

在线固相萃取—二维液相色谱法快速测定婴幼儿谷类辅食中维生素 A、D₃、E 含量及其不确定度评定

龙 强^{1,2} 赵 涛^{1,2} 肖 媚^{1,2} 吴海智^{2,3} 周 凡^{1,2} 戴志勇^{1,2}

(1. 湖南英氏营养食品有限公司, 湖南 长沙 410300; 2. 国家农副产品质量检验检测中心(湖南)婴幼儿辅食联合研发实验室, 湖南 长沙 410300; 3. 湖南省产商品质量检验研究院, 湖南 长沙 410007)

摘要: [目的] 建立一种基于在线固相萃取—二维液相色谱技术, 实现同时快速测定婴幼儿谷类辅食中维生素 A、D₃、E 含量。[方法] 样品皂化液经在线固相萃取净化后, 维生素 A、E 通过一维色谱完成分离测定, 维生素 D₃ 经一维初步分离转移至二维色谱完成分离测定, 均采用外标法定量。[结果] 维生素 A、D₃、E 在相应的浓度范围内线性关系良好, 相关系数 R^2 均大于 0.999; 定量限分别为 1.62, 0.308, 13.9 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 加标回收率为 92.4%~109.2%, 相对标准偏差为 0.36%~3.08%。此外, 维生素 A、D₃、E 的扩展不确定度 ($k=2$) 分别为 7.04%, 17.0%, 5.30%。[结论] 该方法提升了前处理的自动化程度, 简便高效、准确可靠, 可满足婴幼儿谷类辅食中脂溶性维生素的批量检测需要。

关键词: 婴幼儿谷类辅食; 在线固相萃取—二维液相色谱法; 维生素 A; 维生素 D₃; 维生素 E; 测量不确定度

Rapid determination and uncertainty evaluation of vitamins A, D₃, and E content in cereal-based complementary foods for infants and young children by online solid phase extraction-two-dimensional liquid chromatography

LONG Qiang^{1,2} ZHAO Tao^{1,2} XIAO Mei^{1,2} WU Haizhi^{2,3} ZHOU Fan^{1,2} DAI Zhiyong^{1,2}

(1. Hunan Enoulite Nutritional Food Co., Ltd., Changsha, Hunan 410300, China; 2. Infant Complementary Food Joint R&D Lab of National Quality Inspection Center for Agricultural and Sideline Products (Hunan), Changsha, Hunan 410300, China; 3. Hunan Provincial Institute of Product and Goods Quality Inspection, Changsha, Hunan 410007, China)

Abstract: [Objective] To establish a rapid determination method for vitamin A, D₃, and E content in cereal-based complementary foods for infants and young children by online solid phase extraction-two-dimensional liquid chromatography simultaneously. [Methods] Sample saponification solution is purified by online solid-phase extraction. Then, vitamin A and E are separated and detected by the first-dimension chromatography, while vitamin D₃ is preliminarily separated in the first dimension and then transferred to the second-dimension chromatography for further separation and detection, with all quantification achieved by the external standard method. [Results] Vitamin A, D₃, and E exhibit a good linearity in the concentration ranges, with correlation coefficients (R^2) being more than 0.999. The limits of quantification (LOQ) are 1.62, 0.308, and 13.9 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ for vitamins A, D₃, and E, respectively. The spike recoveries range from 92.4% to 109.2%, with relative standard deviations (RSD) between 0.36% and 3.08%. Additionally, the expanded uncertainties ($k=2$) for vitamin A, D₃, and E are 7.04%, 17.0%, and 5.30%, respectively. [Conclusion] With high simplicity, efficiency, accuracy, and reliability, this method enhances the automation degree in sample pretreatment, meeting the needs of batch detection of fat-soluble vitamins in cereal-based

通信作者: 戴志勇 (1978—), 男, 湖南英氏营养食品有限公司高级工程师。E-mail: daizhiyong@engnice.com

收稿日期: 2025-07-04 改回日期: 2025-11-24

引用格式: 龙强, 赵涛, 肖媚, 等. 在线固相萃取—二维液相色谱法快速测定婴幼儿谷类辅食中维生素 A、D₃、E 含量及其不确定度评定[J]. 食品与机械, 2026, 42(5): 68-76.

Citation: LONG Qiang, ZHAO Tao, XIAO Mei, et al. Rapid determination and uncertainty evaluation of vitamins A, D₃, and E content in cereal-based complementary foods for infants and young children by online solid phase extraction-two-dimensional liquid chromatography[J]. Food & Machinery, 2026, 42(5): 68-76.

complementary foods for infants and young children.

Keywords: cereal-based complementary food for infants and young children; online solid phase extraction-two-dimensional liquid chromatography; vitamin A; vitamin D₃; vitamin E; measurement uncertainty

婴幼儿谷类辅食,是以一种或多种谷物为主要原料,添加适量的营养强化剂或其他食品原料加工制成的婴幼儿辅助食品。其主要功能是借助营养强化以填补婴幼儿6个月后乳类营养的不足^[1],是婴幼儿能量和营养素的重要来源^[2]。其中,维生素 A(vitamin A, VA)、维生素 D(vitamin D, VD, 包括 VD₂ 和 VD₃)以及维生素 E(vitamin E, VE, 包括 α -、 β -、 γ -和 δ -维生素 E)是允许添加的重要脂溶性维生素,对婴幼儿生长发育至关重要。在谷类辅食生产加工中,常以维生素 A 醋酸酯、维生素 D₃ 及维生素 E 醋酸酯的形式进行强化添加。但强化的同时应做好质量控制,严格控制其含量。

