

液相色谱-串联四极杆质谱法检测鸡配合饲料中 25 羟基维生素 D₃ 含量

王 博, 吴剑平, 张 婧, 徐 汀, 严 凤*

(上海市兽药饲料检测所, 上海 201103)

摘要: 目的 建立配合饲料中 25 羟基维生素 D₃ 的液相色谱-串联四极杆质谱(Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)检测分析方法。**方法** 取适量鸡配合饲料样品于离心管中, 加水后置于振荡器上振荡破除环糊精包囊, 再加入叔丁基甲醚振荡对目标物进行提取, 在 9000 r/min 条件下离心 5 min, 氮气吹干后用 1.00 mL 流动相溶解, 过滤膜后上机测定。实验使用反相色谱柱进行分离, 流动相为甲醇(0.1%甲酸)和 0.1% 甲酸, 采用梯度程序进行洗脱, 三重四极杆质谱进行定性定量分析, 采用内标法进行计算。**结果** 实验结果表明, 方法的定量限为 5 μg/kg, 含量在 2~500 μg/L 范围内线性良好($r^2 \geq 0.9999$), 加标回收率在 81.18%~97.94%之间, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD) $\leq 9.95\%$, 实际样品的含量为 7.00~46.05 μg/kg。**结论** 本方法具有良好的准确度与精密度, 具有较好的实用性和专属性。

关键词: 液相色谱-串联质谱; 鸡配合饲料; 25 羟基维生素 D₃

Determination of 25-hydroxyvitamin D₃ in compound feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Bo, WU Jian-Ping, ZHANG Jing, XU Ting, YAN Feng*

(Shanghai Municipal Supervisory Institute Veterinary Drugs and Feedstuff, Shanghai 201103, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 25-hydroxyvitamin D₃ in compound feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** An appropriate amount of chicken compound feed samples were placed in the centrifuge tube, water was added and placed on the oscillator to vibrate and break the cyclodextrin cyst, then tert-butyl methyl ether was added to extract the target by oscillation, and centrifuged at 9000 r/min for 5 min. After nitrogen was blow-dried, it was dissolved in 1.00 mL mobile phase, and the solution was filtered by film and then injected. Reverse phase chromatography column was used for separation. The mobile phase was methanol (0.1% formic acid) and 0.1% formic acid. Gradient program was used for elution, triple quadrupole mass spectrometry was used for qualitative and quantitative analysis, and internal standard method was used for calculation. **Results** The results showed that the limit of quantitation was 5 μg/kg, 25-hydroxyvitamin D₃ had good linear relationships in the range of 2–500 μg/L, and the correlation coefficients were all above 0.9999, the recoveries were 81.18%–97.94%, and the relative standard deviations(RSD) were lower than 9.95%. The concentrate of actual sample were 7.00–46.05 μg/kg. **Conclusion** This method showed the good accuracy and precision, and had good practicability.

KEY WORDS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; compound feed; 25-hydroxyvitamin D₃

*通讯作者: 严凤, 硕士, 畜牧师, 主要研究方向为兽药残留分析。E-mail: yan508@163.com

*Corresponding author: YAN Feng, Master, Engineer, Shanghai Municipal Supervisory Institute Veterinary Drugs and Feedstuff, Shanghai 201103, China. E-mail: yan508@163.com

1 引言

维生素 D 是动物生长发育必需的一种营养元素,能预防多种疾病^[1],缺乏维生素 D 可能会使生物无法正常获取所需钙元素,从而导致骨骼无法正常生长,而过高的维生素 D 则可能导致动物血钙浓度增高、肾脏出现结石等问题,最终增大死亡率^[2,3],维生素 D 缺乏现在已成为一种广泛现象^[4]。25 羟基维生素 D₃[以下简称 25(OH)D₃]是维生素 D 被动物吸收转化的中间物质,其生物学效价相当于维生素 D₃ 的 5 倍^[5],具有改善肉鸡的生长性能^[6-8]、提高母猪怀孕率及窝产仔数^[9]、提高生物钙和磷的保留率^[10]等作用,其可以直接进入血液循环,避免因肝损伤或肝功能失调引起的维生素 D₃ 功能紊乱,现已作为饲料添加剂被广泛应用到养殖业中。

目前,欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)规定鸡全价饲料中 25(OH)D₃ 的最高限量分别不得超过 75 μg/kg(蛋鸡)和 125 μg/kg(育肥鸡、火鸡),德国营养生理学学会(Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, GfE)、美国国家研究委员会(United States National Research Council, NRC)和法国国家农业科学院(Institute National de la Recherche Agronomique, INRA)对鸡生长发育过程中所需维生素 D 用量做出推荐^[11],国内 GB 9840-2017《饲料添加剂维生素 D₃(微粒)》^[12]对饲料中维生素 D₃ 的检测方法做出了规定,但对饲料中 25(OH)D₃ 的含量和检测方法并没有明确规定。

