

应用纪要

使用ACQUITY UPLC H-Class系统和 ACQUITY QDa检测器对多种食品基质中的水 溶性维生素进行选择定量测定

Mark E. Benvenuti, Dimple D. Shah, Jennifer A. Burgess

Waters Corporation



摘要

食品制造商和原料供应商需要快速、可靠且经济有效的方法来验证产品一致性和确保产品满足标签所标示的内容。当某些低强化浓度的维生素与复杂的基质相结合时，这会是一项很有挑战性的任务。除此之外，在目前采用的许多方法中，维生素只能单独进行分析或是以小组的形式进行分析。已经建立的方法包括微生物检测法、比色和荧光分析、滴定法和HPLC方法¹。LC-MS将不同的方法结合起来，同时提高了检测器选择性，降低了定量限。为了让实验室能够充分利用质谱检测的优势，并避免采用质谱仪所带来的问题，近期的技术进展都着重于提高仪器可用性和稳定性。这样的动力造就了ACQUITY QDa检测器的面世。在本应用纪要中，使用配备ACQUITY QDa检测器的ACQUITY UPLC H-Class系统对营养保健品和饮料样品中的12种水溶性维生素(WSV)进行了分析。

优势

- 质谱检测的选择性可确保准确检测出低水平的维生素，并且样品制备方案更加简单，只需对样品提取物进行稀释即可。
- ACQUITY QDa质谱检测器是为了与UPLC和UHPLC系统结合使用而设计，它可在紫外光谱区进行稳定可靠的正交检测，让新用户能够快速利用质谱检测的更多选择性。
- ACQUITY QDa质谱检测器可结合到现有的液相色谱工作流程中，与其他LC检测器相比，极大地提升了速度和选择性。

简介

通常，许多食品和饮料产品都要进行维生素强化以提高它们的营养价值，并帮助弥补膳食需求中维生素的缺乏。为了满足法律要求，生产商必须遵循其产品销售所在国家法规给产品贴上标签。这些法规的例子包括欧盟委员会(EC) 1925/2006关于添加维生素和矿物质的规定，以及美国联邦法规(C.F.R.) 21章第101款关于美国食品标签的规定。

食品制造商和原料供应商需要快速、可靠且经济有效的方法来验证产品一致性和确保产品满足标签所标示的内容。当某些低强化浓度的维生素与复杂的基质相结合时，这会是一项很有挑战性的任务。除此之外，在目前采用的许多方法中，维生素只能单独进行分析或是以小组的形式进行分析。已经建立将不同的方法结合起来，同时提高了检测器选择性，降低了定量限。Waters ACQUITY QDa质谱检测器让实验室能够充分利用质谱检测的优势，同时避免采用质谱仪所带来的问题。

在本应用纪要中，使用配备ACQUITY QDa质谱检测器的ACQUITY UPLC H-Class系统对营养保健品和饮料样品中的12种水溶性维生素(WSV)进行了分析。

实验

表1列出了本研究所涉及的水溶性维生素及它们的保留时间、单离子记录(SIR) m/z 和锥孔电压。

分析物	RT (Min)	SIR m/z	锥孔电压 (V)
抗坏血酸(C)	0.91	177	2
硫胺素(B1)	1.01	265	5
烟酸(B3)	1.27	124	15
吡哆醛(B6)	1.75	168	5
烟酰胺(B3)	2.48	123	15
吡哆醇(B6)	2.50	170	10
泛酸钙(B5)	5.88	242	15
氰钴胺(B12)	7.17	678	2
叶酸(B9)	7.22	442	5
核黄素磷酸钠	7.35	457	5
生物素(B7)	7.50	245	10
核黄素(B2)	7.74	377	15

表1.水溶性维生素的保留时间、SIR通道和锥孔电压。

标准品	各种B族维生素 (mg/L)	维生素C (mg/L)
1	1.00	50.0
2	0.75	37.5
3	0.50	25.0
4	0.25	12.5
5	0.10	5.0
6	0.075	3.75
7	0.050	2.5
8	0.025	1.25
9	0.010	0.5
10	0.005	0.25
11	0.001	0.05

表2. B族维生素和维生素C的标准品浓度。

标准品制备

预备1 mg/mL的各个水溶性维生素标准储备水溶液。对于维生素B2、B7和B9，加入200 μ L 1 N NaOH进行溶解。将维生素C溶解在低pH的醋酸盐缓冲液中以提高其稳定性。使用这些单独的储液制成混合储液，具体操作为加入1.25 mL维生素C储液以及其他储液各0.025 mL，然后用水稀释至25 mL。将此混合储液（50 ppm维生素C，1 ppm其他分析物）进一步稀释，得到表2所列出的11种校准标准品。

样品制备

将一包(8.50 g)粉末状维生素饮料溶解在100 mL水中，然后使用0.2 μ m PVDF滤膜进行过滤。接下来，将此样品进一步稀释至两个水平：1:250和1:10。将这三个稀释水平的样品进样，以涵盖此样品的不同维生素浓度。