定量测定是实现良好质量控制的重要方式。随着技术的发展以及现实的需要,定量测定更倾向于采用简便、有效的技术手段。一方面,所用测定方法应尽可能简便、高效。目前,食品中维生素 A、D、E 的测定方法主要有液相色谱法^[3]、液相色谱质谱联用法^[4-5]、二维液相色谱法^[6-10]等。但该类方法要么不能实现维生素 A、D、E 的同时检测分析,要么仍需要耗时耗力的样品前处理,无法满足简便、快速且高效的要求。不过,二维液相色谱的高峰容量、高灵敏度、高分离效率等优势^[11],使其很好地解决了脂溶性维生素同时检测难题。近年来其与在线固相萃取的联用,更是进一步解决了样品前处理耗时耗力的问题。如今,在线固相萃取—二维液相色谱法已逐渐应用于营养补充品、保健食品、配方奶粉以及特医食品等食品^[12-14]中脂溶性维生素的检测。另一方面,所得的检测结果应准确、可靠,具有更高的可信度。测量不确定度,即表征合理地赋予被测量的值的分散性,与测量结果相关联的参数^[15]。其不仅可以增加检测结果的可信度,还可以为检测过程的质量控制提供思路 and 方向^[16]。测量不确定度已在食品质量安全检测领域受到越来越多的重视。

目前,在线固相萃取—二维液相色谱法在婴幼儿谷类辅食中的应用尚未见相关报道。研究拟基于在线固相萃取—二维液相色谱法建立一种婴幼儿谷类辅食中维生素 A、D₃ 及 E 的快速测定方法,以弥补现有方法不能同时检测或前处理耗时耗力的不足。同时,对所建立方法进行测量不确定度评定,为其质量控制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

维生素 A(CAS: 68-26-8; 纯度 $\geq 99.9\%$)、维生素 D₃

(CAS: 67-97-0; 纯度 $\geq 99.8\%$)、 α -维生素 E(CAS: 10191-41-0; 纯度 $\geq 99.8\%$): 上海安谱瑞世标准技术服务有限公司;

甲醇、乙腈和甲基叔丁基醚: 色谱纯, 美国 Tedia 公司;

无水乙醇: 色谱纯, 天津科密欧化学试剂有限公司;

高温淀粉酶: 活力 ≥ 100 U/mg, 北京索莱宝科技有限公司;

氢氧化钾: 分析纯, 西陇科学股份有限公司;

抗坏血酸、二叔丁基对甲酚(BHT): 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器

在线固相萃取—二维液相色谱系统: 1260 Infinity II 型, 美国 Agilent 公司;

紫外可见分光光度计: UV-1780 型, 日本岛津公司;

电子天平: ME204/02 型, 美国 Mettler Toledo 公司;

水浴恒温振荡器: SHZ-A 型, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;

高速离心机: TG16-WS 型, 湖南长沙湘智离心机仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 标准储备溶液配制 分别用无水乙醇直接溶解棕色螺纹口瓶中维生素 A、D₃、E 标准品(50, 100, 500 mg), 全部转移至 100 mL 不同容量瓶中, 定容至刻度, 质量浓度分别为 0.50, 1.00, 5.00 mg/mL。—20℃下避光保存, 维生素 A 标准储备溶液有效期 1 个月、维生素 D₃、E 标准储备溶液有效期 6 个月。临用前参照 GB 5009.82—2016《食品安全国家标准 食品中维生素 A、D、E 的测定》附录 B 校正。

1.2.2 混合标准中间液配制 分别移取上述刚校正好的维生素 A、D₃、E 标准储备溶液 2.00, 0.20, 4.00 mL 于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 得到质量浓度分别为 10.00, 2.00, 200.00 μ g/mL 混合标准中间溶液。

1.2.3 系列混合标准工作溶液配制 准确移取混合标准中间溶液 1.00 mL 于 10 mL 容量瓶中用甲醇定容, 得到质量浓度分别为 1.00, 0.20, 20.00 μ g/mL 混合标准工作溶液。分别吸取 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.50, 5.00 mL 该标准工作液于 10 mL 棕色容量瓶中, 用 50% 乙醇稀释成系列混合标准工作溶液, 维生素 A 质量浓度为 0.010, 0.025, 0.050, 0.100, 0.250, 0.500 μ g/mL; 维生素 D₃ 质量浓度为 2.00, 5.00, 10.00, 20.00, 50.00, 100.00 ng/mL; 维生素 E 质量浓度为 0.20, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00, 10.00 μ g/mL。

1.2.4 样品前处理 称取 5 g 试样,参照 GB 5009.82—2016 第一法皂化。皂化液冷却后,以 50% 乙醇转移并定容至 100 mL。取适量皂化液高速离心 5 min (10 000 r/min),再用 0.22 μm 的针式过滤器过滤,弃去初滤液 5~10 滴后待测。

1.2.5 仪器条件 在线固相萃取净化:PLRP-S 柱(4.6 mm×12.5 mm,15~20 μm),流动相 A、B、C 和 D 分别为水、乙腈、甲醇和甲基叔丁基醚,流速 1.0 mL/min。一维色谱:Poroshell 120 PFP 柱(4.6 mm×100 mm,4 μm),流动相 A、B 分别为水、甲醇,0~6.5 min 时流速 0.5 mL/min,6.5 min 后流速 1.0 mL/min。捕获柱为 Poroshell 120 EC-C₁₈ 柱(4.6 mm×5 mm,4 μm)。二维色谱:ZorbaxEclipse Plus PAH 柱(2.1 mm×100 mm,3.5 μm),流动相 A、B 分别为乙腈、甲醇,流速 0.4 mL/min。各模块梯度洗脱程序如表 1 所示。阀端口切换方式,阀 1:0 min 时,端口位置 1→6,4.5 min 时,端口位置 1→2,5.9 min 时,端口位置 1→6;阀 2:0 min 时,端口位置 1→6,15.0 min 时,端口位置 1→2,15.8 min 时,端口位置 1→6。进样量 100 μL,一维和二维的检测器分别为紫外检测器和二极管阵列检测器,维生素 A、D₃、E 的检测波长分别为 325,264,292 nm。

