

工作简报

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黄芳^{1,2}, 吴惠勤¹, 杭义萍^{2*}

(1. 中国广州分析测试中心, 广东省分析测试技术公共实验室, 广州 510070;

2. 华南理工大学 化学化工学院, 广州 510640)

摘要: 提出了食品中维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的高效液相色谱-串联质谱分析方法。食品样品经氢氧化钾皂化后乙醚萃取, 所得有机相经无水硫酸钠除水后蒸发至干。用 1 mL 乙醇溶解后经 Agilent Zorbax XDB C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 3.5 μm) 分离, 用甲醇-10 mmol · L⁻¹ 乙酸铵溶液 (90+10) 的混合溶液洗脱, 采用电喷雾正离子模式多反应监测。维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的线性范围均为 50~500 μg · L⁻¹, 检出限 (3S/N) 均为 10 μg · L⁻¹。方法应用于测定奶粉和酸酸乳中维生素 D₂ 和维生素 D₃, 回收率在 76.8%~83.9% 之间。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱法; 食品; 维生素 D₂; 维生素 D₃

中图分类号: O657.7

文献标志码: A

文章编号: 1001-4020(2011)05-0577-03

HPLC-MS/MS Determination of Vitamin D₂ and Vitamin D₃ in FoodHUANG Fang^{1,2}, WU Hui-qin¹, HANG Yi-ping^{2*}

(1. Guangdong Provincial Public Lab of Analytical and Testing Technology, China National Analytical Center (Guangzhou), Guangzhou 510070, China;

2. School of Chem. and Chem. Eng., South China University of Science and Engineering, Guangzhou 510640, China)

Abstract: HPLC-MS/MS was applied to the determination of vitamin D₂ (VD₂) and vitamin D₃ (VD₃) in food. The sample was saponified with KOH and extracted with ethyl ether, and the organic phase obtained was dehydrated with anhydrous sodium sulfate and evaporated to dryness. The residue was dissolved with 1 mL of ethanol and used for HPLC-MS/MS determination, using Agilent Zorbax XDB C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 3.5 μm) as chromatographic column, and a mixture of methanol and 10 mmol · L⁻¹ ammonium acetate solution (mixed in the ratio of 90 to 10 by vol.) as mobile phase. Positive electrospray ionization as well as multiple reaction monitoring mode was used in the detection. Linearity ranges of VD₂ and VD₃ were found same between 50–500 μg · L⁻¹ with their detection limits (3S/N) of 10 μg · L⁻¹. The proposed method was used for the determination of VD₂ and VD₃ in milk powder and sour milk, giving values of recovery in the range of 76.8%–83.9%.

Keywords: HPLC-MS/MS; Food; Vitamin D₂; Vitamin D₃

维生素 D (VD) 是维持机体正常生理功能及细胞内特异代谢反应必不可缺少的生命活性物质, 如人体内缺乏维生素 D 可导致小儿佝偻、骨质软化等

病症, 含量过高会导致中毒。维生素 D 不能由机体自身合成, 必须由食物供给, 因而常用来强化食品或保健品, 特别是婴幼儿食品, 维生素 D 含量通常作为评价食品营养价值的重要指标, 因而需要对保健品和食品进行监测。目前, 常用高效液相色谱法测定维生素 D^[1-5], 对于含量很低的样品, 如有些儿童饮料, 标示值为 (1~4) μg/100 mL, 若用高效液相

收稿日期: 2010-03-27

作者简介: 黄芳 (1975-), 女, 湖南岳阳人, 硕士, 高级工程师, 主要从事有机化学分析。

* 联系人

色谱法检测, 需预先将样品皂化后浓缩富集 10~50 倍, 才可被检测出, 但是维生素 D 遇光、氧气、热等易变质^[6], 处理过程可能导致目标物损失, 甚至可能检测不出。另外高效液相色谱法只能通过保留时间定性, 对于基质复杂的样品容易产生干扰, 因而影响检测结果的准确性。本工作采用高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)对食品、保健品等复杂基质中微量维生素 D 进行了分析。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200LC/6410B MS 液相色谱-串联四极杆质谱联用仪。

标准储备溶液: 分别称取维生素 D₂ 和维生素 D₃ 标准品 10.0 mg, 用乙醇(含有 5 g·L⁻¹ 2,6-二叔丁基对甲酚和 5 g·L⁻¹ 抗坏血酸)溶解并定容至 100 mL。得到 100 mg·L⁻¹ 维生素 D₂ 和维生素 D₃ 标准储备溶液, 用时稀释为所需浓度混合标准溶液。