用研钵将复合维生素补充片剂进行研磨。将所得的粉末(1.34 g)定量转移至装有100 mL水的烧杯中。将此混合物超声处理15 min后进行搅拌，然后使用0.2 μ m PVDF滤膜过滤。用水将此样品进一步稀释至三个水平：1:1000、1:100和1:20。对这些稀释液和初始片剂溶液（未稀释）进行分析，以涵盖此样品的不同维生素浓度。

通过用水以1:20的比例进行稀释，并使用0.2 μ m PVDF滤膜过滤，制成两种不同的维生素水样品。

UPLC条件

UPLC系统:	ACQUITY UPLC H-Class
运行时间:	17.5 min
色谱柱:	ACQUITY UPLC HSS T3, 1.8 μm , 2.1 x 100 mm
柱温:	30 $^{\circ}\text{C}$
流动相A:	10 mM甲酸铵, 0.1%甲酸的水溶液
流动相B:	10 mM甲酸铵, 0.1%甲酸的甲醇溶液
进样体积:	5 μL

梯度

	时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B
1.	初始	0.45	99	1
2.	3.0	0.45	99	1
3.	3.1	0.45	95	5
4.	5.1	0.45	80	20
5.	7.1	0.45	2	98
6.	9.0	0.45	2	98
7.	9.1	0.45	99	1
8.	17.5	0.45	99	1

表3.水溶性维生素的UPLC分离梯度。

检测器条件

检测器1:	ACQUITY UPLC PDA
波长:	扫描210至400 nm；模拟通道为270 nm
扫描速率:	10点/秒
检测器2:	ACQUITY QDa
电离模式:	ESI+
运行时间:	8.0 min

探头温度：	600 °C
毛细管电压：	0.8 kV
质量数范围：	<i>m/z</i> 50至800(质心)并选择SIR*
采样频率：	5 Hz
锥孔电压：	全扫描数据：15 V
	*有关各个SIR通道的锥孔电压，请参见表1。
	SIR <i>m/z</i> 的分配基于先前的研究结果 ² 。

结果与讨论

图1显示了本研究中使用的全部12种水溶性维生素的叠加色谱图，所有化合物都在8分钟内被洗脱。这种方法产生了两对共洗脱物（约2.5分钟处的烟酰胺和吡哆醇，以及约7.25分钟处的氰钴胺和叶酸）。使用质谱检测技术意味着不再需要确保所有分析物都实现基线分离。质谱检测的区分能力意味着可以通过质荷比(*m/z*)对这些化合物进行准确测量。这一点在图2中进行了证明，图2显示了所选维生素的线性情况，包括共洗脱的维生素。图2D和2F分别显示了叶酸(*m/z* 442)和氰钴胺(*m/z* 678)的校准曲线。质谱检测的选择性意味着，即使这些化合物发生了共洗脱，也可以对它们进行定量测定。图2还展示了使用UV难以分析的维生素的校准曲线示例。例如，采用UV检测技术时，生物素（图2A）和泛酸钙（图2H）的响应浓度较低。为了获得足够灵敏的响应，通常在低波长范围内对这些化合物进行分析³。在这种低波长范围内，分析的特异性可能会受到影响。质谱检测确保了分析的特异性和灵敏度。