1.2.6 数学模型建立 试样中维生素 A、D₃、E 以标准曲线外标法定量,其数学模型如式(1)所示。

$$X=\frac{C\times V\times 100}{m}\times f_{\text{rec}},\tag{1}$$

式中:

X——试样中目标分析物的含量,μg/100 g(维生素 E 为 mg/100 g);

C——待测试样溶液的质量浓度,μg/mL(维生素 D₃

为 ng/mL);

V——待测试样溶液的定容体积,mL;

m——试样的称样量,g;

f_{rec}——回收率校正因子。

1.2.7 数据处理 采用 Openlab CDS 软件进行数据采集和分析,导出谱图源数据后以 Origin 2017 软件绘制色谱图。数据统计分析以 WPS Office 2025 表格进行。

2 结果与分析

2.1 在线固相萃取条件选择与优化

在线固相萃取装置与二维液相色谱联用时,样品皂化后便可进样测定。但皂化液碱性强,且辅食样品基质复杂,需选择合适的固相萃取柱。目前,常用的在线固相萃取柱有 C₁₈、PLRP-S 等。其中,PLRP-S 柱对高 pH 具有很好的耐受性,且采用聚苯乙烯—二乙烯苯共聚物填料,在耐受皂化液强碱性的同时能够有效保留目标分析物^[17]。另外,相关研究比较了 C₁₈、PLRP-S 柱的净化效果,发现 PLRP-S 的净化效果更佳^[14]。因此,选用 PLRP-S 作为在线固相萃取柱。在线固相萃取分两步洗脱实现对皂化液的自动化净化和富集。第一步,洗脱除去水溶性成分等干扰杂质;第二步,反向冲洗洗脱目标分析物,并转移进入一维分析色谱柱。在线固相萃取梯度洗脱采用高比例的有机溶剂,能很好地改善易受影响的维生素 E 的响应^[17]。相比低比例的有机溶剂组成,如 20% 甲醇和 80% 乙腈,采用 80% 甲醇和 90% 乙腈完成两步洗脱时维生素 E 响应更高。因此,以 80% 甲醇完成第一步洗脱,90% 乙腈完成第二步反向冲洗,而一维泵采用 30% 甲醇的高水相进行在线稀释^[14],具体梯度见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

SPE 洗脱梯度					1D 洗脱梯度			2D 洗脱梯度		
时间/ min	流动相 A 体 积分数/%	流动相 B 体 积分数/%	流动相 C 体 积分数/%	流动相 D 体 积分数/%	时间/ min	流动相 A 体 积分数/%	流动相 B 体 积分数/%	时间/ min	流动相 A 体 积分数/%	流动相 B 体 积分数/%
0.00	20.0	0.0	80.0	0.0	0.00	70.0	30.0	0.00	0.0	100.0
4.00	20.0	0.0	80.0	0.0	6.50	70.0	30.0	5.00	0.0	100.0
4.10	10.0	90.0	0.0	0.0	7.00	25.0	75.0	6.00	90.0	10.0
8.00	10.0	90.0	0.0	0.0	17.00	10.0	90.0	25.00	90.0	10.0
8.50	0.0	100.0	0.0	0.0	19.00	0.0	100.0			
15.00	0.0	100.0	0.0	0.0	25.00	0.0	100.0			
16.00	0.0	80.0	0.0	10.0						
20.00	0.0	80.0	0.0	10.0						
21.00	0.0	0.0	100.0	0.0						
22.00	0.0	0.0	100.0	0.0						
22.10	20.0	0.0	80.0	0.0						
25.00	20.0	0.0	80.0	0.0						

2.2 二维液相色谱分析条件选择与优化

对维生素A、D₃、E的同时检测分析,需通过第一维实现维生素A、E的分离检测与维生素D₃的净化,第二维实现维生素D₃的分离检测。方法开发的过程始于分离模式的选择,应采用易于实现一维和二维流动相兼容的模式。常见分离模式组合有正相×反相(NP×RP)、反相×反相(RP×RP)等模式。相比NP×RP模式,RP×RP模式为同种分离机制,更易实现流动相兼容,故以RP×RP模式构建中心切割二维液相色谱方法。接下来,RP×RP模式下相应色谱柱类型的选择,成为实现目标分析物良好分离的关键。C₈、C₁₈、PFP柱均可作为一维分离柱,但C₈和C₁₈柱不能有效分离维生素E的一些异构体^[14]。考虑后续分离维生素E相关异构体的需要,一维色谱柱选用PFP柱。二维分离柱的选择,需充分考虑分离维生素D₃的适宜性。维生素D₃属于开环甾体类,其环状结构类似于芳香族类化合物。而现有的Zorbax Eclipse PAH多用于芳香族类化合物的分离,且其可与一维色谱柱PFP形成较好的正交性,故以Zorbax Eclipse PAH作为二维分离柱。根据所选分离模式及色谱柱,建立并优化了一维二维色谱柱的梯度洗脱程序,如表1所示。以建立的仪器方法对维生素A、D₃、E混合标准溶液进行测定,得到如图1~图2所示的一维、二维色谱图。

