

快速分析婴幼儿配方奶粉中标准添加的水溶性维生素

Evelyn Goh
Waters Pacific, Singapore

应用优势

此方法可同时分析12种水溶性维生素:

- 替代耗时的单一化合物微生物测定法。
- 在复杂基质中如婴幼儿配方奶粉里检测低浓度目标物(尤其是维生素 B₁₂)。
- 一次分析便可同时获得MRM和全扫描数据。

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC® 系统

Xevo® TQ MS

MassLynx™ 软件

TargetLynx™ 应用软件

IntelliStart™ 技术

RADAR™

关键词

水溶性维生素, 维生素C、B3、B6、B12、
B1、B9、B2、B7

简介

维生素是一种微量元素, 由于人体内无法对其进行合成, 只能通过食物摄取。婴幼儿配方奶粉中的维生素对婴幼儿的健康成长尤为重要, 尤其对无法进行母乳喂养、将配方奶粉作为主要营养来源的婴儿而言。官方的水溶性维生素检测方法以程序化为基础, 主要是微生物鉴定法, 此方法已使用了近十年。为达到提取目的, 需对每种维生素都进行单独分析, 进而测定其在食物里的总含量。这通常需耗费大量时间。

使用一种检测方式同时分析添加营养元素的婴幼儿配方奶粉中的维生素十分困难, 原因在于:

- 维生素结构多样, 化学成分复杂
- 维生素含量低
- 基质复杂
- 光和热下不稳定
- 溶解性问题
- 配方奶粉中浓度范围广

在此应用文献中, 我们将介绍一种只需五分钟快速UPLC®/MS/MS质谱检测方法, 利用ESI正模式同时检测婴幼儿配方奶粉中的12种水溶性维生素。

实验

在样品准备和分析阶段, 所有溶剂均储存在低于5°C的避光处。
维生素标准溶液每日制备。

液相条件

| | |
|--------|---|
| LC系统: | ACQUITY UPLC 系统 |
| 色谱柱: | ACQUITY UPLC HSS T3, 2.1 x 50 mm, 1.8 μm |
| 色谱柱温度: | 40 °C |
| 样品温度: | 4 °C |
| 流速: | 0.6 mL/min |
| 流动相A: | 10 mM甲酸铵 + 0.1% 甲酸水溶液 |
| 流动相B: | 10 mM 甲酸铵 + 0.1% 甲酸甲醇溶液 |

梯度:

| 时间(分钟) | %A | %B |
|--------|----|----|
| 0.0 | 99 | 1 |
| 2.0 | 99 | 1 |
| 3.0 | 45 | 55 |
| 3.1 | 1 | 99 |
| 4.0 | 99 | 1 |
| 5.0 | 99 | 1 |

| | |
|--------|---------------|
| 总运行时间: | 5.0 分钟 |
| 注入量: | 10 μL, 全充满定量环 |

质谱条件

| | |
|--------|--------------------------------|
| MS系统: | Xevo TQ MS |
| 离子化: | ESI+ |
| 毛细管电压: | 1.0 kV |
| 源温度: | 150 °C |
| 脱溶剂温度: | 600 °C |
| 脱溶剂气: | 1200 L/hr |
| 采集: | 多反应监测(MRM) 及RADAR全扫描 |
| 碰撞气: | 氦气 3.5 x 10 ⁻³ mbar |

标准添加法

当无法获得空白试样时, 婴幼儿配方奶粉中水溶性维生素的定量分析将通过标准添加法进行, (烟酰胺除外)*。在试样中添加已知浓度(标准溶液)的分析溶液, 使任何基质效应都可在校准时消除。分析员最初并未知道试样中分析物的含量, 但可对加入的标准溶液的含量以及加入标准溶液后仪器响应的变化进行追踪。因此, 通过校准曲线外推法可测定试样中分析物的浓度。实践中, 标准溶液的添加体积需保持在少量水平, 以避免样品基质的稀释。

*试样基质使用现有稀释系数(见实验步骤), 无标准品添加, 仪器对婴幼儿配方奶粉中烟酰胺(B3)的响应接近检测器饱和值。如果标准添加法用于烟酰胺, 将使检测器达到饱和。