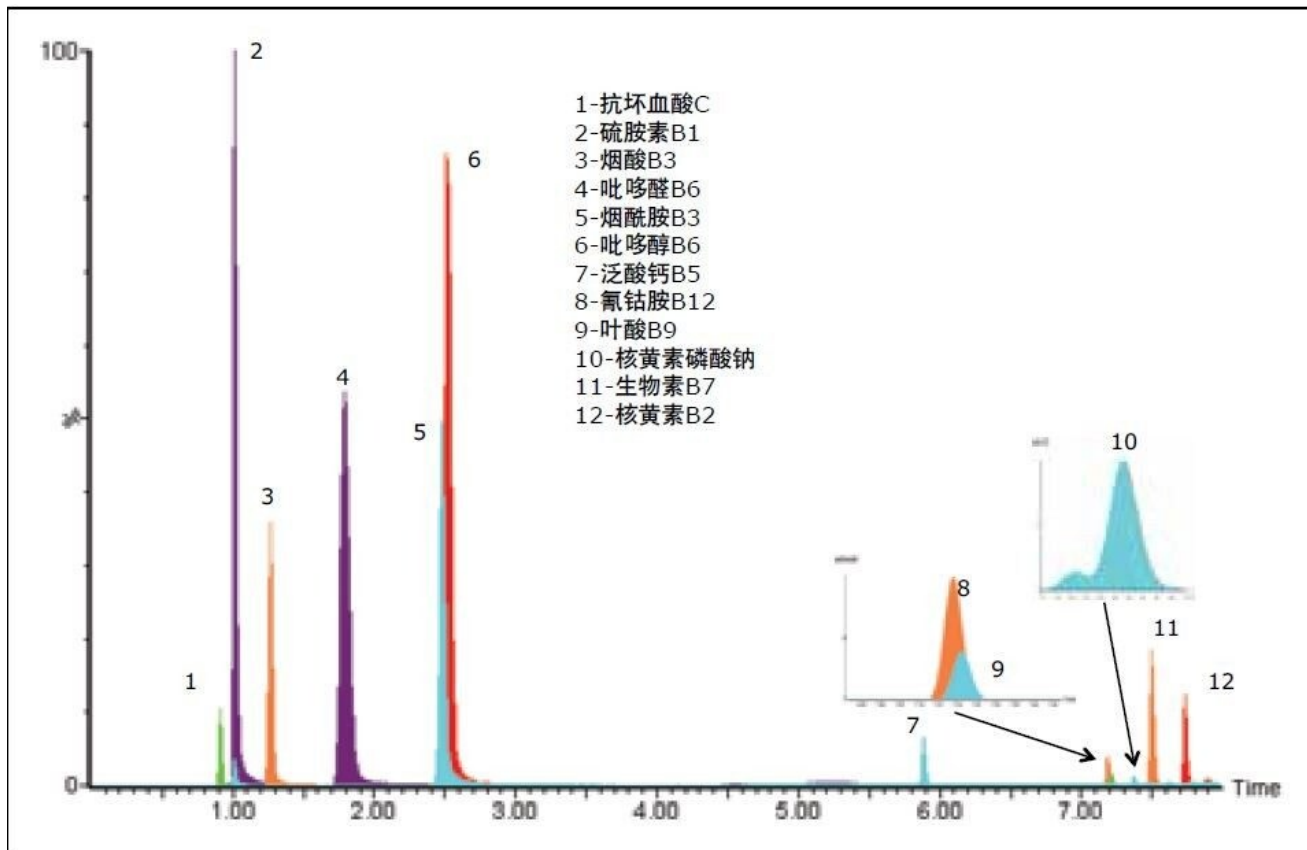


图1.在8分钟内分离的12种水溶性维生素的SIR叠加色谱图。

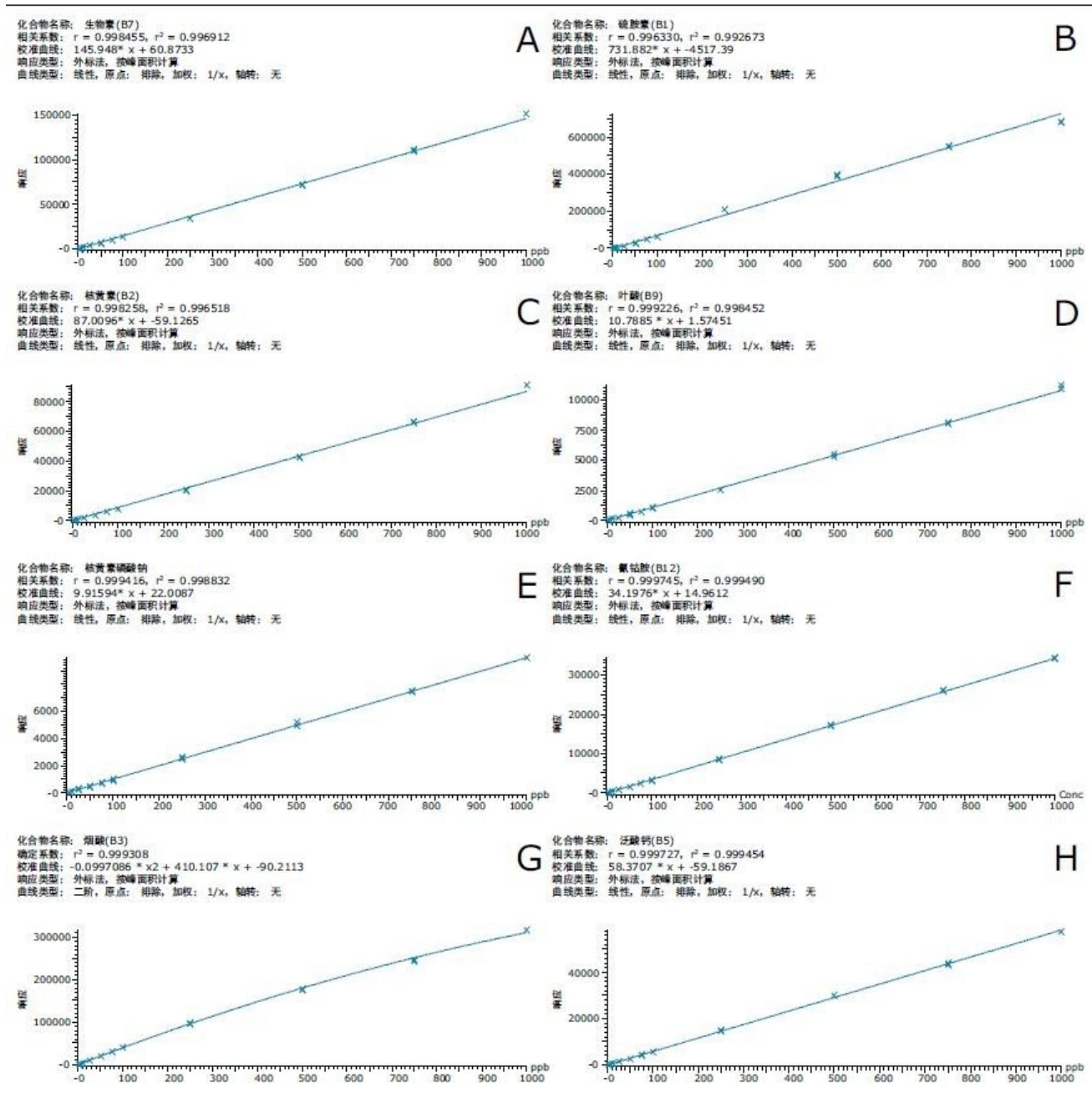


图2.所选水溶性维生素的校准曲线。

质谱检测可实现比UV检测更低的维生素检出限。图3显示了维生素吡哆醇、吡哆醛、烟酸和烟酰胺在5 ppb (5 μ g/L)浓度下的SIR色谱图以及UV色谱图 (图3A, 270 nm)。如图3A所示, 在此浓度下, 无法通过UV检测出维生

