

# 婴幼儿配方奶粉中维生素 A、D、E 的含量测定

## 在线固相萃取-二维高效液相色谱法

参考——T/SHFCA 002-2024

### 一、背景

维生素是婴幼儿配方奶粉中的必需营养成分,对婴儿生长发育至关重要。依据国家标准《GB 10765-2021 食品安全国家标准 婴幼儿配方食品》和《GB 10766-2021 食品安全国家标准 较大婴儿配方食品》等的规定,婴幼儿配方奶粉中必须添加 14 种维生素,其中包括脂溶性维生素 A、D、E。维生素 A 具有支持视力发育和免疫系统完善(如预防夜盲症)的功效;维生素 D 可促进钙吸收,强化骨骼发育;维生素 E 又名生育酚,是  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  和  $\delta$ -生育酚以及  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  和  $\delta$ -生育三烯酚等脂溶性维生素的总称,具有抗氧化作用,可保护细胞免受损伤。

本报告参考《T/SHFCA 002-2024 特殊医学用途配方食品中维生素 A、D、E 的测定 在线固相萃取-二维液相色谱法》,采用在线固相萃取方法,使用悟空 K2025 二维液相色谱系统,同时测定婴幼儿配方奶粉中维生素 A、D、E 的含量。该方法摒弃了复杂的样品前处理步骤,在保证分析结果准确性的前提下,显著优化了样品分析流程,大幅提升了样品分析效率。

## 二、实验过程

### 1 原理

试样经皂化后,皂化液经离心、过滤后注入二维液相色谱系统;试样通过在线固相萃取柱浓缩净化后,经一维色谱柱分离维生素 A 和维生素 E ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  和  $\delta$ -生育酚);再通过中心切割,维生素 D 经切阀、捕集后经二维色谱柱分离为维生素 D<sub>2</sub>和 D<sub>3</sub>。通过保留时间定性,外标法定量。

### 2 试剂与材料

2.1 水:符合 GB/T 6682 的一级水;

2.2 甲醇:色谱纯;

2.3 乙腈:色谱纯;

2.4 无水乙醇:色谱纯;

2.5 50 %乙醇水溶液:将无水乙醇(2.4)和水(2.1)按 1:1 的体积比混匀;

2.6 抗坏血酸:分析纯;

2.7 2, 6-二叔丁基对甲基苯酚(BHT):分析纯;

2.8 氢氧化钾:分析纯;

2.9 50 %氢氧化钾溶液(质量分数):称取 50 g 氢氧化钾(2.8),用 50 g 水(2.1)溶解,混匀,冷却后储存于聚乙烯瓶中;

2.10 维生素 A (V<sub>A</sub>) 标准品: CAS 号为 68-26-8, 纯度为 95.6 %;

- 2.11 维生素 D<sub>2</sub> (VD<sub>2</sub>) 标准品: CAS 号为 50-14-6, 纯度为 98.0 %;
- 2.12 维生素 D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) 标准品: CAS 号为 67-97-0, 纯度为 98.0 %;
- 2.13 α-生育酚 (α-V<sub>E</sub>) 标准品: CAS 号为 10191-41-0, 纯度为 97.8 %;
- 2.14 β-生育酚 (β-V<sub>E</sub>) 标准品: CAS 号为 148-03-8, 纯度为 99.9 %;
- 2.15 γ-生育酚 (γ-V<sub>E</sub>) 标准品: CAS 号为 54-28-4, 纯度为 98.3 %;
- 2.16 δ-生育酚 (δ-V<sub>E</sub>) 标准品: CAS 号为 119-13-1, 纯度为 99.8 %;
- 2.17 2.17 婴幼儿配方奶粉试样。

### 3 仪器与设备

- 3.1 二维液相色谱系统: K2025 P4 四元低压输液泵 (SPE)、K2025 P2 二元高压输液泵 (1D)、K2025 P4 四元低压输液泵 (2D)、K2025 AS-TC 自动进样器、K2025 Plus CO 立式柱温箱 (配置两个 2 位 6 通阀)、K2025 UVD 紫外-可见光检测器 (1D)、K2025 UVD 紫外-可见光检测器 (2D)、Wookinglab 2D 二维色谱工作站;
- 3.2 分析天平: 精确到 0.0001 g;
- 3.3 超声波清洗机;
- 3.4 涡旋混合器;
- 3.5 具塞锥形瓶: 100 mL;
- 3.6 磁力搅拌器: 带控温功能, 可控温至 80 °C±2 °C;
- 3.7 离心机: ≥8000 r/min;
- 3.8 具塞离心管: 15 mL;

3.9 容量瓶: 10 mL、25 mL、100 mL, 棕色带刻度;

3.10 一次性针头注射器;

3.11 0.22  $\mu\text{m}$  微孔有机滤膜。

## 4 色谱方法

a) 切阀示意图:

$V_A$ 、 $V_D$ 、 $V_E$  的测定包括四个阶段: 第一阶段为进样, 进而对样品进行 SPE 净化; 第二阶段为 SPE 洗脱, 一维系统对  $V_A$  进行测定; 第三阶段为  $V_D$  的捕获与富集; 第四阶段为一维系统继续测定  $V_E$ , 二维系统对  $V_D$  进行洗脱、分离及测定。四个阶段阀切换示意图如图 1 所示。

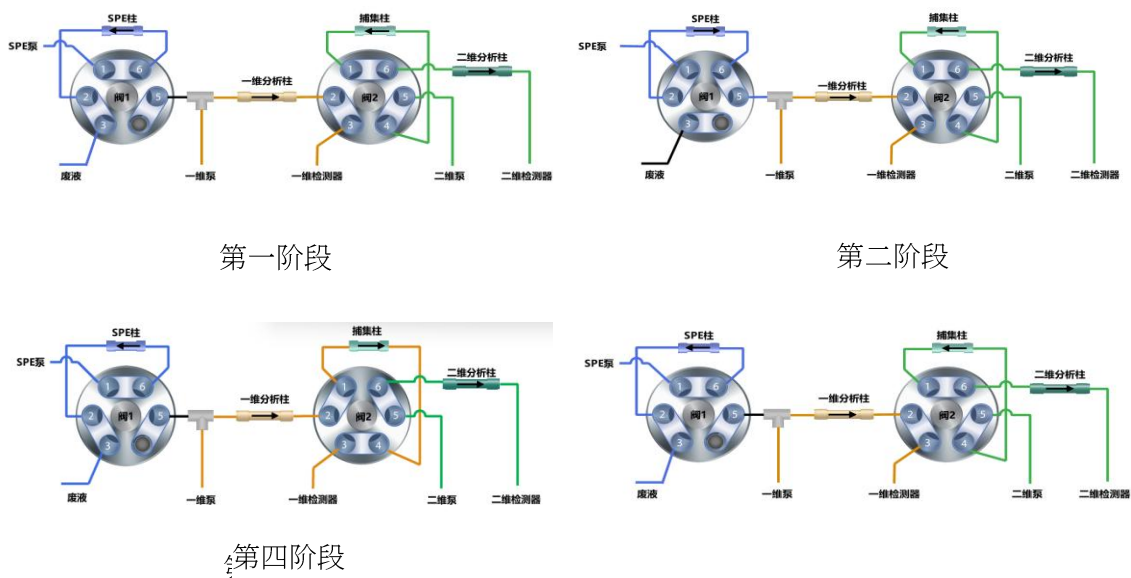


图 1 在线固相萃取-二维高效液相色谱法同时分析  $V_A$ 、 $V_D$ 、 $V_E$  阀切换示意图

b) 色谱条件:

项目	SPE 泵					1D 泵			2D 泵		
梯度表	时间 (min)	流动相 A% (甲醇)	流动相 B% (乙腈)	流动相 C% (水)	流动相 D% (甲基叔 丁基醚)	时间 (min)	流动相 A1% (甲 醇)	流动相 B2% (0.1%磷酸溶 液)	时间 (min)	流动相 A% (甲 醇)	流动相 B% (乙腈)
	0.0	80	0	20	0	0.0	10	90	0.0	100	0
	4.0	80	0	20	0	7.2	10	90	7.0	100	0
	4.1	0	90	10	0	7.5	85	15	7.5	2	98
	8.0	0	90	10	0	24.0	95	5	17.0	2	98
	9.0	0	100	0	0	26.0	100	0	28.0	100	0
	15.0	0	100	0	0	26.1	10	90	35.0	100	0
	16.0	0	80	0	20	35.0	10	90			
	20.0	0	80	0	20						
	21.0	0	100	0	0						
	22.0	80	0	20	0						
	35.0	80	0	20	0						
		开始时间 (min)	结束时间 (min)	流速 (mL/min)			开始时间 (min)	结束时间 (min)	流速 (mL/min)		
		0.0	4.0	1.5			0.0	7.2	0.8	0.4 mL/min	
		4.1	8.0	0.8			7.5	35.0	1.0		
		9.0	35.0	1.0							
流速											
进样量											
样品盘温度											
洗针液											
分析柱											

柱温	30 ℃				
切换阀	时间 (min)	A 阀状态	B 阀状态		
	0.0	6-1,2-3,4-5	6-1,2-3,4-5		
	4.6	1-2,3-4,5-6	6-1,2-3,4-5		
	7.2	6-1,2-3,4-5	6-1,2-3,4-5		
	17.5	6-1,2-3,4-5	1-2,3-4,5-6		
	19.0	6-1,2-3,4-5	6-1,2-3,4-5		
检测波长		开始时间 (min)	结束时间 (min)	波长 (nm)	264 nm
	/	0.0	19.0	325	
		19.0	35.0	294	

## 5 溶液制备

本实验需在避光条件下操作。

### 5.1 标准溶液配制

5.1.1  $V_A$  标准储备液: 称取  $V_A$  标准品 (2.10) 100 mg, 用无水乙醇 (2.4) 溶解并定容至 100 mL, 混匀, 配制成  $V_A$  浓度为 0.956 mg/mL 的标准储备液;

$V_A$  标准中间液: 吸取  $V_A$  标准储备液 (0.956 mg/mL) 1 mL, 用无水乙醇 (2.4) 稀释并定容至 10 mL, 混匀, 配制成  $V_A$  浓度为 95.600  $\mu$ g/mL 的标准中间液。

5.1.2  $VD_2$  标准储备液: 称取  $VD_2$  标准品 (2.11) 11.5 mg, 用无水乙醇 (2.4) 溶解并定容至 10 mL, 混匀, 配制成  $VD_2$  浓度为 1.127 mg/mL 的标准储备液;

$VD_3$  标准储备液: 称取  $VD_3$  标准品 (2.12) 12.9 mg, 用无水乙醇 (2.4) 溶解并定容至 10 mL, 混匀, 配制成  $VD_3$  浓度为 1.264 mg/mL 的标准储备液;

VD<sub>2</sub>和 VD<sub>3</sub>混合标准中间液: 分别吸取 VD<sub>2</sub>标准储备液 (1.127 mg/mL) 和 VD<sub>3</sub>标准储备液 (1.264 mg/mL) 各 100 μL, 用无水乙醇 (2.4) 稀释并定容至 10 mL, 混匀, 配制成 VD<sub>2</sub>和 VD<sub>3</sub>浓度分别为 11.270 μg/mL、12.642 μg/mL 的混合标准中间液。

5.1.3 α-V<sub>E</sub>标准储备液: 称取α-V<sub>E</sub>标准品 (2.13) 100 mg, 用无水乙醇 (2.4) 溶解并定容至 100 mL, 混匀, 配制成α-V<sub>E</sub>浓度为 0.998 mg/mL 的标准储备液;

β-V<sub>E</sub>标准储备液: 称取β-V<sub>E</sub>标准品 (2.14) 10 mg, 用无水乙醇 (2.4) 溶解并定容至 10 mL, 混匀, 配制成β-V<sub>E</sub>浓度为 0.999 mg/mL 的标准储备液;

γ-V<sub>E</sub>标准储备液: 称取γ-V<sub>E</sub>标准品 (2.15) 25 mg, 用无水乙醇 (2.4) 溶解并定容至 25 mL, 混匀, 配制成γ-V<sub>E</sub>浓度为 0.983 mg/mL 的标准储备液;

δ-V<sub>E</sub>标准储备液: 称取δ-V<sub>E</sub>标准品 (2.16) 100 mg, 用无水乙醇 (2.4) 溶解并定容至 100 mL, 混匀, 配制成δ-V<sub>E</sub>浓度为 0.978 mg/mL 的标准储备液;

V<sub>E</sub>混合标准中间液: 分别吸取α-V<sub>E</sub>标准储备液 (0.998 mg/mL)、β-V<sub>E</sub>标准储备液 (0.999 mg/mL)、γ-V<sub>E</sub>标准储备液 (0.983 mg/mL)、δ-V<sub>E</sub>标准储备液 (0.978 mg/mL) 各 1 mL, 用无水乙醇 (2.4) 稀释并定容至 10 mL, 混匀, 配制成α-V<sub>E</sub>浓度为 99.800 μg/mL、β-V<sub>E</sub>浓度为 99.900 μg/mL、γ-V<sub>E</sub>浓度为 98.300 μg/mL、δ-V<sub>E</sub>浓度为 97.800 μg/mL 的 V<sub>E</sub>混合标准中间液。

5.1.4 V<sub>A</sub>、V<sub>D</sub>、V<sub>E</sub>混合标准系列工作液: 分别吸取 V<sub>A</sub>标准中间液 200 μL、VD<sub>2</sub>和 VD<sub>3</sub>混

合标准中间液 100  $\mu\text{L}$ 、 $V_E$  混合标准中间液 2 mL，用 50 %乙醇水溶液（2.5）稀释并定容至 10 mL，混匀，配制成混合标准系列溶液，其中  $V_A$  的浓度为 1.91  $\mu\text{g/mL}$ ， $VD_2$  的浓度为 112.70 ng/mL， $VD_3$  的浓度为 126.42 ng/mL， $\alpha-V_E$  的浓度为 19.96  $\mu\text{g/mL}$ ， $\beta-V_E$  的浓度为 19.98  $\mu\text{g/mL}$ ， $\gamma-V_E$  的浓度为 19.66  $\mu\text{g/mL}$ 、 $\delta-V_E$  的浓度为 19.56  $\mu\text{g/mL}$ 。使用 50 %乙醇水溶液（2.5）稀释其余浓度点：

