

基于不同基质中维生素 D 含量测定样品制备及分析方法研究进展

张庆, 焦萌, 杨丽娜, 卢大峰, 李存福, 李树英
(青岛双鲸药业股份有限公司, 青岛 266000)

[摘要] 维生素 D 是一种人体必需的脂溶性维生素, 在维持人体内钙的动态平衡方面起着非常重要的作用, 可预防骨质疏松、佝偻病等钙缺乏疾病。维生素 D 过量或缺乏都会对人体健康产生严重威胁, 因此有必要建立监测不同基质(如药品、食品、生物样品等)中维生素 D 浓度的方法。但维生素 D 化学性质不稳定且含维生素 D 的样品基质大多较为复杂, 因此含维生素 D 样品的前处理以及测定具有较大挑战。本文综述了近年来不同基质中维生素 D 含量测定前处理方法和测定方法的研究进展, 据报道目前最常用的前处理方法为液-液萃取、固相萃取和液-液微萃取, 而测定方法主要包括高效液相色谱、质谱、超临界流体色谱等方法, 通过该综述以期对维生素 D 系列制剂的含量测定提供技术支持。

[关键词] 维生素 D; 样品前处理; 分析方法; 含量; 有关物质

[中图分类号] R972.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)08-0826-09

Recent advances in sample preparation and analysis methods for vitamin D in different matrices

ZHANG Qing, JIAO Meng, YANG Li-na, LU Da-feng, LI Cun-fu, LI Shu-ying
(Qingdao Double Whale Pharmaceutical Co., Ltd., Qingdao 266000, China)

[Abstract] Vitamin D is an essential fat-soluble vitamin, which plays a very important role in maintaining the dynamic balance of calcium in human body and can prevent calcium deficiency diseases such as osteoporosis and rickets. Both excess and deficiency of vitamin D pose a threat to human health, so it is necessary to establish methods for monitoring vitamin D concentrations in different matrices (e. g., pharmaceuticals, foods, biological samples, etc.). However, due to the unstable chemical properties of vitamin D and the complex matrix of vitamin D-containing samples, the pre-treatment and determination of vitamin D-containing samples have a great challenge. This paper reviews the research progress of pretreatment and determination of vitamin D in different matrices in recent years. It is reported that the most commonly used pretreatment methods are liquid-liquid extraction, solid-phase extraction and liquid-liquid microextraction, and the determination methods mainly include high performance liquid chromatography, mass spectrometry, supercritical fluid chromatography and other methods. This review is expected to provide technical support for the determination of vitamin D series preparations.

[Key words] vitamin D; sample pretreatment; analysis methods; assay; related substances

维生素 D 作为一种脂溶性维生素, 主要包括维生素 D₂ 和维生素 D₃, 其在调节钙、磷的代谢和促进骨骼生长中起着重要作用。维生素 D₂ 多含于植物性食物中, 维生素 D₃ 可由人体皮肤组织内的 7-脱

氢胆固醇经日光中紫外线照射后转化而成, 也可通过膳食摄入。然而在部分人群体内, 其内源性合成不足以维持血清中维生素 D 的正常水平。维生素 D 缺乏不仅可能导致佝偻病和骨质疏松症等疾病, 还与肿瘤、自身免疫性疾病、感染性疾病和心血管疾病相关^[1]。目前, 维生素 D 已广泛应用于药物制剂、食品添加剂和饲料添加剂中以治疗和预防维生素 D 缺乏症, 合理摄入富含维生素 D 的食物或补充剂已

[作者简介] 张庆, 女, 硕士研究生, 主要从事药品质量研究。

E-mail: zhang_qing0918@163.com。

[通讯作者] 李树英, 男, 博士研究生, 高级工程师, 主要从事儿童药物开发。E-mail: lishuying@qddwp.com。

成为补充人体内维生素 D 的重要途径。然而维生素 D 摄入过量同样会对人体造成伤害,如婴幼儿摄入过量维生素 D 会导致食欲减退、恶心,严重者可引起高钙血症^[1-2]。

近年来,随着对维生素 D 研究的广泛关注,越来越多的预处理和测定方法用于分离和定量不同基质中的维生素 D,对食品、药品中维生素 D 进行分析检测可保证药品、食品等的质量,而对血液中维生素 D 的分析检测在临床上对于诊断人体维生素 D 过量或缺乏具有重要意义。目前分析维生素 D 常用的前处理技术有液-液萃取(LLE)、固相萃取(SPE)等,分析方法包括色谱法、电泳法、免疫法等。本文着重对近年来常用的液-液萃取、固相萃取等前处理技术以及色谱、质谱等分析方法进行了总结。

1 样品前处理

样品前处理对于维生素 D 的检测是一项重大挑战,具体原因如下:① 维生素 D 对光、热、酸碱、氧化等条件较敏感,剧烈的条件会导致维生素 D 发生不可逆的降解。② 维生素 D 在生物样品、食品、药品中均处于较低的浓度水平。③ 样品大都基质复杂,存在蛋白质、脂肪等干扰物。过去皂化回流是提取维生素 D 的主要方法,随着分析技术的发展,出现了更多环保且高效的方法,这些方法的出现大大减少了分析时间以及成本^[3]。

