[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

12种水溶性维生素化合物的快速、同时分析

Eleanor Riches
沃特世公司, Manchester, UK.

目的

应用兼容快速质谱采集速率的沃特世(Waters®) ACQUITY® 超高效液相色谱(UPLC®)，来提供一种快速而且有选择性的方法，在4min的运行时间中同时分析12种水溶性维生素化合物。

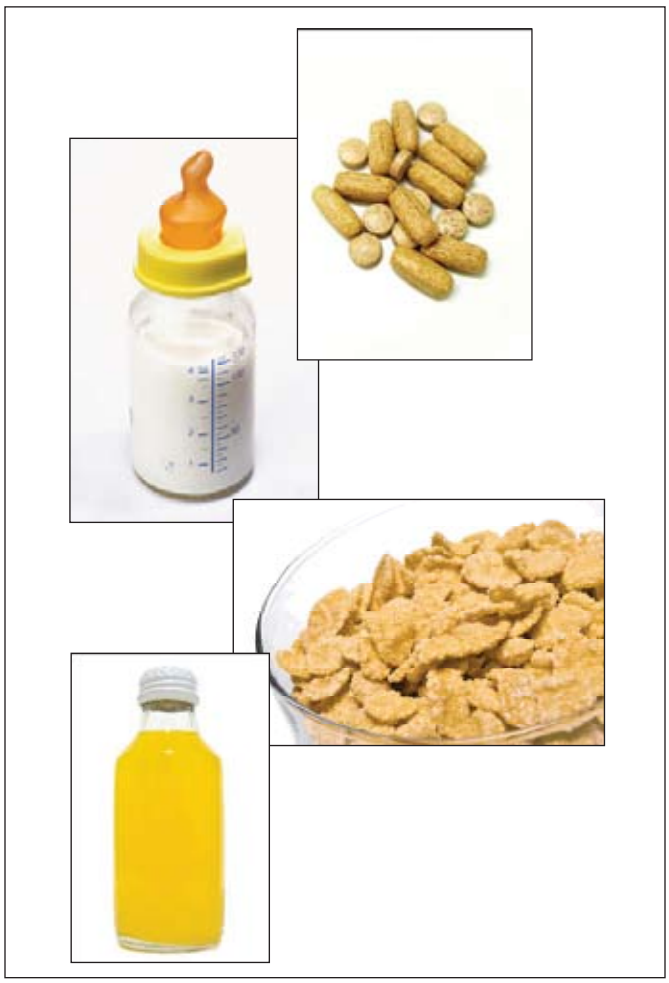
简介

针对全球饮食不足的现状，食品生产商正依法增强许多食品和饮料产品，以增加消费者的营养水平。一旦维生素化合物被添加到消费品中，这个信息应该在相关的包装中明确标识出来，而且要和严格的法规要求一致，如欧洲法规(EC) No.1925/2006[1]关于食品中维生素和矿物质的添加；包含饮食增补的欧洲指令2002/46/EC[2]；或美国联邦法规全书(CFR)标题21的101部分–食品标记[3]。

食品生产商需要快速的、可信赖的和利润高的方法来分析他们的产品中的营养组分，以确保他们的标签声明可以被证实。维生素经常是存在的，即使是被强化之后，在挑战性的基质中的浓度水平仍然很低，这就使得准确分析很费力。

现在，水溶性维生素化合物都是单独分析的，或在小组里，使用广大范围的不同的分析方法，如微生物测试法、比色法、滴定法、荧光法和HPLC方法[4]。这就意味着分析实验室需要一笔可观的费用用于各种各样不同仪器的财政支出，以便于多种维生素分析，同时如果有一系列的分析需要进行的话，还需要投入大量的员工时间和努力。所以，一个快速的、选择性好的解决方案的同时分析水溶性维生素化合物的能力，可以给商业带来以下潜力：提高生产率、由于提高了效率而引起的财政收入的增加、加速样品周转，以及减少劳动力和培训成本。

这篇应用文献描述了一个用来同时分析12种用于增补或增强食品和饮料的水溶性维生素化合物的快速的、选择性好的解决方案。这个方案尤其适用于希望得到与UV检测器相比更高灵敏度、更高选择性和更快的样品周转时间的水溶性维生素分析物。



