

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

翟洪稳, 马红玉, 马俊美, 曹梅荣, 王敬, 王娟, 李强*

(河北省食品检验研究院, 河北省食品安全重点实验室, 国家市场监管重点实验室(特殊食品监管技术), 特殊食品安全与健康河北省工程研究中心, 河北 石家庄 050091)

摘要: 采用在线固相萃取结合二维液相色谱技术, 建立一种快速测定特殊医学用途配方食品中VA、VD (VD₂、VD₃) 和VE (α -、 β -、 γ -、 δ -VE) 含量的方法。样品皂化处理后, 经过在线固相萃取小柱自动完成VA、VD、VE的富集和净化, 利用第一维色谱完成VA和4种VE的定量分析, 通过中心切割, 将VD转移至二维色谱系统完成分离和测定。考察不同填料固相萃取柱、上样溶剂及洗脱溶剂比例, 并对二维色谱分离条件进行系统优化。结果表明, 各类维生素在其范围内线性良好, 相关系数 R^2 均大于0.997, 平均回收率在84.4%~109.0%之间, 相对标准偏差为0.34%~6.55% ($n=6$)。该方法自动化程度高, 有效降低检测误差, 检测效率高, 可用于特殊医学用途配方食品中脂溶性维生素的测定。

关键词: 二维液相色谱; 在线固相萃取; 特殊医学用途配方食品; VA; VD; VE

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

ZHAI Hongwen, MA Hongyu, MA Junmei, CAO Meirong, WANG Jing, WANG Juan, LI Qiang*

(Hebei Food Safety Key Laboratory, Key Laboratory of Special Food Supervision Technology for State Market Regulation, Hebei Engineering Research Center for Special Food Safety and Health, Hebei Food Inspection and Research Institute, Shijiazhuang 050091, China)

Abstract: A rapid method for the determination of VA, VD (VD₂, VD₃) and VE (α -、 β -、 γ - and δ -vitamin E) in foods for special medical purposes was established using online solid phase extraction (SPE) combined with two-dimensional liquid chromatography (2D-LC). After saponification, enrichment and purification of VA, VD and VE from samples were accomplished on an online SPE cartridge. VA and four VEs were quantitatively analyzed by the first-dimensional LC, and VD was transferred by heart-cutting to the second-dimensional chromatographic system for separation and detection. SPE columns with different fillings, sample loading solvents, and eluent composition were evaluated, and 2D-LC conditions were systematically optimized. Good linearity was achieved for all vitamins tested with correlation coefficients (R^2) greater than 0.997. The mean recoveries of the developed method were 84.4%–109.0% with relative standard deviation (RSD) of 0.34%–6.55% ($n=6$). This method was highly automated with low detection errors and high detection efficiency, and could be used for the analysis of vitamins in foods for special medical purposes.

Keywords: two-dimensional liquid chromatography; online solid phase extraction; food for special medical purposes; VA; VD; VE

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220923-241

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 20-0315-06

引文格式:

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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220923-241. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-09-23

基金项目: 河北省市场监督管理局科研计划项目 (2021ZD17)