1.1 液-液萃取

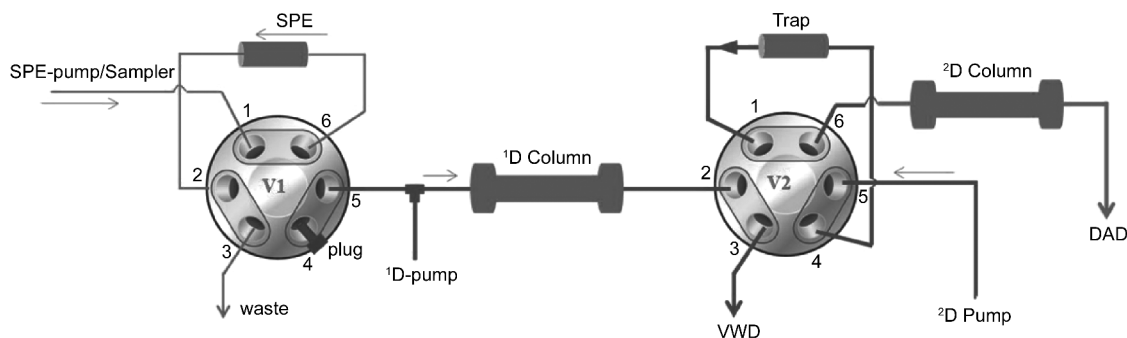
液-液萃取是目前测定维生素 D 最成熟且最常用的一种提取方法^[4-5],通常使用的萃取溶剂为正己烷^[6]、甲醇^[7]、环己烷^[8]、二甲基亚砜^[9]、乙腈^[10]等。对于基质中含有大量脂类的样品,通常先经过皂化以除去样品基质中的脂类,皂化后的样品采用乙醚等试剂萃取以提取维生素 D。经过简单的皂化并不能彻底去除基质干扰,往往经皂化提取的样品还需经过进一步的净化,如《中华人民共和国药典》2020 年版四部通则 0722 中维生素 D 测定的第二法中,皂化后的样品进一步采用反相色谱(RPLC)净化以消除油脂类的干扰,尽管此种方法用到大量乙醚且步骤繁琐,但仍是去除基质中大量脂类的常用提取方法。对于基质中油脂较少的样品通常可不必皂化,如王英新等^[9]采用二甲基亚砜-水的混合溶液溶解阿仑膦酸钠维生素 D₃ 片中维生素 D₃,再经正己烷提取浓缩,该方法无需皂化,减少了样品前处理步骤,避免了样品处理过程中维生素 D₃ 的损失,提高了测定的准确度;Sazali 等^[10]利用盐析辅助液-液

萃取技术,采用可与水混溶的乙腈作为萃取剂,以硫酸铵为盐析剂对牛奶样品中的维生素 D₃ 进行萃取,提取后的维生素 D₃ 使用 C₁₈ 色谱柱进行分离测定,此种萃取方法样品不必经过皂化,避免了维生素 D₃ 在高温下降解的可能性;韦月早等^[11]建立了一种针对性提取多种维生素矿物质片中维生素 D₃ 的前处理方法,在 0.2% 氨水中用碱性蛋白酶破坏维生素 D₃ 的包埋物质,无水乙醇浸提后再用正己烷萃取,该方法可将维生素 D₃ 与其他维生素和矿物质等干扰组分分离,非常适用于采用明胶包埋的维生素 D₃ 原料的制剂含量检测。

1.2 固相萃取

固相萃取作为一种简单通用的提取脂溶性维生素的方法,与传统的溶剂萃取方法相比其操作更为简单,不需要耗费大量的有机溶剂,避免了环境污染,降低了研发成本。随着分析科学的发展,各种新型萃取剂已经在食品药品的微量元素检测中得到应用^[12-13]。Jiao 等^[13]采用超声波-微波技术制备了聚吡咯包覆的磁铁矿纳米颗粒复合材料,并将其用作磁性固相萃取吸附剂用于复杂样品中维生素 D 的提取,在不需皂化和蛋白质沉淀的情况下,可直接从牛奶等样品中提取维生素 D₂ 和维生素 D₃,回收率可达到 90.3%。Han 等^[14]在聚苯乙烯纳米纤维表面原位聚合制备了吸附材料聚苯乙烯/聚吡咯纳米纤维,并利用制备材料采用固相萃取方法用于乳制品中维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的预处理,该方法大大缩短了样品制备时间,保证了维生素 D 的稳定性。

与传统的固相萃取相比,在线固相萃取具有更明显的优势,其减小了样品损失、提高了灵敏度和回收率;因在线固相萃取在封闭系统内完成,降低了样品污染和降解的可能性。因其明显的优势,在线固相萃取方式已经越来越多应用于复杂样品中^[15-16]。Zhang 等^[17]开发了一种在线固相萃取方法分离维生素 D 和其他脂溶性维生素,如图 1 所示,样品溶液由固相萃取泵输入固相萃取柱后进行富集,然后通过高比例的有机相将富集物输入二维液相进行分离检测,该文系统考察了固相萃取的负载溶剂、洗脱溶剂、洗脱时间和在线稀释条件,大大简化了样品整个分析流程,提高了样品分析效率,降低了分析成本。更重要的是,它是一种环保的方法,避免了使用戊烷或其他有机试剂,该方法可完全满足食品和膳食补充剂中维生素 D 和其他脂溶性维生素的提取。

图1 在线固相萃取与二维液相结合^[17]

1.3 其他前处理方法

与传统萃取相比,微萃取因其仅使用微量的溶剂,具有简单、快速、绿色和低成本等优点,目前也被大量应用于样品制备中^[18-20], Ghalebi等^[21]采用分散液-液微萃取对牛奶和酸奶中的维生素D₃进行浓缩提取,为了能有效提取维生素D₃对分散液-液微萃取进行了优化,最终确定了样品处理方法,将牛奶样品加入乙腈后,涡旋混合离心,取上层液体加入80 μL四氯化碳作为萃取溶剂,之后注入5 mL蒸馏水后离心,取下层沉淀干燥后用50 μL乙腈复溶后对维生素D₃进行测定。Shahdousti等^[22]采用溶解二氧化碳浮选-乳化微萃取结合高效液相色谱(HPLC)技术分离和测定复合维生素制剂中的脂溶性维生素(A, D₃, E和K₃),该方法具有较好的重现性。

此外,超临界流体萃取(SFE)在脂溶性维生素提取方面也有所应用^[23],蛋白沉淀法在血清中维生素D提取方面应用也较为广泛^[24]。

2 维生素D分析方法

维生素D及其类似物的检测方法有液相色谱法、液相色谱-质谱法(LC-MS)、超临界流体色谱法(SFC)等,其中液相色谱以及液相色谱与质谱的联用是目前最普遍的方法。

2.1 HPLC

在过去的几十年里,HPLC法已经成为维生素

D分析最常用的方法,其多采用紫外-可见检测器进行定量分析。除常用正相色谱法外,RPLC已越来越多应用于维生素D检测。另外,二维液相应用于基质复杂的样品检测也已渐成趋势。

