

衍生化-超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中 维生素 D 和 25-羟基维生素 D

刘 宇, 谢继辉, 章萍萍, 周 迪, 赵维克, 张居舟*

(安徽省食品药品检验研究院, 国家农副加工食品质量检验检测中心, 安徽 合肥 230051)

摘要: 动物源性食品是人体摄入维生素 D 和 25-羟基维生素 D 的重要食物来源。目前我国相关标准限于维生素 D 的含量测定, 使用非衍生化方法进行检测。本研究以 4-苯基-1,2,4-三唑啉-3,5-二酮 (PTAD) 作为衍生试剂, 通过 Diels-Alder 反应, 在维生素 D 和 25-羟基维生素 D 上引入易电离基团, 提高离子化效率, 建立了衍生化-超高效液相色谱-串联质谱法 (UPLC-MS/MS) 同时测定动物源性食品中维生素 D 和 25-羟基维生素 D 的检测方法。本研究对衍生化条件、样品前处理条件、色谱分离条件和质谱检测条件进行了优化。结果表明, 在乙腈溶剂中, 目标化合物与衍生试剂 PTAD 质量比为 1:10 000 的条件下, 衍生反应充分; 衍生反应 1 h 后达到稳定; 相较于 Silica 和 C₁₈ 固相萃取 (SPE) 柱, HLB SPE 柱对目标化合物的回收率更高, 同时可有效降低基质效应的影响; 在水-甲醇流动相体系中添加 5 mmol/L 甲胺, 可显著提升目标化合物的检测灵敏度。样品经过均质, 加入同位素内标, 碱液皂化, 萃取浓缩, 固相萃取柱净化和化学衍生, 在 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 上, 以 0.1% 甲酸-5 mmol/L 甲胺水溶液和 0.1% 甲酸-5 mmol/L 甲胺甲醇溶液作为流动相梯度洗脱。分析物在电喷雾正离子模式 (ESI⁺) 下进行多反应监测 (MRM) 测定, 内标法定量。结果表明, 维生素 D 和 25-羟基维生素 D 在 0.2~50 μg/L 内线性良好, 相关系数为 0.999 5~0.999 9, 方法检出限为 0.018~0.066 μg/kg, 方法定量限为 0.06~0.22 μg/kg, 在 0.20、1.0、5.0 μg/kg 3 个加标水平下, 加标回收率为 92.6%~99.4%, 相对标准偏差为 3.6%~6.2%。该方法灵敏度高, 重复性好, 适用于动物源性食品中维生素 D 和 25-羟基维生素 D 灵敏、准确的定量检测。

关键词: 超高效液相色谱; 串联质谱; 维生素 D; 25-羟基维生素 D; 衍生化反应; 4-苯基-1,2,4-三唑啉-3,5-二酮
中图分类号: O658 **文献标识码:** A

Determination of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D in animal-derived foods by derivatization-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LIU Yu, XIE Jihui, ZHANG Pingping, ZHOU Di, ZHAO Weike, ZHANG Juzhou*

(Anhui Institute for Food and Drug Control, China National Center for Quality Supervision and Test of Agricultural-Avocation Processed Food, Hefei 230051, China)

Abstract: Animal-derived foods are essential sources of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D in the human diet. Currently, the relevant regulatory methods in China are limited to using non-derivatization methods to determine vitamin D content. In this study, 4-phenyl-1,2,4-triazoline-3-5-dione (PTAD) was used as a derivative reagent, and the ionization efficiencies of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D were improved by introducing readily ionizable groups via the Diels-Alder reaction. This method allowed for the simultaneous determination of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D in animal-derived foods using derivatization and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The conditions for derivatization, sample pretreatment, chromatographic separation, and MS detection were optimized. The

收稿日期: 2024-02-05

* 通讯联系人. Tel: (0551) 63356522, E-mail: juzhouzhang@163.com.

基金项目: 安徽省市场监督管理局科技计划项目 (2022MK031); 市场监管总局科技计划项目 (2023MK064).

Foundation item: Science and Technology Planning Project of Anhui Administration for Market Regulation (No. 2022MK031); Science and Technology Planning Project of State Administration for Market Regulation (No. 2023MK064).

results showed that the derivatization reaction was effective in acetonitrile solvent at a target compound to PTAD mass ratio of 1:10 000 and stabilized after 1 h. Compared with Silica and C_{18} solid-phase extraction (SPE) columns, hydrophilic lipophilic balanced (HLB) SPE columns yielded higher recoveries of the target compounds, while simultaneously reducing the matrix effect. The detection sensitivity was significantly improved by adding 5 mmol/L methylamine to the water-methanol mobile phase system. An isotopic internal standard was added to the homogenized samples, which were saponified with alkali solution, extracted and concentrated, purified using a SPE column, derivatized, and separated on a Waters Acquity UPLC BEH C_{18} column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m) with a gradient elution using 0.1% formic acid-5 mmol/L methylamine aqueous solution and 0.1% formic acid-5 mmol/L methylamine of methanol as the mobile phases. The analytes were determined by multiple reaction monitoring (MRM) in positive electrospray ionization mode (ESI^+) and quantified using the internal standard method. The results for both vitamin D and 25-hydroxyvitamin D showed good linearity in the range of 0.2–50 μ g/L, with correlation coefficients of 0.999 5–0.999 9. The limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) were in the range of 0.018–0.066 and 0.06–0.22 μ g/kg, respectively. Recoveries were 92.6%–99.4% at three spiked levels (0.20, 1.0, and 5.0 μ g/kg), and the relative standard deviations (RSDs) were 3.6%–6.2%. This highly sensitive method yields reproducible and accurate results for the quantitative determination of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D in animal-derived foods.

