

乳中脂溶性维生素 A、D、E、K 的快速检测方法研究

胡韶华, 张星河, 卢永茂, 陶冠军, 韦 伟, 金青哲, 王兴国

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:旨在为哺乳期母亲营养需求的确定和婴幼儿配方奶粉的设计提供参考数据,建立了一种超高效液相色谱(UPLC)搭配光电二极管阵列检测器(PDA)分析母乳中脂溶性维生素 A、D、E、K 含量的方法,对其进行了方法学验证,并采用该方法检测了母乳、其他哺乳动物乳(牛乳、羊乳、驴乳)及配方奶粉中维生素 A、D、E、K 的含量,同时对不同样品中脂溶性维生素含量进行了主成分分析(PCA)。结果表明:所建立的 UPLC-PDA 方法可在 10 min 内实现对不同脂溶性维生素的分离;各脂溶性维生素的标准曲线回归方程均具有良好的线性关系($R^2 \geq 0.9994$),检出限和定量限范围分别为 0.01~0.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.09~1.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$,精密度和准确度的计算结果均不大于 5%,除维生素 K 受到碱法前处理影响导致加标回收率偏低外,其他脂溶性维生素的加标回收率范围(80.69%~111.66%)均处于良好水平;母乳中维生素 A 含量介于羊乳与牛乳间,维生素 E 的含量高于其他哺乳动物乳,但明显低于配方奶粉,且母乳及其他哺乳动物乳中均未检出维生素 D;PCA 结果显示,其他哺乳动物乳(尤其是羊乳)和母乳中脂溶性维生素组成及含量相近。综上,UPLC-PDA 方法适用于乳和配方奶粉中脂溶性维生素含量的测定。

关键词:超高效液相色谱;母乳;脂溶性维生素;哺乳动物乳;婴幼儿配方奶粉

中图分类号:TS252.7;O657.7+2 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2025)06-0139-07

Fast analysis of fat-soluble vitamins A, D, E and K in milk

HU Shaohua, ZHANG Xinghe, LU Yongmao, TAO Guanjun, WEI Wei,
JIN Qingzhe, WANG Xingguo

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: To provide reference data for determining the nutritional needs of lactating mothers and designing infant formula, a method for analyzing the contents of fat-soluble vitamins A, D, E, and K in human milk using ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) coupled with a photodiode array detector (PDA) was established, and the method was validated. The UPLC-PDA method was applied to detect the contents of vitamins A, D, E, and K in human milk, other mammalian milks (cow milk, goat milk, and donkey milk) and infant formula. A principal component analysis (PCA) of the fat-soluble vitamin contents in different samples were also performed. The results indicated that the established UPLC-PDA method achieved separation of different fat-soluble vitamins within 10 min. The regression equations of the standard curves for each fat-soluble vitamin showed good linearity ($R^2 \geq 0.9994$), with detection limits and quantification limits ranging from 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 0.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 1.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The calculation results for precision and accuracy were not greater than 5%. Except for vitamin K, which was affected by the alkaline pretreatment resulting in a lower spiked recovery rate, the spiked recovery rates for the other fat-soluble vitamins ranged from 80.69% to 111.66%, indicating good levels. Vitamin A content in human milk was between that of goat milk and

收稿日期:2024-03-14;修回日期:2024-11-22

作者简介:胡韶华(1999),男,硕士研究生,研究方向为油脂及制品加工(E-mail)hushaohua109@163.com。

通信作者:金青哲,教授,博士(E-mail)jqzwuxi@163.com。

cow milk, and the vitamin E content was higher than that in other mammalian milks, but significantly lower than that in infant formula. Vitamin D was not detected in human milk or

other mammalian milks. PCA results showed that the composition and content of fat-soluble vitamins in mammalian milks, especially goat milk, was similar to that in human milk. In conclusion, UPLC-PDA method is suitable for analyzing the content of fat-soluble vitamins in milk and infant formula.

Key words: ultra-high performance liquid chromatography; human milk; fat-soluble vitamins; mammalian milk; infant formula

脂溶性维生素(Fat-soluble vitamins, FSV)由环状结构和长的脂肪族烃链组成,稳定性较强,水溶性较差,但易溶于多种非极性有机溶剂^[1]。常见的FSV包括维生素A(V_A)、维生素E(V_E)、麦角钙化醇(V_{D2})、胆钙化醇(V_{D3})、叶绿醌(V_{K1})、甲基萘醌(V_{K2})^[1-5],其中 V_E 包括4种生育酚(α -、 β -、 γ -、 δ -生育酚)和4种生育三烯酚^[6]。缺乏维生素会引起相关疾病,如缺乏维生素D(V_D)易引发佝偻病,缺乏 V_A 易引起干眼症,缺乏 V_E 易引起感染性疾病^[7-8]。