浓度梯度\目标物	$V_A$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$VD_2$ (ng/mL)	$VD_3$ (ng/mL)	$\delta-V_E$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\beta-V_E$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\gamma-V_E$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\alpha-V_E$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
STD1	0.04	2.25	2.53	0.40	0.40	0.39	0.39
STD2	0.10	5.64	6.32	1.00	1.00	0.98	0.98
STD3	0.19	11.27	12.64	2.00	2.00	1.97	1.96
STD4	0.38	22.54	25.28	3.99	4.00	3.93	3.91
STD5	0.96	56.35	63.21	9.98	9.99	9.83	9.78
STD6	1.91	112.70	126.42	19.96	19.98	19.66	19.56

## 5.2 试样测定液制备

### 5.2.1 测定液制备

称取粉末试样（2.17）5 g（精确至 0.0001 g），置于 100 mL 具塞锥形瓶中，加入 20 mL 温水（约 40  $^{\circ}\text{C}$ ~45  $^{\circ}\text{C}$ ），充分混匀；再加入 1.0 g 抗坏血酸（2.6）和 0.1 g BHT（2.7），混匀；加入 30 mL 无水乙醇（2.4），再加入 20 mL 氢氧化钾溶液（2.9），边加边摇匀，涡旋混匀后于 80  $^{\circ}\text{C}$   $\pm$  2  $^{\circ}\text{C}$  条件下避光恒温搅拌 30 min，皂化后立即用冷水冷却至室温；皂化液转移至 100 mL 棕色容量瓶中，用 50 %乙醇水溶液（2.5）定容至刻度，混匀；移取 10 mL 皂化液于 15 mL 离心管中，于 8000 r/min 条件下离心 8 min；上清液经 0.22  $\mu\text{m}$

微孔有机滤膜过滤，取续滤液，即得试样测定液，待上机测定。

该试样做两次平行实验，同时做空白实验。

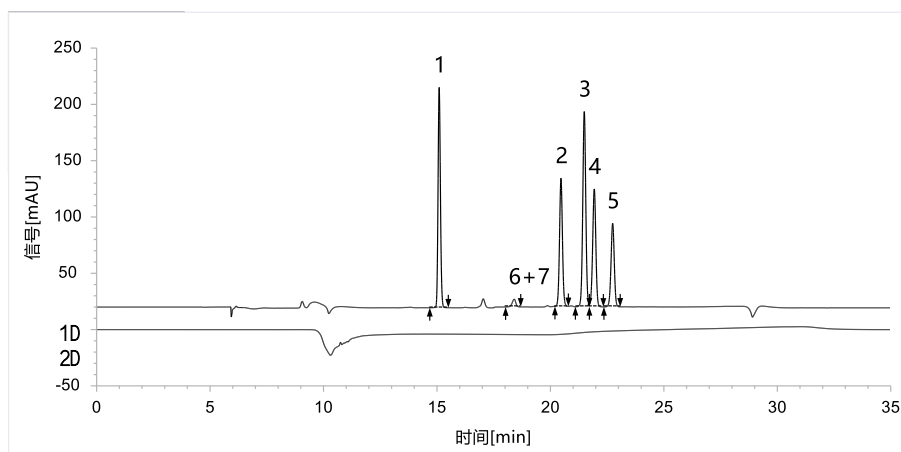
### 5.2.2 加标回收实验

称取粉末试样（2.17）5 g（精确至 0.0001 g），置于 100 mL 具塞锥形瓶中，加入 20 mL 温水（约 40 °C~45 °C），充分混匀；依次加入 75  $\mu\text{L}$   $V_A$  标准中间液（ $V_A$  浓度为 95.600  $\mu\text{g/mL}$ ）、800  $\mu\text{L}$   $V_E$  混合标准中间液（ $\alpha$ - $V_E$  浓度为 99.800  $\mu\text{g/mL}$ 、 $\beta$ - $V_E$  浓度为 99.900  $\mu\text{g/mL}$ 、 $\gamma$ - $V_E$  浓度为 98.300  $\mu\text{g/mL}$ 、 $\delta$ - $V_E$  浓度为 97.800  $\mu\text{g/mL}$ ）及 50  $\mu\text{L}$   $VD_2$  和  $VD_3$  混合标准中间液（ $VD_2$  和  $VD_3$  浓度分别为 11.270  $\mu\text{g/mL}$ 、12.642  $\mu\text{g/mL}$ ），后续步骤同 5.2.1 试样测定液制备过程，即得试样加标测定液，待上机测定。

## 6 实验结果

### 6.1 一维系统和二维系统色谱图

按照色谱条件（4）设置参数并平衡系统，当设置 B 阀不切换时，将  $V_A$ 、 $V_D$ 、 $V_E$  混合标准溶液（STD6）注入二维系统中进行采集，一维色谱图和二维色谱图如图 2 所示。

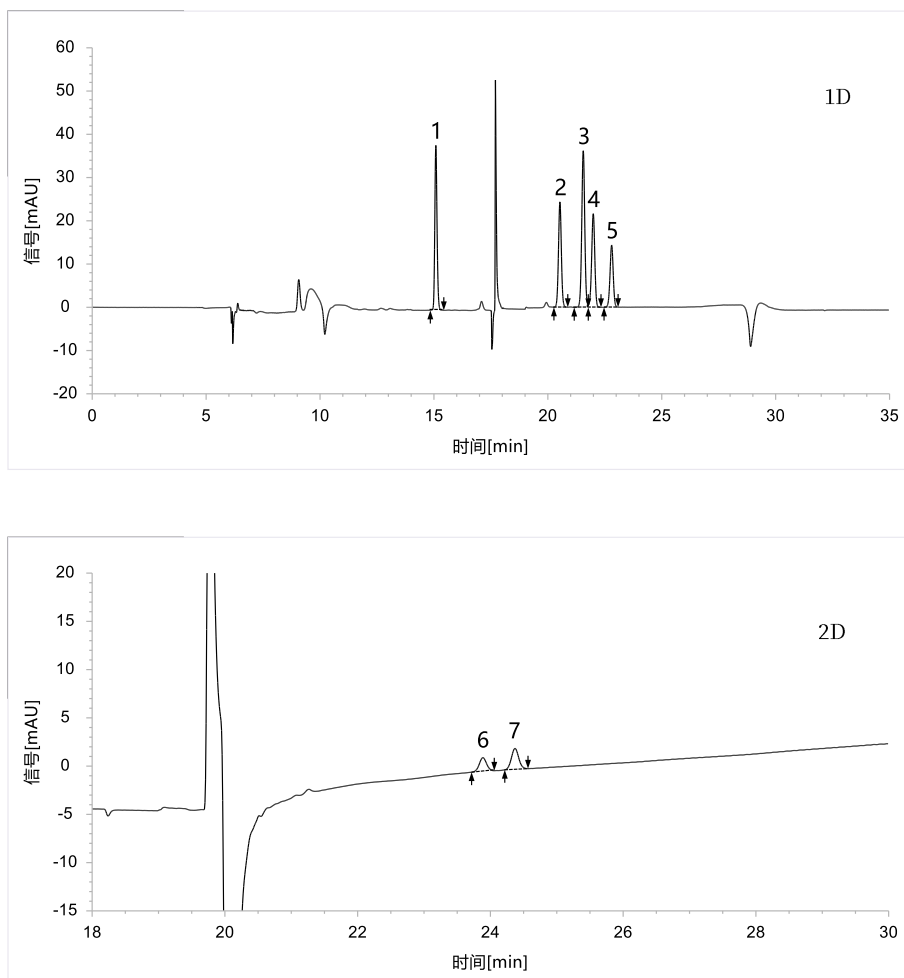


(1:  $V_A$ ; 2:  $\delta$ - $V_E$ ; 3:  $\beta$ - $V_E$ ; 4:  $\gamma$ - $V_E$ ; 5:  $\alpha$ - $V_E$ ; 6:  $VD_2$ ; 7:  $VD_3$ )