第一作者简介: 翟洪稳 (1991—) (ORCID: 0000-0002-8583-1166), 女, 中级工程师, 硕士, 研究方向为食品安全。

E-mail: anjingzhai@163.com

*通信作者简介: 李强 (1981—) (ORCID: 0000-0001-5744-1403), 男, 正高级工程师, 硕士, 研究方向为食品安全。

E-mail: sjzliq@163.com

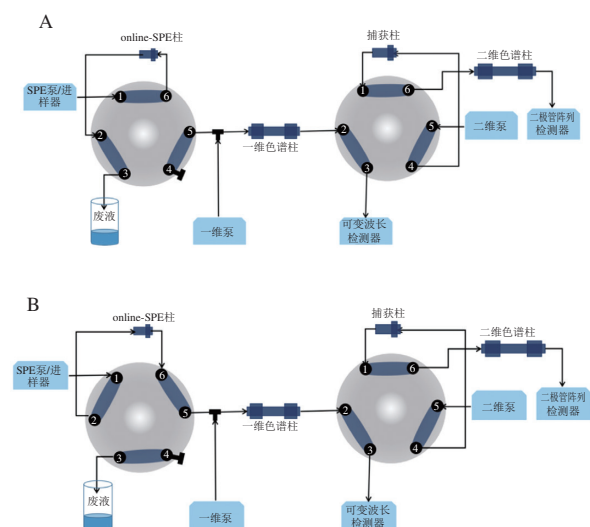
ZHAI Hongwen, MA Hongyu, MA Junmei, et al. Simultaneous determination of vitamins A, D and E in foods for special medical purposes by online solid phase extraction combined with two-dimensional liquid chromatography[J]. Food Science, 2023, 44(20): 315-320. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220923-241. <http://www.spkx.net.cn>

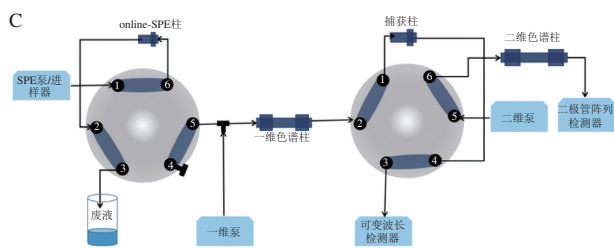
特殊医学用途配方食品（以下简称特医食品）是为了满足各种特定疾病人群对营养素或膳食的特殊需要，专门加工配制而成的配方食品^[1-2]。二十世纪八九十年代，特医食品开始广泛使用于欧美国家临床治疗中，此后，特医食品进入快速发展阶段。至2015年，特医食品在欧美发达国家年消费约为400~500亿美元，年增长速率为4.5%^[3]。特医食品在我国起步晚，近年来，市场占有率增速明显，平均年增长速率超过37%^[4]。GB 25596—2010《特殊医学用途婴幼儿配方食品通则》、GB 29922—2013《特殊医学用途配方食品通则》及GB 29923—2013《特殊医学用途配方食品良好生产规范》规范了不同类别特医食品中营养元素、多种维生素和矿物质等不可缺少的营养成分^[5-8]。其中VA、VD（VD₂和VD₃）和VE（ α -、 β -、 γ -和 δ -VE）是机体维持正常代谢和机能所必需的脂溶性维生素^[7]。VA又叫视黄醇，可促进眼内色素形成，防止夜盲症，同时还可以促进机体正常生长发育、保持代谢平衡和增强免疫力等^[9]；缺乏会引起夜盲症、干眼病、免疫功能异常等各种疾病^[10]。VD是固醇类衍生物，具有调节钙和磷代谢、维持骨骼和牙齿健康、免疫调控和促进机体内多种细胞增殖等功能，其在母乳中主要以VD₃和25-OH VD₃的形式存在^[11]；人体内缺少可导致佝偻病、骨软化症及骨质疏松^[12]。VE又叫生育酚，一类具有生物活性的酚类物质，包含 α -、 β -、 γ -、 δ -生育酚4种同分异构体。VE是最主要的抗氧化剂之一，可降低衰老速率，维持生殖器官正常功能，对机体认知功能和神经发育有重要作用^[13]；缺乏VE会导致新生儿溶血性贫血^[14]。特医食品中需强化VA、VD、VE，但添加量要在规定范围内，不能过高也不能过低。因此，检测特医食品中VA、VD、VE的含量具有重要意义。

为确保维生素在特医食品运输和贮存过程中的稳定性，VA和VE主要是以醋酸酯或棕榈酸酯的状态，采用微胶囊化技术添加到婴幼儿特医食品中；VD₃通常被制成水可分散性的微粒。因此，食品检验检测过程中，VA、VD、VE定量过程复杂，难度较大^[15]。目前，VA、VD、VE的研究主要针对乳粉、奶制品等基质，有液相色谱法^[16-19]、液相色谱-质谱联用法^[20-23]等，但是针对于特医食品基质的研究较少。VA、VD、VE的测定方法需通过高温皂化除去样品中脂肪并且将维生素醋酸酯等水解，利用石油醚液液萃取，旋转蒸发浓缩后进行含量