Key words: ultra performance liquid chromatography (UPLC); tandem mass spectrometry (MS/MS); vitamin D; 25-hydroxyvitamin D; derivatization; 4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione (PTAD)

维生素 D 以维生素 D_2 (麦角钙化醇, VD_2) 和维生素 D_3 (胆钙化醇, VD_3) 两种形式存在,都是具有甾体结构的脂溶性维生素。 VD_2 主要由食用菌类或酵母合成,通过紫外线辐射作用将麦角固醇转化为 VD_2 ^[1,2]。人体中 VD_3 主要由 7-脱氢胆固醇通过紫外线辐射转化合成,或者通过摄入动物源性食品获得^[3]。由膳食摄入和皮肤合成两种途径获得的维生素 D 通过血液运输到肝脏,产生以 25-羟基维生素 D_2 (25(OH) D_2) 和 25-羟基维生素 D_3 (25(OH) D_3) 两种形式存在的稳定代谢物。在肾脏中,代谢物被进一步羟基化为稳定性较差的 1,25-二羟基维生素 D,其生物活性达到最高^[4]。维生素 D 的主要生理功能是促进肠道黏膜对钙和磷的吸收。人体中维生素 D 缺乏会影响骨骼健康,引起佝偻病、软骨病和骨质疏松等^[5,6]。近年来的研究发现,维生素 D 还具有

其他生物效应,如调节激素分泌、影响免疫功能、调节细胞增生与分化,其与多种疾病的发生发展密切相关^[7,8]。

维生素 D 与 25-羟基维生素 D 的天然食物来源主要为动物源性食品,例如鱼类、肉类、鸡蛋以及乳制品等^[9]。由于食品基质中维生素 D 及 25-羟基维生素 D 的含量较低,基质干扰比较严重,通常采用碱皂化方法去除油脂等干扰物质,再进行萃取和净化处理^[10–15]。在 GB 5009.296-2023《食品安全国家标准 食品中维生素 D 的测定》^[16]中,维生素 D 的检测方法有正相色谱净化-反相液相色谱法、在线柱切换-反相液相色谱法和液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS),其中液相色谱法中样品前处理过程需要使用正相半制备高效液相色谱或者使用一维液相色谱通过 C_8 柱净化,步骤复杂,灵敏度不高,无法满足

引用本文:刘宇,谢继辉,章萍萍,周迪,赵维克,张居舟. 衍生化-超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中维生素 D 和 25-羟基维生素 D. 色谱,2025,43(3):228–236.

LIU Yu, XIE Jihui, ZHANG Pingping, ZHOU Di, ZHAO Weike, ZHANG Juzhou. Determination of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D in animal-derived foods by derivatization-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Chinese Journal of Chromatography, 2025, 43(3):228–236.

动物源性食品中微量组分的检测要求。在生物医学领域,有关 25-羟基维生素 D 检测方法的研究较多,主要有免疫分析法和 LC-MS/MS^[17-20]。免疫分析法包括放射免疫法、酶联免疫吸附法和化学发光免疫法等^[21,22]。免疫分析法操作相对简单,前处理不需要预纯化,缺点是不能区分不同形式的维生素 D,测定结果为维生素 D 的总量;酶促反应易受温度、时间和抗体状态等因素影响;免疫分析法对基质敏感,容易与其他非目标物质产生交叉反应,特异性较差^[23]。

GB 5009.296-2023 方法限于维生素 D 的含量测定,其中第三法 LC-MS/MS 采用非衍生化方法检测,维生素 D 分子结构中没有质子化位点,较难在溶液中形成质子化的离子,在电喷雾电离模式下的检测灵敏度较低^[16,24,25]。维生素 D 和 25-羟基维生

素 D 均含有共轭双烯结构,可与衍生试剂 4-苯基-1,2,4-三唑啉-3,5-二酮 (PTAD) 发生反应 (图 1)。本实验基于 Diels-Alder 衍生化反应,使目标化合物与 PTAD 形成高相对分子质量、易电离的化合物,在电喷雾正离子模式下容易形成加氢峰 $[M+H]^+$,提高电离效率。衍生物的相对分子质量转移至较高质量范围,从而降低了背景噪声的干扰。

目前,衍生化-液相色谱-串联质谱同时检测动物源性食品中维生素 D 和 25-羟基维生素 D 含量的研究较少^[3,5]。本实验使用 PTAD 作为衍生试剂,建立了一种具有高特异性和灵敏度的衍生化-液相色谱-串联质谱同时测定维生素 D 和 25-羟基维生素 D 的检测方法,为动物源性食品中维生素 D 和 25-羟基维生素 D 的定性定量检测、营养含量分析和监管提供了技术支撑。

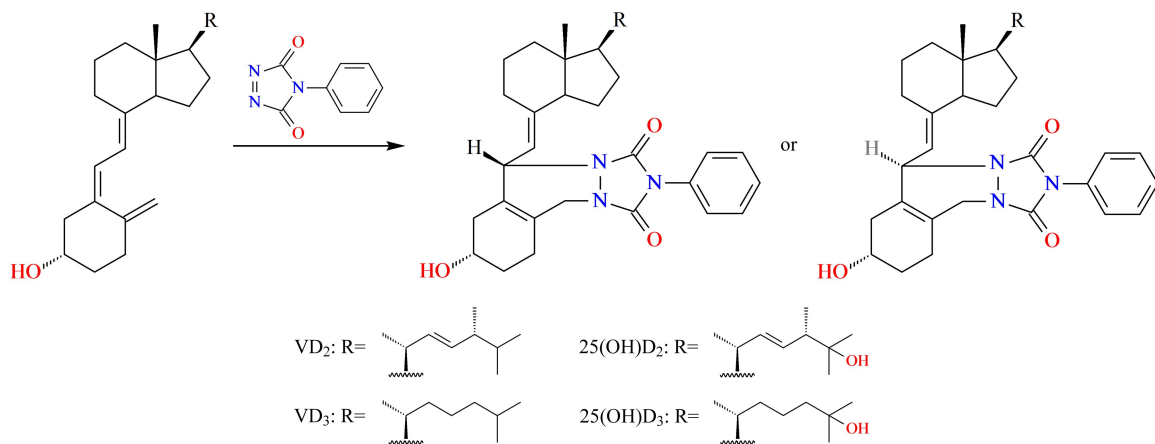


图 1 维生素 D 及 25-羟基维生素 D 与 PTAD 的衍生反应
 Fig. 1 Derivatization of vitamin D (VD) and 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) with 4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione (PTAD)