2.3 方法学验证

2.3.1 方法线性范围和定量限 按1.2.3配制系列混合标

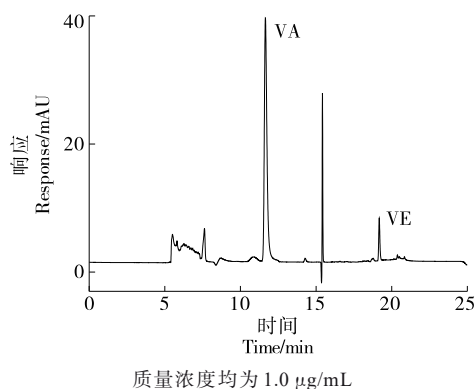


图1 维生素A和E标准物质色谱图

Figure 1 Chromatogram of vitamin A and vitamin E standard

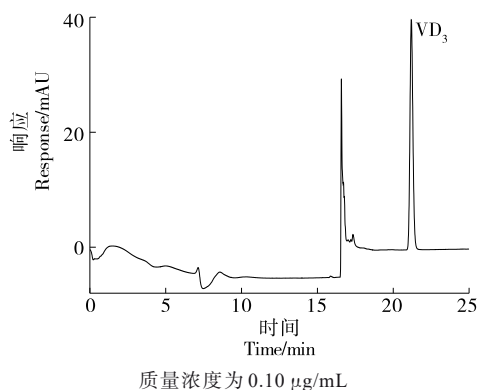


图2 维生素D₃标准物质色谱图

Figure 2 Chromatogram of vitamin D₃ standard

准工作溶液上机测定。以目标分析物峰面积为纵坐标、浓度为横坐标绘制标准曲线,结果见表2。由表2可知,维生素A、D₃、E在一定的浓度范围内线性关系良好,相关系数 R^2 均大于0.999,符合GB 5009.295—2023《食品安全国家标准 化学分析方法验证通则》关于定量方法线性相关系数 ≥ 0.99 的规定。另外,将某一低浓度混合标准溶液加入空白样品中,按1.2.4处理后以 $S/N=10$ 计算各目标分析物的定量限。从表2还可以看出,在线固相萃取—二维液相色谱法测定婴幼儿谷类辅食中维生素A、D₃、E具有较高的检测灵敏度。

2.3.2 方法的回收率和精密度 以空白样品按低、中、高3个水平加入维生素A、D₃、E标准溶液,且每水平独立重复测定6次,结果见表3。由表3可知,维生素A、D₃、E的平均回收率在92.4%~109.2%,相对标准偏差RSD在0.36%~3.08%,符合GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》规定的技术要求。因此,建立的方法具有较好的准确度和精密度,可满足婴幼儿谷类辅食定量检测分析需要。

2.4 测量不确定度评定

2.4.1 样品前处理产生的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{pre})$

$u_{\text{rel}}(\text{pre})$ 由称样引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(m)$ 、定容引入的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(V)$ 以及回收率引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(R)$ 合成,如式(2)所示^[16]。

表2 维生素A、D₃、E线性范围及定量限

Table 2 Linear range and quantification limit of vitamin A, D₃, and E

目标分析物	线性回归方程	相关系数(R^2)	线性范围	定量限/($10^{-2} \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
维生素A	$y=911.476\ 72x-1.502\ 08$	0.999\ 67	0.01~0.50 $\mu\text{g/mL}$	1.62
维生素D ₃	$y=2.298\ 74x-3.266\ 77$	0.999\ 52	2.00~100 ng/mL	0.308
维生素E	$y=37.716\ 21x-2.553\ 75$	0.999\ 28	0.20~10 $\mu\text{g/mL}$	13.9

表 3 维生素 A、D₃、E 的回收率和精密度

Table 3 Recoveries and precision for vitamin A, D₃, and E (n=6)

目标分析物	加标水平/(10 ⁻² μg·g ⁻¹)	测定均值/(10 ⁻² μg·g ⁻¹)	平均回收率/%	RSD/%
维生素	30	27.71	92.4	1.84
	900	885.2	98.4	0.71
	1 800	1 902	105.7	0.53
维生素 E	120	115.8	96.5	3.08
	9 600	9 813	102.2	1.10
	24 000	22 965	95.7	0.91
维生素 D ₃	2	1.886	94.3	1.44
	30	32.19	107.3	0.36
	60	65.51	109.2	0.76

$$u_{\text{rel}}(\text{pre}) = \sqrt{[u_{\text{rel}}(m)]^2 + [u_{\text{rel}}(V)]^2 + [u_{\text{rel}}(R)]^2} = \sqrt{\left(\frac{U_{\text{天平}}}{k \times m}\right)^2 + \left(\frac{U_{\text{容量瓶}}}{k \times V}\right)^2 + \left(\frac{\Delta T \times 7.5 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left[\frac{S(R)}{R \sqrt{n}}\right]^2}, \quad (2)$$

式中:

$U_{\text{天平}}$ ——天平校准证书上的扩展不确定度,g;

k ——包含因子;

m ——称样质量,g;

$U_{\text{容量瓶}}$ ——容量瓶校准证书上的扩展不确定度,mL;

V ——样品最终定容体积,mL;

ΔT ——实验室温度变化范围,℃;

7.5×10^{-4} ——50%乙醇的体积膨胀系数,℃⁻¹;

$S(R)$ ——加标试验回收率的标准偏差,%;

$\bar{R}$ ——加标试验平均回收率,%;

n ——加标试验平行数。

称取 5 g 样品所用电子天平的扩展不确定度 $U_{\text{天平}} = 0.000\ 2\ \text{g}$, 样品定容至 100 mL 所用容量瓶的扩展不确定度 $U_{\text{容量瓶}} = 0.03\ \text{mL}$, 包含因子 $k = 2$ 。校准证书显示, 容量瓶在 23.4℃ 下进行校准, 而实验室温度控制在 $(25 \pm 5)\text{℃}$, 与 23.4℃ 最小温差为 3.4℃, 最大温度差为 6.6℃。故取最大温差值作为温度变化范围, 以覆盖可能的变化