素。质谱检测可达到更低的定量限，这对于在低浓度水平下定量维生素是非常重要的。改善的灵敏度还有助于应对由于稀释样品提取物而引入的多种基质。在本研究中，分析维生素补充剂和饮料时仅对样品进行了稀释（对于片剂，首先需要进行研磨）。

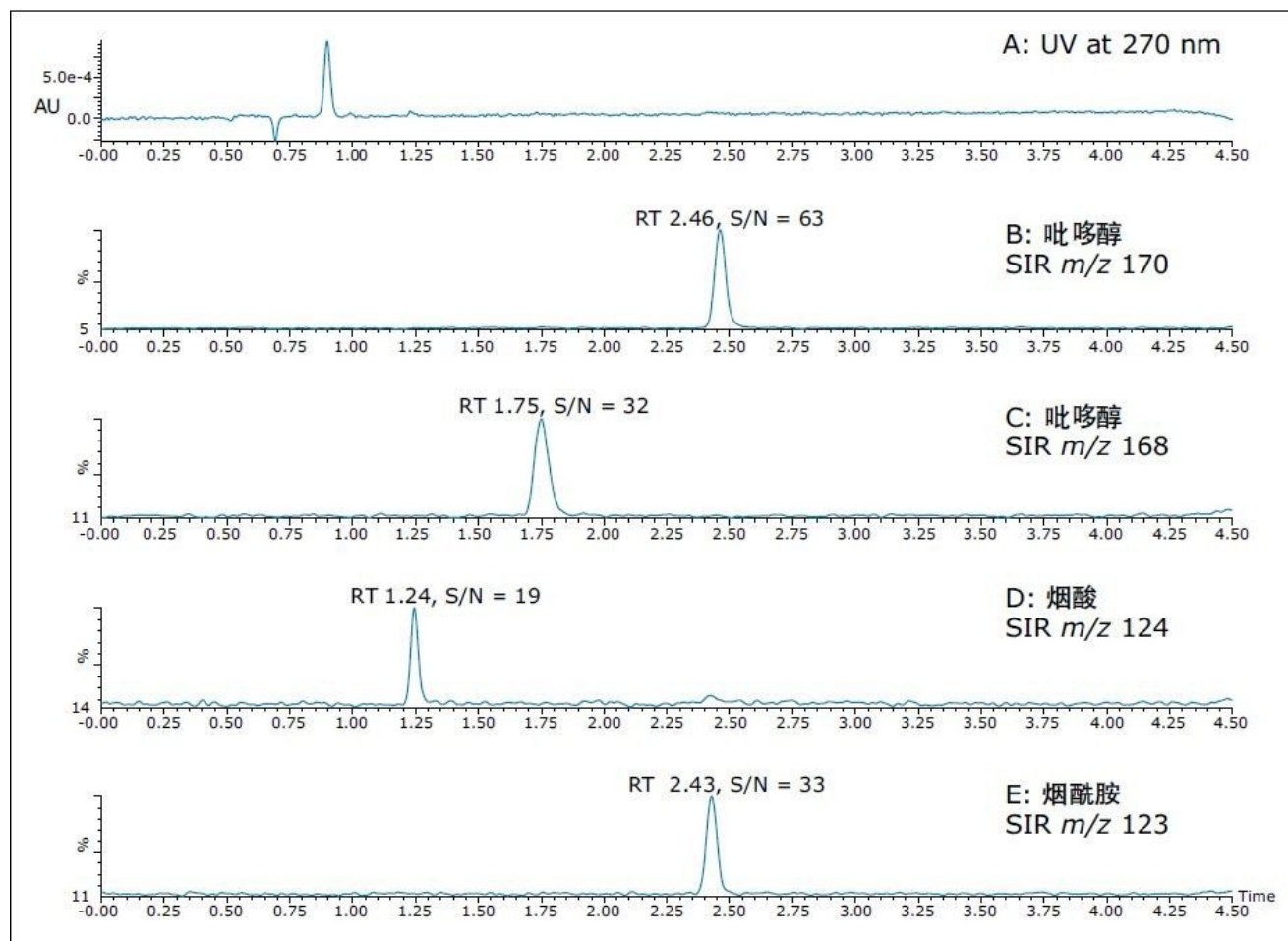


图3.5 $5\mu\text{g/L}$ 维生素混合标准品的270 nm UV色谱图及SIR色谱图。图中展示了四种维生素的SIR通道。B: 吡哆醇；C: 吡哆醛；D: 烟酸；D: 烟酰胺。