甲醇为色谱纯, 其余均为分析纯试剂, 试验用水为双蒸水。

1.2 色谱-质谱分析条件

色谱条件: Agilent Zorbax XDB C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 3.5 μm); 流动相: 甲醇-10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵(90+10)混合溶液, 流量 0.4 mL·min⁻¹; 进样量 5.0 μL。

质谱条件: 电喷雾(ESI)正离子电离模式, 电喷雾电压 4 000 V; 干燥气(氮气)温度 350 °C, 流量 9.00 L·min⁻¹; 雾化气(氮气)压力 275.8 kPa; 多反应监测(MRM)模式检测, 质谱分析参数见表 1。

表 1 测定维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的质谱分析参数

Tab. 1 MS/MS parameters for det. of VD₂ and VD₃

组分	保留时间 /min	质荷比 m/z		碰撞能量 /eV	源内碎裂电压 /eV
		母离子	子离子		
维生素 D ₂	5.79	396.6	271.0	8	100
			378.9	8	100
维生素 D ₃	5.94	385.8	259.8	10	100
			368.1	10	100

1.3 试验方法

称取奶粉试样 5.000 0 g(液态奶制品取样 5.00 mL, 直接加入乙醇溶液处理)于 100 mL 具塞试管中, 加入水 10 mL, 加入含有 2,6-二叔丁基对甲酚的乙醇溶液 20 mL, 再加入 500 g·L⁻¹ 氢氧化钾溶液 10 mL, 置于 60 °C~70 °C 水浴中, 振摇皂化

30 min 后, 转入 250 mL 分液漏斗, 用 10 mL 水分 3 次冲洗试管, 一并置于分液漏斗中, 再用乙醚(含有 1 g·L⁻¹ 2,6-二叔丁基对甲酚和 1 g·L⁻¹ 抗坏血酸溶液)萃取 3 次, 每次 15 mL, 合并乙醚相, 用蒸馏水洗乙醚相, 每次 10 mL, 洗 3~4 次至中性。在漏斗中加入 3 g 无水硫酸钠除水, 过滤, 用氮吹仪在 50 °C 下蒸发至近干, 加入乙醇 1 mL 溶解, 用 0.20 μm 微孔滤膜过滤。

取试样溶液和标准溶液各 5.0 μL 注入液相色谱-串联四极杆质谱仪进行分析, 以保留时间和二级质谱特征碎片离子定性, 以定量离子 m/z 378.9 和 368.1 的峰面积定量。

2 结果与讨论

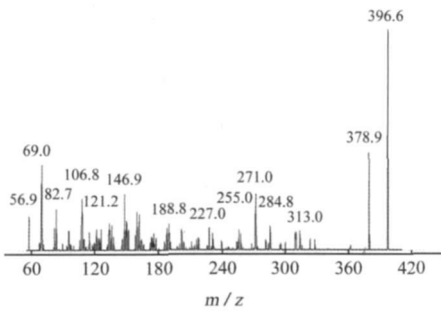
2.1 色谱条件的优化

由于食品及保健品中基质复杂, 如按国家标准方法 GB/T 5413.9-1997 用纯甲醇作流动相, 无法达到基线分离; 采用甲醇-水溶液梯度洗脱可以达到基线分离, 保留时间大于 30 min。保留时间过长, 干扰峰过多的情况下, 目标峰保留时间容易产生偏移造成定性困难, 有时还可能因干扰峰重叠导致定量不准。试验用 HPLC-MS/MS 法, 通过多反应监测, 只对维生素 D 的母离子及相应的子离子进行监测, 即可定性定量。流动相用甲醇-乙酸铵溶液等度洗脱, 仅需 8 min 即可完成一次分析。虽然此条件下两目标物未完全分离, 试验证明有特征离子定性定量不影响测定结果。同时以甲醇-10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵体系作为流动相比甲醇-水体系作为流动相的灵敏度提高了 5 倍。

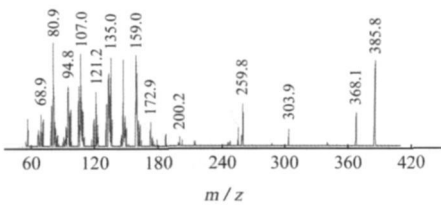
2.2 质谱条件的优化

在电喷雾质谱、正离子监测模式下, 维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的准分子离子峰均为 [M+H]⁺ 396.6, 385.8, 这两种维生素的质谱碎片见图 1。

