《乳及乳制品中维生素 A、D、E 的测定 在线固相萃取-中心切割二维液相色谱法》
编制说明

一、工作简况

1. 任务来源

国家重点研发计划乳制品全产业链和消费行为 NQI 集成及应用示范子课题乳品品质检验方法的改进研究。

2. 起草单位

南京市产品质量监督检验院、上海市产品质量监督检验院、上海通标标准技术有限公司、澳优乳业（中国）有限公司、内蒙古伊利实业集团股份有限公司、内蒙古欧世蒙牛乳制品有限责任公司

3. 主要起草人

徐美玲、张露、王晓丽、陆秀凤、叶沐阳、陈良茜、江雪婷、郭园园、王飞轩、周荣杰、林毅侃、赵立苹、胡雪、吴腾

二、制定（修订）标准的必要性和意义

本标准适用于乳及乳制品中维生素 A、D、E 的检测。脂溶性维生素由于其性质不稳定，还会受环境及实验条件的影响。样品前处理对数据准确性的影响最为关键。脂溶性维生素以各种形态分布在样品中，前处理需要将基质中的脂溶性物质去除，首先要进行皂化处理，再进行提取、净化等操作。目前，维生素 A、D、E 的检测方法主要有紫外可见分光光度法、薄层层析法、荧光法、气相色谱法和高效液相色谱法、液质联用法等。对于维生素 A、D、E 的测定一般参照国家标准《GB 5009.82-2016 食品安全国家标准 食品中维生素 A，D，E 的测定》。该标准样品前处理极其复杂，测定方法多样，同一成分有不同的测试方法，导致测试时间周期长，回收率低，重复性差，极大降低了分析效率。为了解决国标存在的难点，需要研究一种同时测定维生 A、D、E 的稳定高效的在线固相萃取-二维液相色谱方法。

近年来，二维液相色谱技术以峰容量大、基质效应低、分析通量高等特点被广泛

应用于食品检测行业中。二维液相色谱(2D-LC)是将分离机理不同而又相互独立的两支色谱柱串联起来构成的分离系统。样品经过第一维的色谱柱进入接口中，通过浓缩、捕集或切割后被切换进入第二维色谱柱及检测器中。二维液相色谱通常采用两种不同的分离机理分析样品, 即利用样品的不同特性把复杂混合物(如肽)分成单一组分，这些特性包括分子尺寸、等电点、亲水性、电荷、特殊分子间作用(亲和)等，在一维分离系统中不能完全分离的组分，可能在二维系统中得到更好的分离, 分离能力、分辨率得到极大的提高。

采用二维液相色谱中的捕集柱切换技术拟通过三泵双阀切换双检测器搭建的二维液相色谱分离系统，建立了一种可同时实现维生素 A、维生素 D、维生素 E 及其同分异构体的分析检测方法。维生素 A、D、E 的萃取采用在线固相萃取小柱法代替了手动液液萃取方式，经皂化后可直接进行仪器分析。维生素 D 的净化通过一维分析柱完成并通过捕集柱进行富集再转移至第二维完成分离检测。样品的萃取、净化和转移均通过切换阀自动实现。维生素 D 捕集柱的作用是在两维间形成溶质“重新聚焦 ”。捕集柱在第一维流动相洗脱条件下对样品的保留能力比第一维强,在第二维流动相洗脱条件下易于洗脱。当第一维洗脱产物流经捕集柱时，溶质在捕集柱头被富集浓缩，切换阀后，第二维流动相将经过捕集柱富集浓缩的组分反冲入第二维进一步分离。该方法的一维和二维系统均采用反相色谱法，一次进样可完成 7 种化合物的定量分析，显著提高了检测效率，具有方便快速、安全、操作简单等优点，为复合维生素片中维生素 A、D 和 E 的测定提供了可实施方法和技术支持。

与 AOAC 及 GB 5009.82-2016 方法分析流程对比：本方法与 AOAC 及 GB5009.82-2016 分析流程对比。其中热皂化可将目标分析物从脂蛋白包裹状态中释放出来，无论 AOAC 还是 GB 方法，液液萃取步骤都使样品制备流程耗时费力，成为制约整个方法效率的主要瓶颈。而本方法采用 online SPE 替代此步操作，使整个分析流程变得简便快速。由于样品分析流程简化，也显著改善了样品测定结果的重复性，同时减少了有机溶剂消耗，因此本方法更加环保。另外 AOAC 和 GB 方法需要将含量差异较大的维生素 A、维生素 E 与维生素 D 分开测定。本方法采用二维液相色谱结合常规紫外检测器和高灵敏度的 DAD 检测器，可实现常量维生素 A、维生素 E 与微量维生素 D 的同时定量分析，分析时间只需约 25 min，整体分析效率提升近 4 倍，分析成