母乳是婴儿最方便、最易获得的食物来源,对婴儿的成长发育具有重要影响。母乳中含有微量的FSV,可以通过母乳喂养的方式进入婴儿体内并被消化吸收^[9-10]。研究表明,FSV是促进婴儿生长发育的重要物质,除了对婴儿的代谢过程、神经发育、氧气运输、肌肉和软组织的发育以及遗传物质的合成起着关键作用外,还具有抗细菌感染和抗氧化功能,对于婴儿期非常重要^[11-12]。因此,研究母乳中FSV的含量对于改善婴儿母乳喂养的方式和确定哺乳期母亲的营养需求至关重要。

FSV在母乳中的含量较低(占乳脂总含量的1%以下),且母乳基质较为复杂^[13],分析难度大。目前常见的FSV检测方法有微生物法(试剂盒法)、光谱法(分光光度法)和色谱法(气相/液相)^[14]。相比之下,色谱法具有稳定性强、精密度高、运行时间短的特点,其中液相色谱法应用更加广泛^[15-17]。洪亮等^[18]建立的无需皂化的高效液相色谱法(HPLC)在50 min内实现了对牛乳中 V_A 、 V_D 和 V_E 的定量分析。陈万勤等^[19]利用高效液相色谱与二极管阵列检测器(HPLC-PDA)在25 min内实现了对配方乳粉中7种FSV(V_A 、 V_{D2} 、 V_{D3} 、 V_{K1} 、 V_E 、叶黄素、 β -胡萝卜素)的定量测定。Alali等^[20]开发的HPLC-PDA法可在10 min内实现 V_A 、 V_{D3} 和 V_E 的一次性检出,平均加标回收率在73.77%~95.33%之间。然而目前已报道的关于乳脂中FSV的一次性检测方法中仍存在分析种类少、检测时间长等问题^[18-20]。本文采用超高效液相色谱搭配光电二极管阵列检测器(UPLC-PDA)建立了快速高效测定

母乳中多种FSV的方法,以期为哺乳期母亲营养需求的确定和婴幼儿配方奶粉的设计提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

母乳样本(均为成熟乳,产后>14 d),由无锡6位健康母亲提供,均为足月生产。3种不同品牌的配方奶粉(IF1、IF2、IF3),均为市售一段,从相关官方旗舰店购入。羊乳、牛乳1产地为河南,驴乳产地为新疆,牛乳2产地为黑龙江。所有乳液样本未分装前均在-80℃条件下避光保存。

分析纯正己烷、无水乙醇、氢氧化钾、L-抗坏血酸,上海国药集团化学试剂有限公司;色谱纯甲醇、乙腈,美国TEDIA试剂公司;色谱纯甲基叔丁基醚、异丙醇,上海泰坦科技股份有限公司; V_A 、 V_{D2} 、 V_{D3} 、 V_{K1} 、 V_{K2} 、 β -生育酚(β -T)、 D - γ -生育酚(D - γ -T)、 D - δ -生育酚(D - δ -T)标准品(纯度 $\geq 98\%$),百灵威科技有限公司; D - α -生育酚(D - α -T)标准品(纯度 $\geq 98\%$),上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

Acquity超高效液相色谱仪(UPLC)、光电二极管阵列检测器(PDA),美国Waters公司;HIKAVG1型旋涡混合器;TGL-16B型高速离心机;SE812型氮吹仪;R2140型电子天平;HH-W600数显恒温水浴锅;SHA-B水浴振荡器。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制与校准

准确称取10.00 mg V_A 、 V_{D2} 、 V_{D3} 、 V_{K1} 、 V_{K2} 、 D - α -T、 D - γ -T、 D - δ -T标准品和5.00 mg β -T标准品(精确到0.01 mg)于10 mL容量瓶中,加入甲基叔丁基醚溶解并定容,分别配制成质量浓度为1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 V_A 、 V_{D2} 、 V_{D3} 、 V_{K1} 、 V_{K2} 、 D - α -T、 D - γ -T、 D - δ -T和500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 β -T混合标准储备液,置于-20℃环境中避光保存。使用前用紫外分光光度计在相应波长下测定其吸光度,依据紫外吸光系数法对混合标准储备液质量浓度进行校正。

1.2.2 样品前处理(FSV的提取)