图 2 混合标准溶液的色谱图 (B 阀不切换)

由图 2 可知, 当设置 B 阀不切换时,  $V_A$ 、 $V_D$ 、 $V_E$  在一维色谱柱上均出峰, 此时  $V_A$ 、 $\alpha$ - $V_E$ 、 $\beta$ - $V_E$ 、 $\gamma$ - $V_E$ 、 $\delta$ - $V_E$  均可实现良好分离,  $VD_2$  和  $VD_3$  未分开。

按照色谱条件 (4), 当设置 B 阀切换时, 将  $V_A$ 、 $V_D$ 、 $V_E$  混合标准溶液 (STD4) 注入二维系统中进行采集, 一维色谱图和二维色谱图如图 3 所示, 积分结果如表 1 所示。



(1:  $V_A$ ; 2:  $\delta$ - $V_E$ ; 3:  $\beta$ - $V_E$ ; 4:  $\gamma$ - $V_E$ ; 5:  $\alpha$ - $V_E$ ; 6:  $VD_2$ ; 7:  $VD_3$ )

图 3 混合标准溶液一维和二维色谱图 (B 阀切换)

表 1 混合标准溶液色谱图积分结果

序号	目标物	保留时间 (min)	峰面积 (mAU.s)	峰高 (mAU)	理论塔板数	分离度	对称/拖尾因子
1	V <sub>A</sub>	15.083	260.168	38.146	116101	-	1.16
2	δ-V <sub>E</sub>	20.533	215.984	24.373	126579	26.73	1.00
3	β-V <sub>E</sub>	21.558	334.774	36.232	129333	4.36	0.98
4	γ-V <sub>E</sub>	21.992	209.484	21.675	121967	1.76	0.97
5	α-V <sub>E</sub>	22.800	141.840	14.402	125637	3.18	0.98
6	VD <sub>2</sub>	23.892	11.034	1.436	223741	-	1.21
7	VD <sub>3</sub>	24.367	16.567	2.164	232455	2.35	1.21

由表 1 中数据可知, V<sub>A</sub>、V<sub>D</sub>、V<sub>E</sub>的理论塔板数范围为 116101~232455, 均具有极佳的峰形; β-V<sub>E</sub>和γ-V<sub>E</sub>的分离度为 1.76, VD<sub>2</sub>和 VD<sub>3</sub>的分离度为 2.35, 均可实现良好分离。

## 6.2 重复性测试

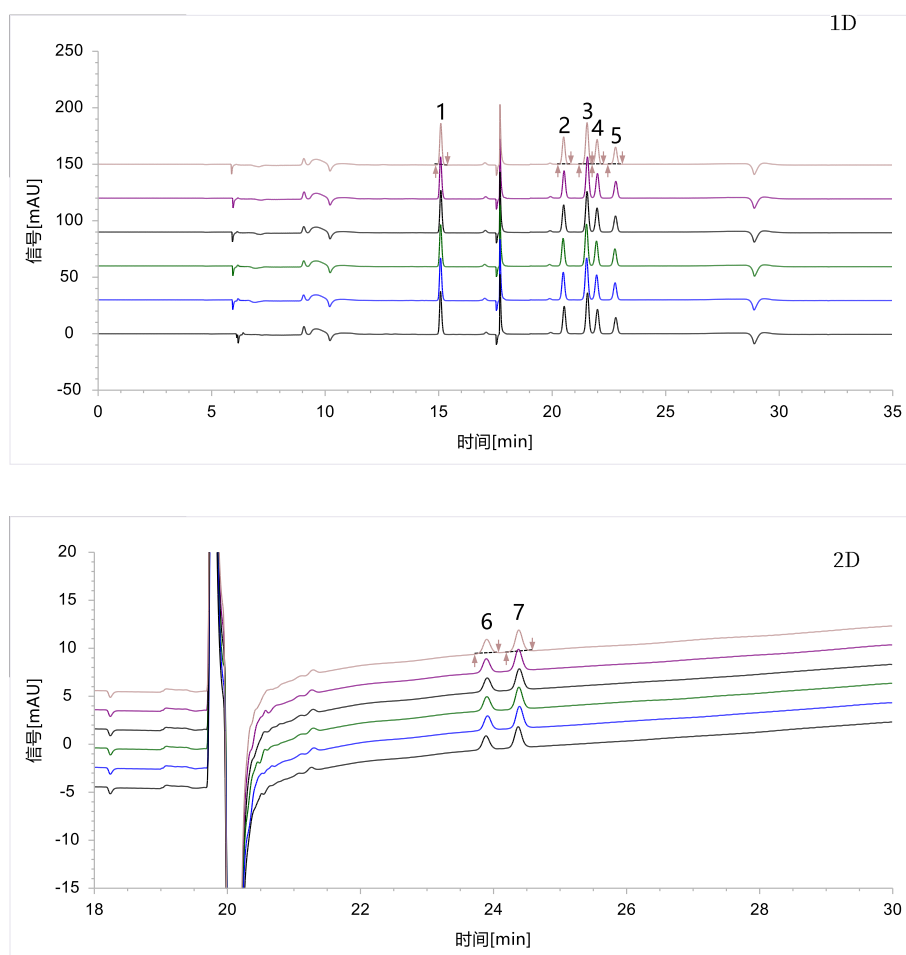
按照色谱条件 (4) , 对 V<sub>A</sub>、V<sub>D</sub>、V<sub>E</sub>混合标准溶液 (STD4) 进行重复性考察, 积分结果如表 2 所示, 叠加图如图 4 所示。

表 2 混合标准溶液连续进样 6 针重复性数据统计表

序号	目标物	项目	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD%
1	V <sub>A</sub>	保留时间 (min)	15.083	15.083	15.083	15.092	15.083	15.092	15.086	0.03
		峰面积 (mAU.s)	259.392	261.033	260.737	258.399	257.406	259.372	259.390	0.53
2	$\delta$ -V <sub>E</sub>	保留时间 (min)	20.533	20.492	20.483	20.508	20.525	20.508	20.508	0.09
		峰面积 (mAU.s)	215.984	216.233	216.874	215.216	215.920	215.897	216.021	0.25
3	$\beta$ -V <sub>E</sub>	保留时间 (min)	21.558	21.517	21.508	21.533	21.550	21.533	21.533	0.09
		峰面积 (mAU.s)	334.774	336.428	335.568	333.335	337.449	333.389	335.157	0.49
4	$\gamma$ -V <sub>E</sub>	保留时间 (min)	21.992	21.958	21.950	21.975	21.992	21.975	21.974	0.08
		峰面积 (mAU.s)	209.484	209.919	208.105	208.511	209.246	207.697	208.827	0.41
5	$\alpha$ -V <sub>E</sub>	保留时间 (min)	22.800	22.767	22.767	22.792	22.800	22.792	22.786	0.07
		峰面积 (mAU.s)	147.193	147.785	149.506	147.412	147.263	149.396	146.759	0.72
6	VD <sub>2</sub>	保留时间 (min)	23.892	23.908	23.900	23.908	23.892	23.900	23.900	0.03
		峰面积 (mAU.s)	11.234	11.258	11.220	11.368	11.271	11.326	11.280	0.50
7	VD <sub>3</sub>	保留时间 (min)	24.367	24.392	24.383	24.383	24.375	24.383	24.381	0.04
		峰面积 (mAU.s)	17.013	17.207	17.030	17.036	17.049	17.166	17.084	0.48

