

# 使用 Agilent Bond Elut Plexa 聚合物 SPE 通过 HPLC 和 LC/MS/MS 测定婴幼儿配方奶粉中的脂溶性维生素

## 作者

Xia Yang 和 Limian Zhao  
安捷伦科技有限公司

## 摘要

本研究开发并验证了一种高效且稳定的方法，用于分析婴幼儿配方奶粉中的维生素 A、维生素 D2/D3 以及  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ - 和  $\delta$ -维生素 E。首先对婴幼儿配方奶粉样品进行皂化处理，然后使用 Agilent Bond Elut Plexa 聚合物 SPE 通过固相萃取 (SPE) 进行萃取和净化。通过 HPLC-DAD 分析净化后的样品提取物中的维生素 A 和 E，并通过 LC/MS/MS 分析其中的维生素 D2 和 D3。所开发的方法重现性好 (RSD < 10%)、回收率高 (81.2%–97.3%)，是用于测定脂溶性维生素的一种简便、低成本、高效且易于操作的技术。

## 前言

脂溶性维生素如维生素 A、D 和 E (图 1)，是影响人体健康和儿童成长的重要营养元素。因此，对于食品行业，在婴幼儿配方奶粉中添加维生素 A、D 和 E 具有重要意义<sup>[1-3]</sup>。然而，未消化的脂溶性维生素会随着时间积累，难以从体内排出<sup>[4]</sup>。因此，出于安全考虑，准确定量婴幼儿配方奶粉中的维生素含量至关重要。

许多研究文献中采用液液萃取 (LLE) 或固相萃取 (SPE) 结合 HPLC 或 LC/MS，对食品中的脂溶性维生素进行定量<sup>[5-8]</sup>。然而这些方法并不适用于婴幼儿配方奶粉，因为婴幼儿配方奶粉的基质组成非常复杂，脂肪含量高，且法规所要求的维生素 A、D 和 E 的含量也存在明显差异<sup>[9,10]</sup>。婴幼儿配方奶粉中添加的维生素 A 和 E 的最常见形式是视黄醇醋酸酯、视黄醇棕榈酸酯和  $\alpha$ -生育酚醋酸酯，因为它们的稳定性更好<sup>[11]</sup>。因此，在对样品进行萃取和净化之前，有必要通过皂化反应或碱消化将所有酯转化为醇，然后再对总含量进行定量<sup>[12]</sup>。配备 DAD 的 HPLC 广泛应用于维生素 A 和 E 的分析，此方法无需内标，但难以检测痕量 (ppb) 的维生素 D2 和 D3，因为这些维生素的基线色谱分离始终是一个难题。LC/MS/MS 可以有效、灵敏地检测维生素 D2 和 D3，无需

完全的基线色谱分离。然而，高浓度的维生素 A 和 E 可能导致 MS 检测器饱和，使定量结果不准确。此外，婴幼儿配方奶粉基质中的脂质共萃取物可能引起明显的离子抑制，因而必须使用昂贵的维生素 D2 和 D3 内标。鉴于此，我们开发了一种方法，首先对婴幼儿配方奶粉样品进行皂化反应，随后使用 Bond Elut Plexa 进行萃取和净化。然后通过 HPLC-DAD 对维生素 A 和 E 进行定量，并通过 LC/MS/MS 对维生素 D2/D3 进行定量。这套用于婴幼儿配方奶粉分析的完整解决方案表现出了优异的性能，所有目标维生素的回收率均 > 80% 且 RSD < 10%。

### 设备与材料

- Agilent 1290 Infinity II 液相色谱，配备全能泵、Multisampler、可变波长检测器
- Agilent 1290 Infinity II 液相色谱和配备安捷伦喷射流电喷雾离子源的 6470A 三重四极杆液质联用系统
- Agilent Bond Elut Plexa 萃取柱，200 mg，6 mL (部件号 12109206)
- Agilent Vac Elut 20 真空萃取装置 (部件号 12234101)
- 带加热系统的氮气蒸发器，购自 Organomation Associates, Inc.

