

同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱技术分析 婴儿配方奶粉中的维生素 D

曹 慧, 陈小珍, 王 瑾, 陈万勤

(浙江省质量检测科学研究院, 浙江 杭州 310013)

摘要:为了准确测定婴儿配方奶粉中维生素 D 的含量,建立了同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱联用技术分析维生素 D 含量的方法。样品经氢氧化钾皂化,用 V(正戊烷):V(乙醚)=4:1 的混合溶液提取,采用 Waters T₃ 色谱柱分离,以 2 mmol/L 甲酸铵-甲醇和 2 mmol/L 甲酸铵-水溶液为流动相进行梯度洗脱,采用电喷雾-正离子电离源多反应监测模式进行定性和定量分析,内标法定量。维生素 D₂ 和维生素 D₃ 在 5~150 μg/L 质量浓度范围内线性关系良好,维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的检出限均为 1.5 μg/kg,定量限均为 5.0 μg/kg,方法回收率分别为 97.0%~104.7%和 92.7%~108.0%,日内和日间相对标准偏差均小于 10%。该方法简单、灵敏度高、分析时间短、定量准确,适用于婴儿奶粉中维生素 D 的测定。

关键词:同位素稀释;超高效液相色谱-串联质谱;维生素 D;婴儿配方奶粉

中图分类号:O 657.63 文献标识码:A 文章编号:1004-2997(2012)04-0232-05

Determination of Vitamin D in Infant Milk Powder by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with Isotopes Dilution

CAO Hui, CHEN Xiao-zhen, WANG Jin, CHEN Wan-qin

(Zhejiang Institute of Quality Inspection Science, Hangzhou 310013, China)

Abstract: In order to establish a reliable method for quantitative analysis of vitamin D in infant milk powder, a ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC/MS/MS) with isotopes dilution method was developed. The samples were saponified with KOH and extracted by pentane-ethyl ether solution (V(pentane):V(ethyl ether)=4:1). The target analytes were separated on the Waters T₃ column with gradient elution using methanol and water (containing 2 mmol/L ammonium formate for both) as mobile phase. The identification and quantification were achieved by using electrospray ionization in positive ion mode and with multiple reaction monitoring. Internal standard method was used to determine the results. The linear range of the calibration curve was 5—150 μg/L. The limit of detection (LOD) of the method was 1.5 μg/kg, and the limit of quantitation (LOQ) was 5.0 μg/kg. The recoveries of the method were in the range of 97.0%—104.7%

收稿日期:2012-04-09;修回日期:2012-06-03

基金项目:浙江省科技厅分析测试科技计划(2011C37072)、浙江省质量技术监督系统科研计划(20110203)项目资助

作者简介:曹 慧(1980~),女(汉),浙江湖州人,博士,工程师,主要从事色谱和质谱检测与科研工作。E-mail: ch_zj_cn@163.com

通信作者:陈小珍(1960~),女(汉),浙江杭州人,教授级高级工程师,主要从事食品检测与研究工作。E-mail: cxz730@163.com

and 92.7%—108.0% for vitamin D₂ and vitamin D₃ respectively. The relative standard deviations (RSD) of intra-day and inter-day were less than 10%. The simply, rapid, accurate and sensitive method can be applied to determine the vitamin D in infant milk powder.

Key words: isotopes dilution; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); vitamin D; infant milk powder

维生素 D 为固醇类衍生物,具有抗佝偻病的作用,是一种重要的脂溶性维生素^[1-3]。维生素 D 对于人体健康有诸多益处,除了可保持骨骼强健、预防软骨病外,还能起到有效治疗软骨病的功效。最新医学研究表明,童年时保证摄入足够的维生素 D 能降低成年后患骨质疏松症的风险。维生素 D 家族成员中最重要的成员是维生素 D₂ 和 D₃,由于它们结构相似、功能相同、色谱行为相近,对其进行有效分离和定量具有一定的难度。目前,对于维生素 D 的检测主要采用高效液相色谱法^[4-10],由于样品中维生素 D 含量低,基质干扰严重,很难对维生素 D 进行准确地定性和定量。有报道采用高效液相色谱-串联质谱法测定食品中的维生素 D^[11-18],由于皂化和液液萃取等过程导致目标分析物不同程度的损失,基质效应在质谱分析中表现明显,因而,很难对维生素 D 进行准确定量。