检测；复杂的前处理过程，容易造成目标物的降解和损失。其中由于VD含量较低，还需利用正向制备色谱进一步净化才能进行检测，不能实现VA、VE和VD的同时测定，实际工作中样品的分析效率低。二维液相色谱是将两个具有不同分离机理的色谱柱串联组合，通过浓缩、捕集或切割后将一个或所有组分从一维柱转移到二维柱进一步分析。与普通液相色谱相比，二维液相色谱能够显著提高峰容量，可以在线联用多个色谱体系，提高色谱分离能力，适用于复杂基质样品和痕量样品的分析，这为复杂体系中VA、VD、VE的同时测定提供了新的思路^[24-25]。相关文献^[26-29]对二维液相色谱法测定乳粉中的VA、VD、VE进行了大量研究，利用一维系统使VA和4种VE异构体得到分离，通过中心切割使VD进入二维色谱柱，进一步分离得到VD₂和VD₃，从而实现7种脂溶性维生素的同时测定。虽然二维液相色谱法在一定程度上提高了分析检测速率，但仍需皂化、有机溶剂萃取、旋蒸浓缩等繁复的前处理过程。

本实验在二维液相色谱法的基础上，增加在线前处理模块，样品经过简单的高温皂化处理后，经固相萃取（solid phase extraction, SPE）泵进样，利用在线固相萃取（online-SPE）柱净化提取，然后进入二维液相色谱系统对VA、VD、VE分离测定（图1）。整个过程前处理过程简单，只需一次进样便可完成7种脂溶性维生素的定量分析，不仅提高了检测效率，而且保证了样品回收率。本方法具有方便、快速、精确等优点，旨在为特医食品中VA、VD、VE的测定提供技术支撑。





A. 切阀步骤1; B. 切阀步骤2; C. 切阀步骤4。

图1 online-SPE-二维液相色谱系统流路示意图

Fig. 1 Flow chart of on-line solid phase extraction coupled with two-dimensional liquid chromatography

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

标准品VA (纯度99.30%)、 α -VE (纯度98%)、 β -VE (纯度98%)、 δ -VE (纯度90.00%)、 γ -VE (纯度 \geq 96%) 美国Sigma公司; 标准品VD₂ (纯度98.30%)、VD₃ (纯度98.84%) 德国Dr. Ehrensorfer公司。

L-抗坏血酸 (纯度 $>$ 99.0%)、2,6-二叔丁基对甲酚 (纯度 $>$ 99.0%) 阿拉丁试剂(上海)有限公司; KOH (优级纯) 天津市科密欧化学试剂有限公司; 甲醇、无水乙醇、异丙醇、乙腈 (均为色谱纯) 美国Thermo Fisher科技有限公司。

1.2 仪器与设备

1260高效液相色谱系统 (包括可变波长检测器、二极管阵列检测器、两个四元泵、一个二元泵 (图1)) 美国Agilent公司; UV-2600紫外-可见分光光度计 日本Shimadzu公司; 电子天平 美国Mettler Toledo公司; 离心机、Milli-Q纯水机 德国Merck公司; 涡旋振荡器 德国Heidolph公司。

1.3 方法

1.3.1 标准品配制

维生素用无水乙醇配成不同质量浓度的标准溶液。VA (0.50 mg/mL), VD₂、VD₃ (均为0.10 mg/mL), α -、 β -、 γ -、 δ -VE (均为1.0 mg/mL) 标准储备液, 于-20 °C冰箱中避光保存。临用前参照GB 5009.82—2016《食品中维生素A、D、E的测定》附录B对储备液进行浓度校正。

取上述校准后标准品溶液适量, 用50%乙醇溶液稀释成系列标准混合工作溶液, 具体质量浓度如表1所示。

表1 VA、VD、VE工作曲线

Table 1 Preparation of standard solutions of VA, VD and VE

目标物	级别					
	1	2	3	4	5	6
VA	0.1	0.2	0.5	1	2	5
α -VE	1	2	5	10	20	50
β -VE	1	2	5	10	20	50
δ -VE	1	2	5	10	20	50
γ -VE	1	2	5	10	20	50
VD ₂	0.001	0.002	0.005	0.01	0.02	0.05
VD ₃	0.001	0.002	0.005	0.01	0.02	0.05