饲料基质复杂,准确测定饲料中 25(OH)D₃ 含量对于评估饲料质量安全具有重要意义,国内外有一些文献对 25(OH)D₃ 进行了检测,检测方法多用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法,但更多是检测血液和血清中的 25(OH)D₃^[13-16],对饲料中 25(OH)D₃ 检测基本没有,本研究建立了鸡配合饲料中 25(OH)D₃ 的 LC-MS/MS 法,以期弥补国内饲料中 25(OH)D₃ 检测方法的空缺。

2 材料与与方法

2.1 仪器与试剂

Ultimate 3000 双三元超高效液相色谱、TSQ Quantiva 串联四极杆质谱(赛默飞世尔科技(中国)有限公司); AL204 电子天平(0.0000~210.0000 g, 瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司); Allegra X-22R 高速冷冻离心机(德国 BECKMAN 公司); VX-III 多管涡漩振荡器(北京 TARGIN 公司); Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司); N-EVAP 水浴控温氮吹仪(上海安谱公司)。

甲醇、叔丁基甲醚(色谱纯,德国默克公司);甲酸(色谱纯,美国 Tedia 公司); 25(OH)D₃ 标准品(批号: G155330, 98.2%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 25 羟基维生素 D₃-d6(以

下简称 25(OH)D₃-d6)标准品(批号: C125702, 100%, 加拿大 TRC 公司)。25(OH)D₃ 化学结构见图 1。

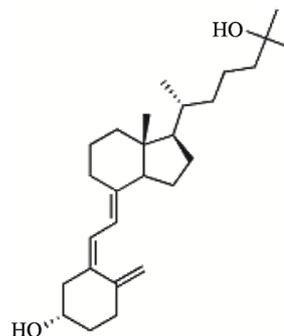


图 1 25(OH)D₃ 化学结构式
Fig.1 Structure of 25(OH)D₃

2.2 实验方法

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Waters T₃(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: A: 甲醇(0.1%甲酸); B: 0.1%甲酸溶液; 洗脱方式: 梯度洗脱, 洗脱方式见表 1; 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Procedure of gradient elution

时间/min	流速/(mL/min)	A/%	B/%
0		85	15
1		85	15
3	0.3	100	0
6		100	0
10		85	15

2.2.2 质谱条件

电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI); 多反应监测模式(multi-reaction monitor, MRM); 鞘气: 5 L/min; 辅助气: 9 L/min; 吹扫气: 3 L/min; 离子传输温度: 350 °C; 雾化器温度: 350 °C; 电离电压: 3500 V; 采集离子对信息见表 2。

2.2.3 标准品准备与处理

取 25(OH)D₃ 和 25(OH)D₃-d6(内标)标准品, 用纯甲醇将其分别配置成至 500 μg/L 浓度的储备液, 置于 -20 °C 冰箱避光保存, 保存期限为 1 个月。

2.2.4 样品准备与处理

称取鸡配合饲料样品 2 g 至 50 mL 离心管中, 加入 200 μL 浓度为 1 μg/mL 的内标, 加入 5 mL 水, 混匀后置于振荡器上振荡 20 min, 精密加入 20 mL 叔丁基甲醚, 混匀后继续振荡 20 min, 取下后在 9000 r/min 条件下离心 5 min, 精密取上清 10 mL 置 15 mL 离心管中, 氮气吹干, 精密加 1 mL 流动相复溶, 复溶后过滤膜上机测定。

表 2 化合物名称、分子式、理论分子量以及质谱碎片离子信息
Table 2 Formula, theoretical mass, experimental mass and MS fragmentation data of 2 standards

化合物	化学式	理论分子量	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>
25(OH)D ₃	C ₂₇ H ₄₄ O ₂	400.6	401.3	383.2
				365.3*
				257.1
25(OH)D ₃ -d6	C ₂₇ H ₃₈ O ₂ D6	406.7	407.2	389.3
				371.6*
				239.0

注: “*”为定量离子。

3 结果与分析

3.1 色谱条件优化

3.1.1 色谱柱优化

结合饲料基质复杂的情况和超高效液相色谱的性能, 实验比较了 Waters T₃ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱、Thermo C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 1.9 μm) 色谱柱和 Thermo C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 3 μm) 色谱柱对 25(OH)D₃ 和 25(OH)D₃-d6 与杂质峰的分离和灵敏度的不同影响。结果表明 Waters T₃ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱更适合于饲料中 25(OH)D₃ 和 25(OH)D₃-d6 的检测。虽然 Thermo C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 3 μm) 色谱柱用时更短, 但样品中杂峰会干扰目标峰产生干扰, Thermo C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 1.9 μm) 色谱柱能将目标峰和杂质峰分离开来, 但是柱效较差, 而 Waters T₃ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱能在较短时间内出峰, 且峰型对称, 与杂峰的分度良好。

