

液相色谱-质谱联用法同时测定保健食品中 维生素 D₃ 和维生素 K₁ 的含量

刘光兰*, 陈彩云, 吴 银
(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: 目的 建立液相色谱-质谱联用法同时测定维生素 D₃ 和维生素 K₁ 的含量。**方法** 样品经前处理, 于液相色谱-质谱联用仪中进行检测, 采用 5 mmol/L 甲酸铵甲醇溶液为流动相, 等度洗脱, 经 C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×150 mm, 2.6 μm) 分离。**结果** 维生素 D₃ 在浓度 0.0546~0.819 μg/mL 之间呈现良好的线性关系, $r=0.9990$, 平均回收率为 92.15%~98.99%, RSD 为 2.4%; 在 0.134~2.006 μg/mL 之间, 维生素 K₁ 的浓度, 呈现良好的线性关系, $r=0.9990$, 平均回收率为 94.15%~101.01%, RSD 为 2.2%。**结论** 该方法能同时测定维生素 D₃ 和维生素 K₁ 含量, 操作简便准确、耗费时间短、重现性较好, 可在实验室广泛推广。

关键词: 液相色谱-质谱联用法; 维生素 D₃; 维生素 K₁; 保健食品

Simultaneous determination of the vitamin D₃ and vitamin K₁ content in healthy food by liquid chromatography mass spectrometry

LIU Guang-Lan*, CHEN Cai-Yun, WU Yin
(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous determination of vitamin D₃ and vitamin K₁ content by liquid chromatography mass spectrometry. **Methods** The samples were pretreated and detected by liquid chromatography-mass spectrometry. The 5 mmol/L ammonium formate and methanol were used as mobile phase for isocratic elution, and the sample was separated by C₁₈ column (4.6 mm×150 mm, 2.6 μm). **Results** Vitamin D₃ had a good linear relationship in range of 0.0546–0.819 μg/mL ($r=0.9990$), the recoveries were 92.15%–98.99%, and the RSD was 2.4%. Vitamin K₁ had a good linear relationship in range of 0.134–2.006 μg/mL ($r=0.9990$), the recoveries were 94.15%–101.01%, and the RSD was 2.2%. **Conclusion** This method can simultaneously determine the vitamin D₃ and vitamin K₁ content in healthy food, which is simple, accurate, time-consuming and reproducible, and can be widely used in laboratory.

KEY WORDS: liquid chromatography mass spectrometry; vitamin D₃; vitamin K₁; healthy food

1 引言

维生素 D₃ 是维生素 D 的一种, 7-脱氢胆固醇由胆固醇脱氢后生成, 后经紫外线照射反应形成胆钙化醇。维生素 D₃ 是脂溶性维生素类的一种, 易溶解于有机溶剂中, 但不

溶于水, 在中性及碱性溶液中, 能耐高温和氧化, 常用的检测方法为高效液相色谱法^[1-6]。维生素 K₁^[7-9] 是多环芳香酮的一种, 也是一种脂溶性维生素, 在空气和潮湿环境中较为稳定, 在阳光下容易分解。维生素 K₁ 是肝脏合成因子 II、VII、IX、X 所必需的物质, 能促进血凝、促进肝脏中

*通讯作者: 刘光兰, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 1048005722@qq.com

*Corresponding author: LIU Guang-Lan, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 1048005722@qq.com

凝血酶原的合成及增加肠道蠕动及分泌功能,常用检测方法为高效液相色谱法^[10-15]。常用的方法都是检测单独成分的方法,但由于其前处理过程时间长,成分容易被氧化,使得结果重现性不理想。本研究采用液相色谱-质谱联用法同时检测维生素 D₃ 和维生素 K₁ 的含量,且前处理操作简单快捷,针对同时检测维生素 D₃ 和维生素 K₁ 的研究研究不多,因此期望能为脂溶性类维生素在液相色谱-质谱联用领域的检测提供研究参考。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

4500 质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); 20A 型高效液相色谱仪(配紫外检测器,日本岛津公司); EQ-500 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 水浴锅(上海乔跃电子有限公司); EC-C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 2.6 μm, 美国 Agilent 公司)。