1.3.2 样品前处理

称取5 g (精确至0.01 g) 试样于50 mL聚丙烯管中, 加入10 mL温水 (40 °C), 涡旋混匀, 加入1.0 g抗坏血酸和0.1 g 2,6-二叔丁基对甲酚, 再加入20 mL无水乙醇和10 mL KOH溶液 (质量分数50%), 涡旋振荡1 min, 皂化30 min (80 °C水浴), 过程中不断振摇。皂化后冷却至室温, 用体积分数50%乙醇溶液定容至50 mL。离心10 min (4 °C、10 000 r/min), 取上层清液1 mL, 过0.22 μ m微孔滤膜后, 待测。

1.3.3 色谱条件

online-SPE柱: PLRP-S (4.6 mm \times 12.5 mm, 15~20 μ m); 流动相: A相为水, B相为乙腈, C相为甲醇, D相为异丙醇。一维色谱柱: Poroshell 120 PFP (4.6 mm \times 100 mm, 4.0 μ m); 流动相: A相为水, B相为甲醇; 二维色谱柱: Zorbax Eclipse PAH (2.1 mm \times 100 mm, 3.5 μ m), 流动相: A相为乙腈, B相为甲醇; 进样量: 50 μ L。流动相梯度洗脱见表2。阀切换步骤和位置见表3。高效液相色谱系统流路示意图见图1。

表2 online-SPE-二维液相色谱梯度洗脱程序

Table 2 Gradient elution program for on-line solid phase extraction coupled with 2D-LC

时间/min	SPE洗脱梯度				一维洗脱梯度			二维洗脱梯度		
	水	乙腈	甲醇	异丙醇	时间/min	水	甲醇	时间/min	乙腈	甲醇
0.0	20	0	80	0	0.0	70	30	0.0	0	100
4.0	20	0	80	0	6.5	70	30	5.0	0	100
4.1	0	50	0	50	7.0	25	75	6.0	97	3
21.0	0	50	0	50	17.0	10	90	22.0	97	3
21.1	20	0	80	0	19.0	0	100	23.0	0	100
25.0	20	0	80	0	25.0	0	100	25.0	0	100

表3 阀切换过程和位置

Table 3 Valve switching programs and positions

步骤	阀1	阀2	说明
1	1-6	1-6	SPE泵上样, 并快速去除水溶性基质和强碱
2	1-2	1-6	SPE泵反向冲洗转移目标物至一维色谱柱; 一维泵采用高水相进行在线稀释
3	1-6	1-6	一维系统分离VA和4种VE异构体, 同时净化VD
4	1-6	1-2	将含有VD的部分转移至捕获柱内
5	1-6	1-6	二维系统完成对VD的分析

2 结果与分析

2.1 online-SPE条件的优化

近年来,二维液相色谱测定乳粉中的脂溶性维生素得到充分研究,方法也日趋成熟,但此类方法仍需经过液液萃取,净化,旋蒸浓缩等步骤,样品回收率的稳定性较差^[26-29]。本实验旨在利用SPE代替液液萃取及净化等过程,并利用六通阀切换实现在线上样、转移和平衡等步骤,提高回收率并保证其稳定性^[30-31](图1A、B)。因此,不仅需要选择适宜的SPE柱,上样及转移过程也必须得到关注。

本方法前处理过程参照GB 5009.82—2016皂化步骤,皂化液为强碱性,直接进入仪器分析,分别选取C₁₈和PLRP-S两种online-SPE柱进行考察,比较其净化效果。分别用体积分数60%甲醇、80%甲醇、60%乙醇、80%乙醇溶液将样品从自动进样器引入SPE柱,当80%甲醇作为上样溶剂时,SPE柱对于脂溶性维生素具有较好的富集作用。选用60%、70%、80%甲醇溶液进行洗脱转移,发现70%甲醇溶液具有较好的净化效果。同时比较两种SPE柱发现,PLRP-S柱的净化效果更好,PLRP-S柱采用聚合物填料,具有良好的化学稳定性,对于碱性皂化液耐受性更强^[31]。此外,使用乙腈-异丙醇(50:50, V/V)溶液和甲醇-水(80:20, V/V)溶液对SPE柱进行淋洗,除去残留的无机盐、蛋白质、脂肪酸和其他非皂化物等杂质成分^[32]。综上考虑,选取PLRP-S柱作为online-SPE柱,甲醇-水(80:20, V/V)溶液上样,乙腈-异丙醇(50:50, V/V)溶液和甲醇-水(80:20, V/V)溶液淋洗去除杂质,甲醇-水溶液(70:30, V/V)洗脱转移,后进入一维色谱柱进行分析,具体梯度洗脱和阀切换程序见表2。