由表 2 中数据可知，混合标准溶液（STD4）连续进样 6 针进行重复性测试，V<sub>A</sub>、V<sub>D</sub>、

$V_E$  保留时间的 RSD 范围为 0.03 %~0.09 %，峰面积的 RSD 范围为 0.25 %~0.72 %，均具有良好的定性定量重复性。



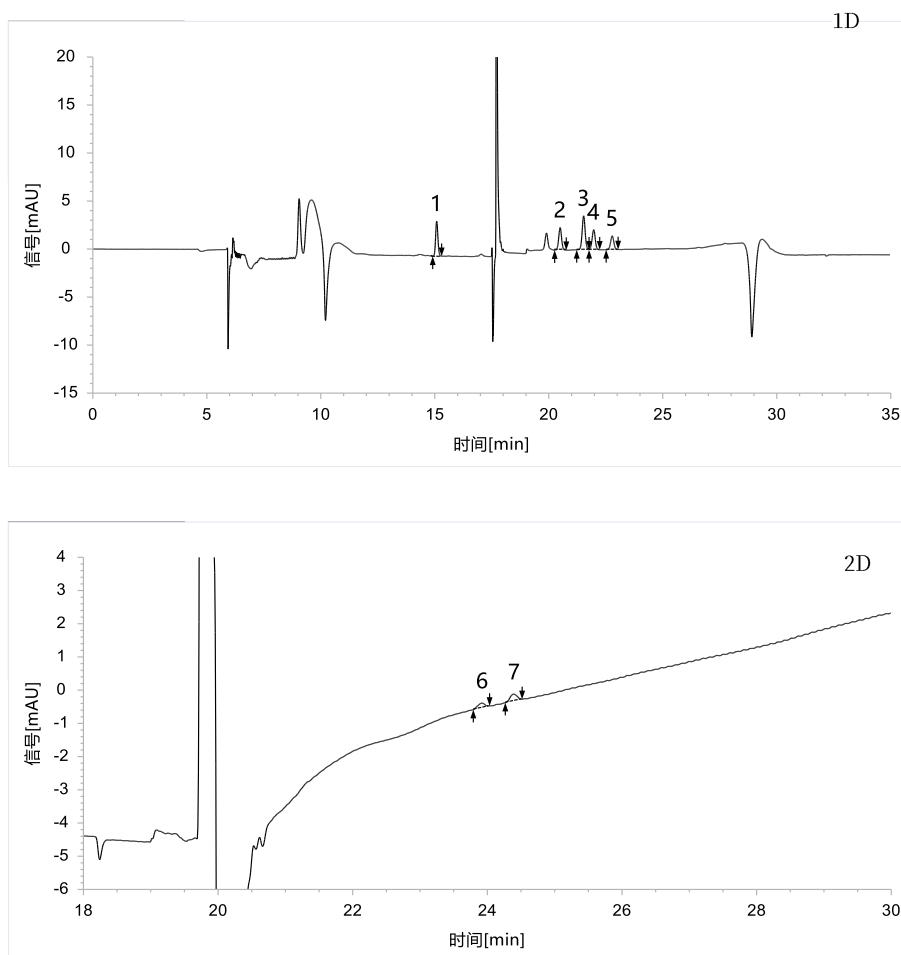
(1:  $V_A$ ; 2:  $\delta$ - $V_E$ ; 3:  $\beta$ - $V_E$ ; 4:  $\gamma$ - $V_E$ ; 5:  $\alpha$ - $V_E$ ; 6:  $VD_2$ ; 7:  $VD_3$ )

图 4 混合标准溶液连续进样 6 针叠加色谱图

### 6.3 灵敏度测试

将  $V_A$ 、 $V_D$ 、 $V_E$  混合标准溶液 (STD1) 作为灵敏度溶液，将其注入二维系统中进行采

集，色谱图如图 5 所示，计算结果见表 3。



(1:  $V_A$ ; 2:  $\delta-V_E$ ; 3:  $\beta-V_E$ ; 4:  $\gamma-V_E$ ; 5:  $\alpha-V_E$ ; 6:  $VD_2$ ; 7:  $VD_3$ )

图 5 灵敏度测试的色谱图

表 3 灵敏度测试结果表

序号	目标物	浓度 ( $\mu$ g/mL)	峰高 (mAU )	噪声 (mAU)	S/N	LOD (ng/mL)	LOD ( $\mu$ g/100g)	LOQ (ng/mL)	LOQ ( $\mu$ g/100g)
1	$V_A$	0.04	3.661	0.017	215.35	0.533	1.07	1.776	3.55

2	$\delta$ -V <sub>E</sub>	0.40	2.358	0.017	138.71	8.634	17.27	28.780	57.56
3	$\beta$ -V <sub>E</sub>	0.40	3.542	0.017	208.35	5.754	11.51	19.179	38.36
4	$\gamma$ -V <sub>E</sub>	0.39	2.098	0.017	123.41	9.558	19.12	31.861	63.72
5	$\alpha$ -V <sub>E</sub>	0.39	1.443	0.017	84.88	13.826	27.65	46.087	92.17
6	VD <sub>2</sub>	0.0023	0.138	0.016	8.63	0.784	1.57	2.613	5.23
7	VD <sub>3</sub>	0.0025	0.205	0.016	12.81	0.592	1.18	1.973	3.95

由表 3 中数据可知, V<sub>A</sub>、V<sub>D</sub>、V<sub>E</sub>的方法检出限范围为 1.07  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ~27.65  $\mu\text{g}/100\text{g}$ , 方法定量限范围为 3.55  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ~92.17  $\mu\text{g}/100\text{g}$ , 满足《T/SHFCA 002-2024 特殊医学用途配方食品中维生素 A、D、E 的测定 在线固相萃取-二维液相色谱法》对检出限及定量限的要求。

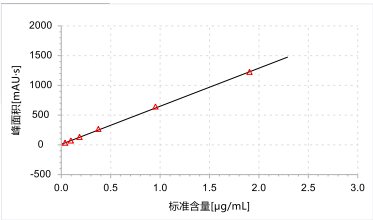
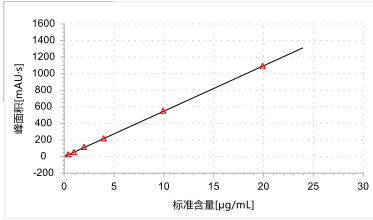
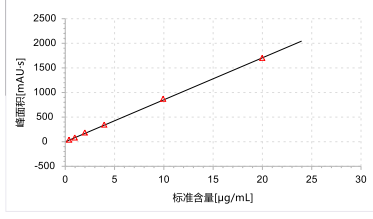
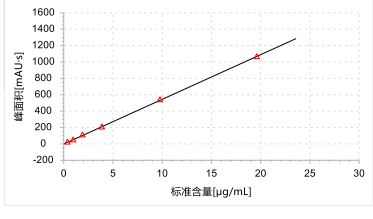
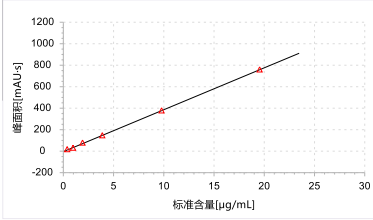
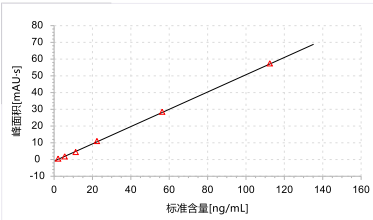
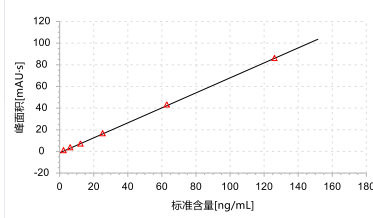
## 6.4 含量测定