试样准备、萃取和标准添加

按婴幼儿配方奶粉包装说明上的三倍浓度进行制备。

将10毫升婴幼儿配方奶粉溶液放入用箔覆盖的聚丙烯(PP)管中; 加入20毫升100%浓度的乙醇。

摇晃混匀2分钟, 以3500 RPM的速率离心15分钟。

上清液用0.45μmPVDF滤膜过滤。

将20μL上清液转移至样品瓶, 加入10μL含11种分析物的已知标准浓度溶液, 样品瓶加水至1毫升(将试样基质中的分析物稀释50倍; 标准溶液中的分析物最终稀释100倍)。

溶液中烟酰胺标准曲线单独制备。

通过LC/MS/MS进行分析。

采集和数据处理方法

通过MassLynx软件v.4.1版本获取数据, 使用TargetLynx应用管理软件进行数据处理。

使用IntelliStart技术对12种目标维生素进行自动MRM采集方法优化。IntelliStart只需输入复合物的基本信息, 即可自动找到母离子, 优化锥孔电压, 找到子离子并优化碰撞能量。

每种维生素的2个MRM通道均已得到优化；第一个通道为定量离子通道，第二个通道为定性离子通道。通道的驻留时间自动得到优化，每个色谱峰最少有12点以保证定量重现性。分析物的MRM通道、锥孔电压、碰撞能量、以及保留时间详见下表1。

| 分析物 | 母离子 (m/z) | 子离子 1/子离子 2 (m/z) | 锥孔电压 (V) | 碰撞能量 1/碰撞能量 2 (eV) | 保留时间 (分钟) |
|-----------|-----------|-------------------|----------|--------------------|-----------|
| 抗坏血酸 | C | 177.0 | 16 | 8 | 0.37 |
| | | 141.0 | | 12 | |
| 硫胺素 | B1 | 265.2 | 18 | 16 | 0.41 |
| | | 122.0 | | 12 | |
| 烟酸 | B3 | 124.0 | 34 | 20 | 0.51 |
| | | 80.2 | | 22 | |
| 吡哆醛 | B6 | 168.0 | 14 | 14 | 0.64 |
| | | 150.0 | | 24 | |
| 吡哆醇 | B6 | 170.0 | 20 | 12 | 0.86 |
| | | 134.0 | | 20 | |
| 烟酰胺 | B3 | 123.0 | 32 | 18 | 0.93 |
| | | 80.0 | | 12 | |
| 泛酸 | B5 | 220.1 | 20 | 14 | 2.73 |
| | | 90.0 | | 12 | |
| 氰钴胺 | B12 | 678.6 | 30 | 36 | 2.98 |
| | | 147.1 | | 24 | |
| 叶酸 | B9 | 442.2 | 18 | 16 | 2.99 |
| | | 295.1 | | 36 | |
| 核黄素-5'-磷酸 | B2 | 457.2 | 30 | 16 | 3.04 |
| | | 439.2 | | 20 | |
| 生物素 | B7 | 245.1 | 20 | 14 | 3.10 |
| | | 227.0 | | 30 | |
| 核黄素 | B2 | 377.2 | 36 | 24 | 3.15 |
| | | 243.1 | | 42 | |
| | | 172.1 | | | |

表1. 检测水溶性维生素的LC/MS/MS参数。

除MRM数据外，使用Xevo TQ MS的RADAR模式可获得全扫描数据。RADAR是一种可获得丰富信息的采集方法，获取MRM数据的同时可实时获取试样基质的背景质谱信息。使用RADAR不会影响MRM数据的质量。

结果与讨论

ACQUITY UPLC系统结合Xevo TQ MS的ESI正离子模式成功分析了12种水溶性维生素。使用ACQUITY UPLC可在5分钟内快速分离所有分析物，包括1分钟平衡时间，详见图1。

在同一分析检测中，使用Xevo TQ MS的RADAR模式监测婴幼儿配方奶粉基质中化合物的全扫描质谱信息。RADAR利用Xevo TQ MS的快速采集速率获取全扫描MS数据，且同时在MRM模式下得到足够的分析物峰点数，以准确定量和定性。

通过RADAR可观察试样基质中的杂质，并了解可能造成基质效应的化合物含量和类别。这对LC-MS/MS方法开发过程中优化方法以降低基质影响带来帮助。例如，可通过调整分离方法使得目标峰与可能引起基质影响或离子抑制的区域分离。图1中插入部分为从婴幼儿配方奶粉试样基质全扫描数据中提取的质谱图。