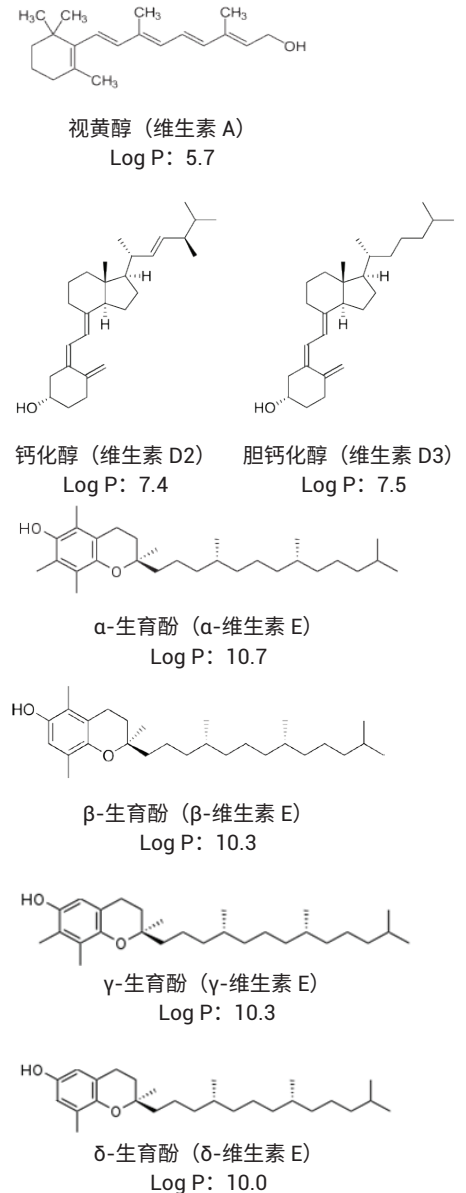


图 1. 脂溶性维生素的结构和 Log P 值

(MA, USA)

## 试剂与标准品

所有试剂和溶剂均为 HPLC 或分析纯级。甲醇 (MeOH) 购自 Honeywell (Muskegon, MI, USA); 乙醇 (EtOH) 购自 Acros Organics (Geel, Belgium); 丙酮和氢氧化钾 (KOH) 购自国药集团 (中国北京)。抗坏血酸和 2,6-二叔丁基对甲酚 (BHT) 均购自 CNW (中国上海)。维生素标准品和内标购自阿尔特塔科技有限公司 (中国天津), 用乙醇配制, 置于  $-20^{\circ}\text{C}$  下储存。

## 样品前处理

用乙醇 (EtOH) 配制 5 mg/mL 维生素 A 和 E 储备液。用 EtOH 配制 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  维生素 D2、D3 溶液及相应的内标。婴幼儿配方奶粉购自本地超市。图 2 展示了分步程序, 其主要包括两个部分: 样品皂化和 SPE 净化。

将 5 mL 水加入 1 g 配方奶粉中。将样品充分混合, 得到均匀的浆液。据报道, 抗坏血酸和 BHT 为抗氧化剂, 在样品前处理和检测过程中可防止维生素降解<sup>[13]</sup>, 因此在开始处理样品时加入这两种物质。加入 EtOH 是为了增加维生素溶解度, 改善脂肪样品与 KOH 溶液发生皂化反应时的均匀性。80  $^{\circ}\text{C}$  水浴皂化过程中, 在样品底部通入温和的氮气流, 以防止维生素氧化。皂化处理后, 样品颜色由黄绿色变为深棕色。

LC/MS/MS 条件																	
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 $\times$ 100 mm, 2.7 $\mu\text{m}$ (部件号 695775-902)																
柱温	40 $^{\circ}\text{C}$																
自动进样器温度	15 $^{\circ}\text{C}$																
进样量	5 $\mu\text{L}$																
流动相	A) 含 0.1% FA、4.5 mmol/L 甲酸铵和 0.5 mmol/L 氟化铵的水溶液 B) 含 0.1% FA、4.5 mmol/L 甲酸铵和 0.5 mmol/L 氟化铵的甲醇溶液																
流速	0.4 mL/min																
梯度	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>B%</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>88</td></tr><tr><td>1</td><td>88</td></tr><tr><td>4</td><td>90</td></tr><tr><td>5</td><td>93</td></tr><tr><td>5.1</td><td>94</td></tr><tr><td>5.8</td><td>94</td></tr><tr><td>6</td><td>100</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	B%	0	88	1	88	4	90	5	93	5.1	94	5.8	94	6	100
时间 (min)	B%																
0	88																
1	88																
4	90																
5	93																
5.1	94																
5.8	94																
6	100																
停止时间	17 min																
电离模式	正离子																
池加速电压	4																
气体温度	300 $^{\circ}\text{C}$																
气体流速	5 L/min																
雾化器	45 psi																
鞘气温度	250 $^{\circ}\text{C}$																
鞘气流速	11 L/min																
毛细管	4000 V																