本工作采用同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱技术对婴幼儿配方奶粉中的维生素 D 进行分析测定,在试验中加入同位素内标,避免由于皂化和萃取过程导致的目标物损失,采用内标法进行定量,消除基质效应的影响^[19-21]。

1 试验部分

1.1 主要仪器与装置

Acquity™ 超高效液相色谱仪和 Xevo™ TQ-MS 质谱仪:美国 Waters 公司产品,配有电喷雾电离接口(ESI)及 Masslynx 数据处理系统;Milli-Q 超纯水器:美国 Millipore 公司产品;高速离心机:美国 Thermo 公司产品;氮气吹干仪:天津市恒奥科技有限公司产品;往复式恒温培养振荡器:上海智城分析仪器制造有限公司产品;涡旋混合器:太仓市华利达实验设备有限公司产品。

1.2 主要材料与试剂

甲醇、乙腈:色谱纯,德国 Mekeo 公司产品;异辛烷、乙醚、正戊烷:色谱纯,美国 Tedia 公司产品;婴儿配方奶粉:市售品;维生素 D₂ 和维生

素 D₃ 标准品:美国 pharmacopeia 公司产品;维生素 D₂-²H₃(1 mg)和维生素 D₃-²H₃(1 g/L, 1 mL)标准品:美国 IsoSciences LLC 公司产品。

标准溶液的配制:分别准确称取 10 mg 维生素 D₂ 和维生素 D₃ 标准品于 10 mL 容量瓶中,用异辛烷定容,配置成 1 g/L 的储备液,密封储存于-20 ℃冰箱中。分别吸取 1 g/L 的维生素 D₂ 和维生素 D₃ 标准溶液 50 μL 于 50 mL 容量瓶中,用甲醇定容,配置成 1 mg/L 的混合标准溶液,用时稀释成一系列浓度的标准溶液,待测。

内标溶液的配制:取 1 mg 维生素 D₂-²H₃ 标准品于 10 mL 容量瓶中,用异辛烷定容,配置成 100 mg/L 的储备液,密封储存于-20 ℃冰箱中。取 1 mL 浓度为 1 g/L 的维生素 D₃-²H₃ 标准品于 10 mL 容量瓶中,用异辛烷定容,配置成 100 mg/L 的储备液,密封储存于-20 ℃冰箱中。分别吸取 100 mg/L 的维生素 D₂-²H₃ 和维生素 D₃-²H₃ 标准溶液 100 μL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,配置成 1 mg/L 的混合内标溶液。

1.3 试验条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱:Waters Acquity UPLC HSS T₃ 柱 2.1 mm×100 mm,粒径 1.8 μm;柱温:35 ℃;样品温度:25 ℃;进样体积:5 μL;流速:0.3 mL/min;流动相:2 mmol/L 甲酸铵甲醇(A),2 mmol/L 甲酸铵水混合溶液(B);洗脱程序:0~1min,95% A,3~6min,100% A,7~10min,95% A。

1.3.2 质谱条件 离子源:电喷雾离子源(ESI);扫描方式:正离子模式;检测方式:多反应监测(MRM);毛细管电压:3.00 kV;锥孔电压:20 V;离子源温度:150 ℃;脱溶剂气温度:500 ℃;脱溶剂气流量:1 000 L/h。

1.4 前处理方法

称取 2 g 试样于离心管中,加入 100 μL 浓度为 1 mg/L 的混合内标溶液、0.4 g 抗坏血酸和 10 mL 水,涡旋混合均匀,再加入 6 mL 甲醇

和 5 mL 45% 的氢氧化钾溶液,置于 75 °C 水浴中,振摇皂化 30 min 后转移入分液漏斗,用 22 mL $V(\text{正戊烷}) : V(\text{乙醚}) = 4 : 1$ 的混合溶液和 6 mL 乙腈萃取,有机相经水洗至中性,在 40 °C 下氮气吹至干,加入 2 mL $V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 95 : 5$ 的混合溶液溶解。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