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

EXPEC 5210 超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪 (杭州谱育科技公司); AutoVap S60 型多样品自动氮吹仪 (美国 ATR 公司); Smart E6 Plus 全自动液液萃取仪 (济南阿尔瓦仪器公司); R-210 旋转蒸发仪 (瑞士步琦公司); SHA-C 水浴恒温振荡器 (常州丹瑞仪器公司); 20 位固相萃取装置 (美国 Agilent 公司); Milli-Q 超纯水制备仪 (美国 Millipore 公司)。

25-羟基维生素 D₂ (CAS 号:21343-40-8)、25-羟基维生素 D₂-d₆ (CAS 号:1262843-46-8)、25-羟基维生素 D₃ (CAS 号:19356-17-3)、25-羟基维生素 D₃-d₆

(CAS 号:78782-98-6)、维生素 D₂ (CAS 号:50-14-6)、维生素 D₂-d₃ (CAS 号:1217448-46-8)、维生素 D₃ (CAS 号:67-97-0)、维生素 D₃-d₃ (CAS 号:80666-48-4) 标准品均购自美国 Sigma 公司 (质量浓度均为 100 mg/L); Oasis HLB (200 mg/6 mL)、Sep-Pak Silica (500 mg/6 mL)、Sep-Pak C₁₈ (500 mg/6 mL) 固相萃取柱均购自美国 Waters 公司; 乙酸乙酯、正己烷、乙腈、甲醇和甲胺 (色谱纯, 德国 Merck 公司); PTAD (纯度 97%, 美国 Sigma 公司); 甲酸 (FA, 纯度 > 99%, 美国 Fisher 公司); 石油醚、氢氧化钾、无水硫酸钠、抗坏血酸、2,6-二叔丁基对甲酚 (BHT) 和无水乙醇均为分析纯。

实验用鱼肉、虾肉、猪肉、羊肉、鸡蛋、鸭血和脱脂乳粉购自合肥市超市。

1.2 溶液的配制

空白基质溶液:取脱脂乳粉 5.0 g,按 1.3.1~1.3.3 节步骤进行前处理(不加入混合内标使用液),用 1.0 mL 甲醇溶解。

标准使用液:取 10 μL 标准品溶液加入 990 μL 空白基质溶液后混匀,取 10 μL 混匀溶液加入 990 μL 空白基质溶液,混匀后制得质量浓度为 0.01 mg/L 的标准使用液。

混合标准使用液:分别取标准品溶液各 100 μL,置于 10 mL 棕色容量瓶中,用甲醇定容,混匀,得到质量浓度为 1.0 mg/L 的混合标准使用液。

混合内标使用液:分别取同位素内标溶液各 100 μL,置于 10 mL 棕色容量瓶中,用甲醇定容,混匀,得到质量浓度为 1.0 mg/L 的混合内标使用液。

标准工作溶液:分别吸取混合标准使用液 0.02、0.05、0.1、0.5、1.0、5.0 mL,置于 10 mL 棕色容量瓶中,各加入混合内标使用液 0.5 mL,用甲醇定容,混匀。分别吸取上述标准系列溶液各 100 μL,置于离心管中,氮吹至干,再分别加入含有 1.0 g/L PTAD 的乙腈溶液 1 mL,配制得到 0.2、0.5、1.0、5.0、10 和 50 μg/L 的系列标准工作溶液。

1.3 样品前处理

1.3.1 皂化

称取 2~5 g(精确至 0.01 g)经均质处理的固体试样或 50 g(精确至 0.01 g)液体样品于 250 mL 平底烧瓶中,固体试样加入 50 mL 温水(40~45 ℃),用甲醇将混合内标使用液稀释至 50 μg/L,吸取 100 μL 加入平底烧瓶中,再加入 1.0 g 抗坏血酸和 0.1 g BHT,混匀。加入 100 mL 无水乙醇,加入 20 mL 氢氧化钾溶液(50%,质量分数),边加边振摇,混匀后于恒温振荡器中皂化,温度(80±2) ℃,时间 30 min,皂化后立即用冷水冷却至室温。

1.3.2 提取

将皂化液用 30 mL 水转入 500 mL 的分液漏斗

中,加入 100 mL 石油醚后使用液液萃取仪振荡萃取 5 min,取下层溶液再次萃取,合并醚层,用水洗至中性。将洗涤后的醚层过无水硫酸钠粉末填充的玻璃层析柱,滤入 250 mL 旋转蒸发瓶中,用 15 mL 石油醚冲洗后合并,水浴中减压旋蒸,待瓶中醚液剩下约 2 mL 时,取下蒸发瓶,氮吹至干。

1.3.3 净化

用甲醇-水(9:1, v/v) 分次将蒸发瓶中的残留物溶解并转移至 5 mL 容量瓶中,定容待净化。将 Oasis HLB 固相萃取柱依次用 6 mL 乙酸乙酯、6 mL 甲醇、6 mL 水进行活化,取待净化样品过柱,用 6 mL 水、6 mL 甲醇-水(7:3, v/v)淋洗,用真空泵抽干固相萃取柱,用乙酸乙酯 6 mL 洗脱,使用氮吹仪吹干。

1.3.4 衍生

加入 1.0 mL 含有 1.0 g/L PTAD 的乙腈溶液,涡旋 10 s,室温下衍生 1 h 后,过 0.22 μm 有机系滤膜后供 LC-MS/MS 分析。

1.4 分析条件

色谱条件:Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相 A 为 0.1% 甲酸-5 mmol/L 甲胺水溶液,流动相 B 为 0.1% 甲酸-5 mmol/L 甲胺甲醇溶液,流速为 0.35 mL/min,柱温 40 ℃,进样量为 10 μL。梯度洗脱:0~1.0 min, 60% B; 1.0~10.0 min, 60% B~100% B; 10.0~15.0 min, 100% B; 15.0~15.5 min, 100% B~60% B; 15.5~18 min, 60% B。