本下降约 60%，对于有高通量分析需求的实验室具有重要意义。

三、主要起草过程

本标准在起草过程中系统调研了现行国内外的标准方法以及近年来国内外文献中的参考分析方法，同时也对国内相关用户的应用现状做了调查。目前国内大部分相关企业、第三方检测实验室、质检院等仍参考 GB5009.82-2016 进行乳及乳制品中维生素 A、D、E 的检测。该标准中分成四个方法，其中第一法和第四法是针对配方食品的液相色谱方法，其分析的主要流程见图 1。整个过程不仅操作步骤繁琐，通常需要投入两个操作人员，配合完成整个检测过程，严重影响实际样品的检测效率，而且该法在液液萃取过程中需要消耗大量的石油醚/乙醚等有机试剂，做维生素 D 检测还需要正相色谱的净化过程等等，整体上完成第一法和第四法需要投入大量人力物力。国标的第三法针对维生素 D 检测，方法基本与 AOAC 方法一致，为同位素内标的 LC-MSMS 方法，样品的前处理同样包括皂化和液液萃取过程，还需要硅胶固相萃取柱的净化过程，虽然方法具有较好的准确性和更低的定量限和检出限，但前处理过程依然繁琐，并消耗大量正己烷/正庚烷等有机试剂，高昂的仪器使用和维护成本也使该方法难以普及。

因此目前的方法尚存在以下缺点：1、样品前处理过程繁琐，耗时长，不仅严重影响实际样品的检测效率，也使测试结果的重现性受到挑战；2、VD 检测的 LC-MSMS 同位素内标法，仪器购置和检测维护成本较高，对操作人员技术水平也提出更高的要求；3、样品制备中的液液萃取过程中需要消耗大量的石油醚/乙醚/正己烷等有机试剂，不仅污染环境，也对人员健康造成危害。因此构建一种简单、快速且生态友好的分析方法具有重要意义。

与传统的液液萃取方法相比较，液固萃取通常需要更少的样品和试剂，操作也较为简便，且随着分析科学、材料科学的发展，越来越多的特色固相萃取材料被应用到食品中微量营养素的检测上。与传统离线固相萃取相比，在线固相萃取（online Solid Phase Extraction）具有以下优点：1、整个萃取过程在密闭仪器系统内完成，不仅能够有效减少目标待测物损失，方法整体回收率更高，也降低了目标物降解和污染的可能性；2、省时省力；3、减少人为干预，方法重现性更好；4、减少有机溶剂和样品的损耗。近年来，online SPE 在食品等复杂基质中目标组分检测上已有很多应用。另外

二维液相方法，通过第一维和第二维分离选择性的互为补充，不仅能够提升系统分离能力，亦可“去粗取精”，完成微量目标物的富集和定量，已成为液相色谱技术的重要发展方向之一。近年来随着二维液相色谱商品化程度越来越成熟，其在食品中生物活性成分检测上应用也越来越多。

维生素 A、D、E 在配方食品中通常以脂蛋白包裹的微粒形式存在，皂化或酶解通常是释放目标物的常用手段，标物释放后的萃取过程必不可少。因此本项目拟构建基于在线固相萃取结合二维液相色谱的全自动分析方案，皂化溶液可直接进样分析，自动完成目标物的富集、净化、分离和分析的全过程。

为建立基于在线固相萃取-二维液相色谱的分析方法，试验分别从 SPE 柱的选择、上样和洗脱溶剂的筛选、目标物的转移时间、在线稀释过程、第一维分离条件优化、第二维 trap 柱条件等因素进行了系统考察。

通过对目前标准参考方法的实际使用情况的痛点和难点的调研分析，构建新的简单、快速及绿色环保方法具有重要的现实意义。随着在线固相萃取技术和多维液相色谱技术在食品分析中应用的不断增多，结合对现有参考方法中样品溶液制备过程和目标待测物理化性质的充分了解，在线固相萃取和二维液相技术相结合的方案在解决食品中脂溶性维生素 ADE 分析具有较强的可行性。通过试验对方法的关键条件进行了系统考察和验证，确定了分析条件，同时在实际样品的检测中检验方法的可靠性和耐用性，及时发现问题，分析问题原因，不断做出改进。最终使方案日臻成熟。