根据全思思^[14]的方法并稍作改动提取样品中的FSV。分别取5 mL母乳、其他哺乳动物乳及配方

奶粉乳液〔由 0.5 g(精确至 0.01 g)配方奶粉与 5 mL 纯净水在(45 ± 5)℃ 混匀至完全分散制成〕于 50 mL 离心管中,在室温下依次加入 10 mL 18 g/L 抗坏血酸乙醇-水溶液(体积比 90:10)和 2 mL KOH 溶液(KOH 与水质量体积比 25:20),涡旋 30 s 后放入 80℃ 恒温水浴中振荡(200 r/min)皂化 1 h,取出离心管置于冷水浴中静置 30 min,待样品冷却至室温后,加入 10 mL 正己烷,涡旋 2 min 后离心(4 000 r/min,8 min),将上清液转移至 50 mL 离心管中。重复以上正己烷萃取操作,合并上清液后置于 40℃ 下氮吹至干,用 0.2 mL 甲基叔丁基醚涡旋 1 min 复溶,离心(10 000 r/min,5 min)后取上清液于棕色进样瓶中待测。以上操作均在避光或弱光环境下进行。

1.2.3 FSV 的测定

采用 UPLC - PDA 检测 FSV。UPLC 条件: StarCore C18 色谱柱(2.1 mm × 100 mm,2.6 μm); 流动相 A 为异丙醇-乙腈(体积比 90:10),流动相 B 为乙腈-水(体积比 40:60);梯度洗脱程序为 0 ~ 1 min 时 55% A,3 min 时 70% A,6 min 时 80% A,7 min 时 90% A,7.1 min 时 55% A,7.1 ~ 10 min 时 55% A;流速 0.4 mL/min;进样量 2 μL;进样器温度 8℃;柱温 55℃;PDA 检测器,全波段扫描范围为 240 ~ 330 nm,检测波长分别为 V_A 325 nm、 V_D 264 nm、 V_E 295 nm、 V_K 245 nm。

通过标准品的保留时间对 FSV 进行定性,根据全波长扫描色谱图上所得到的各种 FSV 在其对应最大紫外吸收波长处的峰面积,由混合标准储备液梯度稀释拟合的标准曲线采用外标法进行定量。

1.2.4 方法学验证

将混合标准储备液使用甲基叔丁基醚逐级稀释为 7 个质量浓度梯度后,按 1.2.3 方法进行 UPLC - PDA 检测,以标准品质量浓度(x)为横坐标,相应的最大紫外吸收波长处的峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归分析,得到标准曲线回归方程和决定系数(R^2)。将 FSV 混合标准储备液逐级稀释,在全波长扫描色谱图上,取信噪比为 3 时的质量浓度为检出限(LOD),信噪比为 10 时的质量浓度为定量限(LOQ)。

根据预实验测得母乳样品中 FSV 的含量范围,在同一母乳中加入低、中、高 3 个不同质量浓度水平(3.13、12.5、50 μg/mL)的 FSV 混合标准溶液,按照 1.2.2 方法进行前处理后再按照 1.2.3 方法进行检测,计算加标回收率。

通过对低、中、高 3 个不同质量浓度(3.13、12.5、50 μg/mL)的 FSV 混合标准溶液进行检测,每个样品平行检测 3 次,计算相对标准偏差(RSD)得到日

内精密度,通过对同一样品连续 3 d 检测计算 RSD 得到日间精密度(RSD 越小,精密度越高),同时计算方法的日内准确度与日间准确度(以相对误差衡量准确度,相对误差越小,准确度越高,相对误差 = |测定值 - 算术平均值|/算术平均值 × 100%)。

取 5 mL 母乳样品 6 份,按照 1.2.2 的方法进行前处理,再按 1.2.3 方法进行测定,记录 9 种 FSV 对应的峰面积并对峰面积的 RSD 进行计算,以表征方法的重复性。

取 5 mL 母乳,按照 1.2.2 方法进行前处理,分别于 0、4、8、12、16、20、24 h 按 1.2.3 方法进行测定,记录 9 种 FSV 对应的峰面积并对峰面积的 RSD 进行计算,以表征方法的稳定性。

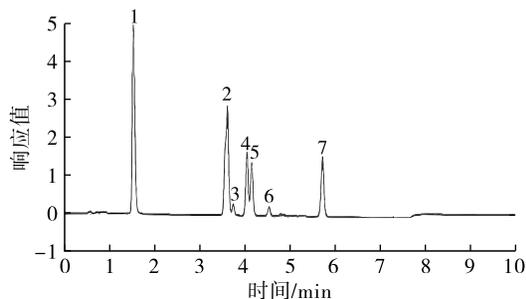
1.2.5 数据分析

使用 MassLynx V4.1 软件分析 UPLC - PDA 收集的测试数据。所有样品平行测定 3 次,结果以“平均值 ± 标准差”表示。采用 IBM SPSS Statistics 21 对数据进行统计分析,分析方法为单因素方差分析法的 Tukey s - b 检验。同时,采用 MetaboAnalyst 进行主成分分析(PCA),采用 GraphPad Prism 8.0 绘制图形。