2.1.1 正相色谱法 正相色谱法测定维生素D及其类似物通常采用等度洗脱,正己烷或正己烷与极性溶剂的混合物(如异丙醇、正戊醇等)是正相色谱常用流动相^[25-26]。表1对近几年来正相色谱法测定不同样品中维生素D的前处理方法以及测定方法进行了汇总^[9,27-29]。张学农等^[27]利用异丙醇:水(1:1)回流皂化提取碳酸钙颗粒中维生素D₃,其采用Waters硅胶柱,以正己烷:异丙醇(994:6, v/v)为流动相,在波长265 nm下测定维生素D₃含量,该方法回收率好、专属性强,适用于含维生素D₃制剂的质量控制。胡桂丽等^[28]采用氨基柱作为色谱柱,以正己烷和异丙醇(99:1)为流动相,在检测波长265 nm条件下,对液-液萃取后提取的咀嚼片中维生素D₃进行了含量测定,该方法准确度高,专属性强,适用于钙类维生素D₃的含量测定。周华^[29]建立了测定阿仑膦酸钠维生素D₃片中维生素D₃含量及有关物质的HPLC法,采用Agilent ZORBAX RX_SIL色谱柱,以正己烷-正戊醇(997:3)为流动相,在波长264 nm下测定了维生素D₃及其杂质的含量,结果显示在该色谱条件下维生素D₃和相邻杂质峰均能完全分离。

表1 正相色谱法测定维生素D含量样品前处理及测定方法汇总

年份	样品	前处理方法	检测条件	参考文献
2012	碳酸钙D ₃ 咀嚼片	液-液萃取	色谱柱:硅胶柱;流动相:正己烷:正戊醇(997:3);流速:1.5 mL·min ⁻¹ ;波长:265 nm;柱温:30 ℃	[9]
2002	复方碳酸钙颗粒	液-液萃取	色谱柱:Waters硅胶柱;流动相:正己烷:异丙醇(994:6);检测波长:265 nm;流速:1 mL·min ⁻¹ ;进样量:25 μL	[27]

年份	样品	前处理方法	检测条件	参考文献
2017	维生素 D 咀嚼片	液-液萃取	色谱柱:氨基柱;流动相:正己烷-异丙醇(99:1);流速:1.4 mL·min ⁻¹ ; 波长:265 nm;柱温:25 ℃	[28]
2012	阿仑膦酸钠维生素 D ₃ 片	液-液萃取	色谱柱:Agilent ZORBAX RX-SIL 柱;流动相:正己烷:正戊醇(997:3); 流速:1 mL·min ⁻¹ ;检测波长:264 nm;柱温:30 ℃	[29]

2.1.2 RPLC 尽管正相色谱测定维生素 D 含量方法较为成熟,但由于正相色谱存在一些不足:① 流动相一般采用正己烷等挥发性较强溶剂,环境不友好。② 流动相中的极性溶剂与固定相的作用力较强,需要较长时间对色谱柱进行平衡。③ 对系统中

水分含量要求较为苛刻,操作要求较高。因此近年来,文献报道多以 RPLC 对维生素 D 含量及有关物质进行研究,表 2 为采用 RPLC 测定维生素 D 含量的样品处理和测定方法汇总^[7,10,12,22,30-34]。

表 2 RPLC 测定维生素 D 含量样品前处理及测定方法汇总

年份	样品	前处理方法	检测条件	参考文献
2015	钙片	液-液萃取	色谱柱:C ₁₈ 色谱柱;流动相:甲醇;流速:1 mL·min ⁻¹ ;波长:264 nm	[7]
2019	牛奶样品	液-液微萃取	色谱柱:Hypersil ODS 柱;流动相:甲醇:水(98:2);流速:0.8 mL·min ⁻¹ ; 波长:265 nm	[10]
2020	乳制品	固相萃取	色谱柱:C ₁₈ 柱;流动相:甲醇:水(98:2);流速:1.0 mL·min ⁻¹ ;波长: 264 nm;柱温:25 ℃	[12]
2017	复合维生素制剂	溶解二氧化碳浮选- 乳化微萃取	色谱柱:C ₁₈ 柱;流动相 A:水;流动相 B:10% 异丙醇的甲醇溶液;梯度 洗脱;流速:1.0 mL·min ⁻¹ ;波长:265 nm	[22]
2012	钙尔奇 D ₃ 片等	液-液萃取	色谱柱:Amethyst C ₁₈ -H 柱;流动相:乙腈;柱温:20 ℃;波长:265 nm;流 速:1.0 mL·min ⁻¹	[30]
2016	营养补充剂	超声提取	色谱柱:C ₁₈ 柱;流动相:乙腈-水(99:1);柱温:40 ℃;波长:265 nm;流 速:1.0 mL·min ⁻¹	[31]
2019	维生素 D ₃ 软胶囊	超声提取	色谱柱:XDB-C ₁₈ 柱;流动相:乙腈-乙醇(90:10);检测波长:265 nm;流 速:1 mL·min ⁻¹ ;柱温:25 ℃	[32]
2011	血浆	液-液萃取	色谱柱:C ₃₀ 柱;流动相:甲醇-乙醇;梯度洗脱;检测波长:265 nm;流速: 1 mL·min ⁻¹	[33]
2020	阿托伐他汀钙、维生 素 D ₃	超声提取	色谱柱:C ₈ 柱;流动相:甲醇-乙腈(50:50)93 mL(含 1 mL 0.1% 甲酸) 与 20 mmol·L ⁻¹ 甲酸铵缓冲液 7 mL 混合,采用 0.1% 甲酸调节 pH 为 4;流速:0.6 mL·min ⁻¹ ;进样体积:5 μL;检测波长:265 nm	[34]

王尚等^[30]首次建立了维生素 D₃ 制剂中有关物质检查的 RPLC 方法,该方法能够有效分离维生素 D₃ 与相邻杂质,采用该方法对 3 种维生素 D₃ 制剂进行有关物质考察并与正相 HPLC 方法对比,2 种方法结果一致。Temova 等^[31]开发了一种简单、快速的 HPLC 法,在 C₁₈ 色谱柱上使用乙腈和水(99:1)的混合物作为流动相,成功地将维生素 D₃ 与其降解产物分离,该方法经过充分验证,由于该方法较稳定、运行时间短且具有良好的线性、准确度和精密性,因此可应用于固体营养补充剂和处方药中的维生素 D₃ 及有关物质的常规分析。李梦瀚等^[32]评估了不同流动相组分及比例对于维生素 D₃ 和有关物