### 6.4.1 校准曲线绘制

按照色谱条件 (4) , 将 V<sub>A</sub>、V<sub>D</sub>、V<sub>E</sub> 混合标准系列工作液 (5.1.4) 上机测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制校准曲线, 汇总表如表 4 所示。

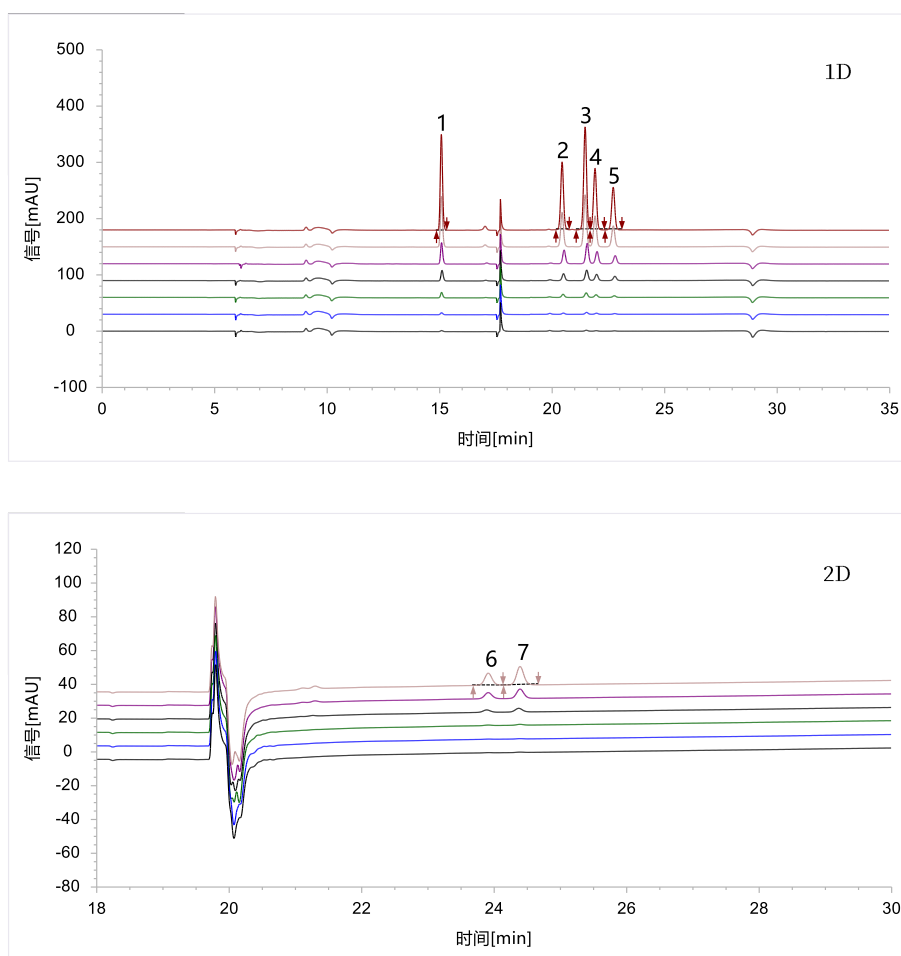
表 4 校准曲线、线性范围及方程和相关系数汇总表

序号	目标物	校准曲线	线性范围	线性方程及相关系数 R
----	-----	------	------	-------------

1	V <sub>A</sub>		$y=640.07202 \cdot x+9.0348$	0.04 µg/mL~1.91 µg/mL	6	0.9999
2	δ-V <sub>E</sub>		$y=54.76603 \cdot x-0.15516$	0.40 µg/mL~19.96 µg/mL		0.9999
3	β-V <sub>E</sub>		$y=85.35189 \cdot x-1.52875$	0.40 µg/mL~19.98 µg/mL		0.9999
4	γ-V <sub>E</sub>		$y=54.53051 \cdot x-1.56970$	0.39 µg/mL~19.66 µg/mL		0.9999
5	α-V <sub>E</sub>		$y=39.01543 \cdot x-4.49628$	0.39 µg/mL~19.56 µg/mL		0.9999
6	VD <sub>2</sub>		$y=0.51630 \cdot x-0.96665$	2.25 ng/mL~112.70 ng/mL		0.9999
7	VD <sub>3</sub>		$y=0.69200 \cdot x-1.28954$	2.53 ng/mL~126.42 ng/mL		0.9999

由表 4 中数据可知,  $V_A$ 、 $V_D$ 、 $V_E$  在其线性浓度范围内均呈现良好的线性关系, 相关系数  $R$  均  $>0.9999$ 。

$V_A$ 、 $V_D$ 、 $V_E$  混合标准系列工作液叠加的色谱图如图 6 所示。



(1:  $V_A$ ; 2:  $\delta-V_E$ ; 3:  $\beta-V_E$ ; 4:  $\gamma-V_E$ ; 5:  $\alpha-V_E$ ; 6:  $VD_2$ ; 7:  $VD_3$ )

图 6 混合标准系列工作液叠加色谱图

#### 6.4.2 含量测定

按照色谱条件（4），对空白溶液、试样测定液和试样加标测定液进行采集，依据公式

（1）计算试样中  $V_A$ 、 $V_E$  的含量，依据公式（2）计算试样中  $V_D$  的含量。

$$X_1 = \frac{C_1 \times V}{m \times 10^3} \times 100 \quad \text{----公式（1）}$$

式中： $X_1$ ----为试样中  $V_A$ 、 $V_E$  的含量，单位为毫克每百克（mg/100g）；

$C_1$ ----为从校准曲线计算得到的试样测定液中  $V_A$ 、 $V_E$  的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$V$ ----为试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

$m$ ----为试样的质量，单位为克（g）；

$10^3$ 、100----为单位换算系数。

$$X_2 = \frac{C_2 \times V}{m \times 10^6} \times 100 \quad \text{----公式（2）}$$

式中： $X_2$ ----为试样中  $V_D$  的含量，单位为毫克每百克（mg/100g）；

$C_2$ ----为从校准曲线计算得到的试样测定液中  $V_D$  的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