2 结果与讨论

2.1 FSV 的全波长扫描色谱图

本研究所采用的 StarCore C18 色谱柱为实心核颗粒填料,其窄粒径分布的特点可以显著降低谱带展宽并提高分离效率,其高硅胶表面覆盖率的特点可以有效地减少色谱峰拖尾和次级相互作用,同时不会产生过大反压,从而实现快速分离目标物的目的。图 1 和图 2 分别为 9 种 FSV 混合标准溶液(除 β - T 质量浓度为 5 μg/mL 外,其他均为 10 μg/mL)和母乳中 FSV 全波长扫描色谱图。



注:1. V_A ; 2. $V_{D2} + V_{D3}$; 3. $\delta - T$; 4. V_{K2} ; 5. $\gamma - T + \beta - T$; 6. $\alpha - T$; 7. V_{K1} 。下同

Note: 1. V_A ; 2. $V_{D2} + V_{D3}$; 3. $\delta - T$; 4. V_{K2} ; 5. $\gamma - T + \beta - T$; 6. $\alpha - T$; 7. V_{K1} . The same below

图 1 9 种 FSV 混合标准溶液全波长扫描色谱图
Fig.1 Full wavelength scanning chromatogram of 9 FSV mixed standard solution

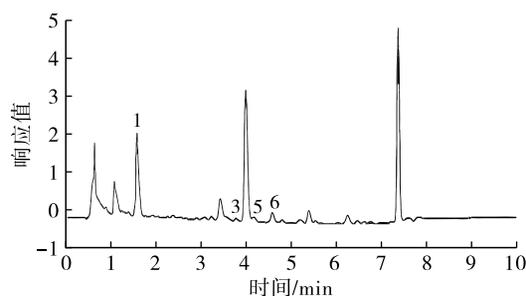


图2 母乳中FSV全波长扫描色谱图

Fig. 2 Full wavelength scanning chromatogram of FSV in human milk

由图1可知,9种FSV并未得到完全有效的分离,其中 V_{D2} 与 V_{D3} 、 $\beta-T$ 与 $\gamma-T$ 没有分开,这是因为 V_{D2} 与 V_{D3} 具有相似的化学结构(V_{D2} 与 V_{D3} 在结构上的唯一区别是 V_{D2} 在22位上有一个双键,在24位上有一个甲基)^[21], $\beta-T$ 和 $\gamma-T$ 的结构相似、极性

接近^[15,22],传统的C18色谱柱难以实现对 V_{D2} 与 V_{D3} 、 $\beta-T$ 与 $\gamma-T$ 的分离。由图1还可知,所测定的FSV的保留时间在6min之内,与洪亮^[18]、陈万勤^[19]等报道的方法相比,本方法将分析时间分别由50min和25min缩短至10min内,同时还增加了对4种生育酚含量的测定。因此,本研究中所采用的检测方法缩短了分离时间,提高了分离效率,适用于大批量样品上机检测。

由图2可知,在母乳中检测到5种FSV,分别为 V_A 、 $\delta-T$ 、 $\gamma-T$ 、 $\beta-T$ 和 $\alpha-T$ 。 V_D 和 V_K 由于在母乳中含量较低未出现对应的紫外吸收峰。

2.2 方法学验证

2.2.1 线性方程、检出限、定量限和加标回收率

按1.2.4方法得到FSV标准曲线回归方程、LOD、LOQ和加标回收率,结果如表1所示。

表1 FSV的线性方程、 R^2 、LOD、LOQ和加标回收率

Table 1 Linear equation, R^2 , LOD, LOQ and spiked recovery rate of FSV

FSV	LOD/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LOQ/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	线性方程	R^2	线性范围/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	加标回收率/%		
						低浓度	中浓度	高浓度
V_A	0.01	0.09	$y = 571.980x + 123.760$	0.9997	0.03 ~ 50	97.33	83.64	80.69
$V_{D2} + V_{D3}$	0.03	0.20	$y = 368.200x + 119.850$	0.9994	0.05 ~ 50	91.77	85.09	83.07
$\delta-T$	0.40	1.38	$y = 26.813x - 2.182$	0.9999	0.80 ~ 100	111.66	86.64	82.19
V_{K2}	0.05	0.23	$y = 189.750x + 62.712$	0.9997	0.05 ~ 50	-	-	67.25
$\gamma-T + \beta-T$	0.10	0.34	$y = 60.950x + 29.440$	0.9998	0.40 ~ 100	86.13	97.53	104.41
$\alpha-T$	0.30	1.06	$y = 32.879x + 4.406$	0.9999	0.80 ~ 100	83.12	87.48	82.52
V_{K1}	0.05	0.24	$y = 174.970x + 41.541$	0.9994	0.05 ~ 50	63.58	40.24	57.44

由表1可知,几种FSV标准曲线回归方程的 R^2 均大于0.999,说明标准曲线回归方程线性关系良好。不同的FSV的LOD和LOQ不同,其中 V_A 的LOD和LOQ均最低,分别为0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和0.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $\delta-T$ 的LOD和LOQ均最高,分别为0.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和1.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。FSV线性范围为0.03 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