2.2 色谱分析条件的优化

二维液相色谱是将两个不同分离效果的色谱柱串联组合,采用中心切割原理,将一维柱上未完全分离的目标物转移到二维色谱柱上进一步净化分析,适用于多干扰物的复杂基质样品,在食品检测中也得到了广泛应用^[24]。特医食品中VD因含量较低,且杂质干扰严重,经一维色谱柱无法得到峰形良好的目标峰,需要二维色谱柱进一步分离测定(图1C)。另外,VE的4种同分异构体中, α -生育酚活性最高,其含量测定方法研究较多^[33-34],近期有文献表明,其余异构体也有重要的生物活性作用^[35],故需建立一种准确分离4种异构体的测定方法。因此,建立色谱分析条件时,需要充分考虑以上因素。

建立二维液相色谱条件时,需要充分考虑到流动相的兼容性,因此不能采用GB 5009.82—2016中先经正相色谱分离净化,再利用反相色谱分析的条件。目前,二维液相色谱均采用反相色谱法,VA和4种VE在特医食

品中含量较高,直接在一维色谱柱上完成测定,但需重点关注同分异构体的有效分离。本实验尝试了C₈、C₁₈、PFP三种色谱柱用于一维液相分离,结果发现C₈、C₁₈柱均不能将 β -、 γ -VE有效分离,而PFP柱因其五氟苯基硅烷键合相的存在,对于 β -、 γ -VE同分异构体的分离效果良好(一维色谱图见图2),因此选用Poroshell 120 PFP柱作为一维色谱柱^[33]。另外,VD在样品中含量低,利用一维色谱系统净化除去部分干扰成分,将其转移至二维系统进行定量分析,此时准确判断切割时间窗口尤为关键,太窄不能保证全部目标物被转移,太宽则会带入过多干扰物质(图1C)。实验过程中,先以高浓度标准品注入色谱系统中,连续进样,准确定位其色谱峰的保留时间,确定阀切换时间,从而保证实际样品中VD被完整地切割至二维分析柱中(二维色谱图见图3)。VD主要包括VD₂和VD₃,均属于开环甾体类,两种化合物结构类似,性质接近,较难实现基线分离。二维系统选择Zorbax Eclipse PAH色谱柱,该色谱柱适用于芳香烃类化合物的分离,研究发现其可以有效地分离VD₂和VD₃,此外该色谱柱与一维色谱柱兼容性良好。

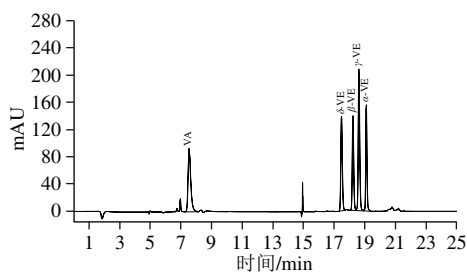


图2 VA和4种VE标准品的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of VA and VE standards

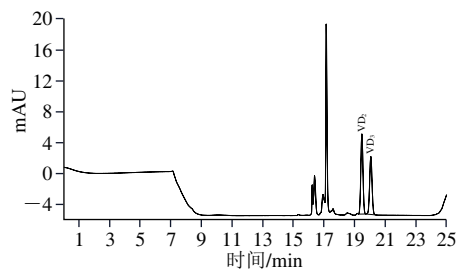


图3 VD标准品的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of VD standard

2.3 方法线性范围、定量限

对上述优化条件进行方法学考察。结果表明,7种维生素在其质量浓度范围内线性关系良好,相关系数均大于0.997。将混合标准溶液加入空白基质中,经前处理后以 $R_{SN}=10$ 计算各组分的定量限,得出VA、VD、VE定量限分别为5.35、0.298 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 和53.5 $\mu\text{g}/100\text{g}$ (表4)。