维生素 K₁(批号: BCBN1267V; 含量: 99.2%, 美国 Sigma 公司); 维生素 D₃(批号: 100656; 含量: 99.9%, 德国 DR 公司); 甲醇、乙酸铵、无水乙醇、正己烷(色谱纯, 德国 CNW 公司)。

2.2 仪器条件

色谱柱: C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 2.7 μm, 美国 Agilent 公司); 流动相: 5 mmol/L 甲酸铵甲醇溶液, 等度洗脱; 流速: 0.6 mL/min; 进样量: 2 μL; 柱温箱: 柱温 40 °C; 运行时间: 10 min。质谱条件见表 1。

2.3 检测方法

2.3.1 标准溶液的配制

(1) 标准储备液的配制

维生素 D₃ 储备液: 精密称量适量的维生素 D₃ 标准品, 置于 500 mL 的棕色容量瓶, 加入一定量的无水乙醇, 置于超声仪超声 3~5 min 后取出, 待溶液温度达到室温后定容至刻度, 摇匀备用。标准储备液使用前需要进行浓度校正(校正方法参照 GB 5009.82-2016《食品安全国家标准食品中维生素 A、D、E 的测定》^[16]附录 B)。

维生素 K₁ 储备液: 精密称量适量的维生素 K₁ 标准品, 置于 50 mL 的棕色容量瓶, 加入无水乙醇适量, 超声 3~

5 min 后取出, 待溶液温度达到室温后定容至刻度, 摇匀备用。标准储备液使用前需要进行浓度校正(校正方法参照 GB 5009.158-2016《食品安全国家标准食品中维生素 K₁ 的测定》^[17]附录 A)。

(2) 标准溶液的配制

维生素 D₃ 与维生素 K₁ 混合标准溶液: 精密吸取适量的维生素 D₃、维生素 K₁ 标准储备液, 置于容量为 100 mL 的棕色容量瓶, 后用无水乙醇定容至刻度, 经 0.22 μm 滤膜过滤后, 精密吸取混合的标准溶液 2、5、8、10、20 μL 进样。

2.3.2 供试品溶液的配制

称取混匀的测试样 0.1100 g, 置于 50 mL 棕色离心管中, 加入适量的水, 常温超声 10 min 使完全溶解, 取出放置室温加入适量的正己烷萃取, 重复萃取 2~3 次, 合并上层萃取液, 40 °C 条件下氮气吹干, 放置室温, 转移至 25 mL 棕色容量瓶中, 用无水乙醇定容至刻度后摇匀, 经 0.45 μm 滤膜过滤后进样。

2.3.3 精密度实验

精密称取 6 份待测样品, 按 2.3.2 方法对样品进行前处理, 检测出待测样品的含量, 计算其 RSD。

2.3.4 加标回收率实验

精密称取约 0.1200 g 的 9 份待测试样品, 放置于容量为 50 mL 棕色离心管, 每组 3 份, 分成 3 组, 在每组中分别精密加入维生素 D₃ 与维生素 K₁ 标准使用液(维生素 D₃ 浓度为 10.922 μg/mL)0.15、0.20、0.25 mL, (维生素 K₁ 浓度为 0.13365 mg/mL)0.10、0.15、0.20 mL; 按 2.3.2 试样制备方法处理样品。