$V$ ----为试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

$m$ ----为试样的质量，单位为克（g）；

$10^6$ 、100----为单位换算系数。

空白溶液、试样测定液和试样加标测定液的色谱图如图 7~图 9 所示，试样中  $V_A$ 、 $V_D$ 、

$V_E$  的含量结果见表 5。

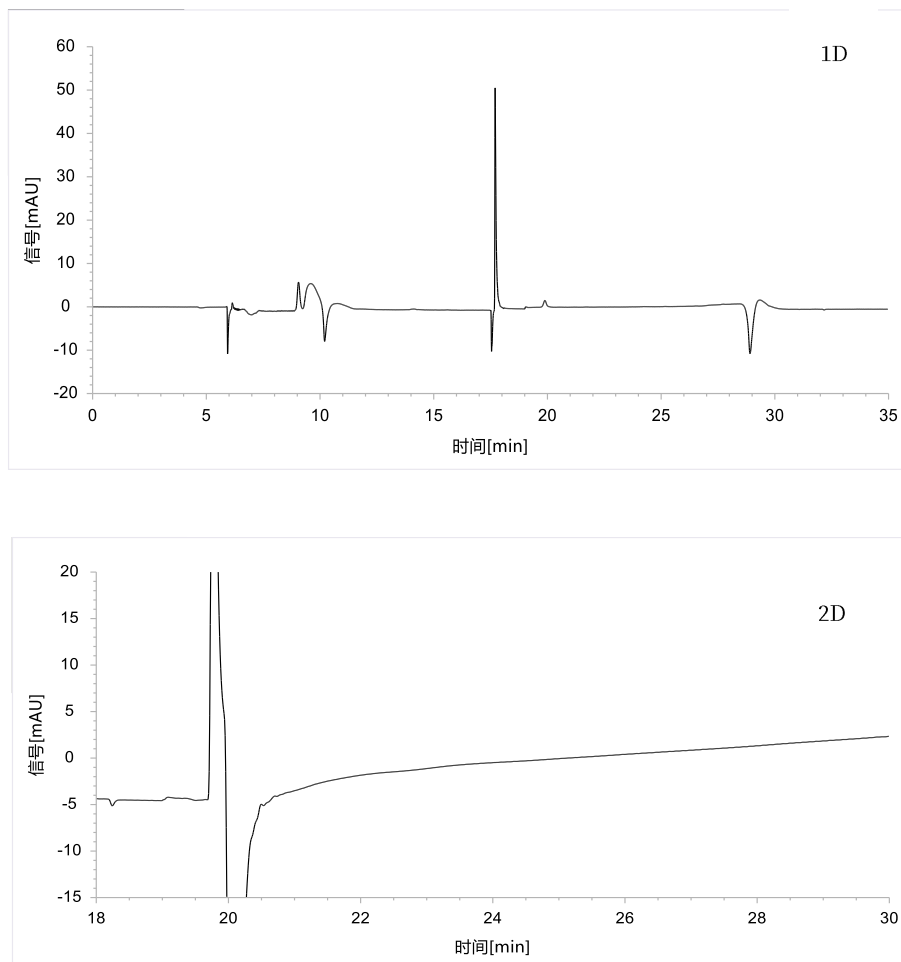
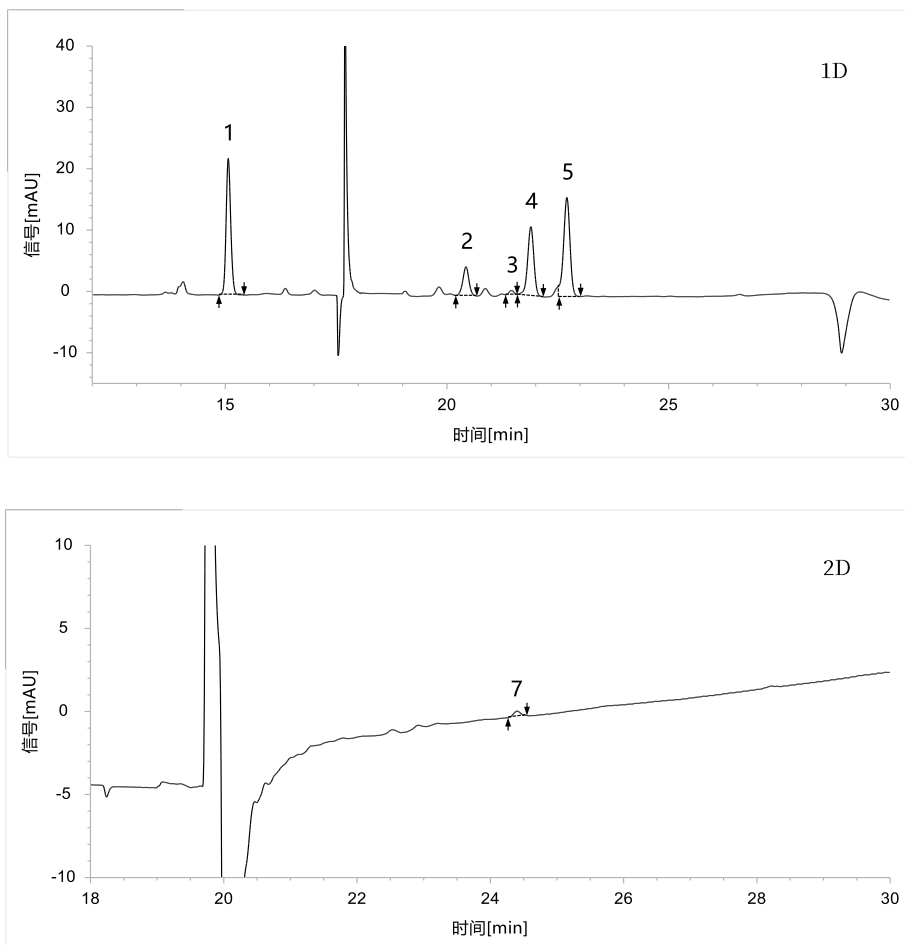
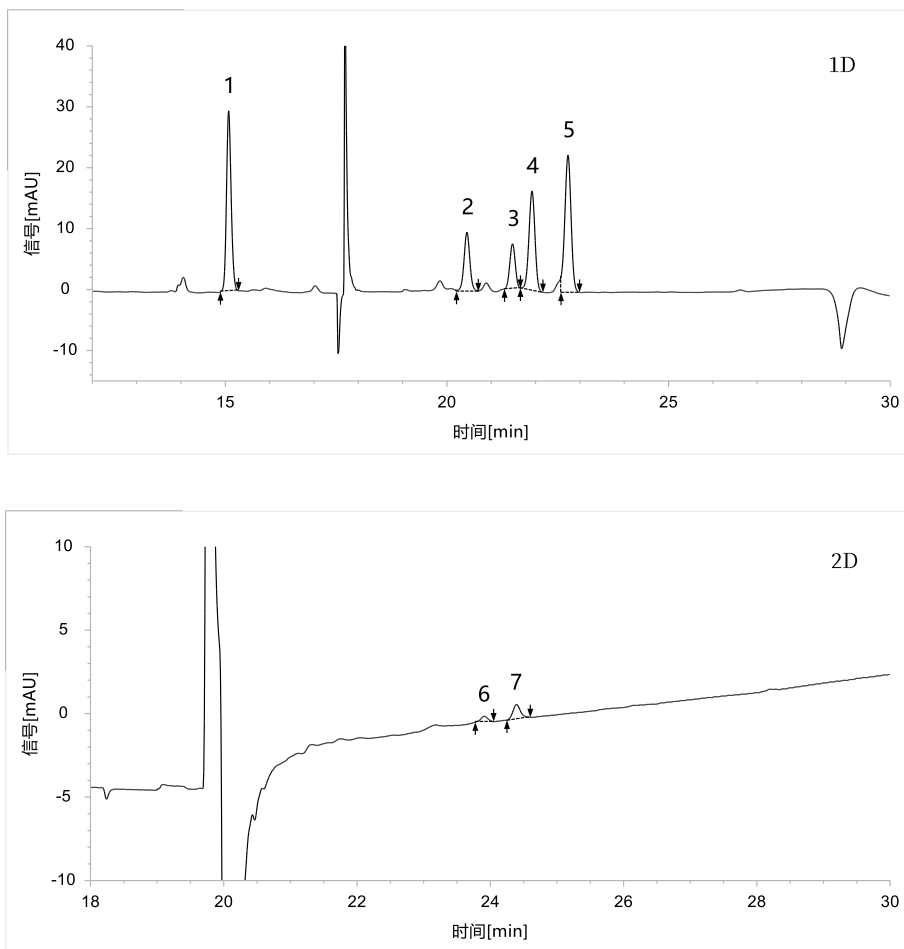