3.1.2 流动相优化

25(OH)D₃ 和 25(OH)D₃-d6 是脂溶性维生素, 高有机相比例的流动相能对目标物进行良好的洗脱, 酸性条件下目标峰的峰型会更尖锐, 因此, 实验考察了乙腈(0.1%甲酸)、90%乙腈溶液(0.1%甲酸)、甲醇(0.1%甲酸)、90%甲醇溶液(0.1%甲酸)和 85%甲醇溶液(0.1%甲酸)作为流动相对目标物的分离效果。结果表明, 当流动相为 85%甲醇溶液(0.1%甲酸)时, 25(OH)D₃ 和 25(OH)D₃-d6 均与杂质峰能良好分离, 且峰型较好。流动相中有机相只为乙腈时, 不能洗脱 25(OH)D₃, 而当有机相为甲醇时, 能较好洗脱下来, 这可能是因为目标物的分子结构与甲醇的结构较为相似, 且有机溶剂 100%或与此极接近时, 常常都是甲醇的洗脱能力强。当流动相为甲醇(0.1%甲酸)和 90%甲醇溶液(0.1%甲酸)时, 目标物出峰时间快, 但是杂质峰能明显对目标峰产生影响。考虑到当流动相为 85%甲醇溶液(0.1%甲酸)时, 目标峰能和前面杂质峰良好分离, 为节约时间, 实验选择

梯度程序进行洗脱, 程序见表 1, 在保证杂质峰出完后, 加大甲醇比例, 使得目标峰较快分离。

3.2 质谱条件优化

ESI+离子化模式下, 在 50~1000 *m/z* 范围内作一级质谱全扫描, 得到 25(OH)D₃ 和 25(OH)D₃-d6 的总离子色谱图, 25(OH)D₃ 在 383.2 通道处的响应最高, 但易受到杂质干扰, 针对较低浓度的样品检测会有较大影响, 25(OH)D₃ 在 365.3 通道处响应较高, 且通道几乎没有杂质干扰, 因此, 实验选择 365.3 作为 25(OH)D₃ 检测计算通道; 25(OH)D₃-d6 在 389.2 通道处的响应最高, 但易受到杂质干扰, 在 371.6 通道处响应较高, 且通道几乎没有杂质干扰, 因此, 实验选择 371.6 作为 25(OH)D₃-d6(内标)的检测通道。比较其提取离子色谱图的响应和峰形, 依次优化鞘气流速、辅助气、吹扫气、离子传输温度和雾化器温度, 然后优化电离电压, 在定性分析软件中, 选择最优电压参数。详细参数见 2.2.2。

3.3 标准品典型图谱

在确定好的液相和质谱条件下, 进浓度为 5 μg/L 的标准品, 获得的典型图谱如下图 2 所示。

3.4 前处理条件优化

3.4.1 提取剂的筛选

经调研, 目前市面上鸡配合饲料中 25(OH)D₃ 的制作工艺均采用环糊精包囊法, 以延长产品的保质期, 本实验采用内标法进行计算, 通过向饲料中加水振荡的方式破除包囊; 考虑到 25(OH)D₃ 为脂溶性维生素, 实验考察了甲醇、乙醇、正己烷、石油醚、乙酸乙酯和叔丁基甲基醚 6 种提取剂对 25(OH)D₃ 的提取效率, 考察结果如表 3 所示, 通过比较可以发现, 6 种提取剂的相对回收率都达到了 90%以上, 其中正己烷、石油醚、乙酸乙酯和叔丁基甲基醚的绝对回收率相接近, 考虑到实际处理过程中, 当提取剂为叔丁基甲基醚时, 复溶后的溶液较为清澈, 后续操作较为容易, 所以实验选择水: 叔丁基甲基醚(5:20, *V:V*)作为提取剂。

3.4.2 提取次数的优化

当提取剂为叔丁基甲基醚时, 提取效率较高, 此时相对回收率能满足要求, 但是绝对回收率只有接近 30%, 因此, 本实验还从叔丁基甲基醚提取次数方面进行了考察, 考察了 1 次提取和 2 次提取的区别, 结果如表 4 所示, 1 次提取和 2 次提取的绝对回收率和相对回收率相差不大, 因此, 实验选择提取 1 次, 保证了实验的准确性, 同时大大减少了工作量。