图4显示了两种维生素水样品中维生素B5（泛酸钙）的检测结果。如UV色谱图所示，这种维生素若不进行额外的样品制备处理，便无法通过UV检测出来。维生素B1（硫胺素）也是一种使用UV很难被检测出来的维生素。图5显示了一种粉末状维生素饮料稀释后的维生素B1和维生素C（抗坏血酸）检测结果示例。虽然UV色谱图检测出了维生素C，但维生素B1未被检出。然而，使用SIR方法通过ACQUITY QDa检测器则可以明确地检测出维生素B1，如图5A所示。

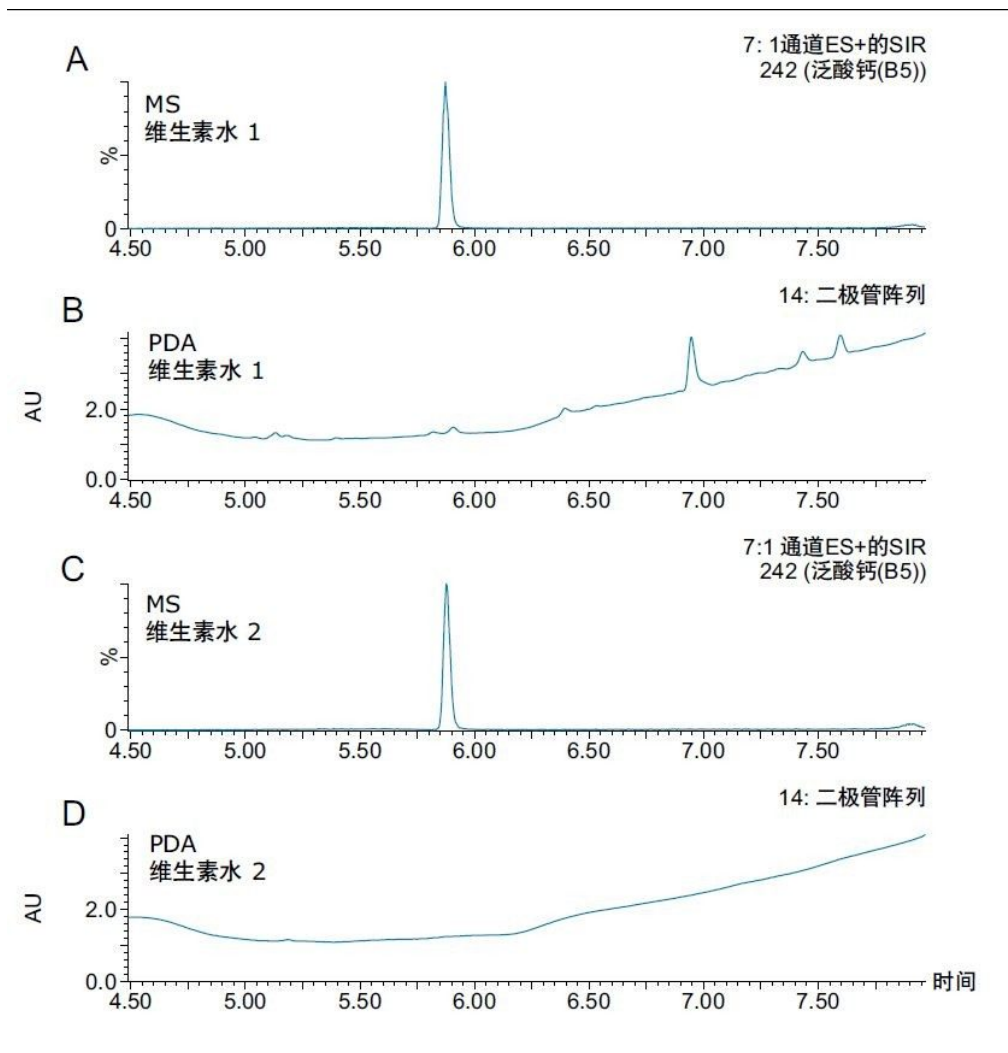


图4.两种不同的维生素水样品中维生素B5的检测结果。使用质谱检测时，5.9分钟处的峰显示出良好的信噪比（A和C），而使用UV则无法检出（B和D）。

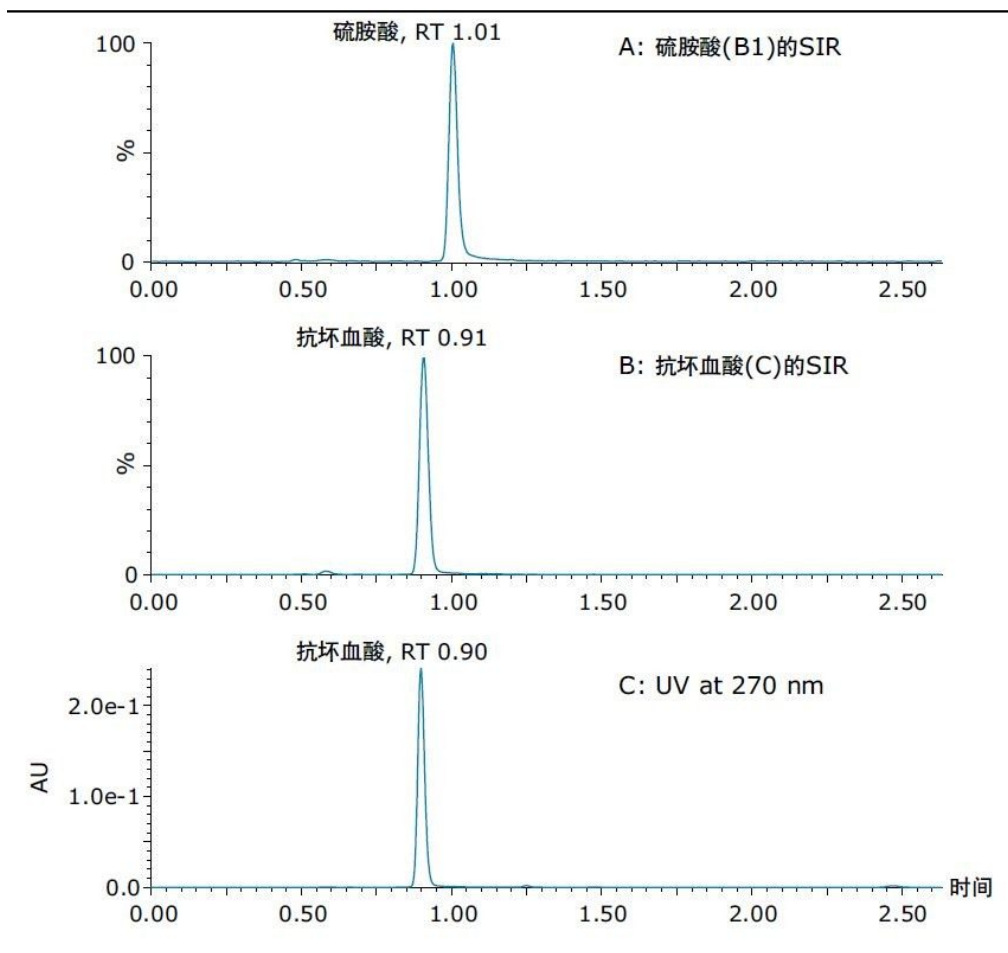


图5.粉末状维生素饮料的1:250稀释液的色谱图。A: 维生素B1 (硫胺素) 的SIR, B: 维生素C (抗坏血酸) 的SIR, C: UV, 270nm; 在UV迹线中测出了维生素C, 而维生素B1未通过UV被检测到。

氰钴胺是一种水溶性维生素，它在补充剂和食品中的添加水平很低，过去需要用单独的方法对其进行定量。二维色谱是检测这种维生素的一种常用手段⁴。图6显示了使用本文所述UPLC-MS方法检测复合维生素补充剂中的氰钴胺的一个例子。