由于维生素 D 分子结构中多为烷烃和烯烃的组合, 打碎后碎片离子较多, 且难找到明显的特征离子对。试验表明: 选用 m/z 69.0, 146.9 等低质量端的离子容易产生干扰, 因此选择其干扰小且丰度较高的 4 个离子作为特征离子。维生素 D₂ 的母离子 m/z 为 396.6, 二级特征离子 m/z 为 271.0, 378.9, 维生素 D₃ 的母离子 m/z 为 385.8, 二级特征离子 m/z 为 259.8, 368.1, 维生素 D₂ 和维生素 D₃ 标准品的 HPLC-MS/MS 图见图 2。



(a) 维生素 D₂



(b) 维生素 D₃

图1 维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的质谱图
Fig. 1 Mass spectra of VD₂ and VD₃

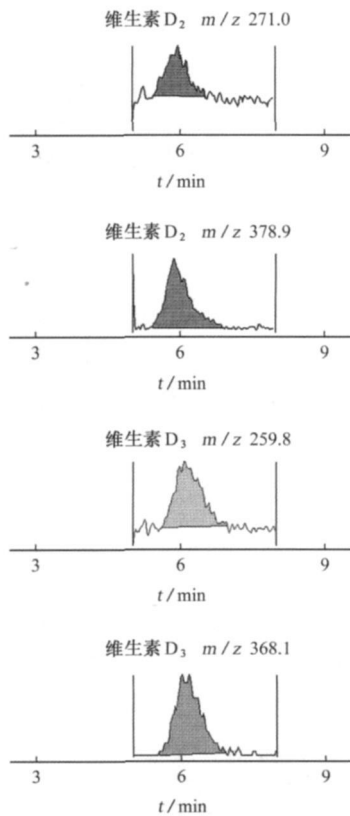


图2 维生素 D₂ 和维生素 D₃ 标准溶液的 HPLC-MS/MS 色谱图

Fig. 2 HPLC-MS/MS chromatograms of standard solutions of VD₂ and VD₃

导入质谱其余均导入废液通道, 减少对仪器的污染, 保证了灵敏度。

2.3 样品前处理步骤的优化

样品放入 100 mL 具塞试管中, 置于 60 °C ~ 70 °C 水浴中处理 30 min, 简化了处理过程。试验表明: 样品前处理所用的溶剂, 均加入抗氧化剂 2, 6-二叔丁基对甲酚和抗坏血酸, 有利于提高维生素 D 的稳定性。

2.4 工作曲线和检出限

按色谱-质谱分析条件对维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的混合标准溶液系列进行测定, 维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的质量浓度均在 50 ~ 500 μg · L⁻¹ 范围内与其峰面积呈线性, 线性回归方程为 $y_{VD_2} = 5288x + 19.7 (r = 0.9992)$; $y_{VD_3} = 6965x + 21.8 (r = 0.9993)$ 。按 3 倍信噪比计算方法的检出限均为 10 μg · L⁻¹。取奶粉样品 5.000 0 g, 按照试验方法处理后测得样品中维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的检出限 (3S/N) 均为 2.0 μg · kg⁻¹, 测定下限 (10S/N) 均为 6.0 μg · kg⁻¹。

2.5 方法的回收率

分别取 6 份奶粉和酸酸乳各 5.000 0 g, 加入适量的维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的混合标准溶液, 按试验方法处理后测定维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的含量, 结果见表 2。

表 2 回收试验结果 (n=3)

Tab. 2 Results of test for recovery

样品名称	测定组分	测定值 m/μg	标准加入量 m/μg	测得总量 m/μg	回收率 /%
奶粉	维生素 D ₂	-	0.323	0.271	83.9
	维生素 D ₃	0.33	0.285	0.549	76.8
酸酸乳	维生素 D ₂	-	0.032	0.026	81.3
	维生素 D ₃	0.021	0.029	0.044	79.3

2.6 稳定性试验

按色谱-质谱分析条件, 在不同时间内上机测定奶粉提取溶液, 标准溶液现配现用, 在 3d 内测定样品溶液 6 次, 维生素 D₂ 和维生素 D₃ 测得结果的相对标准偏差分别为 0.54%, 0.74%。

2.7 样品分析

按照试验方法对食品样品进行测定, 并用高效液相色谱法 (HPLC) 作对比, 样品中维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的测定结果见表 3。

由两种方法测定结果可知: HPLC-MS/MS 法

(下转第 582 页)