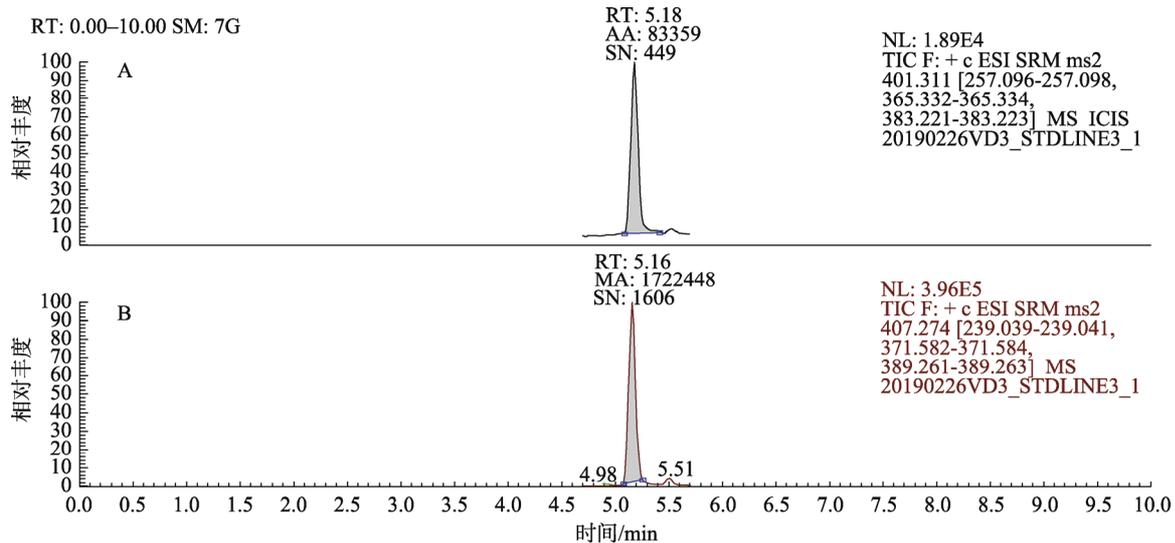
3.5 线性范围及定量限

取适量 25(OH)D₃ 和 25(OH)D₃-d6 标准品储备液, 用 85%甲醇溶液(0.1%甲酸)将其稀释成 25(OH)D₃ 浓度为 0、

2、5、10、50、100、500 $\mu\text{g/L}$ 的标准曲线系列工作溶液,其中内标的浓度均为 100 $\mu\text{g/L}$,在优化的色谱和质谱条件下进行测定,以各组分的峰面积对其质量浓度绘制标准曲线,计算线性方程、线性范围及相关系数,具体结果见表 5。在空白实际样品中添加 25(OH) D_3 浓度为 5 $\mu\text{g/L}$,按照 2.2.4 前处理方法处理后进样分析,所得特征离子质量色谱如图 3 所示,依据信噪比 $S/N > 10$ 作为定量限,结果表明方法的定量限可达 5 $\mu\text{g/kg}$ 。

3.6 回收率和精密度

采用空白鸡配合饲料样品进行加标回收率及精密度实验,样品分别添加低、中、高 4 个浓度的标准溶液,每个浓度平行测定 5 次,计算平均回收率及相对标准偏差(RSD),测定结果见表 6。25(OH) D_3 各浓度的添加回收率为 81.18%~97.94%,相对标准偏差为 0.50%~9.95%,结果均符合 GB/T 23182-2008 《饲料中兽药及其他化学物质检测试验规程》^[17]相应要求。



注: A:25(OH) D_3 ; B: 25(OH) D_3 -d6。

图 2 标准品典型图谱

Fig.2 Typical SRM chromatogram of standards

表 3 不同提取剂对饲料中 25(OH) D_3 的提取效率

Table 3 Extraction efficiency of 25(OH) D_3 with different extractants

提取剂	添加量 /($\mu\text{g/L}$)	绝对回收率 /%	相对回收率 /%	RSD%
甲醇	200	14.48	101.33	5.49
乙醇	200	13.61	98.55	6.09
正己烷	200	26.29	93.05	11.92
石油醚	200	31.63	96.23	2.47
乙酸乙酯	200	29.32	91.20	9.16
叔丁基甲醚	200	30.37	92.32	2.58

表 4 不同提取次数回收率的比较

Table 4 Recovery rates with different extraction times

提取次数	添加量 /($\mu\text{g/L}$)	绝对回收率 /%	相对回收率 /%	RSD/%
1	200	30.37	92.32	2.58
2	200	26.99	101.49	2.06

表 5 25(OH) D_3 的线性方程、线性范围、相关系数、定量限
Table 5 Liner equations, linear ranges, correlation coefficients (r^2), limits of detection (LOD) of 25(OH) D_3

化合物	线性方程	线性范围 /($\mu\text{g/L}$)	r^2	LOD /($\mu\text{g/kg}$)
25(OH) D_3	$Y=3413.8X+1111$	2~500	0.9999	5

注: Y: 峰面积; X: 浓度($\mu\text{g/L}$)。

表 6 饲料中 25(OH) D_3 的加标回收率及相对标准偏差($n=5$)
Table 6 Recovery rate and RSD of 25(OH) D_3 in feed ($n=5$)

化合物	添加浓度/($\mu\text{g/L}$)	相对回收率%	RSD%
25(OH) D_3	5	97.94	9.95
	10	90.11	1.84
	50	81.18	1.11
	200	90.59	0.50

3.7 专属性

常见的脂溶性维生素有维生素 A、维生素 D、维生素 E, 本实验通过向空白饲料样品中添加一定浓度的维生素 A、维生素 D 和维生素 E 标准品考察专属性。实验准备 3 份空白饲料, 第 1 份作为空白对照, 第 2 份中添加一定浓度的维生素 A、维生素 D 和维生素 E 标准品, 第 3 份中添