表4 方法的线性范围、校准曲线及定量限

Table 4 Regression equations, linearity ranges and quantification limits of VA, VD and VE

组分	线性范围/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	标准曲线	相关系数 (R^2)	定量限/ ($\mu\text{g}/100\text{g}$)
VA	0.1~5.0	$y=228.8651x-3.0207$	0.99991	5.35
VD ₂	0.001~0.05	$y=2031.97x+0.2634$	0.99986	0.298
VD ₃	0.001~0.05	$y=1643.04x+0.2141$	0.99984	0.298
α -VE	1.0~50	$y=17.2291x-16.8009$	0.99797	53.5
β -VE	1.0~50	$y=17.9810x-7.3263$	0.99977	53.5
δ -VE	1.0~50	$y=19.0025x-3.1666$	0.99997	53.5
γ -VE	1.0~50	$y=27.6996x-9.0340$	0.99860	53.5

2.4 方法回收率、精密度考察结果

以乳清粉作为空白样品, 加入VA、VD和VE的标准溶液, 分低、中、高3个水平, 每个添加水平重复做6个样品。按1.3.2节皂化后, 利用online-SPE-二维液相色谱法测定方法的回收率和精密度, 结果见表5。7种脂溶性维生素的加标回收率在84.4%~109.0%之间, 相对标准偏差为0.34%~6.55%, 所建方法各项性能参数满足检测需求。

表5 VA、VD和VE的加标回收率和精密度

Table 5 Recoveries and precision for VA, VD and VE

组分	加标量/ ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	测定平均值/ ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	平均回收率/%	相对标准偏差/% ($n=6$)
VA	600	604.7	100.8	2.56
	1200	1122	93.5	2.82
	2400	2301	95.9	2.24
VD ₂	5	4.22	84.4	1.26
	10	9.54	95.4	2.11
	20	19.8	99.0	5.43
VD ₃	5	4.22	84.4	6.55
	10	9.29	92.9	3.56
	20	20.7	103.5	5.36
α -VE	6000	6337	105.6	0.63
	12000	12186	101.5	2.35
	24000	24755	103.1	5.36
β -VE	6000	6376	106.3	0.34
	12000	12260	102.2	5.03
	24000	26153	109.0	1.17
δ -VE	6000	5449	90.8	1.79
	12000	10582	88.2	2.81
	24000	20776	86.6	2.33
γ -VE	6000	5912	98.5	0.85
	12000	11786	98.2	1.38
	24000	25275	105.3	4.46

2.5 实际样品测定及与标准方法比较

为进一步验证本方法对特医食品的适用性, 选择3种类型的配方粉, 利用本方法和二维液相色谱法^[15]分别测定其维生素含量, 测定结果如表6所示。应用t检验对两组测定结果进行比较, 两组数据无显著差异, 表明本方法适用于特医食品中VA、VD和VE的测定。

表6 本方法与二维液相色谱法测定结果对比

Table 6 Comparison of results from this method and conventional 2D-LC

组分	样品序号	乳蛋白部分水解配方粉		无乳糖配方粉		早产低出生体重质量婴儿配方粉	
		本方法	二维液相色谱法	本方法	二维液相色谱法	本方法	二维液相色谱法
VA/ ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	1	670.8	656.3	547.8	532.5	642.5	633.1
	2	657.3	653.1	410.7	408.6	565.2	548.6
	3	482.1	468.5	592.9	583.5	999.2	987.3
VD ₂ / ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	1	7.01	6.78	8.69	8.52	9.34	9.05
	2	9.09	8.85	8.39	8.33	7.51	7.12
	3	6.67	6.53	8.27	8.09	23.3	21.8
α -VE/ ($\text{mg}/100\text{g}$)	1	20.0	20.1	13.8	13.1	10.6	9.87
	2	12.0	12.5	16.6	15.5	13.3	12.2
	3	13.6	12.3	13.3	12.8	33.7	32.0