情况。另外, 维生素 A、D₃、E 分别以 30, 2, 120 μg/100 g 水平进行加标试验, 结果见表 4。

由式 (2) 求得: $u_{\text{rel-VA}}(\text{pre}) = 0.007\ 84$, $u_{\text{rel-VD}_3}(\text{pre}) = 0.013\ 2$, $u_{\text{rel-VE}}(\text{pre}) = 0.006\ 51$ 。

2.4.2 标准物质引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(S)$

$u_{\text{rel}}(S)$ 由纯度引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(p)$ 、标准溶液配制过程引起的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(S\text{-pre})$ 以及线性最小二乘法校准引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{LSR})$ 合成, 如式 (3) 所示^[16]。

表 4 加标回收结果

Table 4 Spike recovery results (n=6)

目标分析物	回收率 R/%						$\bar{R}/\%$	$S(R)/\%$
	1	2	3	4	5	6		
维生素 A	92.23	91.19	91.26	90.62	95.20	92.64	92.2	1.6
维生素 D ₃	92.07	94.01	91.78	92.40	96.68	98.93	94.3	2.9
维生素 E	96.56	97.35	97.59	95.29	9.69	94.31	96.5	1.4

$$u_{\text{rel}}(S) = \sqrt{[u_{\text{rel}}(p)]^2 + [u_{\text{rel}}(S\text{-pre})]^2 + [u_{\text{rel}}(\text{LSR})]^2} = \sqrt{\left(\frac{U_p}{k \times p}\right)^2 + \sum_{\eta=1}^n \left[\left(\frac{U_{\eta}}{k \times V_{\eta}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta T \times \beta}{\sqrt{3}}\right)^2 \right] + \left(\frac{U_{\lambda}}{k \times \lambda}\right)^2 + [u_{\text{rel}}(\text{LSR})]^2}, \quad (3)$$

式中:

U_p ——标准物质纯度扩展不确定度,%;

k ——包含因子;

p ——标准物质的纯度,%;

U_{η} ——各级标准溶液配制过程中所用玻璃器具的扩展不确定度,mL;

V_{η} ——配制过程的定容体积或移取体积,mL;

ΔT ——实验室温度变化范围,℃;

β ——配制所用溶剂的体积膨胀系数,℃⁻¹;

U_{λ} ——紫外可见分光光度计校准证书上给出的扩展不确定度,nm;

λ ——目标分析成分的测定波长,nm。

维生素 A、D₃、E 标准物质证书上给出的纯度 p 分别为 99.9%、99.8%、99.7%, 扩展不确定度 U_p 分别为 2.0%、0.4%、0.6%, 各级标准溶液配制过程中所用玻璃器具的扩展不确定度由其校准证书给出, 包含因子 $k = 2$ 。实验室

温度变化范围为 6.6 °C。液体无水乙醇、甲醇的体积膨胀系数分别为 1.08×10^{-3} , $1.20 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ 。紫外可见分光光度计校准证书上给出的扩展不确定度为 0.6 nm, 维生素 A、D₃、E 的测定波长分别为 325, 264, 292 nm。

另外, 线性最小二乘法校准引入的不确定度可由式(4)计算^[16]。

$$u_{\text{rel}}(\text{LSR}) = \frac{S}{a \bar{C}_{\text{试样}}} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{mn} + \frac{(\bar{C}_{\text{试样}} - \bar{C})^2}{S_{xx}}}, \quad (4)$$

式中:

a ——回归拟合所得标准曲线的斜率;

p ——同一试样平行测定的次数;

m ——系列混合标准工作溶液的每一浓度级别重复测定的次数;

n ——系列混合标准工作溶液的浓度级别数;

S_{xx} ——系列混合标准工作溶液浓度的离均差平方和;

S ——残差的标准偏差;

$\bar{C}$ ——试样中目标分析成分的平均质量浓度, $\mu\text{g/mL}$ (维生素 D₃ 为 ng/mL);

$\bar{C}_{\text{试样}}$ ——系列混合标准工作溶液中目标分析成分的平均质量浓度, $\mu\text{g/mL}$ (维生素 D₃ 为 ng/mL)。

对系列混合标准工作溶液的每一浓度级别重复测定 3 次, 并采用(未加权)线性最小二乘法回归拟合获得标准

曲线方程 $A = aC + b$, 结果见表 5。

对同一试样平行测定 6 次, 以上述回归方程计算试样溶液浓度, 结果见表 6。

根据表 5~表 6, 由式(4)求得: $u_{\text{rel-VA}}(\text{LSR}) = 0.019 1$, $u_{\text{rel-VD}_3}(\text{LSR}) = 0.075 5$, $u_{\text{rel-VE}}(\text{LSR}) = 0.012 1$, 再由式(3)求得: $u_{\text{rel-VA}}(S) = 0.030 8$, $u_{\text{rel-VD}_3}(S) = 0.030 8$, $u_{\text{rel-VE}}(S) = 0.025 3$ 。

2.4.3 随机效应产生的相对标准不确定度 $u_{\text{VA}}(\text{RE})$ 按式(5)计算 $u_{\text{VA}}(\text{RE})$ ^[16]。

$$u_{\text{VA}}(\text{RE}) = \frac{1}{x} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}, \quad (5)$$

式中:

$\bar{x}$ ——样品中目标分析物的平行测定结果, $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ (维生素 E 为 $\text{mg}/100 \text{ g}$);

x_i ——每次的测定结果, $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ (维生素 E 为 $\text{mg}/100 \text{ g}$);

n ——平行测定次数。

对样品进行 6 次平行测定, 结果见表 7。

由式(5)求得: $u_{\text{rel-VA}}(\text{RE}) = 0.015 1$, $u_{\text{rel-VD}_3}(\text{RE}) = 0.027 2$, $u_{\text{rel-VE}}(\text{RE}) = 0.005 4$ 。