加一定浓度的维生素 A, 维生素 D, 维生素 E 和 25(OH)D₃ 标准品, 按照优化后的前处理条件处理样品, 在优化后的液相和质谱条件下进样, 结果如图 4 所示, 未添加 25(OH)D₃ 标准品的样品未出现目标峰((a)、(b)), 而添加了 25(OH)D₃ 标准品的样品在确定的通道里面有响应(c), 证明本方法具有良好的专属性。

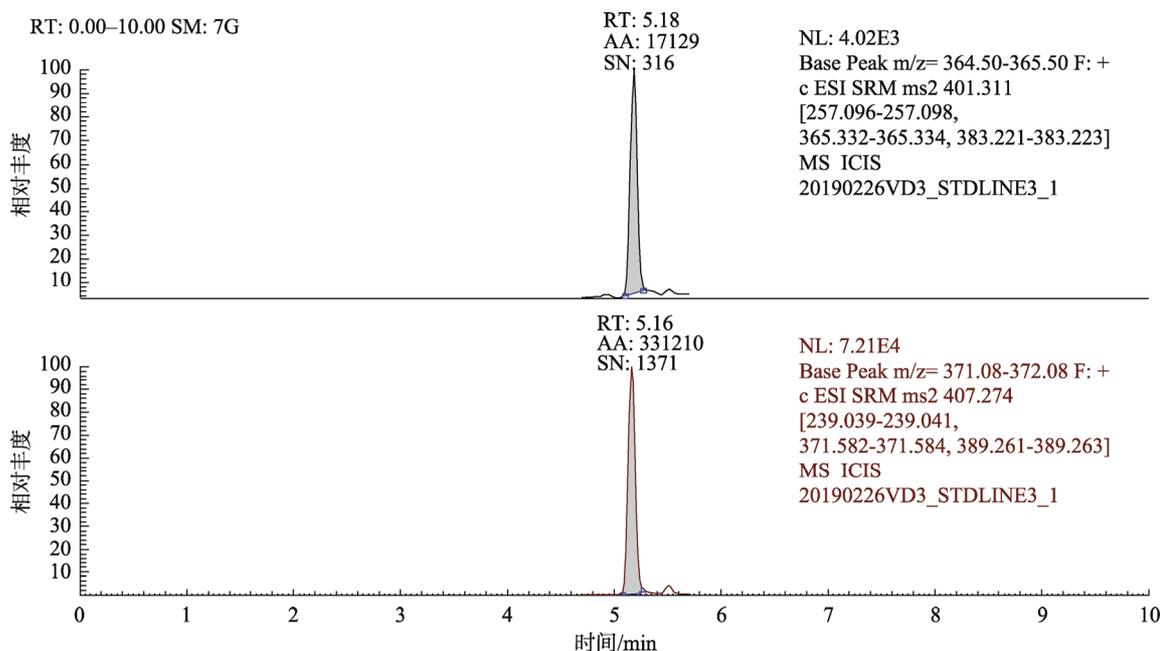
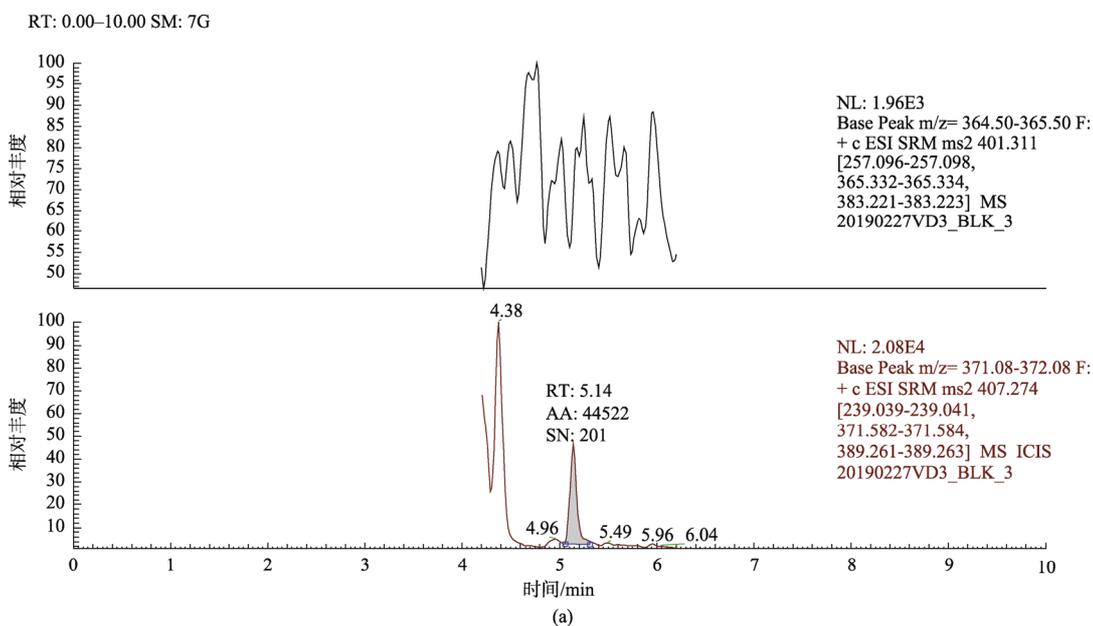