HPLC 条件																			
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 PFP, 2.1 $\times$ 100 mm, 2.7 $\mu\text{m}$ (部件号 695775-408)																		
柱温	40 $^{\circ}\text{C}$																		
自动进样器温度	15 $^{\circ}\text{C}$																		
进样量	5 $\mu\text{L}$																		
流动相	A) 水 B) 甲醇																		
梯度	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>%B</th><th>流速 (mL/min)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>80</td><td>0.5</td></tr><tr><td>2</td><td>80</td><td>0.5</td></tr><tr><td>3</td><td>90</td><td>0.5</td></tr><tr><td>6</td><td>90</td><td>0.5</td></tr><tr><td>7</td><td>100</td><td>0.5</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	%B	流速 (mL/min)	0	80	0.5	2	80	0.5	3	90	0.5	6	90	0.5	7	100	0.5
时间 (min)	%B	流速 (mL/min)																	
0	80	0.5																	
2	80	0.5																	
3	90	0.5																	
6	90	0.5																	
7	100	0.5																	
停止时间	9 min																		
DAD 检测	维生素 E 为 294 nm, 维生素 A 为 325 nm																		

名称	保留时间	离子对 ( $m/z$ )	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (eV)
VD2	7.14	397.3 $\rightarrow$ 379.7 397.3 $\rightarrow$ 91.0	100	10 70
VD2-d3	7.13	400.3 $\rightarrow$ 125.4	120	10
VD3	7.19	385.3 $\rightarrow$ 259.5 385.3 $\rightarrow$ 367.6	100	10 10
VD3-d3	7.18	388.3 $\rightarrow$ 370.4	100	10

使用 Bond Elut Plexa 萃取柱（独特的聚合物基质 SPE）进行样品净化。先进的聚合物结构可实现出色的维生素提取性能，且不会使大分子内源蛋白质结合到孔中。即使在皂化反应的极强碱性条件下，该性能仍然保持稳定。在样品清洗过程中，使用约 10 mL 水清洗萃取柱（可通过 pH 试纸确认），并用 80/20 甲醇/水混合溶液洗去疏水性干扰物。样品净化后，一半样品用于 HPLC-DAD 分析维生素 A 和 E，另一半用于 LC/MS/MS 分析维生素 D2 和 D3。