简便(simplification)、快速（speediness）、微型化（miniaturization/wastage reduction）、自动化（automation）、成本（costs）和安全性（safety）是近年来关于食品中脂溶性维生素分析的 6 个重要趋势。基于在线样品制备串联二维液相色谱技术的方案，既体现了仪器自动化程度的提高、综合分析成本的降低和分析效率上的提升；通过取代了石油醚等有机试剂的液液萃取步骤，更体现了方法安全性的改进。

四、制定（修订）标准的原则和依据与现行法律、法规标准的关系

本标准以 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》、GB/T 27417-2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》为依据制定，完全符合法律法规要求。

五、主要条款的说明、主要技术指标、参数、试验验证的论述

通过对目前标准参考方法的实际使用情况的痛点和难点的调研分析，构建新的简单、快速及绿色环保方法具有重要的现实意义。随着在线固相萃取技术和多维液相色谱技术在食品分析中应用的不断增多，结合对现有参考方法中样品溶液制备过程和目标待测物理化性质的充分了解，在线固相萃取和二维液相技术相结合的方案在解决食品中脂溶性维生素 ADE 分析具有较强的可行性。通过试验对方法的关键条件进行了系统考察和验证，确定了分析条件，同时在实际样品的检测中检验方法的可靠性和耐用性，及时发现问题，分析问题原因，不断做出改进。最终使方案日臻成熟。通过系统方法学验证结果表明各目标待测物的线性相关性较好（r>0.9999），含量相对较低的维生素 VD2、VD3 的方法最低定量限 (LOQ) 分别为 0.129 ng/ mL 和 0.142 ng/ mL 检测（按照进样量 100 μL 计算），比 LC-MSMS 方法略低，但在同一数量级水平。同时重现性考察结果显示，目标分析物的含量的 RSD 均小于 2%，表明本方法重现性良好，并显著优于 GB 5009.82-2016 的要求 (15%)；试验通过加标回收率和多次的质控样品测定结果来综合评价方法测定的准确性。结果显示各目标待测物的回收率在 93.29%~103.66%，奶粉质控样品也均在质控范围内，证实本法测定结果准确可靠。

六、有关标准性质的措施建议

建议标准实行推荐性标准-团体标准。

七、贯彻标准的措施建议

建议各乳及乳制品厂家都采用该团体标准，全面提升产品质量，优化检测工艺。

八、预期效益分析

在线固相萃取结合二维液相色谱技术的方案，能够充分发挥仪器自动化、智能化的特点，解决食品中维生素 ADE 的同时定量分析的问题。首先仪器配置了两台 UV 检测器，第一维串联常规紫外检测器，兼顾配置成本的同时，利用波长切换解决食品中常量的维生素 A 和 E 的同时定量，第二维搭配基于光导纤维技术超高灵敏度的二极管阵列检测器，用于微量的维生素 D 的检测，结合大体积进样，能够显著改善维生素 D 的定量限，两个检测器的搭配，使本法能够很好兼顾国标的第一法和第四法，一次进样同时完成维生素 ADE 的定量；其次在实际样品检测中，在线固相萃取柱可以重复进样 500~1000 次，试验中通过充分优化上样、洗脱和清洗、再生条件，结合系统中配置的在线过滤器等，最大限度的延长了 online SPE 小柱的使用寿命，从而使单次

样品检测成本显著低于其他方法；再次基于在线液固萃取技术，取代了 GB 和 AOAC 中液液萃取步骤，从而避免使用石油醚、乙醚、正己烷/正庚烷等有机试剂（如按照 GB 完成第一法和第四法单个样品需要消耗石油醚 150mL，乙醚 50mL，正己烷 20mL，环己烷 15mL），本法 online SPE 过程单针仅需消耗少量的甲醇（约 5.6mL）、乙腈（约 15mL）和甲基叔丁基醚（约 1.0mL），从而大大减少有机试剂的使用量，是一种较环保、低碳的方法。最后从分析效率和单次检测成本上分析。本法通过对分析流程上的优化，样品皂化后上机分析，自动完成目标物的富集、净化、分离和分析全过程，由图 2 可知，总分析时间较国标方法减少约 70~80%，维生素 D 检测较 AOAC 方法减少约 70%，所以整体分析效率明显提升。与 GB 对比，人力成本投入减少 50%以上，总分析成本降低约 2/3，经济效益明显。