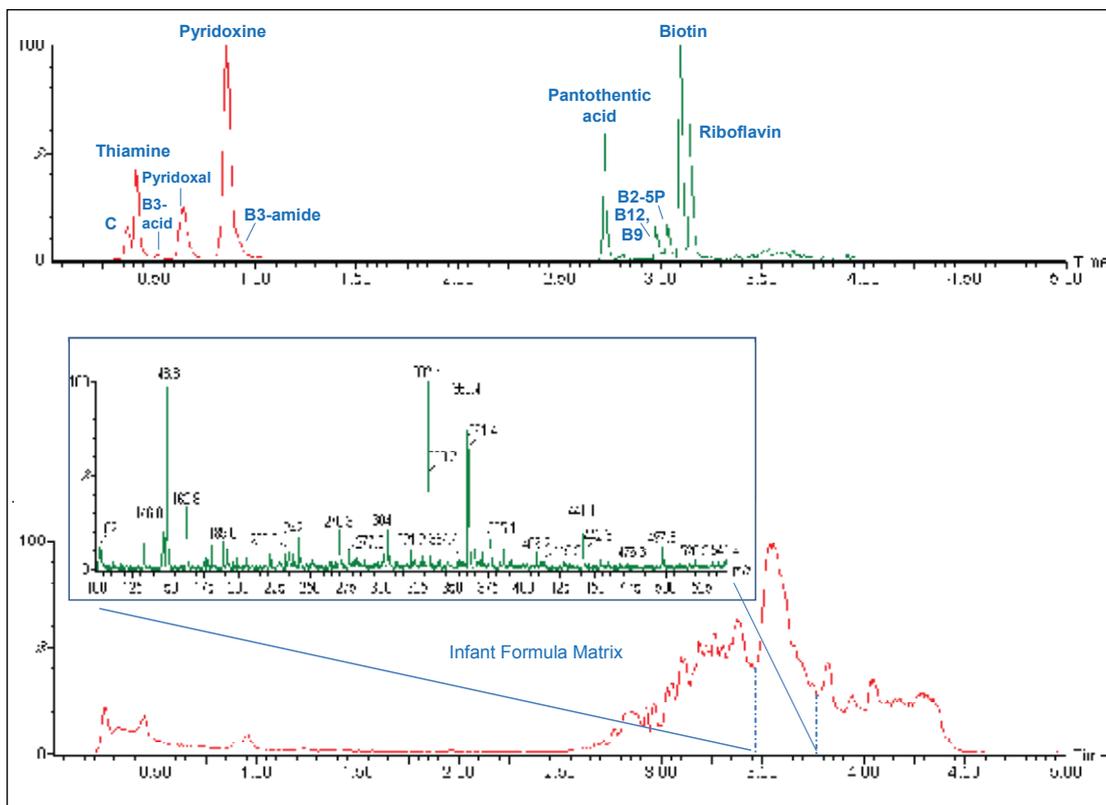


图1. RADAR技术可通过一次分析同时获取MRM和全扫描数据。样品基质中非目标物质谱图如嵌入的全扫描数据所示。

此方法检测了两种不同大众品牌的婴幼儿配方奶粉。图2显示的是从其中一种品牌里提取的水溶性维生素定量离子色谱图。

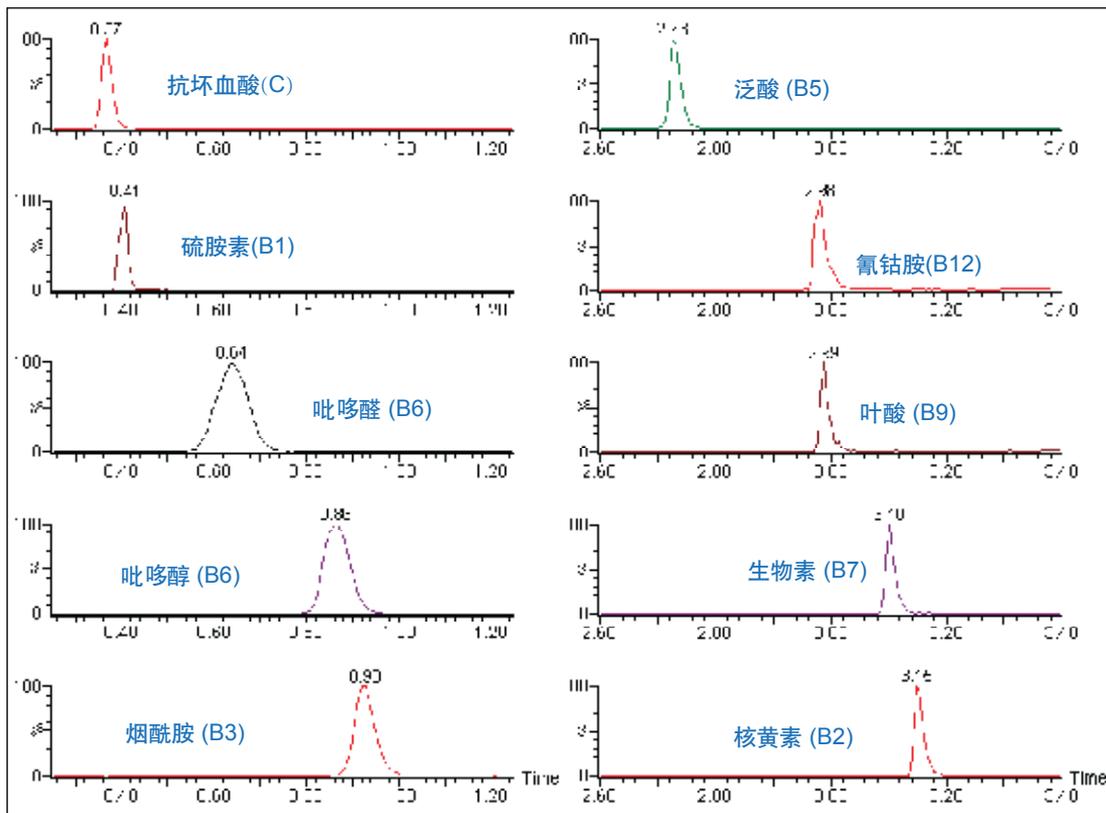


图2. 婴幼儿配方奶粉里提取的水溶性维生素定量离子色谱图。

回收率与重现性

通过比较提取前加标样品和提取后加标样品得到回收率。实验分两天检测两种不同品牌的婴幼儿配方奶粉，每日重复进行6次。

每种婴幼儿配方奶粉的大部分化合物都达到了 $\geq 90\%$ 的提取回收率，吡哆醛、叶酸和核黄素-5'-磷酸除外，回收率相对较低的主要原因是上述物质的水溶性较差。

尽管婴幼儿配方奶粉是一种非常复杂的基质，6个重复样的相对标准偏差(RSDs)仍然都低于5%。这显示了该方法的高重现率以及稳定性。

| 分析物 | 加标水平 (ng/g) | 配方奶粉A | | 配方奶粉B | |
|--------------|-------------|-----------|------------|-----------|------------|
| | | 平均回收率 (%) | %RSD (n=6) | 平均回收率 (%) | %RSD (n=6) |
| 抗坏血酸 C | 1000 | 100.4 | 1.1 | 99.4 | 1.1 |
| 硫胺素 B1 | 10 | 98.7 | 1.6 | 118.6 | 2.2 |