另外采用切换法进样, 只在维生素 D 出峰时间

0.01, 0.05, 0.25, 0.5 mg · L⁻¹ 的标准溶液, 按试验方法进行测定。以质量浓度(ρ)为横坐标, 峰面积(y)为纵坐标绘制标准曲线。呋喃丹的线性回归方程为 $y = 6\,260\,000\rho - 2\,620$, 相关系数为 0.999 9; 甲萘威的线性回归方程为 $y = 8\,480\,000\rho + 1\,320$, 相关系数为 0.999 9。根据 3 倍信噪比计算方法的

检出限, 得到呋喃丹和甲萘威的检出限(3S/N) 均为 4×10^{-4} mg · L⁻¹。

2.6 回收试验

分取 3 份出厂水和河水各 10.00 mL, 分别加入不同量的呋喃丹和甲萘威混合标准溶液, 按试验方法, 酸化过滤后测定其回收率, 结果见表 1。

表 1 回收试验结果(n=6)

Tab. 1 Results of test for recovery

水样	标准加入量 ρ/(mg · L ⁻¹)	回收量 ρ (mg · L ⁻¹)		回收率/%		RSD/%	
		呋喃丹	甲萘威	呋喃丹	甲萘威	呋喃丹	甲萘威
出厂水	0.010 0	0.009 3	0.009 3	93.0	93.0	0.45	0.45
	0.050 0	0.047 7	0.049 7	95.4	99.4	0.16	0.23
	0.200 0	0.186 6	0.188 6	93.3	94.3	0.15	0.15
河水	0.010 0	0.009 5	0.009 5	95.0	95.0	0.32	0.32
	0.050 0	0.049 0	0.047 0	98.0	94.0	0.15	0.25
	0.200 0	0.195 0	0.192 0	97.5	96.0	0.17	0.18

结果表明: 呋喃丹的回收率在 93.0% ~ 98.0% 之间, 相对标准偏差在 0.15% ~ 0.45% 之间; 甲萘威的回收率在 93.0% ~ 99.4% 之间, 相对标准偏差在 0.15% ~ 0.45% 之间。用本法检测多个管网水、出厂水及河水, 均未检出呋喃丹和甲萘威。

参考文献:

[1] 甘日华, 温伟群. 饮用水卫生与管理[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 123.

[2] GB/T 5750.9-2006 生活饮用水标准检验方法[S].
 [3] 巢猛, 陈明, 刘健明. 水中呋喃丹的固相萃取 高效液相色谱测定法[J]. 环境与健康杂志, 2008, 25(2): 153-154.
 [4] 李娟, 赵永刚, 丁曦宁. 固相萃取/高效液相色谱法测定地表水中氨基甲酸酯类农药[J]. 环境监测管理与技术, 2006, 18(1): 27-28.
 [5] 杨丽莉, 胡恩宇, 母应峰, 等. 水中呋喃丹气相色谱质谱的测定方法研究[J]. 中国环境监测, 2007, 23(2): 16-18.

(上接第 579 页)

表 3 样品中 VD₂ 和 VD₃ 的测定结果

Tab. 3 Results of detection of VD₂ and VD₃ in samples

样品名称	本法测定值 w/(μg · g ⁻¹)		HPLC 法测定值 w/(μg · g ⁻¹)	
	VD ₂	VD ₃	VD ₂	VD ₃
婴儿配方奶粉	-	0.098	-	0.092
幼儿有机大米粉	-	-	-	-
紫菜苏打饼	0.021	0.13	-	0.16
酸酸乳	-	0.018	-	-

具有准确且检测下限低的优势。

维生素 D 因容易分解, 经大量试验证明, 在前处理过程中以及最后溶解的乙醇溶液中都加入抗氧化剂 2,6-二叔丁基对甲酚, 大大提高了样品的稳定性。HPLC-MS/MS 法测定食品中微量维生素 D₂ 和维生素 D₃ 含量, 结果准确可靠, 为婴幼儿食品和儿童饮料的质检和质控提供了切实可行的方法。

参考文献:

[1] 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]. 分析实验室, 2008, 27(2): 15-18.
 [2] 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): 1047-1049.
 [3] 王晖, 刘红河, 尹江伟. HPLC 用于食品中维生素 A 和维生素 E 的测定[J]. 中国热带医学, 2006, 5(6): 856-857.
 [4] 高星. 高效液相色谱法(HPLC)双柱串联方式测定饲料中维生素 A 和维生素 D₃[J]. 中国奶牛, 2006, 3: 16-19.
 [5] 张戈, 张虹. 乳粉维生素 A、D、E 的高效液相色谱测定[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2002, 36(2): 171-174.
 [6] 彭湘红, 张俐娜. β-环糊精包合维生素 D₂ 的稳定性及结构研究[J]. 武汉大学学报: 自然科学版, 1999, 45(4): 423-426.