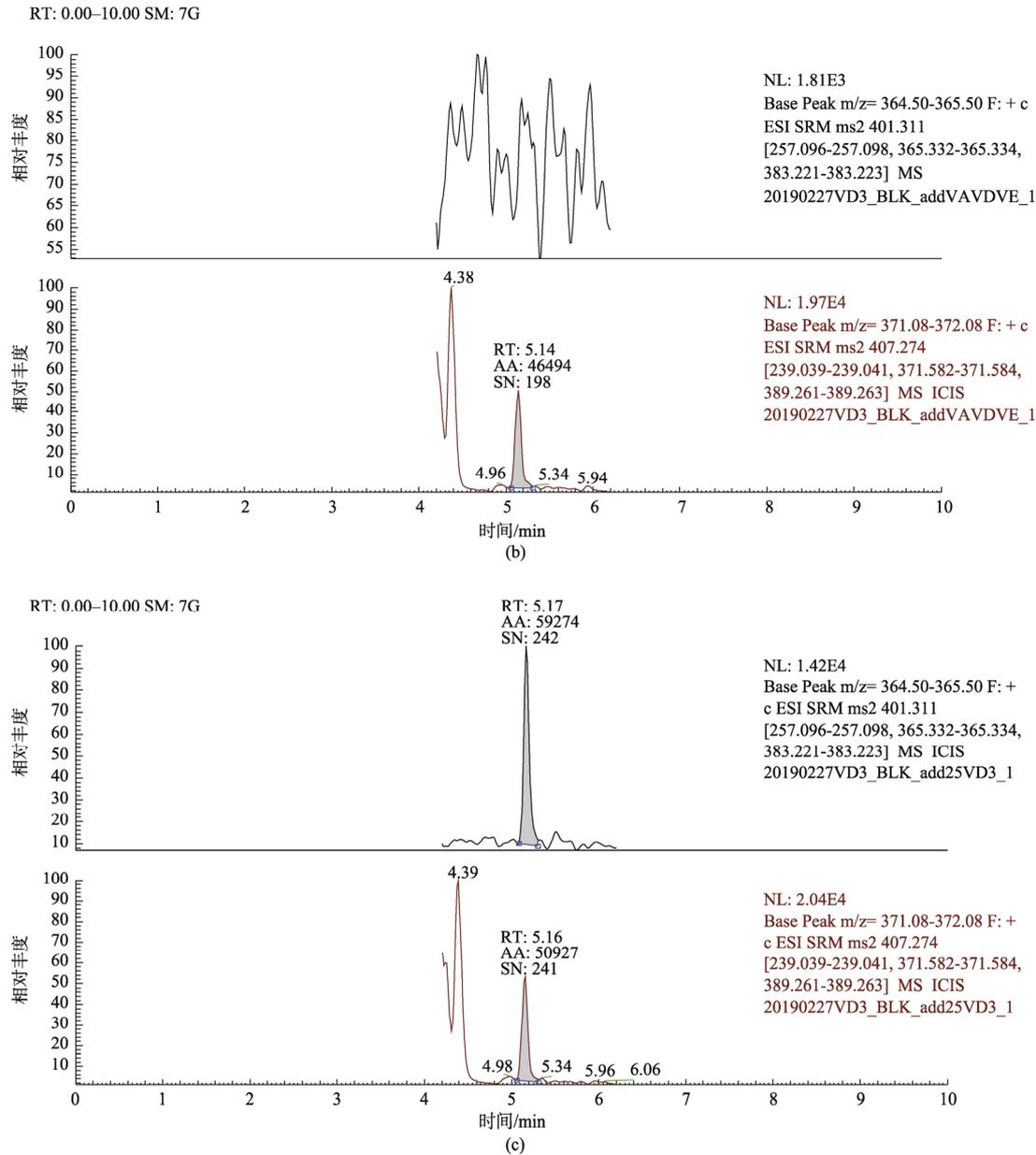


图 3 空白饲料样品添加 5 μg/L
Fig.3 Blank feed added with 5 μg/L



注: (a)空白饲料; (b)添加维生素 A、维生素 D 和维生素 E; (c)添加 25(OH)D₃。

图 4 空白饲料中添加不同维生素实验特征离子质量色谱图
Fig.4 Typical SRM chromatogram of vitamin added in blank feed