质谱条件:电喷雾电离(ESI)源,正离子模式;干燥气温度:270 ℃;干燥气流量:10 L/min;雾化器压力:345 kPa(50 psi);鞘气温度:400 ℃;鞘气流量:11 L/min;毛细管电压:4 000 V;喷嘴电压:500 V;检测方式:多反应监测(MRM)模式;保留时间、加合离子、定性离子对、定量离子对及碰撞能量等参数见表 1。

表 1 维生素 D、25-羟基维生素 D 及其同位素内标衍生产物的质谱参数

Table 1 MS parameters of the derivatives of vitamin D, 25-hydroxyvitamin D and their isotope internal standards							
Compound	t _R /min	M _r	Adduct ion	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	CEs/eV	Fragment voltage/V
25(OH)D ₂ -PTAD	6.68	588.3	[M+CH ₃ NH ₃] ⁺	619.4	280.25, 298.15 [*]	28, 14	155
25(OH)D ₂ -d ₆ -PTAD	6.66	594.3	[M+CH ₃ NH ₃] ⁺	625.4	280.25, 298.15 [*]	28, 14	155
25(OH)D ₃ -PTAD	6.57	576.3	[M+CH ₃ NH ₃] ⁺	607.4	280.25, 298.15 [*]	28, 10	125
25(OH)D ₃ -d ₆ -PTAD	6.55	582.3	[M+CH ₃ NH ₃] ⁺	613.4	280.25, 298.15 [*]	28, 10	125
VD ₂ -PTAD	8.93	572.3	[M+CH ₃ NH ₃] ⁺	603.4	280.15, 298.15 [*]	16, 17	155
VD ₂ -d ₃ -PTAD	8.91	575.3	[M+CH ₃ NH ₃] ⁺	606.4	283.15, 301.18 [*]	16, 17	155
VD ₃ -PTAD	8.96	560.3	[M+CH ₃ NH ₃] ⁺	591.4	280.15, 298.15 [*]	20, 20	155
VD ₃ -d ₃ -PTAD	8.94	563.3	[M+CH ₃ NH ₃] ⁺	594.4	283.15, 301.18 [*]	20, 20	155

M_r: molecular mass of the derivatives; * quantitative ions; CEs: collision energies.

2 结果与讨论

2.1 衍生溶剂及浓度的优化

衍生化反应中,一般要求衍生试剂过量且稳定,与目标化合物反应完全。本研究考察了在不同溶剂环境下,衍生试剂 PTAD 的添加量对维生素 D 及 25-羟基维生素 D 衍生化反应的影响。使用甲醇、乙酸乙酯和乙腈分别配制不同质量浓度的 PTAD 溶液,质量浓度分别为 1.0、5.0、10、50、100 和 1000 mg/L。分别取 1.2 节中 1 mL 标准使用液于不同离心管中,氮吹至干,各加入 1 mL 上述不同质量浓度的 PTAD 溶液,涡旋 10 s,室温下反应 1 h,进行 LC-MS/MS 分析。通过衍生产物峰面积分析目标化合物衍生反应的转化率,结果见图 2。结果表明,在甲

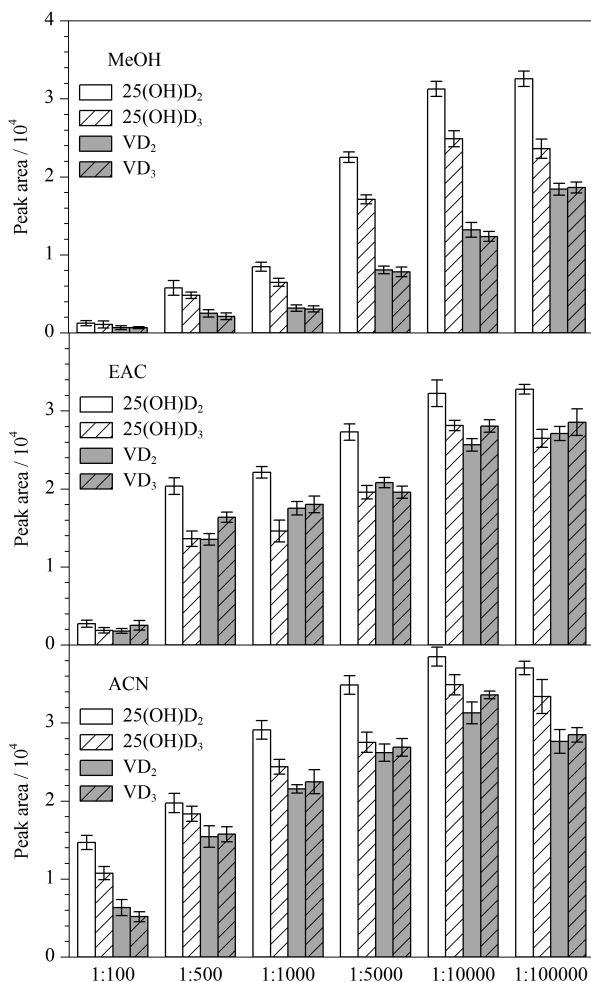


图 2 不同溶剂中维生素 D 及 25-羟基维生素 D 与 PTAD 的质量比对衍生产物峰面积的影响 ($n=3$)

Fig. 2 Effects of the mass ratios of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D to PTAD on the peak areas of the derivative products in different solvents ($n=3$)

EAC: ethyl acetate.