2.4.4 合成相对标准不确定度与扩展不确定度 合成相对标准不确定度由上述分量合成:

表 5 线性最小二乘法回归拟合的结果

Table 5 Results of linear least-square regression fitting

目标分析物	系列标准溶液质量浓度 $C_i/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	峰面积 A_{ij}				回归方程	由回归方程所得 A_i
		A_{i1}	A_{i2}	A_{i3}	$\bar{A}_{ij}$		
维生素 A	0.011	10.503 9	11.506 0	9.934 8	10.648	$A = 910.357 85C - 1.594 34$	8.420
	0.028	28.063 4	27.816 9	28.426 4	28.102		23.896
	0.057	48.087 5	47.397 0	48.520 2	48.002		50.296
	0.114	98.119 6	97.087 8	98.822 9	98.010		102.186
	0.284	254.961 1	255.283 3	255.905 5	255.383		256.947
	0.568	516.903 3	518.382 8	515.981 5	517.089		515.489
维生素 D ₃	2.00×10^{-3}	2.896 6	2.957 6	3.038 0	2.964	$A = 2.310 3C - 3.887 1$	0.733
	6.00×10^{-3}	9.471 8	9.062 9	9.785 6	9.843		9.975
	1.10×10^{-2}	19.806 0	19.351 5	19.997 8	19.718		21.526
	2.20×10^{-2}	46.511 8	46.520 4	47.169 8	46.734		46.940
	5.50×10^{-2}	123.973 8	122.260 1	121.661 9	122.632		123.179
	1.10×10^{-1}	250.350 4	250.520 5	251.251 6	250.708		250.246
维生素 E	0.197	7.646 0	7.490 3	7.203 3	7.447	$A = 38.028 62C - 3.350 13$	4.142
	0.493	18.290 0	18.711 7	17.591 8	18.198		15.398
	0.986	31.947 1	33.035 9	30.671 8	31.885		34.146
	1.972	66.049 5	67.076 5	64.592 7	65.906		71.642
	4.931	178.096 5	178.590 0	178.329 1	178.339		184.169
	9.862	375.871 1	372.744 1	377.100 3	375.239		371.688

表 6 计算所得试样溶液中维生素 A、D₃、E 质量浓度

Table 6 Mass concentrations of vitamin A, vitamin D₃, and vitamin E calculated in the sample solution

平行	维生素 A			维生素 D ₃			维生素 E		
	测得的峰面积 <i>A</i>	计算所得质量浓度 <i>C</i> /(μg·mL ⁻¹)	平均质量浓度 $\overline{C_{\text{试样}}}$ /(μg·mL ⁻¹)	测得的峰面积 <i>A</i>	计算所得质量浓度 <i>C</i> /(ng·mL ⁻¹)	平均质量浓度 $\overline{C_{\text{试样}}}$ /(ng·mL ⁻¹)	测得的峰面积 <i>A</i>	计算所得质量浓度 <i>C</i> /(μg·mL ⁻¹)	平均质量浓度 $\overline{C_{\text{试样}}}$ /(μg·mL ⁻¹)
1	77.556 6	0.086 94	0.090 9	6.670 3	4.569 71	4.570 1	196.904 0	5.265 88	5.248 7
2	81.322 5	0.091 08		6.423 9	4.463 06		188.723 7	5.050 77	
3	83.381 5	0.093 34		6.404 9	4.454 83		195.725 7	5.234 89	
4	78.140 3	0.087 59		6.900 2	4.669 22		198.027 7	5.295 43	
5	79.812 6	0.089 42		6.635 6	4.554 69		199.056 4	5.322 48	
6	86.681 0	0.096 97		6.991 8	4.708 77		199.073 6	5.322 93	

表 7 样品中维生素 A、D₃、E 的平行测定结果[†]

Table 7 Parallel determination results of vitamin A, D₃, and E in samples (*n*=6)

平行	称样量/ <i>g</i>	维生素 A		维生素 D ₃		维生素 E	
		测定结果/(10 ⁻² μg·g ⁻¹)	平均值/(10 ⁻² μg·g ⁻¹)	测定结果/(10 ⁻² μg·g ⁻¹)	平均值/(10 ⁻² μg·g ⁻¹)	测定结果/(10 ⁻² μg·g ⁻¹)	平均值/(10 ⁻² mg·g ⁻¹)
1	5.004 5	183.1	189	10.70	11.1	10.68	10.8
2	5.006 3	189.6		10.69		10.76	
3	5.004 8	189.6		11.31		10.82	
4	5.006 9	190.0		11.28		10.82	
5	5.007 5	190.1		11.23		10.82	
6	5.008 8	190.6		11.27		10.83	

[†] 测定结果进行了回收率校正。

$$u_{\text{c-rel}}(X)=\sqrt{[u_{\text{rel}}(\text{pre})]^2+[u_{\text{rel}}(S)]^2+[u_{\text{rel}}(\text{RE})]^2}。$$

(6)

取置信水平 95%, 包含因子 *k*=2 时, 相对扩展不确定度:

$$U_{\text{rel}}=k\times u_{\text{c-rel}}(X)。$$

(7)

由式(6)、式(7)求得, $u_{\text{c-rel-VA}}=3.52\%$, $u_{\text{c-rel-VD}_3}=8.51\%$, $u_{\text{c-rel-VE}}=2.67\%$; $U_{\text{rel-VA}}=7.04\%$, $U_{\text{rel-VD}_3}=17.0\%$, $U_{\text{rel-VE}}=5.30\%$ 。