质在色谱柱上保留行为的影响,并建立了基于反相高效液相色谱的维生素 D₃ 软胶囊的含量测定和杂质分析方法,研究表明与以纯乙腈为流动相相比,以乙腈:水(90:10)为流动相时回收率和峰形得到明显改善,可用于含量分析;以乙腈-水(95:5)为流动相能够排除空白油性基质对杂质峰的干扰,可用于杂质分析。

C₁₈ 色谱柱是用于维生素 D 分析的最常见色谱柱。而 C₃₀ 色谱柱已证明其可有效分离长链疏水化合物且已用于脂溶性维生素的分析^[33]。Hymøller 等^[33]采用 C₃₀ 色谱柱,在波长 265 nm 条件下定量检测了血浆等样品中维生素 D₂、维生素 D₃、25-羟

基维生素 D₂ 等含量,该方法回收率约为 86.6% ~ 101.0%。

2.2 LC-MS

近年来,越来越多文献报道采用质谱测定维

生素 D 及其类似物的方法,LC-MS 已逐渐成为临床及实验室的一种常规分析技术。表 3 为采用质谱法测定维生素 D 含量的样品处理和测定方法汇总^[4,8,16,35-37,39]。

表 3 质谱法测定维生素 D 含量样品前处理及测定方法汇总

年份	样品	前处理方法	测定方法	检测条件	参考文献
2010	血清	液-液萃取	LC-MS	色谱柱: Synergi MAX-RP 柱; 流动相: 甲醇-2 mmol·L ⁻¹ 醋酸铵(85:15); 柱温: 40 ℃; 流速: 0.35 mL·min ⁻¹ ; 质谱条件未详细列出	[4]
2012	食品、饲料、片剂	液-液萃取	HPLC/MS/MS	色谱柱 1: C ₈ 柱; 流动相 1: 流动相 A, B 梯度洗脱; 色谱柱 2: C ₁₈ 柱; 流动相 2: 流动相 B 等度洗脱; 柱温: 35 ℃; 流速: 0.5 mL·min ⁻¹ ; 流动相 A: 0.05% 甲酸溶液; 流动相 B: 甲醇-乙腈(80:20, 含甲酸 0.05%) 质谱条件: 射入电压 10 V; 去簇电压 46 V; 碰撞电压 21 V; 射出电压 8 V	[8]
2018	尿液	在线固相萃取	LC-MS/MS	色谱柱: PFP 柱; 流动相 A: 3 mmol·L ⁻¹ 甲酸铵溶液; 流动相 B: 3 mmol·L ⁻¹ 甲酸铵甲醇溶液; 梯度洗脱 质谱条件: 鞘气流量 12 L·min ⁻¹ ; 气体温度 300 ℃; 鞘气温度 250 ℃; 毛细管电压 5 000 V; 喷嘴电压 2 000 V	[16]
2016	血浆	液-液萃取	HPLC-MS/MS	流动相: 0.7 g·L ⁻¹ 醋酸铵 + 0.1% 醋酸; 流速: 0.6 mL·min ⁻¹ 质谱条件: 去簇电压 60 V; 射入电压 10 V; 射出电压 15 V; 量化转变 385→367; 碰撞电压 24 V	[35]
2020	含维生素 D ₃ 保健品	液-液萃取	LC-MS	色谱柱: C ₁₈ 柱; 流动相: 5 mmol·L ⁻¹ 甲酸铵甲醇溶液, 等度洗脱; 流速: 0.6 mL·min ⁻¹ ; 柱温: 40 ℃ 质谱条件: 去簇电压 59 V; 射入电压 10 V; 射出电压 7 V; Q1 为 385.6; Q3 为 259.40; 碰撞电压 23 V	[36]
2016	维生素 D ₃ 溶液	溶剂溶解	UHPLC-MS/MS	液相色谱条件: 色谱柱: Kinetex PFP 柱; 流动相: 0.1% 甲酸-甲醇; 梯度洗脱; 流速: 0.6 mL·min ⁻¹ 质谱条件: 干燥气温 300 ℃, 干燥气流量 10 L·min ⁻¹ , 雾化器 45 psi, 鞘气温度 250 ℃, 鞘气流量 7 L·min ⁻¹ , 毛细管入口电压 3 500 V	[37]
2021	兽药、饲料	液-液萃取	GC-MS	初始柱温: 150 ℃, 程序升温; 进样口温度: 210 ℃; 温度载气流速: 1.2 mL·min ⁻¹ ; 碰撞电压: 15 eV	[39]

Hrvolová 等^[35]开发、验证了一种新的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)方法,用于定量测定血浆中的脂溶性维生素;该方法在 50 min 内,以出色的分辨率和合适的 MS 信号强度分离了 16 种分析物;与最常用的 HPLC-DAD 方法相比,该 HPLC-MS/MS 方法降低了所有分析化合物的检测限和定量限,具有足够的灵敏度、可重复性,适用于生物体液中化合物的大规模分析。刘光兰等^[36]采用液相色谱-质谱联用仪测定保健品中维生素 D₃ 和维生素 K₁ 的含量方法,以 5 mmol·L⁻¹ 甲酸铵甲醇溶液为流

动相进行洗脱,样品中的维生素 D₃ 和维生素 K₁ 的主峰不受杂质峰干扰,能够进行准确定量与分离。Mahmoodani 等^[37]使用 HPLC-DAD 和 UHPLC-MS/MS 研究了不同破坏条件(如温度、碘、酸性条件和氧化)对维生素 D₃ 异构化的影响。加热条件下,维生素 D₃ 可转换为前维生素 D₃;在碘存在下,维生素 D₃ 和前维生素 D₃ 可发生顺-反式异构化,分别形成反式维生素 D₃ 和速甾醇;酸性条件下生成异速甾醇。该报道中这些产物与亲双烯体通过 Diels-Alder 反应的不同反应速率证实了维生素 D₃ 异构化产物