在此浓度下，UV色谱图上没有出现明显的峰（图6B）。质谱检测可以使用与检测其他强化浓度高得多的维生素一样的方法检测维生素B12。ACQUITY QDa检测器可轻松嵌入到现有的LC工作流程中，这一方法比现有的多维方法更简单易用。

维生素加标浓度范围宽是维生素分析面临的一大挑战。正如本研究中使用的复合维生素补充片剂，标签指示其中B族维生素的含量范围从维生素B12（氰钴胺）的6 μg 到维生素B3（烟酸）的16 mg，其他B族维生素的含量则在此

范围之间。在本研究中，为了应对不同的维生素浓度，以不同的稀释系数对初始提取物进行了稀释，然后使用相同的LC-MS方法对所有维生素进行分析。图7显示了复合维生素片剂的分析色谱图。图7A和7B分别显示了样品的1:100稀释液和未稀释样品中核黄素(B2)的SIR通道。图7C显示了未稀释样品中氰钴胺(B12)的SIR通道。稀释样品未检测到峰（数据未示出）。未稀释样品在270 nm处的UV迹线如图7D所示，该样品的核黄素峰响应良好。核黄素和氰钴胺的定量结果分别为12.5 ppm和41 ppb。这些结果分别对应于补充剂标签所标示含量的96%和68%。虽然本研究并没有验证维生素标示含量，也没有进行回收率研究，但这个简单的研究仍然证实了在表2所列的特定校准范围内使用多重稀释策略的可行性。