实验

整个制备和分析过程中，所有的溶液都要避光，并且保存在<5°C条件下。

LC 条件

LC系统:	ACQUITY UPLC®系统
色谱柱:	ACQUITY UPLC HSS T3, 2.1 50mm, 1.7um
柱温:	40°C
样品室温度:	4°C
流速:	0.6mL/min
流动相A:	990mL水：10mL 1M的甲酸铵(aq)：1mL甲酸
流动相B:	990mL甲醇：10mL 1M的甲酸铵(aq)：1mL甲酸
梯度:	0.00min 99% A
	2.00min 99% A
	3.00min 45% A
	3.10min 99% A
	4.00min 99% A
弱洗针溶液:	0.1%甲酸水溶液
强洗针溶液:	0.1%甲酸甲醇溶液
总运行时间:	4min
进样体积:	20µL，满环进样模式
进样针类型:	不锈钢(超级洁净)针

MS条件

MS系统:	ACQUITY TQD
电离模式:	ESI+
喷雾电压:	1kv
脱溶剂气:	氮气，800L/Hr，450°C
锥孔气:	氮气，10L/Hr
源温度:	120°C
采集模式:	多反应监测(MRM)
碰撞气:	氩气，压力为$3.5x10^{-3}$ mBar

与通用检测器相比，ACQUITY TQD质谱仪的优势在于象食品样品之类的复杂基质仍可以得到的选择性和灵敏度增加。当MS使用了MRM模式，只有特殊的、可以代表所感兴趣的维生素的离子才被选择。这也意味着运行时间可能减少，因为色谱峰不需要象UV或荧光检测器那样必须根据保留时间分离开来。待分析化合物的MRM通道、其它的质谱参数和预计的保留时间都列在表1。

维生素化合物	保留时间	MRM通道	锥孔电压(V)	碰撞能(eV)
抗坏血酸(C)	0.40	177 > 144	24	8
硫胺(B1)	0.48	265 > 122	24	17
烟碱酸(B3)	0.54	124 > 80	38	20
吡哆醛(B6)	0.67	168 > 150	27	15
吡哆醇(B6)	0.89	170 > 152	28	14
烟碱(B3)	0.93	123 > 80	40	20
泛酸钙(B5)	2.77	242 > 153	30	15
氰钴胺素(B12)	3.03	678 > 147	36	34
叶酸(B9)	3.03	442 > 295	23	17
核黄素-5'-磷酸盐(B2)	3.08	457 > 439	41	18
生物素(B7)	3.15	245 > 227	28	13
核黄素(B2)	3.20	377 > 243	42	22

表1. 监测的MS/MS离子通道、MS参数和预计的保留时间。

采集和处理方法

这些数据都用Waters' MassLynx™ v. 4.1软件采集。

技术可以自动优化MS参数，而不需要有经验的MS操作人员来开发MS方法。IntelliStart也可以监控LC/MS系统的健康状态，从而减少了操作者以前必须的维护和保养时间。自动化的系统审查可以按预设的时间表进行，即使是在工作时间之外，一个简单的、可视的系统健康信息也可以提供给操作者。