2.4.5 不确定度控制 不确定度体现检测结果质量的高低,也是方法验证的重要补充。上述评定结果表明,各目标分析成分在测定过程中的不确定度保持在合理的可接受范围之内,其分布如图 3 所示。由图 3 可知,标准物质引起的不确定度最大,随机效应次之,样品前处理最小。王霞等^[18]对高效液相色谱法测定维生素 C 的不确定度评定亦表明,标准物质相关不确定度是最主要的不确定度来源,样品前处理的影响较小。因此,对检测过程中不确定度的控制,应重点关注标准物质引起的相关不确定度。

标准物质相关不确定度的分布如图 4 所示。由图 4 可知,其主要来源于标准物质配制过程中的定容以及线

性最小二乘法校准。方法的标准物质配制参照标准采用逐级稀释的方式进行,涉及多次定容过程,其不确定度由多次定容合成。逐级稀释定容次数越多,合成不确定度也相应较大。为了降低其带来的不确定度,可选用合适的储备液或中间液浓度,适当减少逐级稀释过程。另外,温度变化是定容的重要的影响因素,可严格控制环境温度变化,降低定容不确定度。而线性最小二乘法校准引

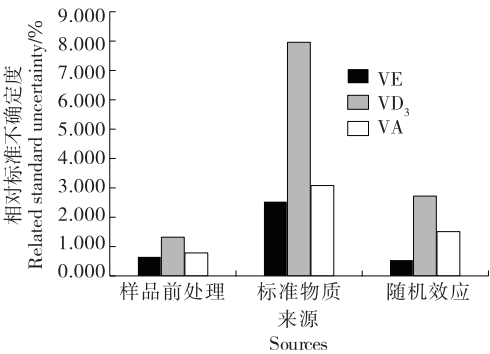


图 3 主要来源中不确定度分量的分布

Figure 3 Uncertainty component distribution of the main sources

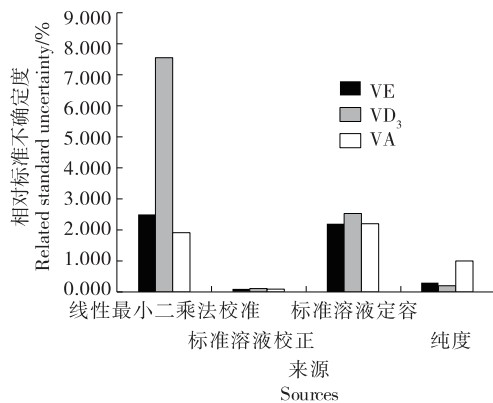


图4 标准物质各分量的分布

Figure 4 Distribution of each uncertainty component of the standards

起的不确定度控制,应确保仪器充分平衡,使得连续两次测定响应的相对标准偏差保持在较小的范围内,以改善校准曲线线性,降低标准物质校准带来的不确定度。特别是维生素 D₃,因其测定范围浓度水平极低,连续两次测定的响应如有较大波动,其校准曲线线性会受较大影响。此外,可选用高纯度且定值不确定度小的标准品,降低标准物质带来的不确定度。

2.5 实际样品测定及与标准方法的比较

采用该方法和标准方法分别对6种不同配方的婴幼儿辅食米粉中维生素 A、D₃、E 的含量进行测定,测定结果见表8。经 *t* 检验,不同方法测定所得到的数据无显著差异,进一步表明试验方法适用于婴幼儿辅食中维生素 A、D₃、E 的测定。

表8 试验方法与标准方法的实际样品测定结果对比

Table 8 Comparison of actual sample results determined by the experimental method and the standard method

样品	目标分析物测定结果					
	维生素 A/(10 ⁻² μg·g ⁻¹)		维生素 D ₃ /(10 ⁻² μg·g ⁻¹)		维生素 E/(10 ⁻² mg·g ⁻¹)	
	试验方法	GB 5009.82—2015 第一法	试验方法	GB 5009.296—2023 第二法	试验方法	GB 5009.82—2015 第一法
多乐能婴幼儿加锌米粉(番茄牛肉)(3阶)	655	665	7.47	8.13	12.8	13.3
婴幼儿加锌米粉(混合谷物)(3阶)	633	668	7.80	7.94	12.5	12.2
婴幼儿益生元加铁米粉(原味)(1阶)	694	654	8.61	10.32	12.3	12.7
婴幼儿加钙米粉(菠菜加铁)(2阶)	663	633	7.31	7.47	13.5	13.6
婴幼儿纯营养加铁米粉(原味)(1阶)	665	689	9.61	9.64	12.6	12.8
婴幼儿加钙米粉(香蕉草莓)(2阶)	675	655	9.20	10.15	14.2	13.1

3 结论

基于在线固相萃取—二维液相色谱建立了一种快速测定婴幼儿谷类辅食中维生素 A、D₃和E 含量的方法。该方法通过在线固相萃取与二维液相色谱的结合,极大简化了样品的前处理过程并实现了维生素 A、D₃、E 的同时分离与检测,具有线性关系良好,灵敏度、准确度和可靠性高等特点,可满足婴幼儿谷类辅食高通量检测的需要。但该方法仅涉及婴幼儿谷类辅食日常生产过程中常规添加的3种脂溶性维生素,未涉及维生素 D₃、β-维生素 E、γ-维生素 E 和 δ-维生素 E 等异构体以及另外一种脂溶性维生素 K。因此,可基于在线固相萃取—二维液相色谱系统,进一步探讨脂溶性维生素 A、D、E、K 及其重要异构体的同时检测分析,特别是借助兼容性强的前处理技术如 QuEChERS 方法克服性质差异较大脂溶性维生素的样品前处理差异。

参考文献

[1] 戴志勇, 张荣彬, 胡伟, 等. 婴幼儿辅助食品分阶喂养体系的现状与前景[J]. 食品与机械, 2024, 40(8): 1-9.

DAI Z Y, ZHANG R B, HU W, et al. Status and prospects of the infants and young children complementary foods step-feeding system[J]. Food & Machinery, 2024, 40(8): 1-9.