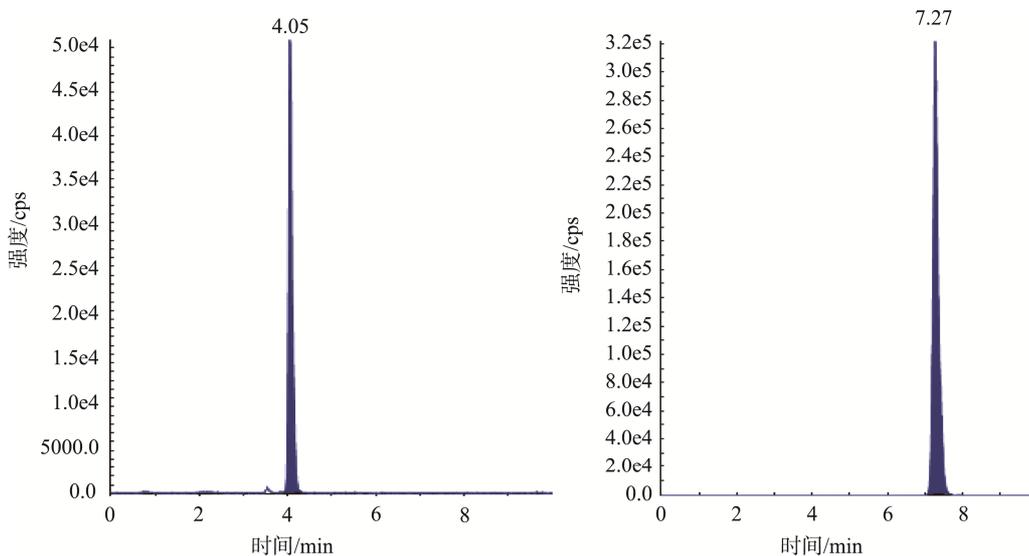
3 结果与分析

3.1 色谱优化

采用液质串联法, 主峰不受到杂质峰的干扰的同时, 快速检测出待测样品中的维生素 D₃ 和维生素 K₁。以 5 mmol/L 甲酸铵甲醇溶液为流动相进行洗脱, 样品中维生素 D₃、维生素 K₁ 能够在 10 min 内流出主峰而不受干扰, 可以使维生素 D₃、维生素 K₁ 的主峰不受其他杂质峰的干扰, 使其能达到准确的定量与分离, 见图 1、图 2。

表 1 质谱条件
Table 1 Mass spectrometry conditions

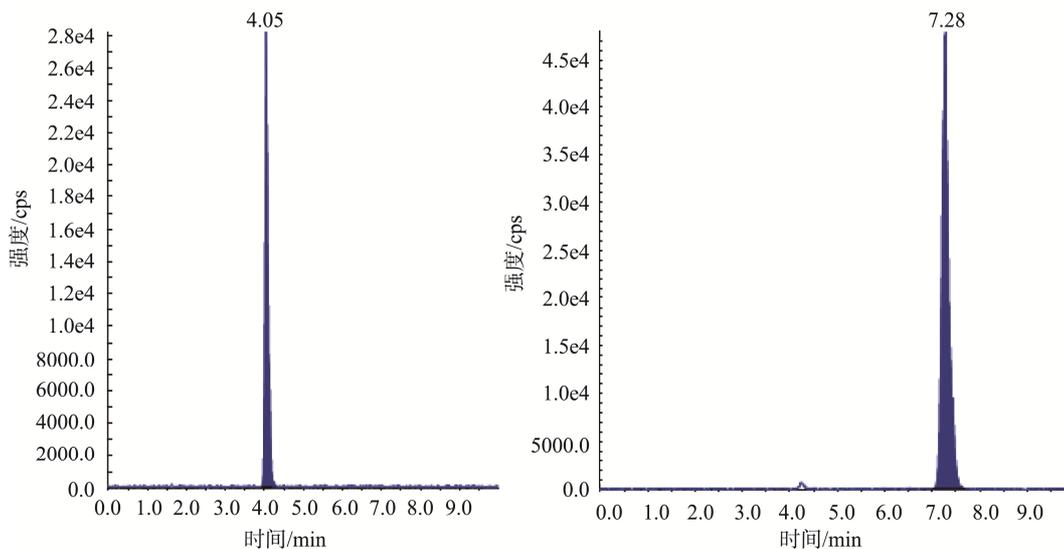
Q1	Q3	时间/s	去簇电压/V	射入电压/V	碰撞电压/V	IP	碰撞室射出电压/V
385.60	259.40	100	59.00	10.0	23.00	维生素 D ₃	7.0
385.60	367.40	100	59.00	10.0	17.00	维生素 D ₃	7.0
451.50	187.00	100	145.00	10.0	34.00	维生素 K ₁	7.0
451.50	227.00	100	145.00	10.0	38.00	维生素 K ₁	7.0