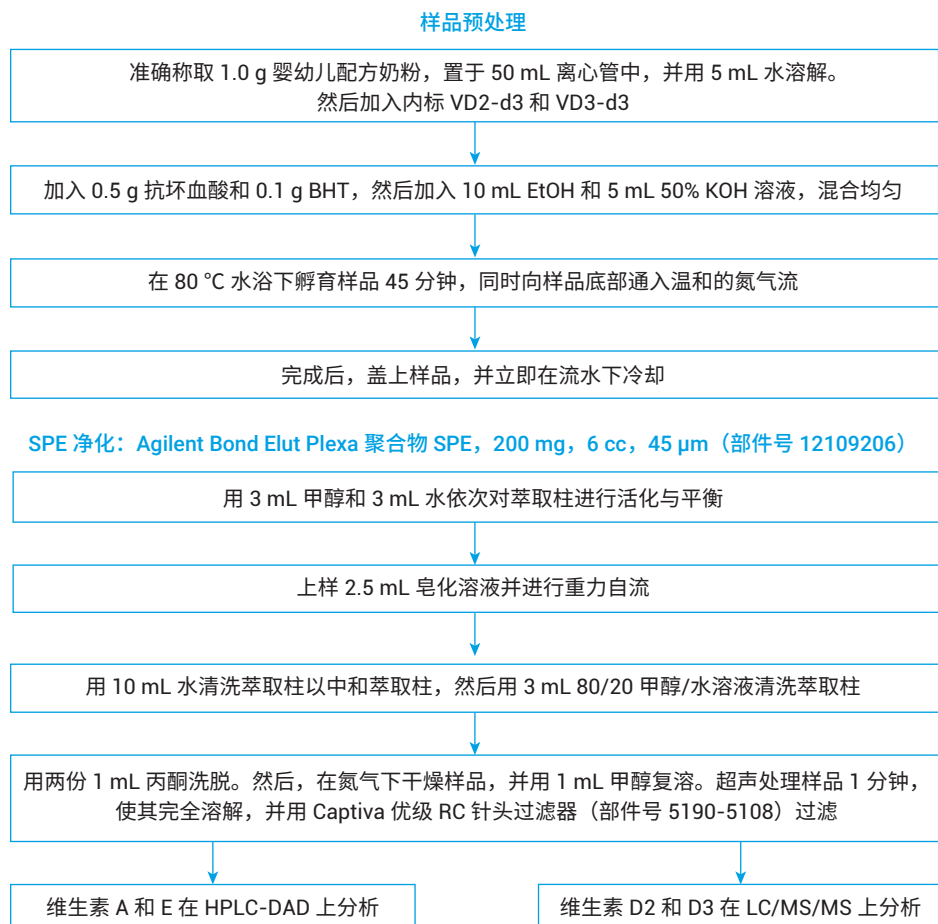


图 2. 使用 Agilent Bond Elut Plexa 聚合物 SPE 对婴幼儿配方奶粉进行脂溶性维生素分析的样品前处理过程

### 方法验证与讨论

将维生素 A 和 E 加入甲醇溶液中，得到 0.05、0.1、0.5、1、5、10、20、100 和 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准溶液，通过 HPLC 分析绘制校准曲线。将用甲醇配制的维

生素 D2 和 D3 标准溶液（浓度分别为 1、5、10、20、50、100、200、500 和 1000  $\text{ng}/\text{mL}$ ，含 80  $\text{ng}/\text{mL}$  内标）用于 LC/MS/MS 分析。在 HPLC-DAD 分析中，Agilent InfinityLab Poroshell 120

PFP 色谱柱为维生素 A 和四种维生素 E 提供了出色的峰形以及基线分离。使用 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱分离维生素 D2 和 D3，在基质干扰下提供了有效的色谱分离。色谱图如图 3 所示。