数据处理通过使用TargetLynx™应用管理器进行，这个定量包可以自动数据处理和报告。

相似的数据采集和处理也可以通过使用Empower™软件进行。

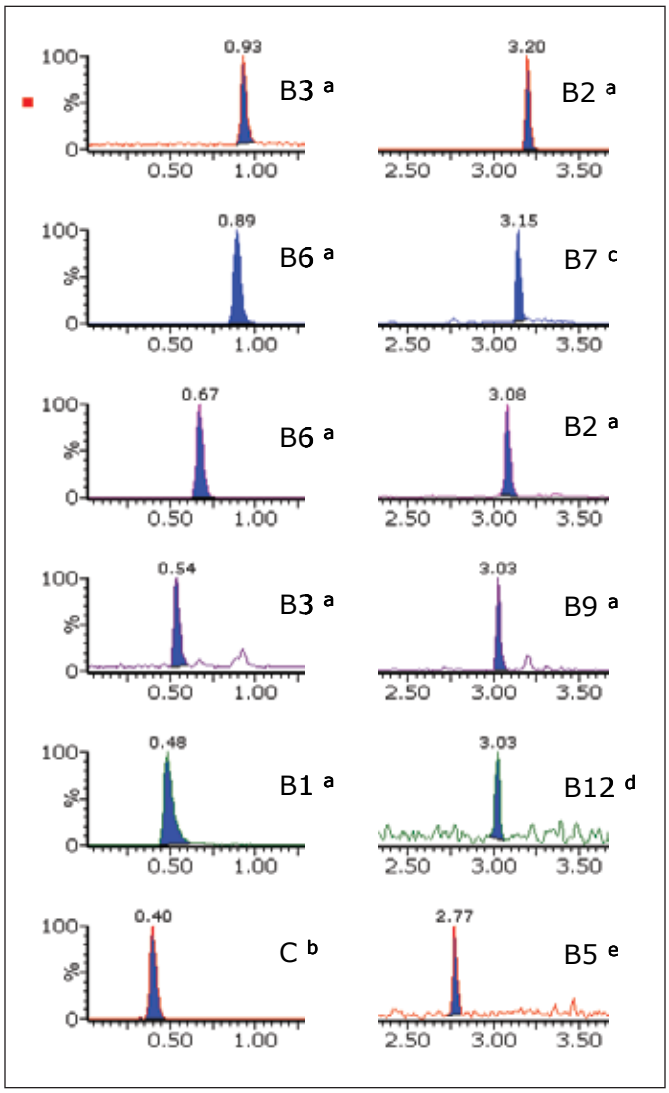


图1. 12种不同的水溶性维生素标准溶液的提取离子色谱图。a浓度=50pg/uL；b浓度=50ng/μL；c浓度=10pg/μL；d浓度=0.5pg/μL；e浓度=100pg/μL.

结果和讨论

12种水溶性维生素化合物的分析可以应用ACQUITY UPLC和采用MRM模式的ACQUITY TQD。MRM模式中的化合物专属通道可以开发出快速而且选择性好的、在4min内所有感兴趣的化合物共流出的解决方案。

在食品和饮料中发现的代表最低水平浓度的12种水溶性维生素化合物标准的提取离子色谱图显示在图1中。它表明了该解决方案既快速又有好的选择性，而且这种类型分析的峰形都很好。

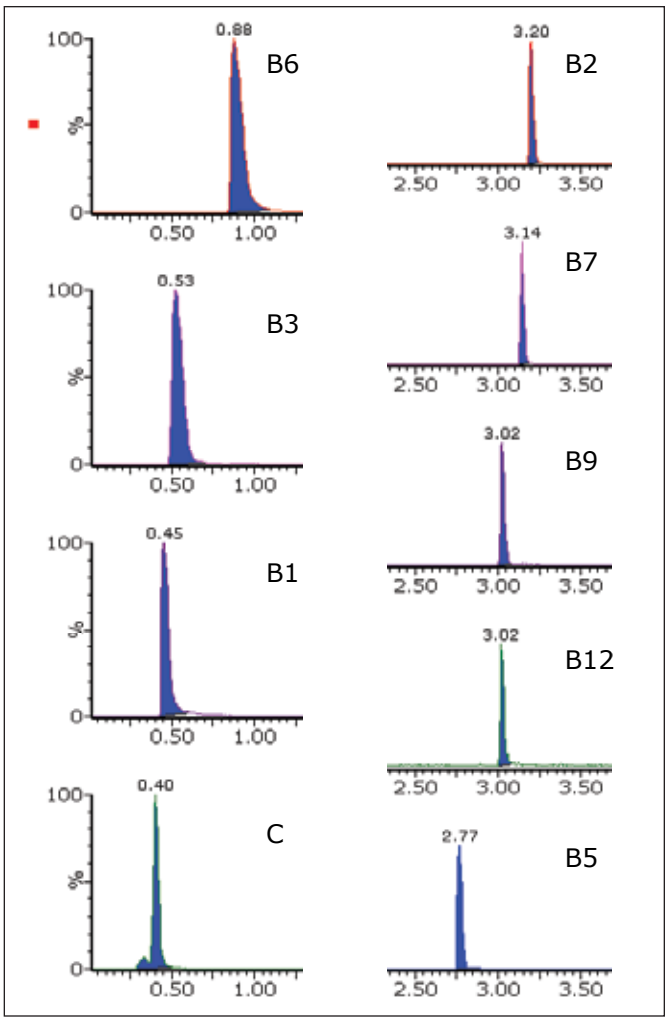


图2. 饮食增补维生素片的提取离子色谱图。

这个分析程序在两种不同的基质中检测过，可是，色谱和质谱条件可以应用于经过适当提取的不同基质。分析物列表包括了不仅一种形式的复合维生素B，这使得它的应用尽可能的广泛；所以只有片剂或婴幼儿调制奶粉使用的形式被检测。