的形成。Gomes 等^[38]通过液相色谱-串联质谱方法首次实现了定量测定 4 种硫酸化维生素 D 的含量。

由于气相较高的进样口温度和色谱柱温度可能会引起维生素 D 的异构化,一直以来未被应用于维生素 D₃ 的测定,而 Lehner 等^[39]利用气相色谱-串联液质方法成功测定了维生素 D₃,D₂ 及其代谢物,结果显示尽管在色谱图中出现了一些热分解化合物峰,但该方法仍能准确地测定饲料中维生素 D₃ 和 D₂ 的含量,可作为液相色谱-串联质谱的有效替代方法。

2.3 二维液相色谱

二维液相色谱具有峰容量大、能够显著降低复杂样品的基质效应等特点,已被开发用于在线自动纯化以测定油性和脂肪基质中的维生素 D。在第一维中,可在线固相萃取或分离去除基质和杂质,仅将目标化合物或难分离组分转移至第二维进行检测。表 4 汇总了近年来采用二维液相色谱法测定不同基质中维生素 D 含量的样品前处理及测定方法^[17,40-43]。

表 4 二维液相色谱法测定维生素 D 含量样品前处理及测定方法汇总

年份	样品	前处理方法	检测条件	参考文献
2021	奶粉、食品、维生素片等	固相萃取	一维色谱条件:色谱柱:Poroshell 120 PFP 柱;流动相 A:0.1% 磷酸;流动相 B:甲醇;梯度洗脱;流速:0~6.5 min,0.5 mL·min ⁻¹ ;6.5~25 min,1.0 mL·min ⁻¹ 二维色谱条件:色谱柱:Zorbax Eclipse Plus PAH 柱;流动相:乙腈-甲醇;梯度洗脱;流速:0.4 mL·min ⁻¹ ;波长:325,264,294 nm	[17]
2020	奶粉、米粉	在线固相萃取	一维色谱条件:色谱柱:Agilent Poroshell 120 EC-C8 柱;流动相 A:水;流动相 B:乙腈;流速:1.5 mL·min ⁻¹ 二维色谱条件:色谱柱:Agilent Eclipse PAH 柱;流动相 A:乙腈;流动相 B:甲醇;流速:0.4 mL·min ⁻¹ SPE 泵流动相:A 水,B 乙醇;检测波长:264 nm	[40]
2021	维生素 D 滴剂,维生素 AD 滴剂	正己烷直接溶解	一维色谱条件:色谱柱:Thermo Acclaim HILIC-10 柱;流动相 A:正己烷;流动相 B:正己烷-正戊醇-异丙醇(98:1:1),梯度洗脱 二维色谱条件:色谱柱:Agilent ZORBAX RXSIL C ₁₈ 柱;流动相:正己烷-正戊醇-异丙醇(996:2:2);检测波长 265 nm;柱温 40 °C;流速为 0.5 mL·min ⁻¹	[41]
2015	复合维生素片等	甲醇超声溶解	一维色谱条件:色谱柱:Agilent Eclipse Plus C ₁₈ 柱;流动相 A:乙腈-水(9:1);流动相 B:乙腈;流动相 C:甲醇,梯度洗脱;流速:0.5 mL·min ⁻¹ ; 二维色谱条件:色谱柱:Agilent poroshell 120 柱;流动相 A:水;流动相 B:乙腈;流动相 C:甲醇,梯度洗脱;流速:1.0 mL·min ⁻¹ ;波长:264 nm;柱温:35 °C	[42]
2019	维生素 D ₃ 溶液	直接溶解	一维色谱条件:色谱柱:HILIC 柱;流动相 A:5% 乙腈;流动相 B:95% 乙腈;A,B 均含 15 mmol·L ⁻¹ 乙酸铵,梯度洗脱;流速:1 mL·min ⁻¹ ;柱温:25 °C 二维色谱条件:色谱柱:Kinetex C ₈ 柱;流动相 A:5% 乙腈;流动相 B:95% 乙腈;A,B 均含 15 mmol·L ⁻¹ 乙酸铵,梯度洗脱;检测波长 270 nm,柱温 25 °C,流速为 1 mL·min ⁻¹	[43]

叶佳明等^[40]采用在线固相萃取结合二维色谱法测定配方奶粉、米粉中维生素 D 的含量,样品溶液皂化后定容,即可通过仪器自动净化分析检测,提高了样品的处理效率和方法准确性。林思荣等^[41]建立用于快速测定维生素 D 含量的柱切换二维液相色谱法,使用正己烷溶解样品后可直接注入色谱系统进行分离和定量,无需皂化等样品前处理过程,提高了分析效率。戚绿叶等^[42]运用二维柱切换色谱技术建立了快速、准确测定保健食品复合维生素片或软胶囊中维生素 A,D₃,E 含量的方法,采用甲

醇与乙醇超声 30 min 提取样品,采用中心切割,将含量较低的维生素 D 从一维预分离柱转移至二维分析柱,实现了自动在线净化。Bäurer 等^[43]采用二维液相成功实现了水溶性和维生素 D₃ 等脂溶性维生素的同时分离,其采用亲水色谱(HILIC)和 RPLC 结合的二维液相色谱方法,在该方法中水溶性维生素采用第一维液相的 HILIC 柱经梯度洗脱模式实现分离,在第一维液相中出峰时间较早的脂溶性维生素转移至采用 C₈ 色谱柱的第二维液相,成功将含维生素 D₃ 在内的脂溶性维生素实现了分离。Zhang

等^[17]建立了一种在线固相萃取和中心切割二维液相色谱相结合的方法,可实现食品中维生素 A、维生素 D 和 4 种维生素 E 同源物的自动检测。如图 1 所示,在该方法中目标分析物经过皂化后直接注入结合在线固相萃取和中心切割二维液相的体系中进行富集、纯化、分离和定量。在线固相萃取过程中加入在线稀释剂,削弱溶剂对第一柱分离的影响。该方法大大简化了分析流程,且具有良好的重现性,提高了分析效率。