注: (a)空白饲料; (b)添加维生素 A、维生素 D 和维生素 E; (c)添加 25(OH)D₃。

续图 4 空白饲料中添加不同维生素实验特征离子质量色谱图

Fig.4 Typical SRM chromatogram of vitamin added in blank feed

3.8 实际样品检测

在市场上购买到的不同厂家的 5 类鸡配合饲料作为本实验实际样品, 用建立好的实验方法对其进行检测, 测定结果如表 7 所示, 实际样品中 25(OH)D₃ 的浓度范围为: 7.00~46.05 μg/kg, 其中 5 号样品图谱见图 5。

4 结论

本文建立了鸡配合饲料中 25(OH)D₃ 的 LC-MSMS 检测分析方法, 能有效准确测定鸡配合饲料中 25(OH)D₃ 含量, 本方法具有良好的准确度与精密度, 能较好应用到实

际饲料样品中 25(OH)D₃ 检测中去, 填补了国内鸡配合饲料中 25(OH)D₃ 检测的空白。

表 7 实际样品测定结果
Table 7 Determination of actual samples

编号	实测值 /(μg/kg)	添加量 /(μg/L)	相对回收率/%	RSD%
1	24.51	50	99.11	0.77
2	23.96	50	94.08	0.88
3	28.88	50	90.03	8.12
4	7.00	50	92.20	0.30
5	46.05	50	73.72	0.52