注: 左图维生素 D₃; 左图维生素 K₁。

图 1 样品色谱图

Fig.1 Chromatograms of the sample



注: 左图维生素 D₃; 左图维生素 K₁。

图 2 混合标准品色谱图

Fig.2 Chromatograms of mixed standard

3.2 线性相关性分析

维生素 D₃、K₁ 线性方程分别为 $Y=3 \times 10^6 X - 7.06 \times 10^3$ 、 $Y=4 \times 10^6 X - 9.66 \times 10^4$, 相关系数 r^2 为 0.999, 0.998, 维生素 D₃ 在浓度 0.0546~0.819 μg/mL 之间呈现良好的线性关系; 维生素 K₁ 在浓度 0.134~2.006 μg/mL 范围内呈现较良好的

线性关系。

3.3 精密度实验

精密度结果见表 2、表 3。结果显示, 维生素 D₃ 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.9%, 维生素 K₁ 的相对标准偏差为 3.7%, 说明都具有较好的精密度。

3.4 加标回收率

回收率结果见表 4、表 5。结果显示,在不同添加水平下,测试样中的维生素 D₃ 的回收率范围为 92.15%~98.99%、维生素 K₁ 的回收率范围为 94.15%~101.01%,相对标准偏差分别为 2.4%、2.2%。说明此法对维生素 D₃ 和维生素 K₁ 的含量测定科学有效。

4 结 论

本研究建立了液相色谱-质谱联用法同时测定维生

素 D₃ 和维生素 K₁ 的含量,以 5 mmol/L 甲酸铵甲醇溶液为流动相,流速:0.6 mL/min,可以获得良好的分离效果。本法采用正己烷作为萃取溶剂,维生素 D₃ 及维生素 K₁ 均为脂溶性物质,在正己烷中极易溶解,使维生素 D₃ 及维生素 K₁ 从样品中快速有效地提取分离出来,且无杂质干扰。综合而言,该方法精密度高、与国标中液相法皂化、萃取等繁琐的提取过程相比操作相对简单、重现性较好,在实际的检测工作中可推行,并且能够同时达到高效检测的要求。

表 2 维生素 D₃ 精密度实验结果(n=6)
Table 2 Precision results of vitamin D₃(n=6)

序号	称样量/g	稀释体积/mL	质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)	含量/($\mu\text{g/g}$)	平均含量/($\mu\text{g/g}$)	RSD/%
1	0.13646	25	0.125	22.900	22.74	1.9
2	0.13113	25	0.120	22.878		
3	0.12115	25	0.107	22.080		
4	0.12027	25	0.112	23.280		
5	0.12259	25	0.112	22.840		
6	0.12446	25	0.112	22.497		

表 3 维生素 K₁ 精密度实验结果(n=6)
Table 3 Precision results of vitamin K₁(n=6)

序号	称样量/g	稀释体积/mL	质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)	含量/($\mu\text{g/g}$)	平均含量/($\mu\text{g/g}$)	RSD/%
1	0.13646	25	0.781	143.082	150.43	3.7
2	0.13113	25	0.800	152.520		
3	0.12115	25	0.754	155.592		
4	0.12027	25	0.738	153.404		
5	0.12259	25	0.756	154.172		
6	0.12446	25	0.716	143.821		

表 4 维生素 D₃ 回收率实验结果(n=9)
Table 4 Recoveries of vitamin D₃ results(n=9)

序号	样品称样量/g	样品质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)	测得加入对照品量/ μg	加标量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.12825	0.179	1.5585	1.6383	95.13	94.6	2.4
2	0.11974	0.171	1.5521	1.6383	94.73		
3	0.11532	0.166	1.5276	1.6383	93.24		
4	0.10798	0.183	2.1195	2.1844	97.03		
5	0.12054	0.192	2.0589	2.1844	94.25		
6	0.10719	0.184	2.1624	2.1844	98.99		
7	0.13516	0.225	2.5514	2.7305	93.44		
8	0.13594	0.225	2.5337	2.7305	92.79		
9	0.12131	0.211	2.5164	2.7305	92.15		

表 5 维生素 K₁ 回收率实验结果(n=9)
Table 5 Recoveries of vitamin K₁ results(n=9)