分别选取 5 种不同长度、不同型号的色谱柱分离维生素 D_2 和维生素 D_3 ,使用标准工作溶液对各规格色谱柱进样分离得色谱质谱图,其中 Waters Acquity UPLC HSS T_3 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm) 的峰形和分离效果最好,这是由于 T_3 色谱柱可以提高极性化合物的保留并与纯水相流动相兼容,使峰形对称且稳定。Waters Acquity UPLC BEH HILIC (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm) 色谱柱要求高比例有机相,水相比比例极小,不适合维生素 D 类物质的分析。Waters Acquity UPLC BEH C_{18} (2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μm) 色谱柱由于长度太短,干扰严重,且维生素 D_2 和维生素 D_3 不能有效分离。Waters Acquity UPLC BEH C_{18} (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm) 和 Waters Acquity UPLC BEH C_8 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm) 色谱柱由于不能完全兼容纯水相流动相,峰形拖尾较严重且分离效果不好。

选取 Waters Acquity UPLC HSS T_3 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱,分别选择甲醇和乙腈作为强洗脱流动相。试验证明:当乙腈作流动相时,离子化受到不同程度的抑制,丰度明显降低,导致灵敏度下降,而甲醇的离子化效率明显优于乙腈,故本试验采用甲醇强洗脱流动相。在流动相中加入甲酸铵能增加维生素 D_2 和维生素 D_3 在 ESI+ 模式下的离子化效率。本试验分别配制 1、2 和 5 mmol/L 的甲酸铵-甲醇和甲酸铵-水作为流动相,试验表明,2 mmol/L 的甲酸铵体系能提供最佳离子化条件,峰面积信号最强,灵敏度最高。图 1 为维生素 D_2 和维生素 D_3 混合标准溶液的 MRM 色谱图。

2.2 质谱条件的优化

在电喷雾质谱、正离子监测模式下,分别对毛细管电压、锥孔电压、碰撞能量和选择离子等进行了充分的优化,选取经碰撞后所得丰度较高的两个子离子作为定量和定性离子,并确定其最

佳碰撞能量的电压值。最终所选择确定的母离子、子离子和碰撞能量等参数列于表 1。

2.3 前处理方法的优化

采用 $V(\text{正戊烷}) : V(\text{乙醚}) = 4 : 1$ 的混合溶液作为萃取溶剂,与乙醚或石油醚相比,具有提取效率高、回收稳定等优点;在萃取试剂中加入乙腈溶液,有利于萃取后两相分层,不利于乳化。在前处理过程中加入了同位素内标,避免了由于多次液液萃取造成的损失,提高了定量分析的准确性。

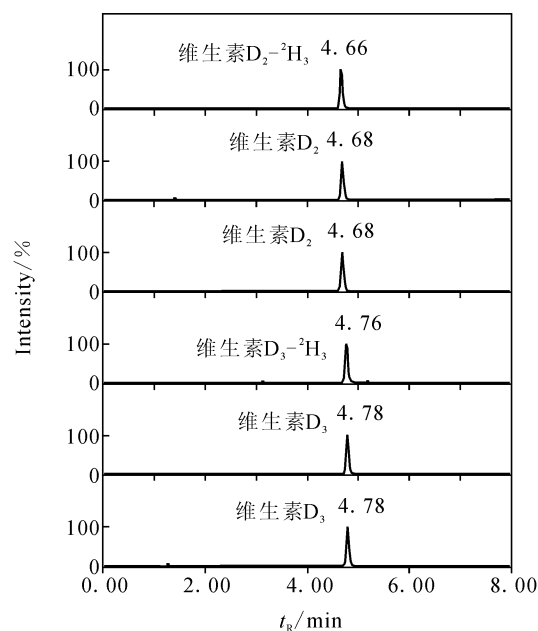


图 1 维生素 D_2 和维生素 D_3 的 MRM 色谱图

Fig. 1 Multiple reaction monitoring chromatograms of vitamin D_2 and vitamin D_3

表 1 维生素 D_2 和维生素 D_3 的质谱分析参数
Table 1 LC-MS/MS parameters for vitamin D_2 and vitamin D_3

编号	化合物	监测离子对 m/z	锥孔电压/V	碰撞能量/V
1	维生素 D_2	397.18/107	20	26
		397.18/69.2	20	22
2	维生素 D_3	385.12/107	20	16
		385.12/259.2	20	20
3	维生素 $D_2-^2H_3$	400.18/69.2	20	18
4	维生素 $D_3-^2H_3$	388.12/259.2	20	12