[2] 屈鹏峰, 刘爱东. 我国婴幼儿辅助食品标准现状和存在问题及修订建议[J]. 中国食品卫生杂志, 2024, 36(1): 68-72.

QU P F, LIU A D. Present situation, issues, and revision suggestions of China's national food safety standard for infant and young children complementary food[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2024, 36(1): 68-72.

[3] 邓梦雅, 甘旺, 岑干君, 等. 超高效液相色谱法测定食用菌中7种脂溶性维生素[J]. 食品科技, 2019, 44(10): 341-345.

DENG M Y, GAN W, CEN G J, et al. Determination of 7 fat-soluble vitamins in edible fungi by ultra-high performance liquid chromatography[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(10): 341-345.

[4] KWAK B M, JEONG I S, LEE M S, et al. Rapid determination of vitamin D₃ in milk-based infant formulas by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2014, 165: 569-574.

[5] 吴琴, 余家胜, 李瑞, 等. 超高效液相色谱—串联质谱法同时测定复杂基质保健食品中7种脂溶性维生素营养补充剂的含

- 量[J]. 理化检验-化学分册, 2024, 60(2): 187-193.
- WU Q, YU J S, LI R, et al. Simultaneous determination of 7 lipid-soluble vitamin nutritional supplements in health food with complex matrix by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis, 2024, 60(2): 187-193.
- [6] 张艳海, 朱晓艳, 曹国洲, 等. 在线二维柱切换—高效液相色谱法同时测定婴幼儿强化奶粉中维生素 A、D₃ 和 E 的含量[J]. 分析化学, 2013, 41(5): 771-775.
- ZHANG Y H, ZHU X Y, CAO G Z, et al. Simultaneous qualification of vitamins A, D₃ and E in fortified infant formulae by liquid chromatography coupled with fully automated online two-dimensional column switching method[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2013, 41(5): 771-775.
- [7] 张艳海, 其布勒哈斯, 金燕, 等. 在线二维液相色谱法同时测定婴幼儿和成人配方营养品中的维生素 A、D₃ 和 E [J]. 色谱, 2015, 33(3): 291-297.
- ZHANG Y H, QIBULE H S, JIN Y, et al. Simultaneous determination of vitamins A, D₃ and E in infant formula and adult nutritions by online two-dimensional liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2015, 33(3): 291-297.
- [8] HUANG B F, PAN X D, ZHANG J S, et al. Determination of vitamins D₂ and D₃ in edible fungus by reversed-phase two-dimensional liquid chromatography[J]. Journal of Food Quality, 2020, 2 020(1): 1-6.
- [9] 张丽媛, 戚绿叶, 周明昊. 柱切换法液相色谱测定保健食品中的 VA、VD、VE[J]. 食品科学, 2022, 43(4): 225-230.
- ZHANG L Y, QI L Y, ZHOU M H. Determination of vitamins A, D and E in health foods using column-switching liquid chromatography[J]. Food Science, 2022, 43(4): 225-230.
- [10] VAN DEN HURK R S, PURSCH M, STOLL D R, et al. Recent trends in two-dimensional liquid chromatography[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2023, 166: 117116.
- [11] LIANG L, DUAN W, ZHAO C, et al. Recent development of two-dimensional liquid chromatography in food analysis[J]. Food Analytical Methods, 2022, 15: 1 214-1 225.
- [12] 黄燕, 林灵超, 蒋婷婷, 等. 在线固相萃取—二维液相色谱法同时测定儿童配方奶粉中维生素 A、D、E[J]. 食品工业科技, 2023, 44(9): 317-323.
- HUANG Y, LIN L C, JIANG T T, et al. Simultaneous determination of vitamins A, D and E in children's formula milk powder by combining online solid phase extraction and two-dimensional liquid chromatography[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(9): 317-323.
- [13] 毛燕妮, 许晴, 李宏铨, 等. 在线固相萃取/二维液相色谱法同时测定婴幼儿配方奶粉中多种脂溶性维生素[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(4): 268-273.
- MAO Y N, XU Q, LI H Q, et al. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins in infant formula by online solid phase extraction with two-dimensional liquid chromatography[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(4): 268-273.
- [14] 翟洪稳, 马红玉, 马俊美, 等. 在线固相萃取—二维液相色谱法同时测定特殊医学用途配方食品中 VA、VD、VE 的含量[J]. 食品科学, 2023, 44(20): 315-320.
- ZHAI H W, MA H Y, MA J M, et al. Simultaneous determination of vitamins A, D and E in foods for special medical purposes by online solid phase extraction combined with two-dimensional liquid chromatography[J]. Food Science, 2023, 44(20): 315-320.
- [15] MEYER V R. Measurement uncertainty[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1 158: 15-24.
- [16] 翟洪稳, 范素芳, 王娟, 等. 测量不确定度在食品检验中的应用及进展[J]. 食品科学, 2021, 42(5): 314-320.
- ZHAI H W, FAN S F, WANG J, et al. Recent progress in measurement uncertainty and its application in food inspection and detection[J]. Food Science, 2021, 42(5): 314-320.
- [17] ZHANG Y H, LIN Y K, YANG X L, et al. Fast determination of vitamin A, vitamin D and vitamin E in food by online SPE combined with heart-cutting two dimensional liquid chromatography[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 101: 103983.
- [18] 王霞, 张维谊, 韩奕奕, 等. 高效液相色谱法测定水果和蔬菜中维生素 C 含量的不确定度评定[J]. 食品与机械, 2021, 37(5): 73-77.
- WANG X, ZHANG W Y, HAN Y Y, et al. Uncertainty evaluation of the determination of vitamin C in fruits and vegetables by high performance liquid chromatography[J]. Food & Machinery, 2021, 37(5): 73-77.