2.4 SFC

SFC 提供了一种快速、高效和绿色的分离方法,

已被用于更快速、更环保地分析维生素。由于其低黏度和高扩散率,基于二氧化碳的流动相可以在 2 μm 以下的固定相上实现高流速,因此在极性固定相的色谱柱中可以用超临界流动相代替正己烷实现分离,减少有机试剂的消耗。更重要的是,超临界 CO_2 流体可以溶解油脂,因此含油样品中一些低含量的脂溶性化合物可以不经预处理或只用己烷稀释即可测定。表 5 汇总了近年来采用 SFC 测定维生素不同基质中维生素 D 含量的样品前处理和测定方法^[45-47]。

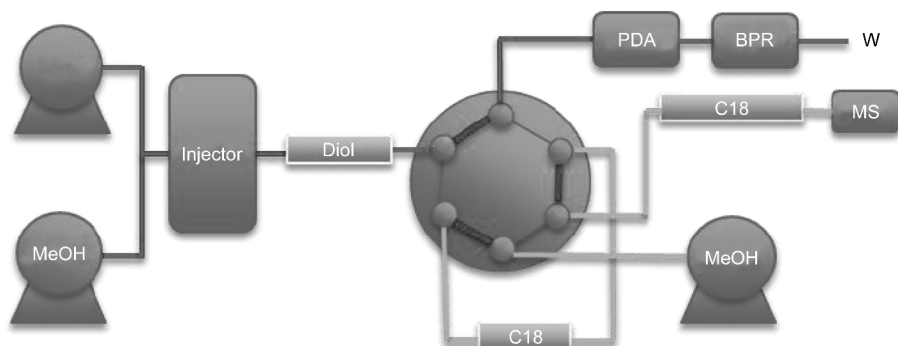
表 5 SFC 法测定维生素 D 含量样品前处理及测定方法汇总

年份	样品	前处理方法	测定方法	检测条件	参考文献
2020	维生素 AD 滴剂	正己烷溶解 在线净化	SFC-LC-MS	流体色谱条件:色谱柱为二醇柱;柱温 40 $^{\circ}\text{C}$;流动相为超临界 CO_2 和 2% 甲醇;流速 3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 液相色谱条件:色谱柱为 C_{18} 柱;流动相为甲醇;流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 质谱条件:毛细管电压 4 kV;接口温度 300 $^{\circ}\text{C}$;热块温度 400 $^{\circ}\text{C}$;雾化气体流量 3 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$;加热气体流量 10 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$;干燥气体流量 10 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	[45]
2016	血浆	液-液萃取	SFC-MS	流体色谱条件:色谱柱为 Waters Acquity UPC2 1-AA 柱;流动相为 CO_2 -甲醇;梯度洗脱;柱温 40 $^{\circ}\text{C}$;流速 2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 质谱条件:毛细管电压 3.5 kV;锥电压 25 V;源温 120 $^{\circ}\text{C}$;溶脱温度 300 $^{\circ}\text{C}$;锥气流速 50 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$;脱溶气流速 600 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$	[46]
2018	维生素 AD 滴剂 维生素 D 滴剂	正己烷直接 溶解	SFC-RPLC/MS	流体色谱条件:色谱柱为纯化柱;二醇柱,流动相为 CO_2 -甲醇(98:2) 液相色谱条件:色谱柱为 C_{18} 色谱柱;流动相为甲醇;流速 0.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 质谱条件:毛细管电压 4 kV;界面温度 300 $^{\circ}\text{C}$;DL 温度 250 $^{\circ}\text{C}$;热块温度 400 $^{\circ}\text{C}$;雾化气体流量 3 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$;加热气体流量 10 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$;干燥气体流量 10 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	[47]

SFC-MS: 超临界流体色谱-质谱

Andri 等^[44]使用梯度级别乙醇作为二氧化碳的共溶剂,在 2 min 内实现了化合物的稳定和高质量分离,比液相色谱法快 10 倍以上,此外该方法的溶剂成本和液体有机废物明显减少。随着 SFC 和色谱柱切换技术的使用,分析时间显著减少,分析过程不再需要溶剂萃取和离线纯化,操作更加简单和自动化。Feng 等^[45]建立了由 SFC 和 RPLC 耦合串联质谱(MS)组成的二维系统,通过阀门切换,在 SFC-MS 和 SFC-LC-MS 这 2 种模式下实现了日常油脂补充剂中维生素 D 的定量分析,该方法重复性和回收率良好。Jumaah 等^[46]首次利用 SFC-MS 对维生素 D 及其代谢产物进行分析,研究开发了一种新的 SFC-MS 方法,其根据化合物结构中羟基的数量和位置以及不饱和键的数量所决定的理化性质,实现了在 1-氨基蒽柱上维生素 D 代谢物的分离,可在

8 min 内分离 9 种维生素 D 代谢物。Hamada 等^[47]建立了一种由超临界流体色谱和反相液相色谱/质谱(RPLC/MS)组成的柱转换系统,用于分析油脂基质中维生素 D 的含量。如图 2 所示,SFC 具有与正相液相色谱(NPLC)相似的保留行为,用于在线清除油质和脂肪样品,然后使用反相 LC-MS/MS 进行分离和检测;其比较了 3 种不同官能团材料(二氧化硅、氨基、二醇基)的 SFC 色谱柱,选择维生素 D 保留时间最长的二醇基色谱柱进行样品纯化。选择 100% 甲醇将维生素 D 从净化柱输送到预处理柱,并在反相 C_{18} 柱上对维生素 D 不同形式进行分离。结果表明,基于 SFC-RPLC/MS 柱切换系统的方法较为简单,适用于油类和脂肪类样品中维生素 D 的分析。

图2 SFC-RPLC/MS柱切换系统^[47]

2.5 其他测定

除以上常用分析方法之外,文献报道的维生素D分析方法还包括免疫分析法^[48-49]、毛细管电泳法^[50-51]、传感器法^[52-53]等,这些方法虽然具有快速、环境友好等优点,但与色谱法比较,其准确性、重现性等还存在不足。