3 结论

采用online-SPE-中心切割二维液相色谱法同时测定特医食品中7种脂溶性维生素的含量。利用阀切换在线控制SPE柱代替GB 5009.82—2016中提取净化等复杂步骤, 操作简单、自动化程度高, 极大的简化了前处理过程, 此外, 基于二维液相色谱原理, 一次进样即可同时完成脂溶性VA、VD₂、VD₃及 α -、 β -、 γ -、 δ -VE的分离测定, 经方法学验证表明, 本方法回收率高, 灵敏度和精密度良好, 可满足批量样品检测需求。此外, online-SPE为VK、 β -胡萝卜素等其他脂溶性维生素的测定, 提供了新的解决思路。

参考文献:

- [1] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 特殊医学用途配方食品通则: GB 29922—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [2] 李旭升, 蒋鑫炜, 孙建霞, 等. 特殊医学用途配方食品的研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(19): 255-260. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201719041.
- [3] 宁俊, 张茜, 王新明, 等. 国内外特殊医学用途配方食品发展概况[J]. 生物产业技术, 2018(6): 68-74. DOI:CNKI:SUN:SWCY.0.2018-06-012.
- [4] 李雨哲, 肖伟敏, 杨俊, 等. 我国特殊医学用途配方食品配套检验方法标准现状及展望[J]. 中国食品卫生杂志, 2021(5): 610-615.
- [5] 郭美娟, 史国华, 张斌, 等. 国标方法检测特殊医学用途婴儿配方食品中部分B族维生素的基质适用性[J]. 食品科学, 2021, 42(12): 268-274. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200910-134.
- [6] 国家卫生和计划生育委员会. 特殊医学用途婴儿配方食品通则: GB 25596—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [7] 国家卫生和计划生育委员会. 特殊医学用途配方食品良好生产规范: GB 29923—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [8] 张兰天, 王晨元, 张斌, 等. 国内外特殊医学用途配方食品营养强化剂使用标准差异化分析研究进展[J]. 乳业科学与技术, 2020, 43(3): 39-44. DOI:10.15922/j.cnki.jdst.2020.03.008.
- [9] DE H F. New concepts of vitamin D functions[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010, 669: 59-68. DOI:10.1111/j.1749-6632.1992.tb17089.x.
- [10] HAMMERLING U. Retinol as electron carrier in redox signaling, a new frontier in vitamin A research[J]. Hepatobiliary