2.4 方法学验证

2.4.1 线性范围和检出限 取浓度分别为5、10、25、50、100、125、150 $\mu\text{g/L}$ 的一系列标准溶液,以峰面积(y)对相应的质量浓度(x)作图,得标准曲线,示于图2,并求出相应的线性回归方程及相关系数,结果列于表2。结果表明:维生素 D_2 和维生素 D_3 在5~150 $\mu\text{g/L}$ 的浓度范围内具有良好的线性关系,相关系数 r^2 均在0.999以上。按3倍信噪比计算得到样品中维生素 D_2 和维生素 D_3 的检出限为1.5 $\mu\text{g/kg}$,定量限为5.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.4.2 精密度和稳定性实验 在不含有维生素 D_2 和 D_3 的奶粉样品基质中添加20 $\mu\text{g/kg}$ 浓度水平的维生素 D_2 和维生素 D_3 标准溶液,按1.4方法进行预处理,平行操作7次,进行分析,维生素 D_2 和维生素 D_3 的RSD分别为1.07%和0.77%。按日内精密度的预处理方法,每天取样1份,连续测定7天,维生素 D_2 和维生素 D_3 的RSD分别为6.82%和5.63%,该试验重现性较好。

2.4.3 回收率实验 分别在不含有维生素 D_2 和 D_3 的奶粉样品基质中添加5、10、20和100 $\mu\text{g/kg}$ 4种不同浓度的维生素 D_2 和维生素 D_3 标准溶液,按1.4方法进行预处理,回收率列于

表3。结果表明:维生素 D_2 的回收率在97.0%~104.7%,维生素 D_3 的回收率在92.7%~108.0%。

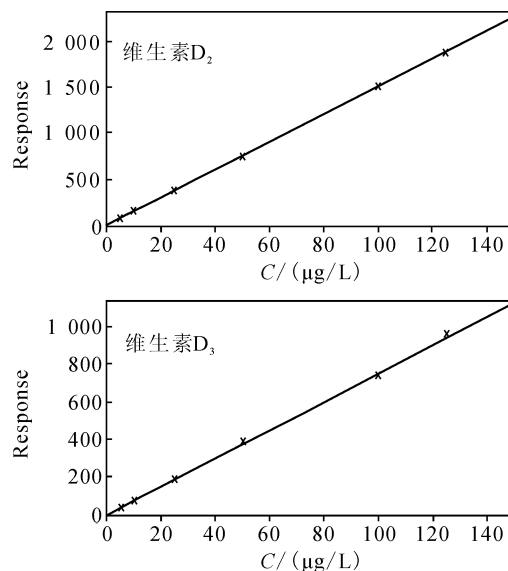


图2 维生素 D_2 和维生素 D_3 的校正曲线

Fig. 2 Calibration curve of vitamin D_2 and vitamin D_3

2.5 实际样品的测定

对市场上3批婴儿配方奶粉,根据1.4方法进行测定,每批平行测定3次,结果列于表4。

表2 维生素 D_2 和维生素 D_3 的线性方程、相关系数、检出限和定量限

Table 2 Linear equations, correlation coefficients, LOD and LOQ of vitamin D_2 and vitamin D_3

编号	化合物	线性方程	相关系数 r^2	检出限/ $(\mu\text{g/kg})$	定量限/ $(\mu\text{g/kg})$
1	维生素 D_2	$y=15.0895x+2.90644$	0.9999	1.5	5.0
2	维生素 D_3	$y=7.52291x+0.303522$	0.9991	1.5	5.0

表3 维生素 D_2 和维生素 D_3 的回收率结果($n=3$)

Table 3 Results of recoveries of vitamin D_2 and vitamin D_3

化合物	添加量/ $(\mu\text{g/kg})$	回收率/%
维生素 D_2	5.0	98.4
	10.0	99.1
	20.0	104.7
	100.0	97.0
维生素 D_3	5.0	101.3
	10.0	92.7
	20.0	97.2
	100.0	108.0

表4 维生素 D_2 和维生素 D_3 的测定结果

Table 4 Testing results of vitamin D_2 and vitamin D_3

编号	维生素 D_2 / $(\mu\text{g/kg})$	维生素 D_3 / $(\mu\text{g/kg})$
1	-	75 ± 2
2	-	110 ± 3
3	-	92 ± 3

3 结论

本工作建立了超高效液相色谱-串联质谱法测定婴儿配方奶粉中的维生素 D_2 和维生素 D_3 含量。该方法具有灵敏度高、前处理方法简单、回收率高且稳定、准确度和精密度高等优点,由于在前处理方法中加入了同位素内标,与国家标