醇溶剂中,衍生产物得率最低。在乙酸乙酯和乙腈溶剂中,当目标化合物与衍生试剂 PTAD 质量比为 1:10 000 时,衍生反应最充分。在 PTAD 质量浓度较低情况下,相较于其他溶剂,乙腈溶剂中衍生化产物得率最高。因此本试验选择乙腈为反应溶剂,目标化合物与衍生试剂 PTAD 质量比为 1:10 000,此条件下衍生反应充分。

2.2 衍生时间的优化

分别取 1 mL 标准使用液于不同离心管中,氮吹至干,各加入 1 mL 质量浓度为 100 mg/L 的 PTAD 乙腈溶液,涡旋 10 s,室温下反应,在不同时间点进行 LC-MS/MS 分析,结果见图 3。结果表明,衍生反应在 1 h 时达到稳定状态,衍生产物在 24 h 内保持稳定。

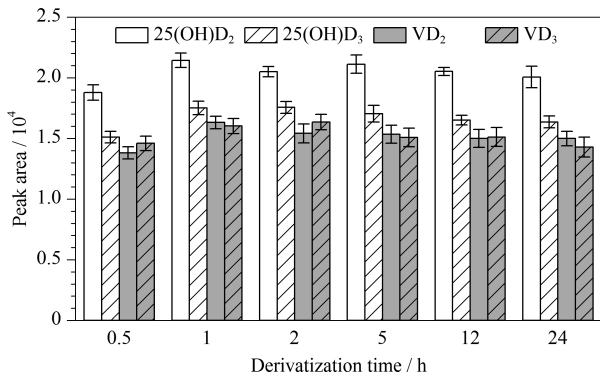


图 3 维生素 D 及 25-羟基维生素 D 与 PTAD 衍生时间对衍生产物峰面积的影响 ($n=3$)

Fig. 3 Effects of the derivative time of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D with PTAD on the peak areas of the derivative products ($n=3$)

2.3 固相萃取条件的优化

本研究比较了 HLB、Silica 和 C₁₈ 固相萃取柱对维生素 D 及 25-羟基维生素 D 的回收率。分别配制含 10 ng 目标化合物的混合标准溶液,氮吹至干,溶解后过不同 SPE 柱。处理过程如下,HLB SPE 柱:甲醇-水(9:1, v/v)溶解,过预先活化好的 HLB 柱,依次用 6 mL 水、6 mL 甲醇-水(7:3, v/v)淋洗,6 mL 乙酸乙酯洗脱;Silica SPE 柱:正己烷溶解,过预先活化好的 Silica 柱,用 6 mL 乙酸乙酯-正己烷溶液(5:95, v/v)淋洗,6 mL 乙酸乙酯洗脱;C₁₈ SPE 柱:甲醇-水(9:1, v/v)溶解,过预先活化好的 C₁₈ 柱,6 mL 甲醇-水(7:3, v/v)淋洗,6 mL 甲醇洗脱。分别收集洗脱液,氮吹至干,加入 1.0 mL 含有 1.0 g/L PTAD 的乙腈溶液,经 0.22 μm 滤膜过滤后,LC-MS/MS 分析。通过与混合标准溶液比较,采用

不同固相萃取柱时的回收率如图 4 所示。结果表明,C₁₈ SPE 柱对 25-羟基维生素 D 回收率最低。相较于 Silica SPE 柱,HLB SPE 柱对目标化合物具有更高的回收率,回收率范围为 74.8%~92.7%。同时为避免 Silica SPE 柱使用过多有机试剂,本实验选择 HLB SPE 柱作为净化材料。

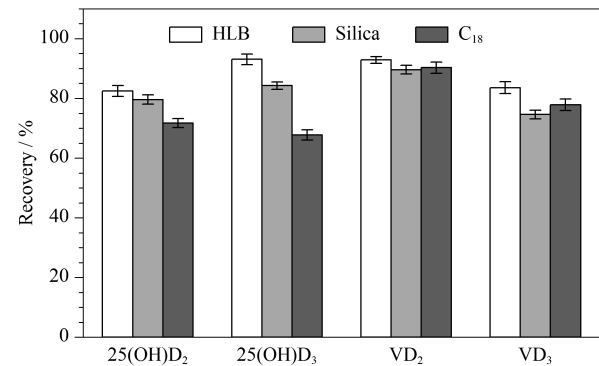


图 4 不同固相萃取柱对维生素 D 和 25-羟基维生素 D 回收率的影响 (n=3)

Fig. 4 Effect of different SPE columns on the recoveries of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D (n=3)

2.4 流动相的优化

在 GB 5009.296-2023 第三法中,流动相条件为在水-甲醇体系中添加甲酸和甲酸铵进行梯度洗脱^[16]。本研究考察了在衍生条件下,3 种不同流动相体系对目标化合物(质量浓度为 10 μg/L)信噪比(S/N)的影响;同时按照国标方法测定非衍生条件下目标化合物(质量浓度为 10 μg/L)的信噪比。3 种不同流动相体系分别为流动相 1:A 相为 0.05% 甲酸-5 mmol/L 甲酸铵水溶液,B 相为 0.05% 甲酸-5 mmol/L 甲酸铵甲醇溶液;流动相 2:A 相为 0.1% 甲酸水溶液,B 相为 0.1% 甲酸甲醇溶液;流动相 3:A 相为 0.1% 甲酸-5 mmol/L 甲胺水溶液,B 相为 0.1% 甲酸-5 mmol/L 甲胺甲醇溶液。不同流动相对 8 种目标化合物信噪比的影响见表 2。

结果表明,目标化合物衍生化处理后,信噪比均有明显提高,可见衍生化反应后电离效率得到提高,信号响应得到增强。在流动相中添加 5 mmol/L 甲胺,使目标化合物形成甲胺加合离子 [M + CH₃NH₃]⁺,可进一步提升其信噪比。在含有甲胺的流动相条件下,25-羟基维生素 D 的信噪比明显提升。在甲胺环境下,PTAD 与 VD₃ 衍生物的二级质谱图如图 5 所示。本实验选择在水-甲醇体系中添加甲酸和甲胺,流动相为 0.1% 甲酸-5 mmol/L 甲胺水溶液和 0.1% 甲酸-5 mmol/L 甲胺甲醇溶液。

表 2 不同流动相体系对 8 种化合物信噪比的影响 (n=3)

Table 2 Effects of different mobile phase systems on signal to noise ratios of the eight compounds (n=3)

Compound	Non-derivatized/10 ² (GB method *)	Derivatized/10 ²		
		MP1	MP2	MP3
25(OH)D ₂	1.60	4.94	13.09	128.7
25(OH)D ₂ -d ₆	1.85	11.05	40.01	130.1
25(OH)D ₃	2.32	8.08	14.76	64.70
25(OH)D ₃ -d ₆	2.49	5.41	10.34	44.43
VD ₂	1.01	17.39	28.30	60.01
VD ₂ -d ₃	0.46	17.06	21.84	44.29
VD ₃	1.06	27.94	26.82	54.56
VD ₃ -d ₃	0.84	22.63	23.27	60.29

* GB 5009.296-2023 (the third method). MP; mobile phase; MP1: 0.05% formic acid-5 mmol/L ammonium formate in water and 0.05% formic acid-5 mmol/L ammonium formate in methanol; MP2: 0.1% formic acid in water and 0.1% formic acid in methanol; MP3: 0.1% formic acid-5 mmol/L methylamine in water and 0.1% formic acid-5 mmol/L methylamine in methanol.