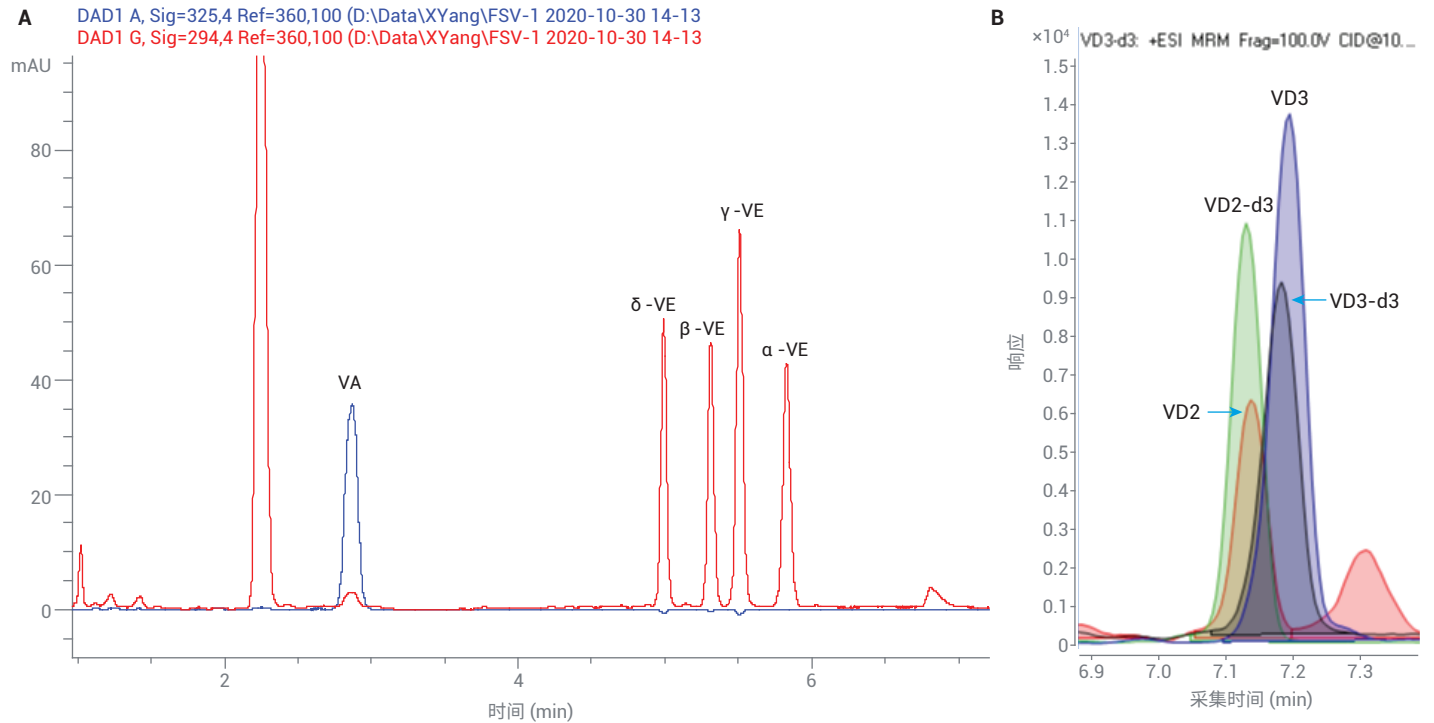
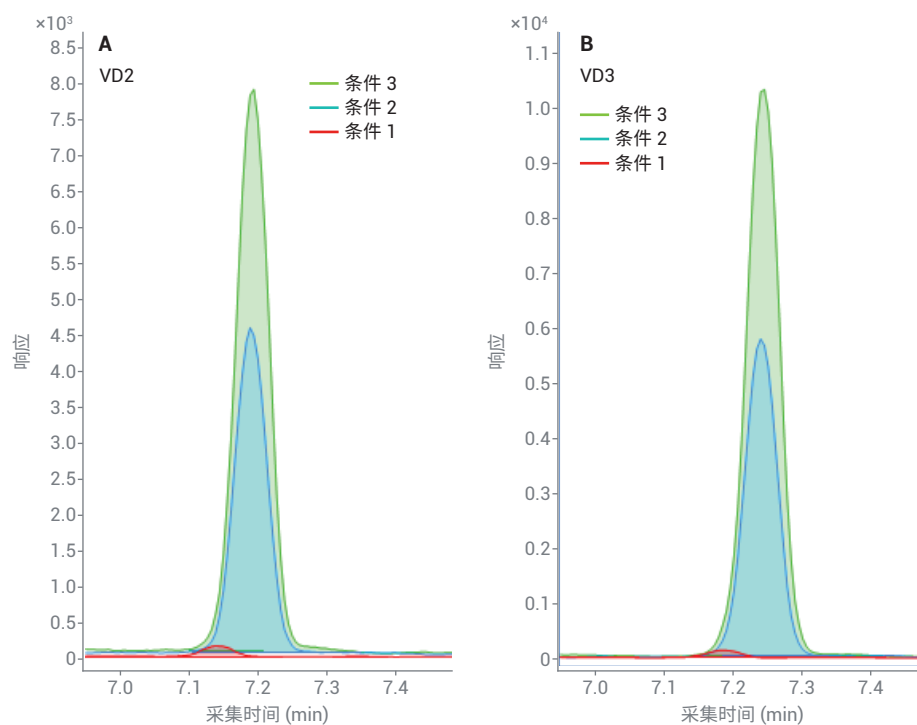


图 3. 左图：婴幼儿配方奶粉中加标浓度为 25  $\mu\text{g}/\text{g}$  的维生素 A (325 nm) 以及加标浓度为 250  $\mu\text{g}/\text{g}$  的  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ - 和  $\delta$ - 维生素 E (294 nm) 的 HPLC 色谱图。右图：婴幼儿配方奶粉中加标浓度为 0.8  $\mu\text{g}/\text{g}$  的维生素 D2 和 D3 以及加标浓度为 0.4  $\mu\text{g}/\text{g}$  的相应内标的 LC/MS/MS 色谱图