图 7 空白溶液的色谱图



(1:  $V_A$ ; 2:  $\delta$ - $V_E$ ; 3:  $\beta$ - $V_E$ ; 4:  $\gamma$ - $V_E$ ; 5:  $\alpha$ - $V_E$ ; 6:  $VD_2$ ; 7:  $VD_3$ )

图 8 试样测定液的色谱图



(1:  $V_A$ ; 2:  $\delta$ - $V_E$ ; 3:  $\beta$ - $V_E$ ; 4:  $\gamma$ - $V_E$ ; 5:  $\alpha$ - $V_E$ ; 6:  $VD_2$ ; 7:  $VD_3$ )

图 9 试样加标测定液的色谱图

表 5 试样中维生素含量及回收率汇总表

序号	目标物	试样	含量 (mg/100g)	偏差 (%)	含量均值 (mg/100g)	加标量 (μg)	回收率 (%)
1	V <sub>A</sub>	S1	0.47	0.00	0.47	7.17	106.0
		S2	0.47				
2	δ-V <sub>E</sub>	S1	1.6	1.45	1.6	79.84	99.6
		S2	1.6				
3	β-V <sub>E</sub>	S1	0.13	4.58	0.13	79.92	104.4
		S2	0.13				
4	γ-V <sub>E</sub>	S1	4.5	0.00	4.5	78.64	98.0
		S2	4.5				
5	α-V <sub>E</sub>	S1	10	0.47	10	78.24	104.5
		S2	10				
6	VD <sub>2</sub>	S1	0.0	0.00	0.0	0.56	101.3
		S2	0.0				
7	VD <sub>3</sub>	S1	0.011	-0.85	0.011	0.63	100.7
		S2	0.011				

由表 5 中数据可知, 婴幼儿配方奶粉试样中 V<sub>A</sub>、V<sub>D</sub>、V<sub>E</sub> 的含量范围为 0.0 mg/100g~10 mg/100g; 两次独立测定结果的相对偏差范围为-0.85 %~4.58 %, 满足《T/SHFCA 002-2024 特殊医学用途配方食品中维生素 A、D、E 的测定 在线固相萃取-二维液相色谱法》中规定的在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算数平均值的 15 %的要求; 加标回收实验中, V<sub>A</sub>、V<sub>D</sub>、V<sub>E</sub> 的回收率范围为 98.0 %~106.0 %。

### 三、 结论

本实验使用悟空在线固相萃取-二维液相色谱系统, 搭配 vADE 专用色谱柱, 在一维系统中测定 V<sub>A</sub>、δ-V<sub>E</sub>、β-V<sub>E</sub>、γ-V<sub>E</sub> 和 α-V<sub>E</sub>, 二维系统中测定 VD<sub>2</sub> 和 VD<sub>3</sub>, 实验结果表明: V<sub>A</sub>、V<sub>D</sub>、V<sub>E</sub> 的理论塔板数范围为 116101~232455, 均具有极佳的峰形; β-V<sub>E</sub> 和 γ-V<sub>E</sub> 的分离度为

1.76,  $VD_2$  和  $VD_3$  的分离度为 2.35, 均可实现良好分离; 混合标准溶液连续进样 6 针进行重复性测试,  $V_A$ 、 $V_D$ 、 $V_E$  保留时间的 RSD 范围为 0.03 %~0.09 %, 峰面积的 RSD 范围为 0.25 %~0.72 %, 均具有良好的定性定量重复性; 灵敏度测试中,  $V_A$ 、 $V_D$ 、 $V_E$  的方法检出限范围为 1.07  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ~27.65  $\mu\text{g}/100\text{g}$ , 方法定量限范围为 3.55  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ~92.17  $\mu\text{g}/100\text{g}$ , 满足《T/SHFCA 002-2024 特殊医学用途配方食品中维生素 A、D、E 的测定 在线固相萃取-二维液相色谱法》对检出限及定量限的要求;  $V_A$ 、 $V_D$ 、 $V_E$  在其线性浓度范围内均呈现良好的线性关系, 相关系数  $R$  均 $>0.9999$ ; 婴幼儿配方奶粉试样中  $V_A$ 、 $V_D$ 、 $V_E$  的含量范围为 0.0  $\text{mg}/100\text{g}$ ~10  $\text{mg}/100\text{g}$ ; 两次独立测定结果的相对偏差范围为 -0.85 %~4.58 %, 满足《T/SHFCA 002-2024 特殊医学用途配方食品中维生素 A、D、E 的测定 在线固相萃取-二维液相色谱法》中规定的在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算数平均值的 15 %的要求; 加标回收实验中,  $V_A$ 、 $V_D$ 、 $V_E$  的回收率范围为 98.0 %~106.0 %。因此, 悟空在线固相萃取-二维液相色谱系统配置 vADE 专用色谱柱, 可用于婴幼儿配方奶粉中维生素 A、D、E 含量的快速测定。

## 四、 注意事项

- 1 整个实验过程需尽量减少光照;
- 2  $V_A$ 、 $V_D$ 、 $V_E$  标准储备液配制后, 可置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  避光保存 1 个月;
- 3 样品前处理过程中, 滴加氢氧化钾溶液时需边加边振摇, 避免局部过热; 整个前处理过程需要尽快完成, 避免试样长期暴露在空气中。

## 附 1: 仪器配置清单

序号	单元
K2025 二维高效液相色谱系统	
A)	Pump Unit 泵单元
	SPE 泵: 四元低压输液泵 (62 MPa)
1	1D 泵: 二元高压输液泵 (62 MPa)
	2D 泵: 四元低压输液泵 (62 MPa)
2	流动相瓶 (肖特瓶, 1 L)
3	溶剂托盘
4	脱气机
5	自动在线清洗系统
B)	Sample Injector 进样器
1	制冷版自动进样器
2	样品瓶 (2 mL, 含瓶盖)
3	脱气组件
4	100 $\mu$ L 定量环
C)	Column Oven 柱温箱
1	立式柱温箱 (室温以下 10 $^{\circ}$ C 至 90 $^{\circ}$ C)
2	2 位 6 通阀 (2 个)
	色谱柱:
	Online SPE 柱: 3.0 $\times$ 30 mm, 40 $\mu$ m;
3	1D 色谱柱: vADE 1D, 4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 $\mu$ m;
	2D 色谱柱: vADE 2D, 2.1 mm $\times$ 100 mm, 3 $\mu$ m;
	vADE 专用捕集柱: 4.6 mm $\times$ 10 mm, 5 $\mu$ m;
	保护柱卡套 (专用捕集柱配套使用)
D)	Detector 检测器 (2 套)
1	紫外-可见光检测器
E)	Workstation 工作站
1	Wookinglab 2D 二维色谱工作站

## 附 2: 悟空 K2025 二维高效液相色谱仪（可靠、精准、友好、合规）