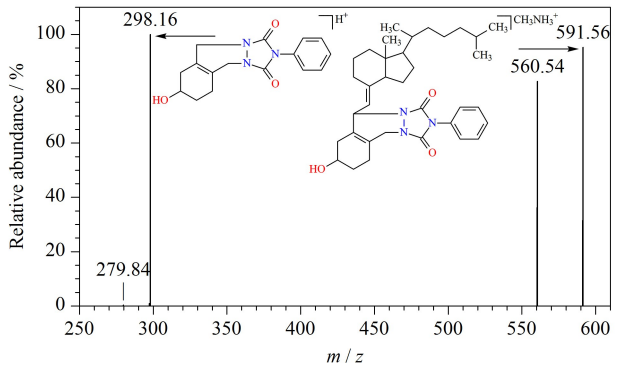


图 5 VD₃ 经 PTAD 衍生后的二级质谱图 (流动相中添加甲胺)

Fig. 5 Secondary mass spectrum of VD₃ derivatized with PTAD (methylamine in mobile phase)

2.5 方法验证

2.5.1 线性关系、检出限和定量限

在优化后的色谱和质谱检测条件下,将 1.2 节配制的系列标准工作溶液进行衍生化反应后,绘制标准曲线。以目标化合物的质量浓度与相应同位素内标的质量浓度比值为横坐标,以目标化合物与相应同位素内标的峰面积比值为纵坐标,确定标准曲线及线性范围内的相关系数。质量浓度为 1.0 μg/L 的维生素 D 及 25-羟基维生素 D 混合标准溶液经 PTAD 衍生后的 MRM 色谱图见图 6a。当取样量为 5.00 g 时,在羊肉样品中添加混合同位素内标,计算样品中维生素 D 及 25-羟基维生素 D 含量,分别以 3 倍和 10 倍信噪比来确定方法的检出限和定量限。羊肉样品中维生素 D 及 25-羟基维生素 D 衍生后的 MRM 色谱图见图 6b。

本方法中维生素 D 和 25-羟基维生素 D 的线性

范围、线性方程、相关系数、内标使用量、检出限和定量限见表 3,同时与 GB 5009. 296-2023 第三法进行了比较。结果表明:维生素 D 和 25-羟基维生素 D 在 0.2~50 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性良好,相关系数(r^2) $\geq 0.999\,5$ 。当固体试样取样量为 5.00 g、定容 1.00 mL 时,维生素 D 及 25-羟基维生素 D 的方法检出限($S/N=3$)为 0.018~0.066 $\mu\text{g/kg}$,方法定量限

($S/N=10$)为 0.06~0.22 $\mu\text{g/kg}$ 。本方法测定维生素 D 及 25-羟基维生素 D 的线性范围宽,较国标方法灵敏度显著提高,同时降低了氘代内标的使用量,有效降低了实验成本。本方法中维生素 D 与 25-羟基维生素 D 的定量限为 0.06~0.22 $\mu\text{g/kg}$,显著低于 GB 5009. 296-2023 第三法中维生素 D 的定量限(5~10 $\mu\text{g/kg}$)。