由表1还可知,除 V_K 外,其他FSV低、中、高浓度加标水平的回收率范围为80.69% ~ 111.66%,

在80% ~ 120%^[23]之间,表明该方法针对 V_A 、 V_D 、 V_E 3种FSV的加标回收率良好,可满足样品测定分析的需求。 V_K 加标回收率低于80%或未检出可能是 V_K 在强碱性环境下不稳定,高温下容易快速分解所导致的^[2,24]。

2.2.2 精密度与准确度

对FSV标准品溶液的日内和日间精密度、准确度进行测定,结果见表2。

表2 UPLC-PDA方法的精密度与准确度

Table 2 Precision and accuracy of the UPLC-PDA method

FSV	日内精密度			日间精密度			日内准确度			日间准确度		
	低浓度	中浓度	高浓度									
	%											
V_A	1.97	1.40	0.32	2.65	1.44	0.43	1.86	1.21	0.31	2.49	1.32	0.40
$V_{D2} + V_{D3}$	2.20	3.53	0.31	3.20	1.98	0.14	2.08	3.26	0.28	3.02	1.80	0.13
V_{K1}	0.40	1.40	0.53	0.58	1.59	0.64	0.37	1.28	0.49	0.50	1.47	0.56
V_{K2}	1.18	1.40	0.40	1.42	1.42	0.88	1.12	1.16	0.38	1.16	1.40	0.77
$\alpha-T$	0.62	0.71	0.43	0.38	1.50	0.57	0.58	0.65	0.39	0.34	1.40	0.47
$\gamma-T + \beta-T$	0.88	1.53	0.81	1.12	1.62	0.33	0.83	1.44	0.74	1.04	1.52	0.30
$\delta-T$	1.90	1.36	0.21	2.02	0.42	0.70	1.72	1.14	0.20	1.91	0.40	0.66

由表2可知,FSV精密度的计算结果不大于3.53%,准确度的结果不大于3.26%,说明所建立的检测方法能够满足对FSV定量分析的要求。

2.2.3 重复性

按1.2.4的方法检验检测方法的重复性,结果表明,除 $V_{D2} + V_{D3}$ 、 V_{K1} 和 V_{K2} 的含量由于低于LOD未检出外, V_A 、 $\alpha - T$ 、 $\gamma - T + \beta - T$ 和 $\delta - T$ 峰面积的RSD分别为1.01%、0.40%、1.23%和2.52%,说明本方法的重复性较好^[15]。

2.2.4 稳定性

按1.2.4的方法检验检测方法的稳定性。结果表明,除 $V_{D2} + V_{D3}$ 、 V_{K1} 和 V_{K2} 的含量由于低于LOD未检出外, V_A 、 $\alpha - T$ 、 $\gamma - T + \beta - T$ 和 $\delta - T$ 峰面积的

RSD分别为0.83%、0.49%、1.06%和4.32%,说明本方法的稳定性较好^[15]。

2.3 母乳、其他哺乳动物乳及配方奶粉中脂溶性维生素的种类与含量

母乳、其他哺乳动物乳及配方奶粉中FSV的含量见表3。

由表3可知,母乳、牛乳1、牛乳2、羊乳、驴乳及配方奶粉中 $\alpha - T$ 含量最高, $\gamma - T + \beta - T$ 在 V_E 中的总含量仅次于 $\alpha - T$,而 $\delta - T$ 在 V_E 中的含量较低。本研究中,除羊乳中 V_A 含量(31.53 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$)明显低于报道范围(50 ~ 68 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$)^[25]外,其他哺乳动物乳中 V_A 和 V_E 含量与报道范围^[25]基本一致。

表3 母乳、其他哺乳动物乳和配方奶粉中FSV含量

Table 3 FSV content in human milk, other mammalian milks and infant formula $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$

样品	V_A	$V_{D2} + V_{D3}$	V_E		
			$\alpha - T$	$\gamma - T + \beta - T$	$\delta - T$
母乳	28.08 \pm 0.13 ^d	-	89.16 \pm 1.01 ^d	19.57 \pm 0.48 ^d	4.28 \pm 0.25 ^c
牛乳1	19.12 \pm 0.90 ^e	-	41.63 \pm 1.67 ^e	8.15 \pm 0.08 ^f	6.74 \pm 0.38 ^{bc}
牛乳2	20.01 \pm 0.43 ^e	-	22.33 \pm 0.02 ^f	7.67 \pm 0.17 ^f	5.42 \pm 0.67 ^c
羊乳	31.53 \pm 0.37 ^c	-	41.16 \pm 0.47 ^e	11.44 \pm 0.10 ^e	7.20 \pm 0.34 ^{bc}
驴乳	2.28 \pm 0.03 ^f	-	5.83 \pm 0.39 ^e	4.44 \pm 0.60 ^e	0.88 \pm 0.04 ^d
IF1	45.84 \pm 0.08 ^a	2.34 \pm 0.07 ^a	550.89 \pm 0.05 ^b	47.40 \pm 0.93 ^b	34.02 \pm 0.07 ^a
IF2	43.97 \pm 0.26 ^b	1.26 \pm 0.12 ^c	699.79 \pm 4.73 ^a	75.77 \pm 0.05 ^a	37.00 \pm 4.88 ^a
IF3	44.87 \pm 0.66 ^b	1.66 \pm 0.18 ^b	489.19 \pm 1.07 ^c	40.61 \pm 1.40 ^c	9.18 \pm 0.06 ^b