3 结语

由于样品中维生素D较低的含量、复杂的基质以及维生素D稳定性差等原因,样品中维生素D的分析一直具有挑战性,分析化学家投入了大量的努力开发高灵敏度、高准确性、高稳定性分析方法以确定多种维生素D种类以及维生素降解产物。通过总结可以发现,样品前处理技术越来越朝向新材料、环保绿色、快速等方向发展。而维生素D的检测目前仍以液相色谱以及质谱的联用作为最常用的技术手段,绿色环保的超临界流体色谱也是目前发展的趋势。表1汇总了近年来维生素D样品前处理及分析方法,不同的样品提取和测定方法各有其优缺点,分析、检验工作者可综合考虑样品基质的复杂性、测定方法灵敏度、测定费用、测定时间及实验室条件等实际情况选择合理的样品处理和分析方法。

[参 考 文 献]

- [1] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 维生素D及其类似物的临床应用共识[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2018, 34(3):187-201.
- [2] 周建烈, 刘忠厚. 补充钙和维生素D防治骨质疏松症的全球临床指南进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(3): 371-380.
- [3] KASALOVÁ E, AUFARTOVÁ J, KR/U010DMOVÁ LK, et al. Recent trends in the analysis of vitamin D and its metabolites in milk: a review[J]. *Food Chem*, 2015, 171: 177-190.
- [4] HØJSKOV CS, HEICKENDORFF L, MØLLER HJ. High-throughput liquid-liquid extraction and LCMSMS assay for determination of circulating 25(OH) vitamin D3 and D2 in the routine clinical laboratory[J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(1-2): 114-116.
- [5] MUSTEATA ML, MUSTEATA FM. Overview of extraction methods for analysis of vitamin D and its metabolites in biological samples[J]. *Bioanalysis*, 2011, 3(17): 1987-2002.
- [6] HOLLIS BW, ROOS BA, DRAPER HH, et al. Vitamin D and its metabolites in human and bovine milk[J]. *J Nutr*, 1981, 111(7): 1240-1248.
- [7] 赵飞, 高广慧, 王凤娇. 微波萃取-反相高效液相色谱法测定钙片中维生素D₃的含量[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(1): 30-33.
- [8] SCHADT HS, GÖSSL R, SEIBEL N, et al. Quantification of vitamin D3 in feed, food, and pharmaceuticals using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *J AOAC Int*, 2012, 95(5): 1487-1494.
- [9] 王英新, 王凤英, 吴学萍, 等. HPLC法测定碳酸钙D₃咀嚼片(Ⅱ)维生素D₃含量[J]. 齐鲁工业大学学报(自然科学版), 2017, 31(1): 16-19.
- [10] SAZALI NH, ALSHISHANI A, SAAD B, et al. Salting-out assisted liquid-liquid extraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of vitamin D3 in milk samples[J]. *R Soc Open Sci*, 2019, 6(8): 190952.
- [11] 韦月早, 杨世联, 黄艳芳, 等. 高效液相色谱法测定多种维生素多种矿物质片中的维生素D₃含量[J]. 大众科技, 2019, 21(6): 40-42.
- [12] ULUSOY HI, GÜLLE S, YILMAZ E, et al. Trace determination of vitamin B12 in food samples by using Fe₃O₄ magnetic particles including multi-walled carbon nanotubes and nanodiamonds[J]. *Anal Methods*, 2019, 11(40): 5108-5117.
- [13] JIAO Z, ZHANG Y, FAN HB. Ultrasonic-microwave method in preparation of polypyrrole-coated magnetic particles for vitamin D extraction in milk[J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1457: 7-13.
- [14] HAN Q, WEI LL, DENG GZ, et al. Rapid determination of vitamins D2 and D3 in dairy products by high-performance liquid chromatography after solid phase extraction based on polystyrene/polypyrrole composite nanofibers[J]. *J Braz Chem Soc*, 2020, 31: 1216-1224.
- [15] LIANG YS, ZHOU T. Recent advances of online coupling of sample preparation techniques with ultra high performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography[J]. *J Sep Sci*, 2019, 42(1): 226-242.
- [16] ABU KASSIM NS, SHAW PN, HEWAVITHARANA AK. Simultaneous determination of 12 vitamin D compounds in human serum using online sample preparation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1533: 57-65.
- [17] ZHANG YH, LIN YK, YANG XL, 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]. *J Food Compos Anal*, 2021, 101: 103983.
- [18] YIN S, YANG Y, WU L, et al. Recent advances in sample preparation and analysis methods for vitamin D and its analogues in different matrices[J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2019, 110:

- 204 - 220.
- [19] KAMANKESH M, SHAHDOOSTKHANY M, MOHAMMADI A, *et al.* Fast and sensitive low density solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction method combined with high-performance liquid chromatography for determining cholecalciferol (vitamin D3) in milk and yogurt drink samples [J]. *Anal Methods*, 2018, 10(9): 975 - 982.
- [20] KONG LY, WANG JQ, GAO QP, *et al.* Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and carotenoids in human serum using a nanostructured ionic liquid based microextraction method [J]. *J Chromatogr A*, 2022, 1666: 462861.
- [21] GHALEBI M, TAMIZI E, AHMADI S, *et al.* A dispersive liquid-liquid micro-extraction technique for the pre-concentration and quantification of vitamin D3 in milk and yogurt samples using a non-aqueous HPLC method [J]. *Iran J Pharm Res*, 2019, 18(2): 677 - 685.
- [22] SHAHDOUSTI P, AGHAMOHAMMADI M. Flotation/ultrasound-assisted microextraction followed by HPLC for determination of fat-soluble vitamins in multivitamin pharmaceutical preparations [J]. *J Sep Sci*, 2018, 41(8): 1821 - 1828.
- [23] MORALES D, GIL-RAMIREZ A, SMIDERLE FR, *et al.* Vitamin D-enriched extracts obtained from shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) by supercritical fluid extraction and UV-irradiation [J]. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 2017, 41: 330 - 336.
- [24] ABU KASSIM NS, GOMES FP, SHAW PN, *et al.* Simultaneous quantitative analysis of nine vitamin D compounds in human blood using LC-MS/MS [J]. *Bioanalysis*, 2016, 8(5): 397 - 411.
- [25] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 2020 年版. 四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [26] 欧洲药典委员会. 欧洲药典 [S]. 2020.
- [27] 张学农, 周慧, 苗爱东, 等. 正相高效液相色谱法定碳酸钙颗粒剂中微量维生素 D₃ 含量 [J]. *新疆医科大学学报*, 2002, 25(1): 39 - 41.
- [28] 胡桂丽, 钱金华, 张晓燕, 等. 正相高效液相色谱法测定钙加维 D 咀嚼片中的维生素 D₃ 含量 [J]. *饮食保健*, 2017, 4(17): 294 - 295.
- [29] 周华. 高效液相色谱法测定阿仑膦酸钠维生素 D₃ 片中维生素 D₃ 的含量及有关物质 [J]. *亚太传统医药*, 2012, 8(6): 51 - 52.
- [30] 王尚, 郑枫, 丁黎. RP-HPLC 法测定维生素 D₃ 制剂中的有关物质 [J]. *中国药科大学学报*, 2012, 43(1): 55 - 59.
- [31] TEMOVA Ž, ROŠKAR R. Stability-indicating HPLC-UV method for vitamin D3 determination in solutions, nutritional supplements and pharmaceuticals [J]. *J Chromatogr Sci*, 2016, 54(7): 1180 - 1186.
- [32] 李梦瀚, 丁雪梅, 梁建英. 反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 系统分析维生素 D₃ 软胶囊 (油性基质) [J]. *复旦学报 (医学版)*, 2019, 46(1): 23 - 31.
- [33] HYMØLLER L, JENSEN SK. Vitamin D analysis in plasma by high performance liquid chromatography (HPLC) with C(30) reversed phase column and UV detection; easy and acetonitrile-free [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(14): 1835 - 1841.
- [34] PATEL AB, JADAV HM, VYAS AJ, *et al.* Specific Stability Indicating RP-HPLC Photodiode Array Based Method for Estimation of Novel combination Atorvastatin Calcium and Vitamin D3 for the treatment of Hyperlipidaemia [J]. *Anal Chem Lett*, 2020, 10(6): 758 - 767.
- [35] HRVOLOVÁ B, MARTÍNEZ-HUÉLAMO M, COLMÁN-MARTÍNEZ M, *et al.* Development of an advanced HPLC-MS/MS method for the determination of carotenoids and fat-soluble vitamins in human plasma [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(10): 1719.
- [36] 刘光兰, 陈彩云, 吴银. 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 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(23): 8697 - 8702.
- [37] MAHMOODANI F, PERERA CO, FEDRIZZI B, *et al.* Degradation studies of cholecalciferol (vitamin D3) using HPLC-DAD, UHPLC-MS/MS and chemical derivatization [J]. *Food Chem*, 2017, 219: 373 - 381.
- [38] GOMES FP, SHAW PN, HEWAVITHARANA AK. Determination of four sulfated vitamin D compounds in human biological fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1009 - 1010: 80 - 86.
- [39] LEHNER A, JOHNSON M, ZIMMERMAN A, *et al.* Vitamin D analyses in veterinary feeds by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)*, 2021, 27(1): 48 - 62.
- [40] 叶佳明, 王京, 叶磊海, 等. 在线固相萃取-二维色谱快速测定配方奶粉、米粉中维生素 D 的含量 [J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(7): 239 - 243.
- [41] 林思荣, 王勇, 林晨, 等. 柱切换高效液相色谱法测定维生素 D 滴剂、维生素 AD 滴剂中维生素 D 的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2021, 41(3): 491 - 500.
- [42] 戚绿叶, 颜琳琦, 张丽媛, 等. 二维液相色谱法测定保健食品中 V_A、V_{D3}、V_E 的含量 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(3): 340 - 343, 347.
- [43] BÄURER S, GUO WK, POLNICK S, *et al.* Simultaneous separation of water- and fat-soluble vitamins by selective comprehensive HILIC × RPLC (high-resolution sampling) and active solvent modulation [J]. *Chromatographia*, 2019, 82(1): 167 - 180.
- [44] ANDRI B, LEBRUN P, DISPAS A, *et al.* Optimization and validation of a fast supercritical fluid chromatography method for the quantitative determination of vitamin D3 and its related impurities [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1491: 171 - 181.
- [45] FENG LL, WU L, GUO YL, *et al.* Determination of vitamin D3 in daily oily supplements by a two-dimensional supercritical fluid chromatography-liquid chromatography-mass spectrometry system [J]. *J Chromatogr A*, 2020, 1629: 461510.
- [46] JUMAAH F, LARSSON S, ESSÉN S, *et al.* A rapid method for the separation of vitamin D and its metabolites by ultra-high performance supercritical fluid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1440: 191 - 200.
- [47] HAMADA N, GUO YL, JI F, *et al.* Determination of vitamin D in oily drops using a column-switching system with an on-line clean-up by supercritical fluid chromatography [J]. *Talanta*, 2018, 190: 9 - 14.
- [48] CHEN X, SUN S, LIU Q, *et al.* A rapid chemiluminescence immunoassay for total vitamin D status assessment in fingertip blood [J]. *Clin Lab*, 2020, 66(8): 1479 - 1484.
- [49] LAHOZ R, SÁNCHEZ JP, GÓRRIZ S, *et al.* Comparative study of two immunoassays used for the determination of serum vitamin D [J]. *Pract Lab Med*, 2021, 26: e00242.
- [50] WANG X, LI KF, YAO LP, *et al.* Recent advances in vitamins analysis by capillary electrophoresis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 147: 278 - 287.
- [51] GHEORGHE DC, STEFAN-VAN STADEN RI, VAN STADEN JF. Mini-review: electrochemical sensors used for the determination of water- and fat-soluble vitamins: B, D, K [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2022: 1 - 10.
- [52] MAGAR HS, BRAHMAN PK, HASSAN RYA. Disposable impedimetric nano-immuno-chips for the early and rapid diagnosis of Vitamin-D deficiency [J]. *Biosens Bioelectron X*, 2022, 10: 100124.
- [53] ESPOSITO F, SANSONE L, SRIVASTAVA A, *et al.* Label-free detection of vitamin D by optical biosensing based on long period fiber grating [J]. *Sens Actuatur B Chem*, 2021, 347: 130637.

编辑: 毕晓帆/接受日期: 2022-05-16