准方法相比,样品消耗量少,萃取效率高,能有效地去除基质干扰,定量结果的准确性更高。

参考文献:

- [1] WANG S H. Epidemiology of vitamin D in health and disease[J]. Nutrition research reviews, 2009, 22 (2): 188-203.
- [2] BLUM M, DOLNIKOWSKI G, SEYOUM E, et al. Vitamin D₃ in fat tissue[J]. Endocrine, 2008, 33 (1): 90-94.
- [3] PERALES S, DELGADO M M, ALEGRIA A, et al. Liquid chromatographic determination of Vitamin D₃ in infant formulas and fortified milk[J]. Analytica chimica acta, 2005, 543 (1/2): 58-63.
- [4] 赵 榕,薛 颖,吴国华,等. 固相萃取-高效液相色谱法测定钙强化食品中的维生素 D[J]. 色谱, 2008,26(1):113-115.
- [5] 仲宣惟,夏 瑞,施 捷. HPLC 法测定保健食品中维生素 D₂、D₃ 的含量[J]. 药物分析杂志,2007, 27(11):1 773-1 774.
- [6] 梁晓艳. 高效液相色谱法同时测定钙镁 D 片中维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的含量[J]. 广西中医学学报,2007,10(2):58-61.
- [7] 谭青松,付 洁,何瑞国. 高效液相色谱法测定鱼样中的维生素 A、维生素 D₃ 和维生素 E[J]. 动物营养学报,2007,19(5):636-640.
- [8] 曹晶萍,陈海波,高 颖. 高效液相色谱法同时测定人血清中维生素 A、D₃、E 的含量[J]. 中国医院药学杂志,2008,28(10):804-806.
- [9] 曾红燕,邹晓莉. HPLC 同时测定保健食品中维生素 A、D、E 和 β-胡萝卜素[J]. 分析试验室,2008,27 (2):15-18.
- [10] 刘红河,尹江伟,仲岳桐. HPLC-DAD 同时测定食品中维生素 A、D、E 研究[J]. 中国卫生检验杂志,2005,9(15):1 047-1 049.
- [11] HEUDI O, TRISCONI M J, BLAKE C J. Simultaneous quantification of Vitamins A, D₃ and E in fortified infant formulae by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of chromatography A, 2004, 1022 (1/2): 115-123.
- [12] 黄 芳,吴惠勤,杭义萍. 高效液相色谱-串联质谱法测定食品中维生素 D₂ 和维生素 D₃[J]. 理化检验-化学分册,2011,47(5):577-579.
- [13] BYRDWELL W C. Comparison of analysis of vitamin D₃ in foods using ultraviolet and mass spectrometric detection [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(6):2 135-2 146.
- [14] HUANG M, WINTERS D. Application of ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the measurement of vitamin D in foods and nutritional supplements[J]. Journal of AOAC International, 2011, 94(1):211-223.
- [15] TRENERRY V C, PLOZZA T, CARIDI D, et al. The determination of vitamin D₃ in bovine milk by liquid chromatography mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2011(125):1 314-1 319.
- [16] ARONOV P A, HALL L M, DETTMER K, et al. Metabolic profiling of major vitamin D metabolites using Diels-Alder derivatization and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008,391(5): 1 917-1 930.
- [17] DIMARTINO G. Simultaneous determination of cholecalciferol (vitamin D₃) and ergocalciferol (vitamin D₂) in foods by selected reaction monitoring[J]. Journal of AOAC International, 2009, 92(2): 511-517.
- [18] DIMARTINO G. Convenient analysis of vitamin D in cheese and other food matrixes by liquid chromatography/mass spectrometry[J]. Journal of AOAC International, 2007, 90 (5): 1 340-1 345.
- [19] 申玉星,全 灿,马 康. 液相色谱-同位素稀释质谱法准确测定人血清中葡萄糖含量[J]. 质谱学报,2011,32(4):211-219.
- [20] 宁啸骏,王丁林,虞成华,等. UPLC-MS/MS 同位素内标法测定食品中对位红、苏丹红 I ~ IV 的研究[J]. 质谱学报,2009,30(1):41-46.
- [21] PHINNEY K W, RIMMER C A, THOMAS J B, et al. Isotope dilution liquid chromatography-mass spectrometry methods for fat-and water-soluble vitamins in nutritional formulations[J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(1):92-96.