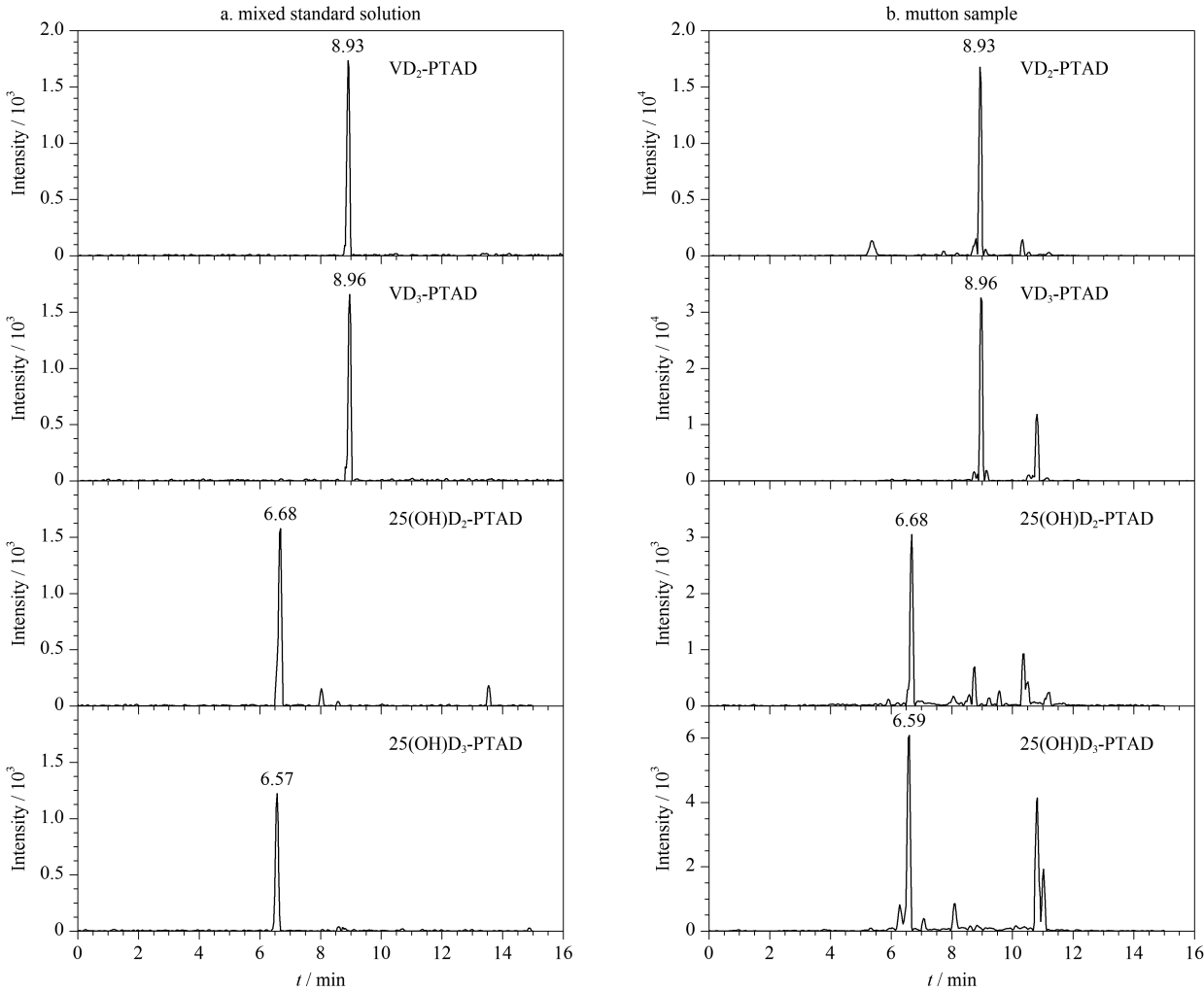


图 6 (a) 维生素 D 和 25-羟基维生素 D 混合标准溶液 (1.0 $\mu\text{g/L}$) 及 (b) 羊肉样品经 PTAD 衍生后的 MRM 色谱图

Fig. 6 MRM chromatograms of (a) vitamin D and 25-hydroxyvitamin D in a mixed standard solution (1.0 $\mu\text{g/L}$) and (b) a mutton sample derivatized with PTAD

表 3 维生素 D 和 25-羟基维生素 D 的线性方程、相关系数、检出限、定量限和内标使用量
Table 3 Linear equations, correlation coefficients (r^2), LODs, LOQs and dosages of internal standards (IS) of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D

Compound	Linear equation	r^2	LODs/($\mu\text{g/kg}$)		LOQs/($\mu\text{g/kg}$)		Dosages of IS/ng	
			This method	GB method *	This method	GB method *	This method	GB method *
25(OH)D ₂	$Y=1.0318X-0.0766$	0.9997	0.027	/	0.09	/	5	/
25(OH)D ₃	$Y=0.9692X-0.0749$	0.9997	0.066	/	0.22	/	5	/
VD ₂	$Y=1.6005X+0.0075$	0.9995	0.024	3	0.08	10	5	200
VD ₃	$Y=0.9460X+0.0108$	0.9999	0.018	1.5	0.06	5	5	100

Linear range; 0.2~50 $\mu\text{g/L}$; Y; peak area ratio of analyte to IS; X; mass concentration ratio of analyte to IS; * GB 5009. 296-2023 (the third method); /; not given.

2.5.2 加标回收率和精密度

以脱脂乳粉为空白样品基质,添加低(0.20 μg/kg)、中(1.0 μg/kg)、高(5.0 μg/kg)3个水平的维生素D和25-羟基维生素D混合标准溶液,按本文所述方法进行提取、净化和测定,每个添加水平重复6次,考察方法的回收率和精密度。结果如表4所示,方法的平均加标回收率为92.6%~99.4%,相对标准偏差为3.6%~6.2%,表明该方法的加标回收率和精密度良好。

表4 维生素D和25-羟基维生素D在脱脂乳粉中的回收率和精密度(n=6)

Table 4 Recoveries and RSDs of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D spiked in nonfat milk powder (n=6)

Compound	0.20 μg/kg		1.0 μg/kg		5.0 μg/kg	
	Rec./%	RSD/%	Rec./%	RSD/%	Rec./%	RSD/%
25(OH)D ₂	93.6	4.6	96.8	5.3	98.4	3.7
25(OH)D ₃	94.1	5.1	97.5	4.9	97.2	5.0
VD ₂	94.4	4.7	98.5	6.2	99.3	4.1
VD ₃	92.6	5.2	99.4	5.8	96.5	3.6

Rec.: recovery.

2.5.3 样品的基质效应

基质效应是由于离子化过程中样品中杂质组分与目标化合物相互竞争所引起的。本研究按照公式ME=(空白基质匹配标准曲线的斜率/纯溶剂标准曲线的斜率-1)×100%测定基质效应。分别测定以脱脂乳粉作为空白样品基质配制标准曲线和乙腈作为纯溶剂配制的标准曲线的斜率,不同净化条件下,维生素D和25-羟基维生素D的基质效应如图7所示。结果表明,25-羟基维生素D在脱脂乳粉样品基质中呈现基质抑制效应,维生素D在样品基质

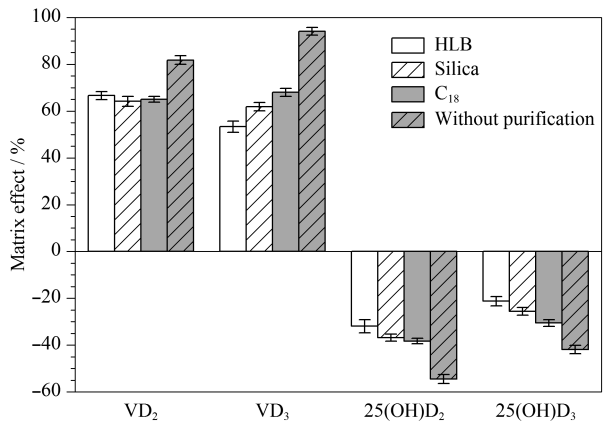


图7 维生素D和25-羟基维生素D在空白样品中的ME(n=3)

Fig. 7 Matrix effects of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D in blank samples (n=3)