注:同列不同字母表示差异显著($p < 0.05$)

Note: Different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$)

本研究结果显示,母乳中 V_A 含量为28.08 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ 。贾宏信等^[26]对全球范围内母乳中 V_A 含量调查发现,成熟乳阶段 V_A 平均含量为178 ~ 825 $\mu\text{g}/\text{L}$;Zhang等^[27]通过对已报道的母乳不同泌乳阶段内 V_A 含量进行汇总发现,成熟乳阶段 V_A 平均含量范围为254.7 ~ 402.4 $\mu\text{g}/\text{L}$,均与本研究测得的结果一致。在本研究中,配方奶粉(IF)的 V_A 含量(43.97 ~ 45.84 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$)最高,且IF2与IF3的 V_A 含量差异不显著($p > 0.05$)。4种动物乳中羊乳的 V_A 含量(31.53 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$)最高,驴乳的 V_A 含量(2.28 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$)最低,牛乳1和牛乳2的 V_A 含量居中,且两者无明显差异($p > 0.05$)。母乳的 V_A 含量介于羊乳和牛乳之间,且三者间具有显著差异($p < 0.05$)。

本研究中,3种配方奶粉IF1、IF2、IF3中 V_D 的含量分别为2.34、1.26、1.66 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$,而母乳与其他哺乳动物乳中 V_D 含量由于低于本方法的LOD而未检出。3种品牌配方奶粉的 V_D 含量具有显著

差异($p < 0.05$),可能与生产厂家的 V_D 添加量不同有关。

本研究中,母乳的 $\alpha - T$ 、 $\gamma - T + \beta - T$ 和 $\delta - T$ 含量分别为89.16、19.57、4.28 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ 。娄泽如等^[28]对我国6个地区成熟母乳中 V_E 含量进行研究,发现,成熟乳中 $\alpha - T$ 、 $\gamma - T$ 和 $\delta - T$ 含量范围分别为0.05 ~ 11.02 mg/L、0.05 ~ 4.57 mg/L和0.00 ~ 1.36 mg/L,这与本研究结果基本一致。Wei等^[29]测定了我国103名健康母亲母乳样本中生育酚的含量,结果显示,成熟乳中 $\alpha - T$ 、 $\gamma - T$ 、 $\beta - T$ 和 $\delta - T$ 含量范围分别为1.3 ~ 6.5 mg/L、0.1 ~ 0.8 mg/L、0.0 ~ 0.2 mg/L和0.1 ~ 0.3 mg/L,与其相比,本研究测得的母乳中的 $\alpha - T$ 和 $\delta - T$ 的含量偏低,可能是采集样本间的个体差异以及地理位置、饮食习惯等不同导致的。在本研究中,同一样品4种生育酚含量大小均为 $\alpha - T > \gamma - T + \beta - T > \delta - T$,这与之前相关报道^[30-33]的结果一致。母乳及其他哺乳动物乳中4种生育酚含量均低于配方奶粉的,IF2中

的 V_E 含量远高于 IF3 的,说明 IF3 中 V_E 添加量较少。母乳中 $\alpha-T$ 和 $\gamma-T+\beta-T$ 的含量均高于其他 4 种哺乳动物乳的,但 $\delta-T$ 含量与牛乳和羊乳的没有显著差异 ($p > 0.05$),但显著高于驴乳的 ($p < 0.05$)。驴乳中 4 种生育酚的含量均最低,这可能是产地和饲养条件等因素影响导致的,还需要收集更多来自不同地区和不同饲养方式下的样本数据进一步验证。

2.4 母乳、其他哺乳动物乳及配方奶粉中 FSV 含量的 PCA

从 2.3 的分析中可以看出母乳、其他哺乳动物乳及配方奶粉在 FSV 含量上存在明显差异,为了更加直观地反映三者之间 FSV 含量的关系,对不同样品中 FSV 含量进行 PCA,结果如图 3 所示。