此外，通过使用合适的流动相添加剂，维生素 D2 和 D3 的 LC/MS/MS 灵敏度明显提高，如图 4 所示。与仅在流动相中加入甲酸（条件 1）相比，加入 4.5 mmol/L 甲酸铵（条件 2）可显著改善峰强度。在条件 2 的基础上，再加入 0.5 mmol/L 氟化铵，可以进一步提高维生素 D2 和 D3 的离子化效率，从而使响应加倍。



LC/MS 流动相条件	峰高比值	
	维生素 D2	维生素 D3
条件 1	1	1
条件 2	30	41
条件 3	54	73

**图 4.** 不同流动相条件下维生素 D2 和 D3 的峰强度。条件 1：A) 含 0.1% FA 的甲醇溶液；B) 含 0.1% FA 的水溶液；条件 2：A) 含 0.1% FA、4.5 mmol/L 甲酸铵的甲醇溶液；B) 含 0.1% FA、4.5 mmol/L 甲酸铵的水溶液；条件 3：A) 含 0.1% FA、4.5 mmol/L 甲酸铵和 0.5 mmol/L 氟化铵的甲醇溶液；B) 含 0.1% FA、4.5 mmol/L 甲酸铵和 0.5 mmol/L 氟化铵的水溶液

分别用 Agilent MassHunter 定量分析软件和 Agilent ChemStation 分析工作站软件处理 LC/MS/MS 和 HPLC 数据。纯标准品校准曲线如图 5 所示。使用未加权线性回归拟合在 0.05–200  $\mu\text{g/mL}$  的动态范围内建立维生素 A 和 E 的校准曲线， $R^2$  为 0.999。使用线性回归拟合和  $1/x$  加权在 1–1000  $\text{ng/mL}$  的动态范围内建立维生素 D2 和 D3 的校准曲线， $R^2$  分别为 0.998 和 0.999。

