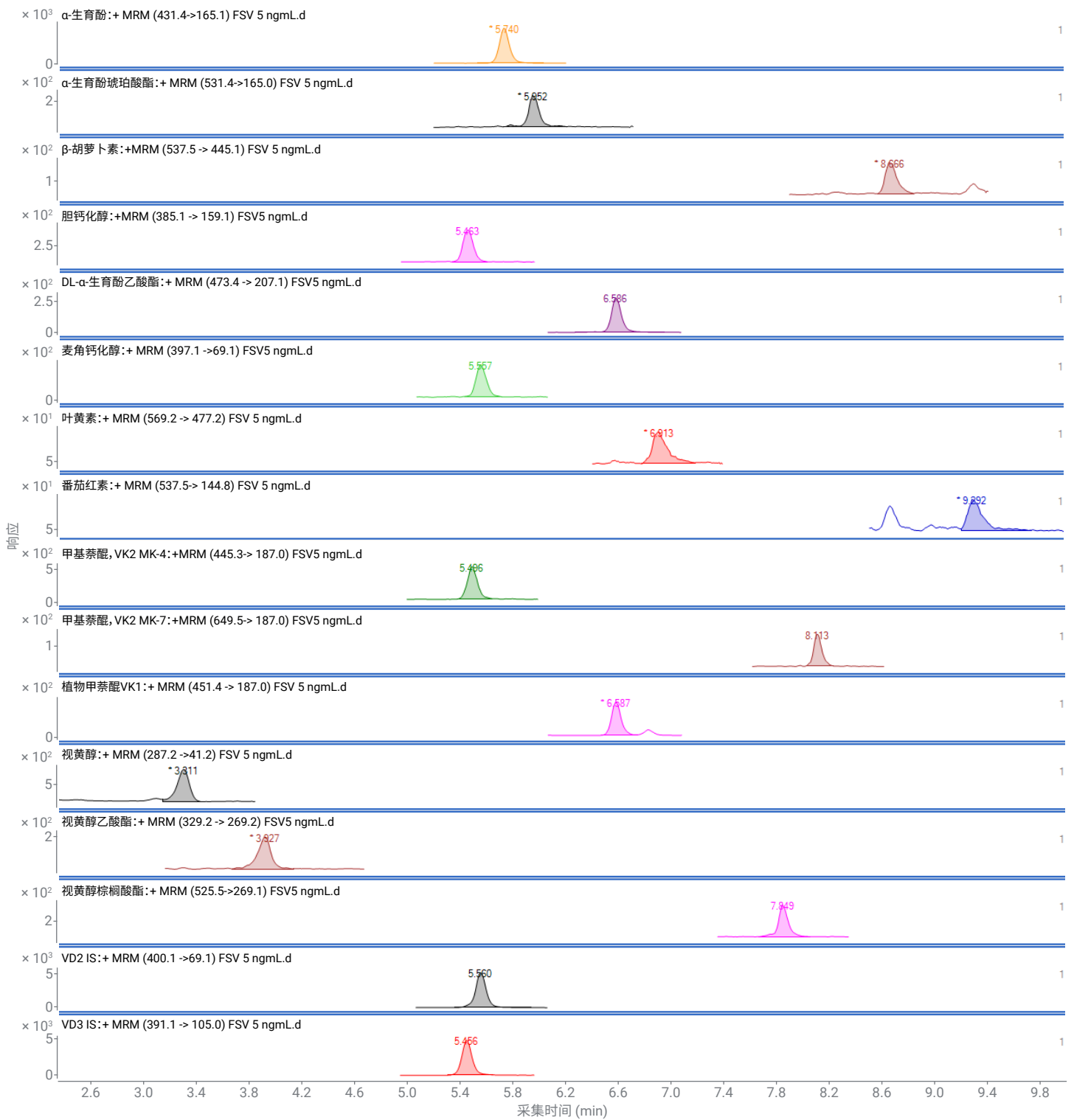


图 3B. 5 ng/mL 维生素复合工作标样乙醇溶液的提取离子色谱图，进样量为 1  $\mu$ L



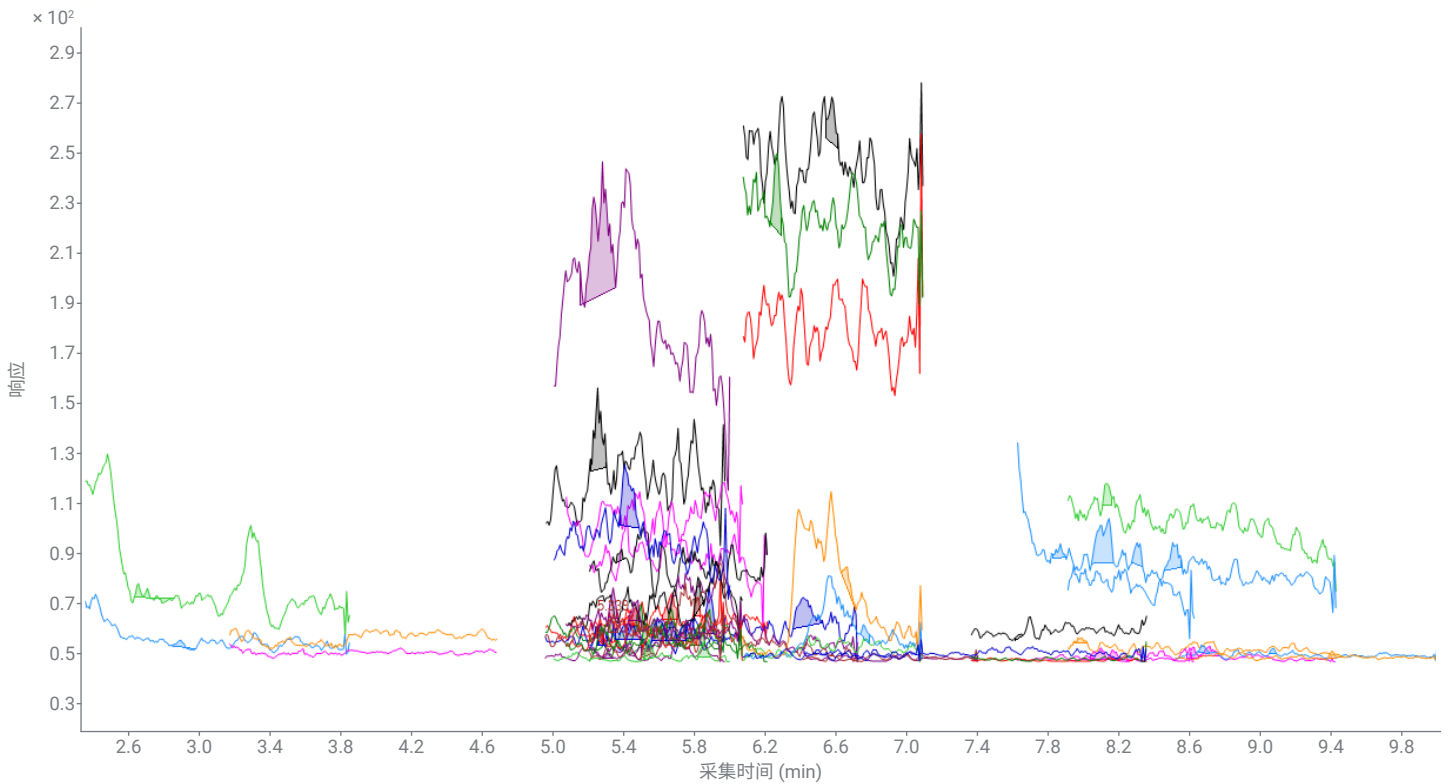


图 4. 溶剂空白（乙醇）的提取离子色谱图

### 范围和线性

在 0.2–500 ng/mL 的浓度范围内，对该方法进行评估。为评估方法线性，配制浓度为 0.2、0.5、1、5、10、50、100、200 和 500 ng/L 的 9 种工作标样 (WS) 溶液。WS1 至 WS9 的校准曲线残差  $\leq 30\%$ 。使用线性校准和加权因子  $1/x$  来测定线性。相关系数 ( $R^2$ ) 值  $\geq 0.99$ 。表 2 列出了校准曲线残差、线性范围和相关系数的统计数据。

表 2. 校准曲线统计数据

化合物名称	校准曲线残差 (%)									范围 (ng/mL)	$R^2$
	WS1 0.2	WS2 0.5	WS3 1	WS4 5	WS5 10	WS6 50	WS7 100	WS8 200	WS9 500		
	ng/mL										
$\alpha$ -生育酚	16.5	2.6	4.9	-12.5	-12.6	-11.3	-3.6	-1.6	2.9	0.2-500	0.9976
$\alpha$ -生育酚乙酸酯	12.9	13.7	-5.8	0.1	-7.4	-8.6	-1.3	-4.6	2.6	0.2-500	0.9980