序号	样品称样量/g	样品质量浓度/(μg/mL)	测得加入对照品量/μg	加标量/μg		回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.12825	1.31	13.457	13.365		100.68		
2	0.11974	1.24	12.987	13.365		97.17		
3	0.11532	1.21	12.902	13.365		96.53		
4	0.10798	1.43	19.5063	20.047		97.3		
5	0.12054	1.51	19.6169	20.047		97.85	98.0	2.2
6	0.10719	1.4	18.8752	20.047		94.15		
7	0.13516	1.86	26.16	26.730		97.89		
8	0.13594	1.88	26.55	26.730		99.32		
9	0.12131	1.81	27.00	26.730		101.01		

参考文献

- [1] 饶华春, 粘少硕, 庄跃玲, 等. 25-羟维生素 D 检测方法的研究进展[J]. 中国医药指南, 2019, (25): 19-20.
Rao HC, Zhan SS, Zhuang YL, et al. Progress in the detection of 25-hydroxyvitamin D [J]. Guide China Med, 2019, (25): 19-20.
- [2] 王智慧, 沈旭娜, 陈新霄, 等. 维生素 D 与胎儿生长受限关联的研究进展[J]. 中华全科医学, 2020, (2): 298-302.
Wang ZH, Shen XN, Chen XX, et al. Progress of vitamin D and pediatric long-term restriction [J]. Chin J Gen Pract, 2020, (2): 298-302.
- [3] 凌龙, 胡海澜, 曹燕明, 等. 维生素 K₂ 联合维生素 D₃ 治疗青壮年早期膝关节关节炎的研究[J/CD]. 中华关节外科杂志(电子版), 2018, 12(2): 197-202.
Ling L, Hu HL, Cao YM, et al. Effect of vitamin K₂ combined with vitamin D₃ on young patients of early osteoarthritis of knee [J/CD]. Chin J Joint Surg (Elect Ed), 2018, 12(2): 197-202.
- [4] 陈爽, 王小丹, 李瑞, 等. VD₃ 与大豆分离蛋白相互作用的多重光谱分析与计算[J]. 食品科学, 2019, (23): 8-13.
Chen S, Wang XD, Li R, et al. Multispectral analysis and calculation of the interaction between vitamin D₃ and soybean with high protein [J]. Chin J Pharm, 2019, (23): 8-13.
- [5] 凌龙, 胡海澜, 曹燕明, 等. 维生素 K₂ 联合维生素 D₃ 治疗青壮年早期膝关节关节炎的研究[J/CD]. 中华关节外科杂志(电子版), 2018, 12(2): 197-202.
Ling L, Hu HL, Cao YM, et al. Effect of vitamin K₂ combined with vitamin D₃ on young patients of early osteoarthritis of knee [J/CD]. Chin J Joint Surg (Elect Ed), 2018, 12(2): 197-202.
- [6] 战思恩, 李幽然, 刘颖, 等. 液相色谱串联质谱法检测微量血维生素 D 含量[J]. 标记免疫分析与临床, 2019, (8): 1366-1369.
Zhan SE, Li YR, Liu Y, et al. The content of vitamin D intrace blood was determined by liquid tandem method [J]. Labeled Immun Clin Med, 2019, (8): 1366-1369.
- [7] 徐超, 周波, 王晓红, 等. 市售大豆油中维生素 K₁ 的含量[J]. 中国食物与营养, 2017, (4): 65-68.
Xu C, Zhou B, Wang XH, et al. The content of vitamin K₁ in commercial soybean oil [J]. Food Nutr China, 2017, (4): 65-68.
- [8] 张萌萌. 维生素 K₂ 调节骨代谢的生物学研究回顾[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(12): 1597-1600.
Zhang MM. A biological study review of the role of vitamin K₂ in regulating on bone metabolism [J]. Chin J Osteoporos, 2016, 22(12): 1597-1600.
- [9] 赵明杰, 黄静静, 王伟伟, 等. 不同血液透析方式对维生素 K₂ 及腹主动脉钙化的影响[J]. 实用医学杂志, 2018, 33(8): 1323-1326.
Zhao MJ, Huang JJ, Wang WW, et al. Effects of different hemodialysis methods on vitamin K₂ and abdominal aortic calcification [J]. J Pract Med, 2018, 33(8): 1323-1326.
- [10] 王萍, 陈丽艳, 孙银玲, 等. 基于维生素 K₂ 的纳豆发酵条件优化[J]. 食品工业, 2018, 39(7): 54-57.
Wang P, Chen LY, Sun YL, et al. Optimization of natto fermentation conditions based on vitamin K₂ [J]. Food Ind, 2018, 39(7): 54-57.
- [11] 徐向峰, 马若影, 常建军, 等. 高效液相色谱法测定奶粉中维生素 K₁ 含量不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, (21): 7406-7411.
Xu XF, Ma RY, Chang JJ, et al. The uncertainty of vitamin K₁ content in milk powder was determined by HPLC [J]. J Food Saf Qual, 2019, (21): 7406-7411.
- [12] 邵艳, 翟立斐, 王焕新, 等. 高效液相色谱法测定奶粉中维生素 K₁ 的改进[J]. 中国乳品工业, 2016, (11): 57-64.
Shao Y, Zhai LF, Wang HX, et al. Improvement of determination of vitamin K₁ in milk powder by HPLC [J]. China Dairy Ind, 2016, (11): 57-64.
- [13] 刘倩, 阳延松, 莫薇薇, 等. 维生素 K₂ 及 Gas6 与维持性血透患者血管钙化相关性研究[J]. 海南医学, 2017, 28(5): 696-697.
Liu Q, Yang YS, Mo WW, et al. Correlation between vitamin K₂, Gas6 and vascular calcification in maintenance hemodialysis patients [J]. Hainan Med J, 2017, 28(5): 696-697.
- [14] 李岩, 陈刚, 袁雅文, 等. 建立 HPLC-MS/MS 测定人血浆中维生素 K₁ 浓度的方法及其临床应用[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, (5): 61-64.
Li Y, Chen G, Yan YW, et al. Establishment of HPLC-MS/MS method for determination of vitamin K₁ concentration in human plasma and its clinical study [J]. Chin J Clin Pharm, 2017, (5): 61-64.