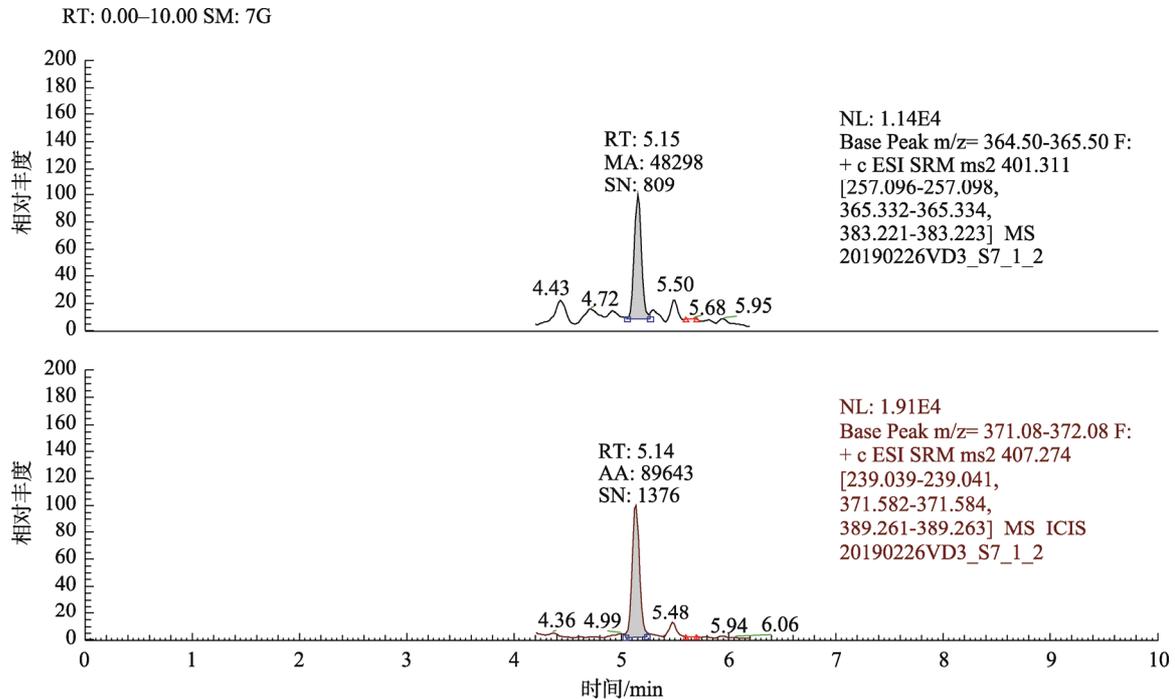


图 5 5 号样品实验特征离子质量色谱图
Fig.5 Typical SRM chromatogram of sample No. 5

参考文献

- [1] 林华, 许蓉蓉, 闭秋华, 等. 高效液相色谱法测定鱼油软胶囊中维生素 D₃ 含量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(12): 3177-3182.
Lin H, Xu RR, Bi QH, *et al.* Evaluation of uncertainty in determination of vitamin d₃ in fish oil soft capsules by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(12): 3177-3182.
- [2] 温倩, 吕林, 张丽阳, 等. 饲料添加不同水平维生素 D₃ 对肉仔鸡生长性能和骨磷代谢利用的影响[J]. 动物营养学报, 2017, 29(9): 3099-3108.
Wen Q, Lv L, Zhang LY, *et al.* Effects of adding different concentrate vitamin D₃ to dietary on growth performance and bone phosphorus metabolism in broilers [J]. Chin J Anim Nutr, 2017, 29(9): 3099-3108.
- [3] 孟德云. 猪佝偻病的病因、临床症状、诊断和防治措施[J]. 现代畜牧科技, 2017, (8): 136.
Meng DY. Etiology, clinical symptoms, diagnosis and treatment of rickets in pigs [J]. Mod Anim Husb Sci Technol, 2017, (8): 136.
- [4] 刘玉玲, 姜成君, 龙凌云, 等. 高效液相色谱法测定保健食品中维生素 D₃ 的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(5): 1622-1628.
Liu YL, Jiang CJ, Long LY, *et al.* Determination of vitamin D₃ in health food by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(5): 1622-1628.
- [5] Cashman KD, Seamans KM, Lucey, *et al.* Relative effectiveness of oral 25-hydroxyvitamin D₃ and vitamin D₃ in raising wintertime serum 25-hydroxyvitamin D in older adults [J]. Am J Clin Nutr, 2012, 95: 1350-1356.
- [6] Koreleski J, Swiatkiewicz S. Performance and tibia bones quality in broilers fed diet supplemented with particulate limestone and 25-hydroxycholecalciferol [C]. Proceedings of the 15th European Symposium on Poultry Nutrition, 2005: 215-218.
- [7] 陈冠华, 张金龙, 王建国, 等. 肉仔鸡对 25-羟基维生素 D₃ 的需要量[J]. 动物营养学报, 2017, 29(7): 2335-2347.
Chen GH, Zhang JL, Wang JG, *et al.* Requirement of 25-hydroxyvitamin D₃ for broilers [J]. Chin J Anim Nutr, 2017, 29(7): 2335-2347.
- [8] 杨德智, 魏时来. 25-羟基维生素 D₃ 与植酸酶对艾维茵肉仔鸡胫骨发育和血清、肝脏生化指标的影响[J]. 畜牧兽医杂志, 2017, 36(1): 1-5.
Yang DZ, Wei SL. Effects of 25-hydroxyvitamin D₃ and phytase on tibial development and serum and liver biochemical indexes in Avian broilers [J]. J Anim Sci Vet Med, 2017, 36(1): 1-5.
- [9] Coffey JD, Hines EA, Starkey JD, *et al.* Feeding 25-hydroxycholecalciferol improves gilt reproductive performance and fetal vitamin D status [J]. J Anim Sci, 2012, 90: 3783-3788.
- [10] Dersjant-Li Y, Awati A, Schulze H, *et al.* Phytase in non-ruminant animal nutrition: A critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors [J]. J Sci Food Agric, 2015, 95: 878-896.
- [11] EFSA (2005) Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on a request from the Commission on the evaluation of safety and efficacy of "Hy•D" (calcifediol), based on 25-hydroxycholecalciferol/25-hydroxy-pre-cholecalciferol, as feed additive in accordance with council directive 70/524/EEC. EFSA J 224, 1-35 [Z].
- [12] GB 9840-2017 饲料添加剂 维生素 D₃(微粒)[S].
GB 9840-2017 Feed additive-Vitamin D₃ (power form) [S].
- [13] 于伟越, 赵瑞, 刘洪川, 等. 高效液相色谱串联质谱法和电化学发光免疫分析法测定人血清中 25-羟基维生素 D 浓度的相关性研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(23): 2424-2426.
Yu WY, Zhao R, Liu HC, *et al.* Study on the correlation between high

- performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and electrochemiluminescence immunoassay for determination of 25-hydroxyvitamin D in human serum [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2017, 33(23): 2424–2426.
- [14] 韩吉春, 王小臣, 李广林, 等. 液相色谱-串联质谱法检测干血点样本中 25-羟基维生素 D₂ 和 25-羟基维生素 D₃ [J]. *分析化学*, 2017, 45(3): 448–454.
- Han JC, Wang XC, Li GL, *et al.* Detection of 25-hydroxyvitamin D₂ and 25-hydroxyvitamin D₃ in dried blood samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2017, 45(3): 448–454.
- [15] Lin Y, Lee H, Tseng S, *et al.* Quantitation of serum 25(OH)D₂ and 25(OH)D₃ concentrations by liquid chromatography tandem mass spectrometry in patients with diabetes mellitus [J]. *J Food Drug Anal*, 2018, (8): 1–8.
- [16] Karaźniewiczłada M, Glowka A, Komosa A, *et al.* Analysis of retinol, α -tocopherol, 25-hydroxyvitamin D₂ and 25-hydroxyvitamin D₃ in plasma of patients with cardiovascular disease by HPLC-MS/MS method [J]. *Biomed Chromatogr*, 2018, 32(9): e4278.
- [17] GB/T 23182-2008 饲料中兽药及其他化学物检测试验规程[S].
GB/T 23182-2008 Procedure for veterinary drug and other chemicals determination in feeds [S].

(责任编辑: 武英华)

作者简介



王 博, 助理畜牧师, 主要研究方向为兽药残留分析。

E-mail: wangbo1839@sina.com



严 凤, 畜牧师, 主要研究方向为兽药残留分析。

E-mail: yan508@163.com