第一个被检测的基质是维生素片剂。一个品牌的饮食增补维生素片剂的提取离子色谱图显示在图2中。

通过分析得到的维生素片剂的计算浓度和峰面积%RSD值，都列在了表2中。当应用到维生素片剂时，%RSD值是这种分析的高水平重复性的象征。

维生素B12通常是食品和饮料商品中添加的最低浓度的水溶性维生素化合物。结果，多维生素分析中的B12含量是经常变化的。这里描述的解决方案对于同时分析维生素B12、复合维生素B和维生素C是耐受的，而且选择性好。维生素B12的峰形和保留时间如图3所示的那样，多次进样之后，稳定性和重现性都很好。

维生素化合物	计算得到的浓度 (ng/mL)	峰面积 %RSD (n=6)
抗坏血酸(C)	135	2
硫胺(B1)	4	1.2
烟碱酸(B3)	15.6	0.4
吡哆醛(B6)	–	不存在
吡哆醇(B6)	5.6	0.2
烟碱(B3)	–	不存在
泛酸钙(B5)	12	2.8
氰钴胺素(B12)	0.0039	4.6
叶酸(B9)	2.4	2.4
核黄素-5'-磷酸盐(B2)	–	不存在
生物素(B7)	0.82	1.7
核黄素(B2)	4.1	1.2