- [15] 严华, 冯鑫, 梁娜娜, 等. 稳定同位素稀释/液相色谱-串联质谱法同时测定婴幼儿配方奶粉中 5 种脂溶性维生素[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, (23): 6130-6139.
Yan H, Feng X, Liang NN, *et al.* At the same time, 5 kinds of fat-soluble vitamins in infant formula were determined by stable isotope dilution or HPLC-MS/MS method [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, (23): 6130-6139.
- [16] GB 5009.82-2016 食品安全国家标准食品中维生素 A、D、E 的测定[S]. GB 5009.82-2016 National food safety standard-Determination of vitamin A, D and E in food [S].
- [17] GB 5009.158-2016 食品安全国家标准食品中维生素 K₁ 的测定[S]. GB 5009.158-2016 National food safety standard-Determination of

vitamin K₁ in food [S]

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



刘光兰, 主要研究方向为保健食品的质量检测。
E-mail: 1048005722@qq.com

“饮料品质控制及检测分析”专题征稿函

饮料工业是我国食品工业的重要组成部分, 与人民物质生活息息相关。近年来, 随着人们物质生活水平的不断提高, 对饮料的品质要求也在不断提升, 好喝与安全已经成为一种潮流与时尚。

近年来的塑化剂风波、勾兑门、农残门、致癌门等诸多事件或多或少地困扰着饮料行业发展, 饮料品质安全问题越来越得到社会和广大消费者的关注。

鉴于此, 本刊特别策划“饮料品质控制及检测分析”专题, 主要围绕饮料产业发展现状、饮料加工过程中质量控制与品质安全管理、饮料质量检测标准、饮料中有害物质的检测方法、饮料包装材料等或您认为本领域有意义问题展开讨论, 计划在 2021 年 3/4 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 学报主编国家食品安全风险评估中心 吴永宁 研究员和专题主编北京市营养源研究所 许洪高 研究员特邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力, 综述及研究论文均可。请在 2021 年 2 月 28 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题饮料品质控制及检测分析):

网站: www.chinafoodj.com(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者

登录-注册投稿-投稿栏目选择“2021 专题: 饮料品质控制及检测分析”)

邮箱投稿: E-mail: jfoodsqa@126.com(备注: 饮料品质控制及检测分析专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部