中呈现基质增强效应。未经净化处理条件下,维生素D和25-羟基维生素D的ME范围为-54.5%~94.0%。通过固相萃取柱净化后,25-羟基维生素D的ME值为-21.2%~-38.3%,维生素D的ME值为53.3%~68.0%,说明净化处理降低了基质效应的影响。

本实验通过同位素内标法抵消基质效应,通过内标法测定维生素D和25-羟基维生素D在脱脂乳粉中标准曲线的斜率,再次评估绝对基质效应,维生素D和25-羟基维生素D的ME绝对值在1.81%~16.9%范围内,说明其基质效应得到了有效补偿。

2.6 实际样品的检测

应用本研究建立的方法对市售不同动物源性食品中维生素D及25-羟基维生素D的含量进行检测,每种样品取3组平行样检测,进样质量浓度和样品含量见表5。

表5 食品中维生素D及25-羟基维生素D的含量测定(n=3)

Table 5 Determination of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D in foods (n=3)

Sample	Sample injection mass concentrations/(μg/L)				Contents/(μg/kg)			
	25(OH)D ₂	25(OH)D ₃	VD ₂	VD ₃	25(OH)D ₂	25(OH)D ₃	VD ₂	VD ₃
Nonfat milk powder	-	-	-	-	-	-	-	-
Flesh of fish	-	-	6.101	37.65	-	-	1.22	7.53
Flesh of shrimp	-	1.965	-	-	-	0.393	-	-
Pork meat	-	5.851	-	14.65	-	1.17	-	2.93
Mutton	4.155	7.202	6.950	6.650	0.831	1.44	1.39	1.33
Egg yolk	-	34.50	-	40.50	-	13.8	-	16.2
Egg white	-	4.315	-	3.365	-	0.0863	-	0.0673
Duck blood	-	45.50	-	5.103	-	18.2	-	2.04

-: not detected

由表5可以看出,鸡蛋黄中VD₃含量最高,含量为16.2 μg/kg,鸭血中25(OH)D₃含量最高,含量为18.2 μg/kg。

3 结论

本研究使用PTAD作为衍生试剂,对衍生化条

件、样品前处理条件、色谱分离条件和质谱检测条件进行了优化,建立了衍生化-超高效液相色谱-串联质谱同时测定动物源性食品中 4 种 D 族维生素物质的方法。本方法有效降低了样品基质干扰,灵敏度高,定量准确,重复性好,可满足动物源性食品中 D 族维生素物质的测定要求。

参考文献:

- [1] Xu M F, Li M, Shen L Y, et al. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2019, 47(3): 109
徐明芳, 黎明, 沈林燕, 等. 华南理工大学学报(自然科学版), 2019, 47(3): 109
- [2] Li L, Jiang J L. Food Science, 2015, 36(1): 273
李丽, 蒋景龙. 食品科学, 2015, 36(1): 273
- [3] Kasalová E, Aufartová J, Krmová L K, et al. Food Chem, 2015, 171: 177
- [4] Rahimi B A, Khalid A A, Usmani A, et al. Sci Rep, 2024, 14: 27167
- [5] Yin S, Yang Y, Wu L, et al. TrAC-Trends Anal Chem, 2019, 110: 204
- [6] Clarke M W, Black L J, Hart P H, et al. J Steroid Biochem, 2019, 194: 105437
- [7] Shah I, Akhtar M K, Hisaindee S, et al. J Steroid Biochem, 2018: 180
- [8] Wang D C. [MS Dissertation]. Beijing: Peking Union Medical College, 2020
王丹晨. [硕士学位论文]. 北京: 北京协和医学院, 2020
- [9] Li B, Zhao H Y, Tu R Y, et al. Journal of Instrumental Analysis, 2019, 38(4): 495
李兵, 赵海燕, 屠瑞莹, 等. 分析测试学报, 2019, 38(4): 495
- [10] Huang B F, Zhang J S, Wang M L, et al. Journal of Hygiene Research, 2023, 52(2): 272
黄百芬, 张京顺, 王梦莉, 等. 卫生研究, 2023, 52(2): 272
- [11] Strobel N, Buddhadasa S, Adorno P, et al. Food Chem, 2013, 138: 1042
- [12] Abu Kassim N S, Shaw P N, Hewavitharana A K. J Chromatogr A, 2018, 1533: 57
- [13] Mena-Bravo A, Priego-Capote F, Castro L D. J Chromatogr A, 2016, 1451: 50
- [14] Kwak B M, Jeong I S, Lee M S, et al. Food Chem, 2014, 165(15): 569
- [15] Makris K, Sempos C, Cavalier E. Hormones, 2020, 19: 97
- [16] GB 5009.296-2023
- [17] Liu Y Q, Zhang X, Peng Y Y, et al. Analytical Instrumentation, 2021(6): 32
刘艳琴, 张璇, 彭莹莹, 等. 分析仪器, 2021(6): 32
- [18] Li Q, Jin Y E, Wang G Q. Modern Preventive Medicine, 2017, 44(11): 2050
李强, 金玉娥, 汪国权. 现代预防医学, 2017, 44(11): 2050
- [19] Wang X D. [MS Dissertation]. Dalian: Dalian Medical University, 2021
王晓迪. [硕士学位论文]. 大连: 大连医科大学, 2021
- [20] Zhang M, Xie X L, Huang X L, et al. Modern Preventive Medicine, 2019, 46(1): 106
张敏, 解晓露, 黄小兰, 等. 现代预防医学, 2019, 46(1): 106
- [21] Goff C L, Cavalier E, Souberbielle J C, et al. Pract Lab Med, 2015, 2: 1
- [22] Zeng W J, Xie J, Gong X Y, et al. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(11): 3419
曾伟杰, 谢洁, 龚晓云, 等. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(11): 3419
- [23] Tong X P, Huang B F. Preventive Medicine, 2018, 30(3): 278
童小平, 黄百芬. 预防医学, 2018, 30(3): 278
- [24] Yan L J, Li W B, Hong Y C, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2017, 35(4): 427
严丽娟, 李文斌, 洪煜琛, 等. 色谱, 2017, 35(4): 427
- [25] Jumaah F, Larsson S, Essén S, et al. J Chromatogr A, 2016, 1440: 191