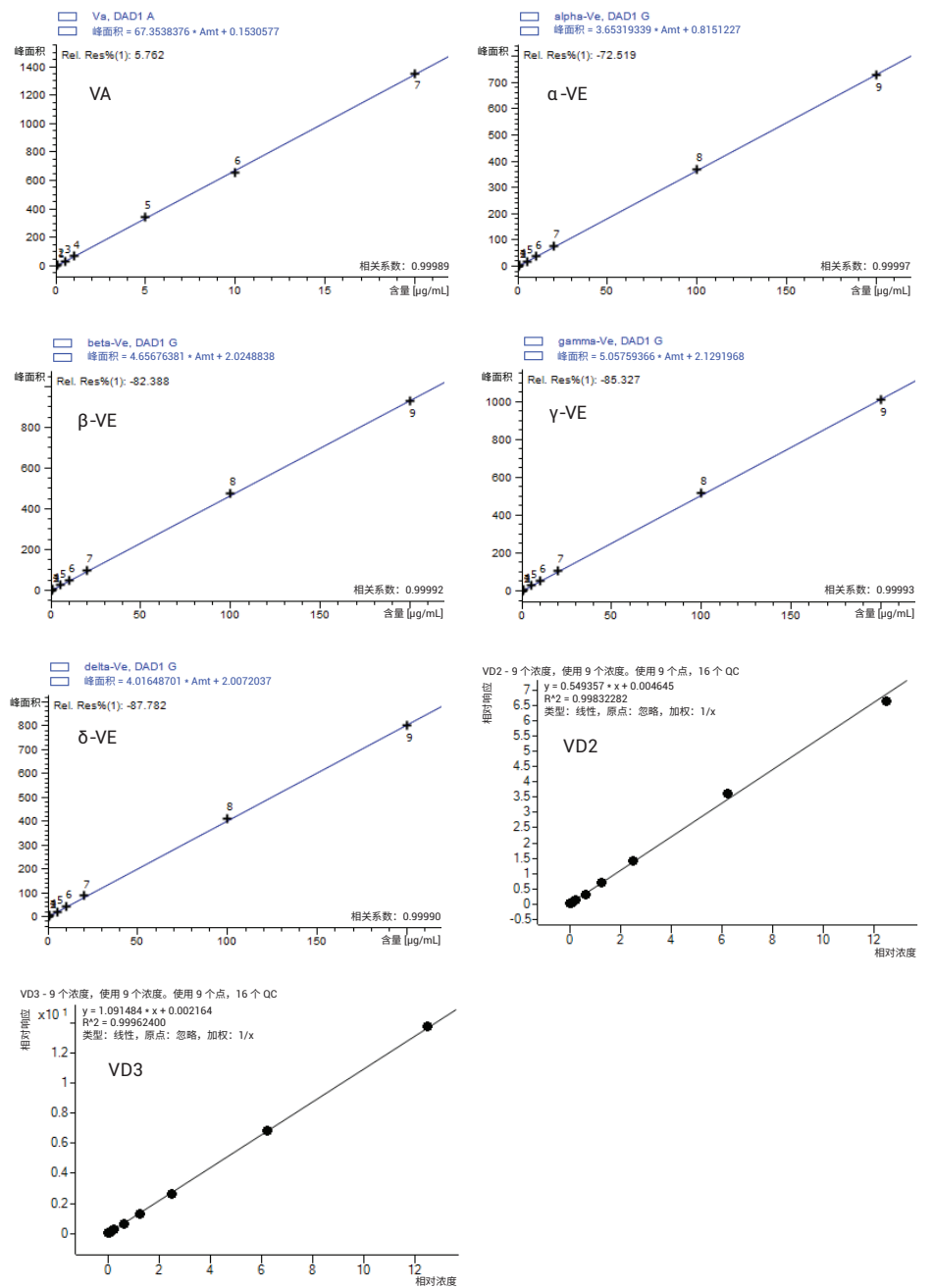


图 5. HPLC-DAD 分析中维生素 A 和 E 的纯标准品校准曲线以及 LC/MS/MS 分析中维生素 D2 和 D3 的纯标准品校准曲线

在低加标浓度和高加标浓度下，对 QC 样品进行四次重复测试，以评估准确度和精密度，结果如表 1 所示。由于婴幼儿配方奶粉中普遍含有营养添加剂，无法获得真正的基质空白。因此，根据纯标准品校准曲线来对分析物进行定量。在 LC/MS/MS 上的基质效应通过使用稳定标记的氘代内标来进行校正。对于 LC-DAD 分析，因为已经对目标物实现了良好的分离，不存在基质效应的问题。对基质对照

进行初步定量，发现维生素 E 的浓度非常高 ( $\alpha$ -生育酚当量总计为 9.8 mg/100 g)，而维生素 D3 浓度较低 (13  $\mu$ g/100 g)。此结果证实了通过 HPLC-DAD 或 LC/MS/MS 同时定量分析所面临的重大挑战。该结果也表明，必须使用 HPLC-DAD 定量分析高浓度的维生素 A 和 E，使用 LC/MS/MS 定量分析低浓度的维生素 D2 和 D3。然后配制两种浓度的加标 QC 样品，并使用基质对照贡献校正进

行四次重复定量分析。低浓度 QC 样品的加标浓度为基质对照的 2-3 倍，而高浓度 QC 样品的加标浓度为基质对照的 4-5 倍。使用基质对照贡献校正计算浓度，然后将校正后的计算浓度对应于实际加标浓度。根据校正后计算浓度与实际加标浓度的比值计算回收率。所有回收率均高于 80%，RSDs 低于 10%。

表 1. 低加标浓度和高加标浓度下，婴幼儿配方奶粉中维生素的方法定量分析结果 (n = 4)