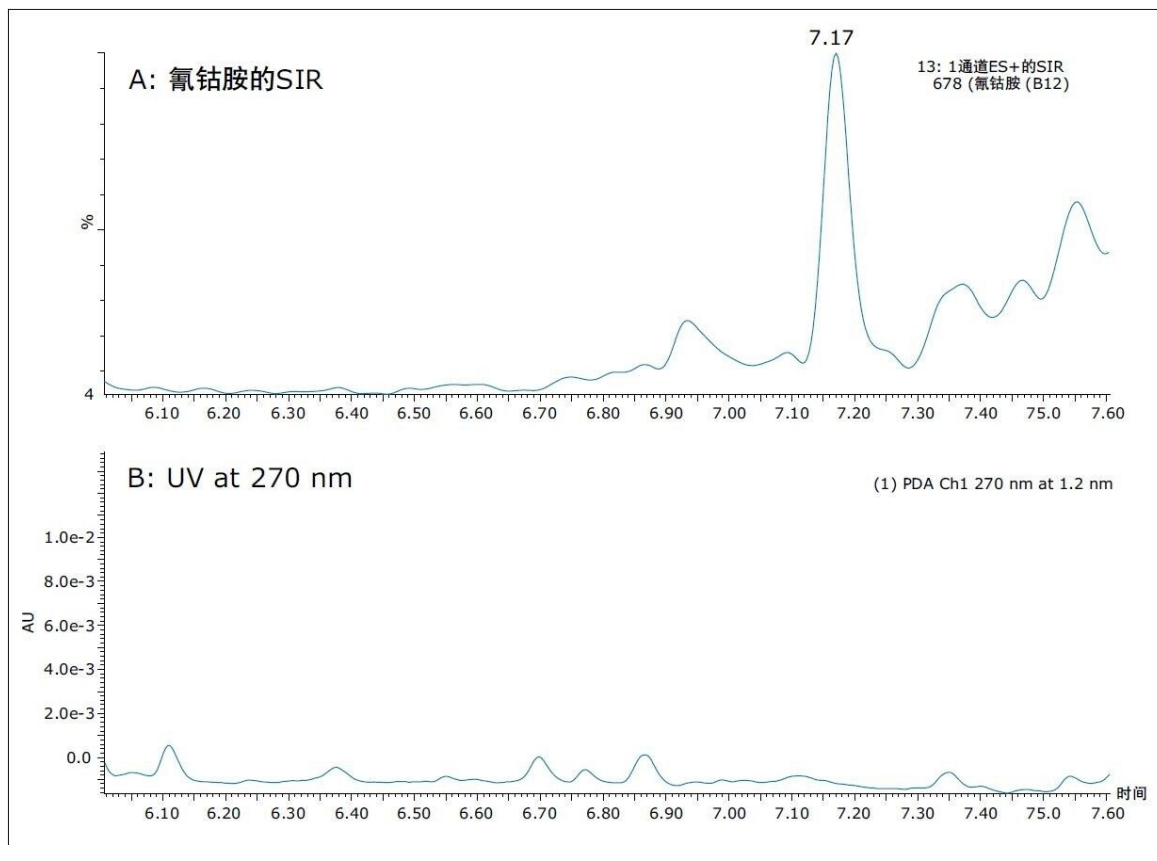


图6.使用质谱检测技术测定一种维生素补充片剂中的维生素B12(A)。维生素浓度低于UV检出限(B)。

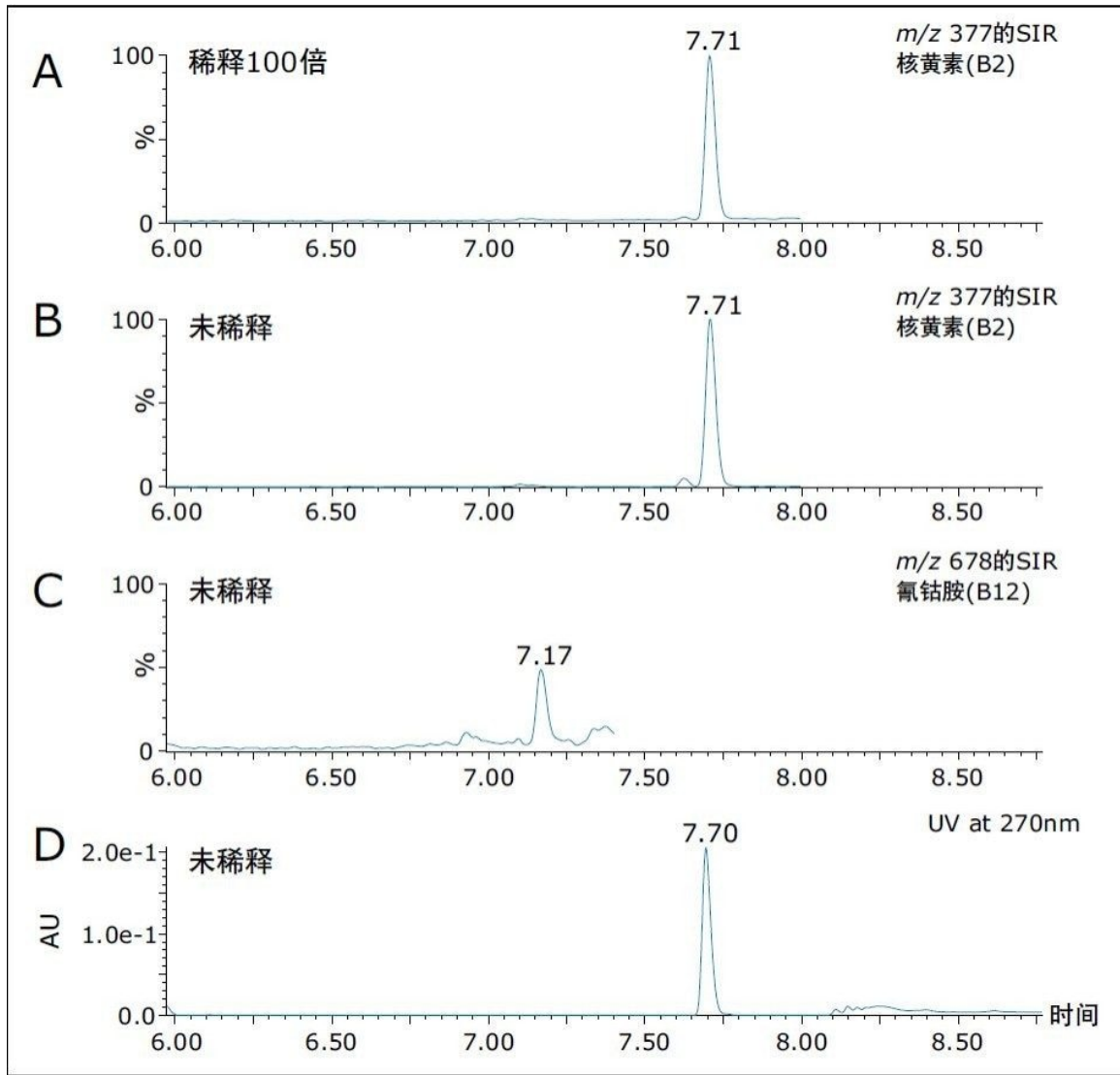


图7.维生素补充剂中两种浓度差异较大的B族维生素的检测结果。在样品提取物的1:100稀释液中可以明确检出核黄素(A)，而维生素B12仅在未稀释的提取物中较为明显(C)。未稀释提取物中核黄素的响应(B)在校准范围之外。在此浓度下，可以使用UV很容易地对它进行检测(D)。

为了评估使用该方法测定B族维生素的重复性，我们对不同浓度维生素的多次进样测定结果进行了评估。保留时间和峰面积的重复性评估结果分别如表4和表5所示。在表4中，合并两种不同标准品的各10次进样，总共为20次进样。结果表现出优异的保留时间稳定性，即使相对早洗脱的水溶性维生素也不例外，所有RSD都不高于0.6%。峰面积重复性通过0.025 mg/L下的10次进样进行评估（表5）。除了叶酸和核黄素磷酸钠这两种上面提到过的响应较低的分析物，大多数维生素的RSD%都远低于10%。众所周知，维生素C会随着时间的推移而降解，因此该研究

排除了维生素C。

分析物	保留时间的%RSD
硫胺素(B1)	0.6
烟酸(B3)	0.19
吡哆醛(B6)	0.23
烟酰胺(B3)	0.22
吡哆醇(B6)	0.26
泛酸钙(B5)	0.04
氰钴胺(B12)	0.03
叶酸(B9)	0.03
核黄素磷酸钠	0.03
生物素(B7)	0.02
核黄素(B2)	0.03

表4.使用两种不同标准品进样20次（0.75 mg/L和0.025 mg/L各10次）的保留时间重复性。

分析物	峰面积的%RSD
硫胺素(B1)	6.78
烟酸(B3)	2.35
吡哆醛(B6)	2.62
烟酰胺(B3)	2.24
吡哆醇(B6)	2.65
泛酸钙(B5)	4.60
氰钴胺(B12)	7.00
叶酸(B9)	11.53
核黄素磷酸钠	14.29
生物素(B7)	2.77
核黄素(B2)	2.28

表5.0.025 mg/L混合标准品10次进样的B族维生素峰面积重复性。

结论

本研究表明，ACQUITY QDa检测器可在UV无法检出的浓度水平对水溶性维生素进行准确定量。SIR通道的采集实现了分析物的高灵敏度和高选择性定量，即使在发生共洗脱的情况下也不例外。此方法无需确保所有分析物都实现基线分离，便可实现低浓度维生素的检测。