$\alpha$ -生育酚琥珀酸酯	-	4.7	3.3	-1.3	1.2	-4.2	-0.2	1.2	0.3	0.5-500	0.9996
胆钙化醇	-	-4.8	11.1	-3.0	6.4	-5.7	0.6	-2.3	2.1	0.5-500	0.9992
麦角钙化醇	-	10.4	-1.3	1.8	-5.0	-5.0	-0.6	0.8	0.5	0.5-500	0.9998
$\beta$ -胡萝卜素	-	-	-24.1	1.5	-2.5	7.9	5.6	6.5	-8.1	1.0-500	0.9943
叶黄素	-	-	-	-7.7	17.4	1.3	3.6	5.2	-1.4	5-500	0.9965
番茄红素	-	-	-	12.2	-10.5	0.0	-6.1	3.8	0.5	5-500	0.9978
甲基萘醌, VK2 MK-4	-	18.9	-2.1	11.1	-2.3	-4.1	0.1	-1.1	0.5	0.5-500	0.9993
甲基萘醌, VK2 MK-7	-	24.7	-11.8	12.6	-2.2	-0.7	7.1	2.3	-4.5	0.5-500	0.9971
植物甲萘醌, VK1	-	-20.0	-17.2	5.6	5.8	4.5	7.1	4.7	-6.8	0.5-500	0.9948
视黄醇	-	-	-	-15.5	-10.9	-0.8	2.1	1.7	-7.1	5-500	0.9932
视黄醇乙酸酯	-	-	4.2	-8.4	2.3	-1.6	-1.3	-5.8	-	1-200	0.9918
视黄醇棕榈酸酯	-	17.4	-18.3	3.0	-2.1	4.8	-1.6	-1.2	0.1	0.5-500	0.9936