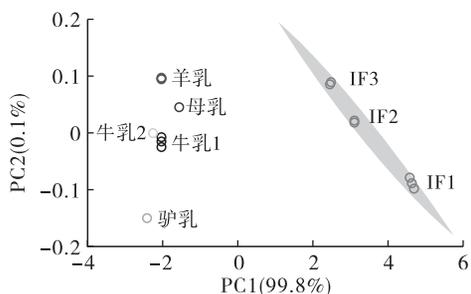


图 3 母乳、其他哺乳动物乳及配方奶粉中 FSV 的 PCA 得分图

Fig. 3 PCA of FSV in human milk, other mammalian milks and infant formula

由图 3 可知,母乳、牛乳、羊乳、驴乳及配方奶粉明显分布在不同的区域,母乳与其他哺乳动物乳(尤其是羊乳)中 FSV 的组成和含量相比于配方奶粉更加接近。牛乳 1 和牛乳 2 部分重叠,可见它们的 FSV 组成和含量比较接近。不同品牌配方奶粉间 FSV 的组成和含量也存在差异,这种差异主要取决于不同品牌对于 FSV 添加量的设计需求。

3 结论

本研究建立了 UPLC-PDA 方法对母乳中 FSV 进行分析,该方法能够在一次分析中分离出多种 FSV (V_A 、 V_D 、 V_E 和 V_K),各 FSV 标准曲线回归方程均具有良好的线性关系 ($R^2 \geq 0.9994$), LOD 和 LOQ 范围分别为 $0.01 \sim 0.40 \mu\text{g/mL}$ 和 $0.09 \sim 1.38 \mu\text{g/mL}$,精密度的 RSD 不大于 3.53%,准确度的相对误差不大于 3.26%,除 V_K 受到碱法前处理影响导致加标回收率偏低外,其他 FSV 的加标回收率范围(80.69% ~ 111.66%)均处于良好水平。应用 UPLC-PDA 方法检测了母乳及其他哺乳动物乳中多种 FSV 的含量,并与市售的配方奶粉进行对比,

发现母乳中 V_A 含量介于牛乳与羊乳之间,母乳中 V_E 含量高于其他哺乳动物乳,但明显低于配方奶粉,母乳及其他哺乳动物乳中未检出 V_D 。PCA 结果显示,相较于配方奶粉,其他哺乳动物乳(尤其是羊乳)和母乳中 FSV 的组成和含量相近。综上,所建立的 UPLC-PDA 方法可用于母乳、其他哺乳动物乳和配方奶粉中 FSV 的定量检测。另外,本研究分析的母乳均为成熟乳,样本量较少,后续可利用此方法对不同哺乳阶段、地区的母乳和更多的配方奶粉样品进行分析,以为帮助哺乳期的母亲及婴儿制定合理的维生素补充摄入方案提供理论支持。

参考文献:

- [1] 王震, 孙利东, 乔健敏, 等. 蒙古族传统奶酪中 8 种脂溶性维生素和 β -胡萝卜素高效液相色谱检测方法的建立[J]. 畜牧与饲料科学, 2023, 44(1): 97-104.
- [2] FANALI C, D'ORAZIO G, FANALI S, et al. Advanced analytical techniques for fat-soluble vitamin analysis[J]. Trac Trends Anal Chem, 2017, 87: 82-97.
- [3] BJERKE D L, LI R, PRICE J M, et al. The vitamin A ester retinyl propionate has a unique metabolic profile and higher retinoid-related bioactivity over retinol and retinyl palmitate in human skin models[J]. Exp Dermatol, 2021, 30(2): 226-236.
- [4] GHEORGHE D C, STEFAN-VAN STADEN R I, VAN STADEN J K F. Mini-review: Electrochemical sensors used for the determination of water- and fat-soluble vitamins: B, D, K[J]. Crit Rev Anal Chem, 2024, 54(1): 1-10.
- [5] 赵晓童, 李晓敏. 乳制品中脂溶性维生素检测的前处理方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(21): 6876-6881.
- [6] SAINI R K, KEUM Y S. Tocopherols and tocotrienols in plants and their products: A review on methods of extraction, chromatographic separation, and detection[J]. Food Res Int, 2016, 82: 59-70.
- [7] FRANSSON G B, AGARWAL K N, GEBRE-MEDHIN M, et al. Increased breast milk iron in severe maternal anemia: Physiological "trapping" or leakage? [J]. Acta Paediatr, 1985, 74(2): 290-291.
- [8] AHMAD S M, HOSSAIN M I, BERGMAN P, et al. The effect of postpartum vitamin A supplementation on breast milk immune regulators and infant immune functions: Study protocol of a randomized, controlled trial [J/OL]. Trials, 2015, 16: 129 [2024-03-14]. <https://doi.org/10.1186/s13063-015-0654-9>.
- [9] INNIS S M. Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants[J]. Am J Clin Nutr, 2014, 99(3): 734S-741S.