- Surgery and Nutrition, 2016, 5(1): 15-28. DOI:10.3978/j.issn.2304-3881.2016.01.02.
- [11] LAING E M, LEWIS R D. Frontiers of hormone research: new concepts in vitamin D requirements for children and adolescents: a controversy revisited[M]. Basel: S. Karger AG, 2018: 42-65.
- [12] LANHAM-NEW S A, THOMPSON R L, MORE J, et al. Importance of vitamin D, calcium and exercise to bone health with specific reference to children and adolescents[J]. Nutrition Bulletin, 2010, 32(4): 364-377. DOI:10.1111/j.1467-3010.2007.00670.x.
- [13] MEDICINE I O. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids[M]. Washington (DC): National Academies Press(US), 2000.
- [14] TRABER M G. Vitamin E: necessary nutrient for neural development and cognitive function[J]. Proceedings of the Nutrition Society, 2021, 80(3): 319-326. DOI:10.1017/S0029665121000914.
- [15] 徐慧静, 刘丽兰, 刘莹, 等. 双三元高效液相色谱仪在线二维快速测定食品中维生素A, D, E方法的研究进展[J]. 中国标准化, 2019(18): 184-186. DOI:CNKI:SUN:ZGBZ.0.2019-18-087.
- [16] 贾永娟, 刘杏立, 雒琴, 等. 高效液相色谱荧光及二极管阵列检测器检测血清中维生素A、E的方法学比较[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(1): 4. DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.01.014.
- [17] XUE X P, YOU J M, HE P L. Simultaneous determination of five fat-soluble vitamins in feed by high-performance liquid chromatography following solid-phase extraction[J]. Journal of Chromatographic Science, 2008(4): 345-350. DOI:10.1093/chromsci/46.4.345.
- [18] MORENO P, SALVADÓ V. Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 870(1/2): 207-215. DOI:10.1016/S0021-9673(99)01021-3.
- [19] JEDLICKA A, KLIMES J. Determination of water- and fat-soluble vitamins in different matrices using high-performance liquid chromatography[J]. Cheminform, 2010, 36(42). DOI:10.1002/chin.200542295.
- [20] 全思思. 超高效液相色谱/超临界流体色谱-串联质谱联用技术同时测定婴幼儿配方乳粉中多种维生素的研究[D]. 广州: 广东药学院, 2017.
- [21] 黄百芬, 柯星, 郑菲菲, 等. 固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法同时测定婴幼儿配方食品中维生素D₂和D₃[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(22): 3203-3207. DOI:CNKI:SUN:ZWJZ.0.2014-22-004.
- [22] 张鹏, 朱姜, 周元元, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定保健食品中的维生素A、D、E[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(3): 322-326. DOI:10.13590/j.cjfh.2016.03.010.
- [23] 谢玉珊, 谢守新, 宋阳, 等. 液相色谱-质谱联用法测定乳品中维生素D₃质量浓度[J]. 中国乳品工业, 2015, 43(1): 33-35. DOI:10.3969/j.issn.1001-2230.2015.01.009.
- [24] CACCIOLA, DUGO P, MONDELLO L. Multidimensional liquid chromatography in food analysis[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2017, 96: 116-123. DOI:10.1016/j.trac.2017.06.009.
- [25] BROWN-THOMAS J M, MOUSTAFA A A, WISE S A, et al. Determination of fat-soluble vitamins in oil matrixes by multidimensional high-performance liquid chromatography[J]. Analytical Chemistry, 1988, 60(18): 1929. DOI:10.1021/ac00169a018.
- [26] 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.
- [27] 赵玉富, 刘晓玲, 咸伟玥, 等. 二维液相色谱同时测定婴幼儿配方乳粉中多种脂溶性维生素[J]. 中国乳品工业, 2019, 47(6): 37-40. DOI:10.3969/j.issn.1001-2230.2019.06.009.
- [28] 赵玉富, 咸伟玥. 二维液相色谱法同时测定饲料中维生素A、维生素D₃、维生素E[J]. 饲料博览, 2019(4): 51-54. DOI:10.3969/j.issn.1001-0084.2019.04.013.
- [29] 岑建斌, 区硕俊, 周朗君, 等. 二维液相色谱法同时检测婴幼儿乳粉中维生素A、E与D₃[J]. 中国乳品工业, 2017, 45(2): 43-46. DOI:10.3969/j.issn.1001-2230.2017.02.010.
- [30] FUMES B H, ANDRADE M A, SILVA F M, et al. On-line approaches for the determination of residues and contaminants in complex samples[J]. Journal of Separation Science, 2017, 40(1): 183-202. DOI:10.1002/jssc.201600867.
- [31] BARREIRO J C, LUIZ A L, MACIEL E, et al. Recent approaches for on-line analysis of residues and contaminants in food matrices. A review[J]. Orbis-prague, 2015, 38(10): 1721-1732. DOI:10.1002/jssc.201401285.
- [32] 黄旭, 刘家阳. 固相萃取-高效液相色谱法测定婴幼儿配方粉中维生素A和维生素E的含量[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(1): 38-42. DOI:10.13590/j.cjfh.2018.01.008.
- [33] GREBENSTEIN N, FRANK J. Rapid baseline-separation of all eight tocopherols and tocotrienols by reversed-phase liquid-chromatography with a solid-core pentafluorophenyl column and their sensitive quantification in plasma and liver[J]. Journal of Chromatography A, 2012, 1243: 39-46. DOI:10.1016/j.chroma.2012.04.042.
- [34] 魏帅, 吕宁, 梁成珠, 等. 婴幼儿配方乳粉中维生素A、E检测方法的比较研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(24): 9083-9092. DOI:10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2020.24.002.
- [35] A S C, B W S, A S W, et al. Development of gamma (γ)-tocopherol as a colorectal cancer chemopreventive agent[J]. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2003, 47(3): 249-259. DOI:10.1016/S1040-8428(03)00042-8.