| 烟酸 B3 | 10 | 90.3 | 4.0 | 96.4 | 4.2 |
| 吡哆醛 B6 | 10 | 83.5 | 1.2 | 88.0 | 1.1 |
| 吡哆醇 B6 | 10 | 98.9 | 0.7 | 100.1 | 0.7 |
| 烟酰胺 B3 | 10 | 101.6 | 0.5 | 98.7 | 0.6 |
| 泛酸 B5 | 10 | 104.2 | 1.9 | 112.6 | 0.8 |
| 氰钴胺 B12 | 10 | 111.4 | 1.0 | 106.2 | 0.9 |
| 叶酸 B9 | 100 | 86.6 | 3.7 | 82.0 | 2.4 |
| 核黄素-5'-磷酸 B2 | 100 | 77.6 | 2.2 | 75.1 | 2.8 |
| 生物素 B7 | 10 | 95.4 | 2.2 | 98.7 | 2.4 |
| 核黄素 B2 | 10 | 102.7 | 1.8 | 103.3 | 2.2 |

表2. 两种婴幼儿配方奶粉产品提取前加标样本的回收率和水溶性维生素RSDs百分比。

线性和定量

线性动态范围、灵敏度和适合性可通过标准添加法进行评测。标准添加法的一大优势是可避免测定基质效应，消除离子抑制的影响。

得到相关系数 ≥ 0.99 的较好线性关系，如表3所示，所有进行分析的婴幼儿配方奶粉浓度范围不同：抗坏血酸 (C) 为10 - 10000 ng/mL；氰钴胺 (B12) 为0.1 - 10.0 ng/mL；其余分析物为1到100 ng/mL。数据3显示的是以标准添加法为基准的一种婴儿配方奶粉抗坏血酸 (C) 和氰钴胺 (B12) 的校正曲线。