- [10] KEIKHA M, BAHREYNIAN M, SALEKI M, et al. Macro- and micronutrients of human milk composition: Are they related to maternal diet? A comprehensive systematic review[J]. *Breastfeed Med*, 2017, 12(9): 517-527.
- [11] KODENTSOVA V M, VRZHESINSKAYA O A. Evaluation of the vitamin status in nursing women by vitamin content in breast milk[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2006, 141(3): 323-327.
- [12] ORTEGA R M, LÓPEZ-SOBALER A M, MARTÍNEZ R M, et al. Influence of smoking on vitamin E status during the third trimester of pregnancy and on breast-milk tocopherol concentrations in Spanish women[J]. *Am J Clin Nutr*, 1998, 68(3): 662-667.
- [13] JENSEN R G. Lipids in human milk[J]. *Lipids*, 1999, 34(12): 1243-1271.
- [14] 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: 广东药科大学, 2017.
- [15] 彭熾雯, 王波, 刘阿静, 等. 超高效合相色谱(UPC²)技术快速测定植物油中的维生素 A 和维生素 E[J]. *中国油脂*, 2022, 47(1): 147-152.
- [16] 武利梅, 吴丽华, 赵晶晶, 等. 反向高效液相色谱法同时测定植物油中 8 种维生素 E 异构体[J]. *中国油脂*, 2022, 47(10): 124-129.
- [17] 朱琳. 超临界流体色谱在药物分析中的研究进展[J]. *药学研究*, 2020, 39(8): 484-487.
- [18] 洪亮, 陈治明, 张权, 等. 无需皂化-高效液相色谱法同时测定牛奶中维生素 A、D 和 E[J]. *食品工业*, 2014, 35(12): 258-261.
- [19] 陈万勤, 王瑾, 黄丽英, 等. 高效液相色谱法同时测定配方乳粉中 7 种脂溶性维生素[J]. *分析科学学报*, 2013, 29(1): 109-112.
- [20] ALALI F, AMAYREH M, MASSADEH A, et al. Determination of fat-soluble vitamins A, D₃, and E in infant formula and milk powder using high-performance liquid chromatography with photodiode array detection: Jordan market as a case study[J]. *Iran J Chem Chem Eng*, 2020, 39(4): 173-181.
- [21] 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.
- [22] 张瑜, 王雪妍, 汪雪芳, 等. 高效液相色谱法测定植物油料油脂中生育酚含量[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(12): 243-248.
- [23] 王春, 杜希萍, 姜泽东, 等. 法夫酵母虾青素高效液相色谱分析前处理方法改进研究[J]. *分析科学学报*, 2018, 34(3): 352-356.
- [24] GENTILI A, MICCHELI A, TOMAI P, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of vitamin K homologues in human milk after overnight cold saponification[J]. *J Food Compos Anal*, 2016, 47: 21-30.
- [25] CLAEYS W L, VERRAES C, CARDOEN S, et al. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits[J]. *Food Control*, 2014, 42: 188-201.
- [26] 贾宏信, 苏米亚, 陈文亮, 等. 母乳中 V_A 与婴幼儿健康研究进展[J]. *乳业科学与技术*, 2022, 45(5): 38-43.
- [27] ZHANG H, REN X, YANG Z, et al. Vitamin A concentration in human milk: A meta-analysis [J/OL]. *Nutrients*, 2022, 14(22): 4844 [2024-03-14]. <https://doi.org/10.3390/nu14224844>.
- [28] 姜泽如, 吴轲, 徐祎紫, 等. 2018—2019 年中国六地区成熟母乳中维生素 E 含量及组成[J]. *卫生研究*, 2021, 50(6): 914-918.
- [29] WEI W, YANG J, XIA Y, et al. Tocopherols in human milk: Change during lactation, stability during frozen storage, and impact of maternal diet[J]. *Int Dairy J*, 2018, 84: 1-5.
- [30] 贾宏信, 苏米亚, 陈文亮, 等. 母乳中的维生素 E 与婴幼儿健康研究进展[J]. *中国乳品工业*, 2023, 51(4): 35-40.
- [31] GORTZI O, MALISSIOVA E, KATSOULIS K, et al. Comparative analysis of fatty acid profile and fat-soluble vitamin content in sheep and goat milk of organic and conventional origin[J]. *Appl Sci - Basel*, 2022, 12(6): 1-13.
- [32] DUAN B, SO H J, SHIN J A, et al. Different content of cholesterol, retinol, and tocopherols in human milk according to its fat content[J]. *Eur Food Res Technol*, 2021, 247(5): 1307-1318.
- [33] WU K, ZHU J, ZHOU L, et al. Lactational changes of fatty acids and fat-soluble antioxidants in human milk from healthy Chinese mothers[J]. *Br J Nutr*, 2020, 123(8): 841-848.