### 准确定量的方法

可能会观察到基质中的干扰物质，它们会影响电喷雾电离过程，导致离子抑制或增强。目前，由于方法和仪器性能的不同，尚无针对维生素中基质效应的指南。但是，需要补偿基质效应。当内标不可用或不易获得时，加入加标后基质匹配标样或单独的标样，可以解决基质效应或任何其他基质相互作用的问题，以实现定量<sup>[9]</sup>。

### 样品检测

复合维生素片样品包含食品类混合物，包括水果、蔬菜、消化酶和更多植物类混合物。产品配方的复杂性提供了出色的基质，可以通过 LC/MS/MS 对多种脂溶性维生素和类胡萝卜素进行明确鉴定与准确定量，可获得高灵敏度。LC/MS/MS 的高灵敏度有利于在样品萃取后进行大量稀释。视黄醇乙酸酯、β-胡萝卜素、胆钙化醇、α-生育酚琥珀酸酯和植物甲萘醌的加标后回收率在可接受的范围内

(70%–130%)，并对结果进行了校正。所有脂溶性维生素的校正结果均符合产品标签上 ≥ 100% 的要求。此外，对其余不属于产品配方成分的脂溶性维生素和类胡萝卜素也进行了后加标，加标后回收率均在可接受的范围内。每种分析物的样品结果和加标后回收率如表 3 所示。此外，还使用内标对胆钙化醇的结果进行了校正，便于与来自基质匹配后校正的结果进行比较。结果表明，这两个结果高度一致（见表 3）。

表 3. 复合维生素片的样品结果

化合物名称	维生素	份量 (g)	产品标签声明 (mg/份)	通过 IS 校正的结果 (mg/份)	通过加标后回收率校正的结果 (mg/份)	加标后回收率 (%)
视黄醇乙酸酯	A	5	0.54		0.60	87.8
β-胡萝卜素	A; 类胡萝卜素	5	1.26		1.85	103
胆钙化醇	D3	5	0.05	0.08	0.078	97.1
α-生育酚琥珀酸酯	E	5	60		87	106
植物甲萘醌	K1	5	0.12		0.18	106
视黄醇	A	5				86.6
视黄醇棕榈酸酯	A	5				102
麦角钙化醇	D2	5				99.7
α-生育酚	E	5				115
α-生育酚乙酸酯	E	5				99.1
甲基萘醌, VK2 MK-4	K2	5				91.2
甲基萘醌, VK2 MK-7	K2	5				104
叶黄素	类胡萝卜素	5				96.4
番茄红素	类胡萝卜素	5				105

## 结论

本研究提出了一种快速、灵敏、准确的 LC/TQ 方法，用于鉴定和定量复杂补充剂基质中的脂溶性维生素和选定的类胡萝卜素。该方法将 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪与 Agilent 6470 三重四极杆 LC/MS 联用。与传统的多次检测相比，单次运行可同时检测 14 种脂溶性维生素和类胡萝卜素，从而提高效率和通量，并降低成本。补充剂产品中的所有脂溶性维生素和类胡萝卜素均符合基质匹配标样定量方法的性能指标。评估表明，该方法可以实现脂溶性维生素分析所需的必要特异性、线性和准确度。

## 参考文献

1. National Research Council. Diet and Health: Implications for Reducing Chronic Disease Risk; The National Academies Press, **1989**
2. Young, A. J.; Lowe, G. L. Carotenoids-Antioxidant Properties. *Antioxidants* **2018**, 7, 28
3. Simultaneous Detection and Quantitation of 14 Water-Soluble Vitamins in a Supplement by LC/MS/MS Triple-Quadrupole (通过 LC/MS/MS 三重四极杆系统同时检测和定量补充剂中的 14 种水溶性维生素)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-3016EN，**2021**

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE16169462

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2022  
2022 年 7 月 20 日，中国出版  
5994-5064ZHCN