分析物	基质		QC-低浓度					QC-高浓度				
	背景 ( $\mu$ g/g)	RSD% (n = 4)	加标浓度 ( $\mu$ g/g)	计算浓度 ( $\mu$ g/g)	校正浓度 ( $\mu$ g/g)	回收率%	RSD% (n = 4)	加标浓度 ( $\mu$ g/g)	计算浓度 ( $\mu$ g/g)	校正浓度 ( $\mu$ g/g)	回收率%	RSD% (n = 4)
VA	5.4	9.1	15.0	19.5	14.1	95.6	8.5	25.0	27.5	22.1	89.9	8.9
VD2	0	0	0.4	0.36	0.36	89.5	2.0	0.8	0.65	0.65	81.2	4.5
VD3	0.13	6.2	0.4	0.46	0.33	87.9	3.4	0.8	0.88	0.75	94.6	2.2
$\alpha$ -VE	87.2	2.4	150.0	229.3	142.1	96.7	8.8	250.0	301.3	214.1	89.4	1.5
$\beta$ -VE	1.3	6.5	150.0	144.0	142.7	95.2	5.6	250.0	213.3	212.0	84.9	2.2
$\gamma$ -VE	99.5	1.2	150.0	242.7	143.2	97.3	6.9	250.0	309.3	209.8	88.5	1.5
$\delta$ -VE	44.0	6.6	150.0	186.7	142.7	96.2	8.6	250.0	248	204.0	84.4	3.2

## 结论

本研究展示了一种用于婴幼儿配方奶粉中脂溶性维生素分析的高效且稳定的工作流程，该工作流程首先将样品皂化，然后使用 Agilent Bond Elut Plexa 聚合物 SPE 进行萃取和净化。HPLC-DAD 和 LC/MS/MS 两个独立平台为婴幼儿配方奶粉中的不同维生素提供了合适的定量水平。方法验证表明该方法具有出色的回收率 (81.2%–97.3%) 和精密度 (RSD < 8.9%)。

## 参考文献

1. Michael, F. H. *et al.* The Vitamin D Content of Fortified Milk and Infant Formula. *N. Engl. J. Med.* **1992**, 326, 1178–1181
2. Alfred, S. Vitamin A Deficiency **2001**
3. Ronald J. S. *et al.* Vitamin E Deficiency with Normal Serum Vitamin E Concentrations in Children with Chronic Cholestasis. *N. Engl. J. Med.* **1984**, 310, 1209–1212
4. Guideline for Vitamin A & D Fortification of Fluid Milk, *The Dairy Practices Council*, <http://www.dairypc.org>
5. Yuan, Z. *et al.* A Review of the Extraction and Determination Methods of Thirteen Essential Vitamins to the Human Body: An Update from 2010, *Molecules* **2018**, 23, 1484–1509
6. Muhammad, I. K. *et al.* Optimization and Validation of RP-LC/UV-VIS Detection Method for Simultaneous Determination of Fat-Soluble Anti-Oxidant Vitamins, all-trans-Retinol and  $\alpha$ -Tocopherol in Human Serum: Effect of Experimental Parameters, *Chromatographia* **2010**, 71, 577–586
7. Barakat, I. S. A.; Hammouri, M. K.; Habib, I. Simultaneous Determination of Vitamins A and D3 in Dairy Products by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS), *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* **2015**, 92, 012020
8. Xiuping, X.; Jinming, Y.; Pingli, H. Simultaneous Determination of Five Fat-Soluble Vitamins in Feed by High-Performance Liquid Chromatography Following Solid-Phase Extraction. *J. Chromatogr. Sci.* **2008**, 46, 345–350
9. SRM 1849a Infant/Adult Nutritional Formula I; SRM 1869 Infant/Adult Nutritional Formula II, *National Institute of Standards & Technology*
10. GB 5009.82-2016, 食品安全国家标准, 食品中维生素 A、D、E 的测定
11. Rodas, M. B. *et al.* Rapid Determination by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography of Vitamins A and E in Infant Formulas. *J. Chromatogr. A.* **2003**, 1018, 197–202
12. Kienen, V. *et al.* Development of a Green Chromatographic Method for Determination of Fat-Soluble Vitamins in Food and Pharmaceutical Supplement. *Talanta* **2008**, 75, 141–146
13. Chen, L. *et al.* Determination of Fat-soluble Vitamins in Food and Pharmaceutical Supplements Using Packed-fiber Solid Phase Extraction (PFSPE) for Sample Preconcentration/Clean-up. *Procedia Environ. Sci.* **2011**, 8, 588–595

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)

DE.7939814815

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, 2020  
2020 年 12 月 22 日, 中国出版  
5994-2948ZHCN