ACQUITY QDa检测器让新用户能够：

- 定量分析UV响应很小或没有UV响应的分析物。
- 对发生共洗脱但质量数不同的化合物进行选择定量分析。
- 将水溶性维生素检测方法与单一的LC-MS方法相结合。
- 降低定量限以评估更简单的样品制备策略。

- 轻松集成到现有的LC工作流程中，并且可选择通过Empower 3 CDS或MassLynx MS软件进行控制。
- 可快速利用ACQUITY QDa的质谱检测功能，不需具备专业的质谱知识。

参考文献

1. G F M Ball (Editor).*Bioavailabilty and Analysis of Vitamins in Foods*.Chapman and Hall.(1998).Chapter 2, pp.33.
2. E Riches.The Rapid Simultaneous Analysis of 12 Water Soluble Vitamin Compounds.Waters Application Note No.720003052en, June, 2009.
3. Heudi et al.Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase high performance liquid chromatography with ultra-violet detection: Application to polyvitaminated premixes.*J Chrom A*. (2005) 1070: 49–56, pp.51.
4. AOAC Method 2011.09: Vitamin B12.

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class系统 <<https://www.waters.com/10138533>>

ACQUITY QDa质谱检测器 <<https://www.waters.com/134761404>>

可在线购买：

ACQUITY UPLC HSS T3, 1.8 μ m, 2.1 mm X 100 mm色谱柱 <
<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186003539>>

720004960ZH, 2016年11月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)