表2. 从饮食增补维生素片剂提取出来的水溶性维生素化合物的计算浓度和面积%RSD。

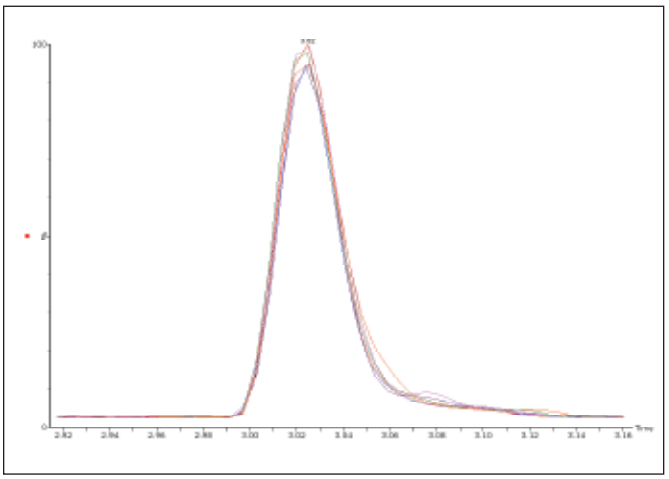


图3. 从饮食增补维生素片剂提取出来的维生素B12色谱峰(n=6，浓度=3.9pg/uL)。

分析条件也在更具挑战性的婴幼儿配制奶粉基质中测试过。一个品牌的婴幼儿配制奶粉的提取离子色谱图，如图4所示。

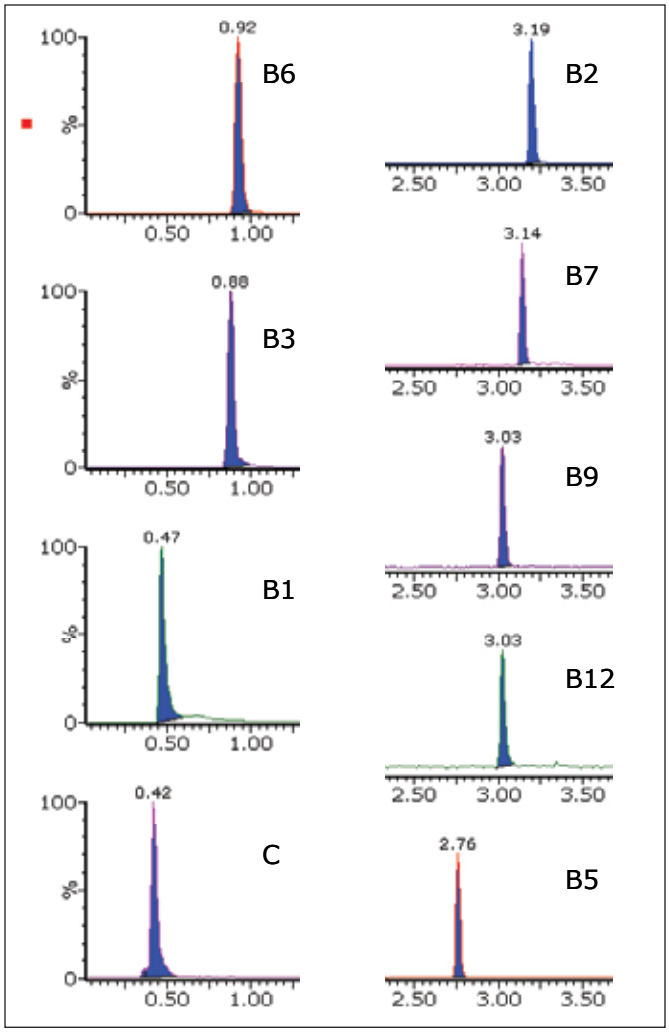


图4. 婴幼儿配制奶粉分析的提取离子色谱图。

通过分析得到的婴幼儿配制奶粉基质的计算浓度和峰面积%RSD，都列在表3。这些%RSD值都是通过相对原始的、用于非常复杂基质的提取方法得到，显示了该解决方案的耐受性。

维生素化合物	计算得到的浓度 (ng/mL)	峰面积 %RSD (n=6)
抗坏血酸 (C)	19.8	14.7
硫胺 (B1)	0.93	5.4
烟碱酸 (B3)	–	不存在
吡哆醛 (B6)	–	不存在
吡哆醇 (B6)	0.45	6
烟碱 (B3)	4.7	11.7
泛酸钙 (B5)	3.1	11.7
氰钴胺素 (B12)	0.0024	3.5
叶酸 (B9)	0.34	6.7
核黄素-5'-磷酸盐 (B2)	–	不存在
生物素 (B7)	0.041	5.3
核黄素 (B2)	2.1	5.5

表3. 婴幼儿配制奶粉中提取得到的水溶性维生素化合物的计算浓度和峰面积%RSD。

结论

一个快速的、选择性好的、应用ACQUITY TQD MRM模式的解决方案被开发用来在4min的运行时间内，同时分析12种水溶性维生素化合物，这样就免去了每个化合物的分离分析程序。饮食增补维生素片剂和婴幼儿配制奶粉的分析表明该解决方案适用于广大范围不同种类的基质。

如图5所示的ACQUITY UPLC/TQD系统可以提供：

- 与传统的HPLC方法相比，可提高色谱分离度、缩短分析时间。
- IntelliStart技术被设计用来减少复杂操作、新使用者培训，以及时间消耗型维护和保养的负担。
- 更小的仪器尺寸，可以为任何实验室节约空间。

图5. ACQUITY UPLC系统和ACQUITY TQD质谱。

这个系统解决方案，融合了ACQUITY UPLC的色谱分离速度和ACQUITY TQD质谱的选择性，可以将12种水溶性维生素化合物的分析融合到一针进样分析。这可以使财政紧张的实验室由于可以节约分析时间而提高效率，通过增加样品通量提高利润，以及有更好的生产率。另外，通过减少实验室消耗品的使用可以节约成本，同时由于减少了试剂使用而减少了对环境的影响。

这个解决方案可以为水溶性维生素分析的流线型方法提供理想的基础，因为它不需要多个方法，可以使分析人员用一个快速而简单的程序分析所有的复合维生素B和维生素C。

References

1. Website: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:404:0026:0038:EN:PDF
2. Website: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:183:0051:0057:EN:PDF
3. Website: http://ecfr.gpoaccess.gov/cgi/t/text/text-idx?c=ecfr&sid=342a1d06a120c8eccd88fa8962891afe&rgn=div5&view=text&node=21:2.0.1.1.2&idno=21#21:2.0.1.1.2.1.1.6
4. Website: http://findarticles.com/p/articles/mi_7098/is_1_88/ai_n28321865/pg_2/

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters, Oasis, ACQUITY UPLC, 和 ACQUITY 是沃特世公司的注册商标。 Xevo, IntelliStart, ScanWave,MassLynx, TargetLynx, Quanpedia, 和 The Science of What's Possible 是沃特世公司的商标。所有其他的商标属于各自的所有者。

©2009 沃特世公司　中国印刷

2009年9月 720003052ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010-5293 6688
上海：021-6879 5888
广州：020-8626 6678
香港：852-2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com