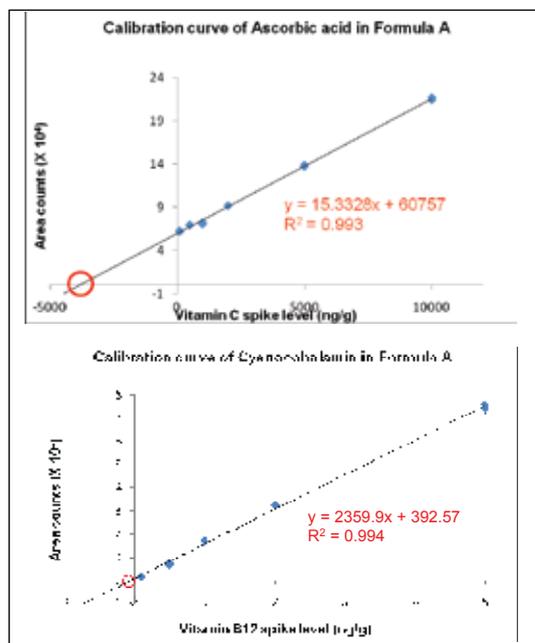


图3. 使用标准添加法的A配方奶粉的抗坏血酸和维生素B12校正曲线。

校正曲线为外推法，由于考虑到稀释因素(50 x)，x轴截距绝对值显示婴幼儿配方奶粉中分析物的浓度。Xevo TQ MS的灵敏度让我们可稀释样本以降低基质效应，同时仍可检测到目标化合物。

| 分析物 | | R ² | 浓度计算 (ng/g) |
|-----------|-----|----------------|-------------|
| 抗坏血酸 | C | 0.993 | 198130 |
| 硫胺素 | B1 | 0.990 | 1778 |
| 烟酸 | B3 | 0.999 | 无 |
| 吡哆醛 | B6 | 0.996 | 205 |
| 吡哆醇 | B6 | 0.998 | 2354 |
| 烟酰胺 | B3 | 0.992 | 14201 |
| 泛酸 | B5 | 0.994 | 8113 |
| 氰钴胺 | B12 | 0.994 | 8.3 |
| 叶酸 | B9 | 0.993 | 152 |
| 核黄素-5'-磷酸 | B2 | 0.997 | 无 |
| 生物素 | B7 | 0.997 | 65 |
| 核黄素 | B2 | 0.992 | 1143 |

表3. 校正曲线相关系数(R²), 以定量为基础, A配方奶粉中水溶性维生素的浓度计算。

结论

一个使用ACQUITY UPLC与Xevo TQ MS ESI正模式5分钟快速测定法，用于同时分析12种水溶性复合维生素。此法替代了耗时的维生素单独分析法。通过将不同维生素分析法融为一体，实验室可提高试样分析量、减少容积消耗、降低运作成本。

Xevo TQ MS的高灵敏度可实现在非常复杂的基质中检测低浓度目标分析物（尤其是氰钴胺），如婴幼儿配方奶粉。Xevo TQ MS可达到低定量限，稀释试样来降低基质效应。

RADAR技术可监测基质干扰，杂质和样品中的降解物，同时准确定量目标分析物。分析员在检测基质效应时便可做出准确决策，并可准确评价基质效应是否有存在。

IntelliStart技术简化系统准备和MRM方法开发，确保所有层次的科学家均可快速准确地操作仪器，生成最高质量的可重现的UPLC/MS/MS数据。

参考文献

1. AOAC Official Method 985.32, Microbiological Method for Analysis of Vitamin B6 (Pyridoxine, Pyridoxal, Pyridoxamine) in Ready-to-feed Milk-based Infant Formula.
2. AOAC Official Method 992.07, Microbiological Turbidity Method of Pantothenic Acid in Milk-based Infant Formula.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



Waters, ACQUITY UPLC和Xevo是沃特世公司的注册标。MassLynx、TargetLynx、RADAR、IntelliStart和The Science of What's Possible是沃特世公司商标。所有其他商标属于各自的所有者。

©2010 沃特世公司 中国印刷
2010年11月 720003694ZH

沃特世科技(上海)有限公司
沃特斯中国有限公司

北京金欧亚科技发展有限公司
北京市崇文区左安门内大街8号伟图大厦301
电话：010-67113925/67113913