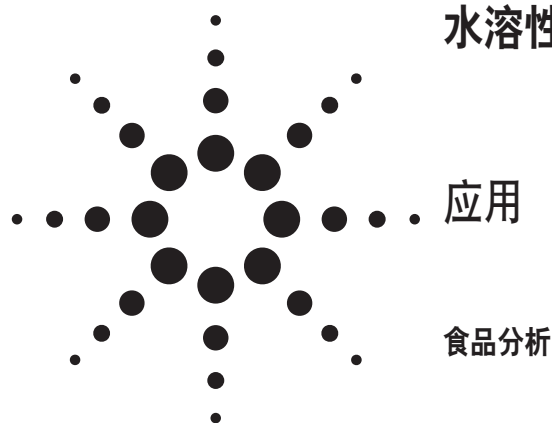


快速高分离度 LC/MS/MS 定量测定麦片中的水溶性 B 族维生素



作者

Sheher Mohsin
Agilent Technologies, Inc.
Schaumburg, IL
USA

Michael Zumwalt
Agilent Technologies, Inc.
9780 S. Meridian Blvd.
Englewood, CO 80112-5910
USA

Indarpal Singh
ConAgra Foods, Inc.
Omaha, NE 68102
USA

摘要

采用 Agilent 6410 三重串联四极杆质谱仪 (QQQ) 分析早餐麦片中的几种水溶性 B 族维生素化合物。在快速分离高通量 SB-Aq 色谱柱上 (粒径 1.8 μm) 进行简单梯度洗脱, 所有化合物在 7.5 分钟内洗脱出来。在 0.5-500ppb 范围内, 除吡哆醇外的化合物都展现出超过三个数量级的良好线性, 并且在 0.5 ppb 水平上具有良好的峰面积重现性, 作为最低定量限。

引言

水溶性维生素极性很强, 在反相色谱柱上保留很差。在流动相中加入离子对试剂, 如七氟丁酸能够明显改善这类化合物的分离和保留。然而, 使用这类离子对也有缺点, 它会在质谱仪中产生较高的背景信号。因此, 我们使用具有专门保留亲水性化合物键合相的色谱柱, 在流动相溶剂中加入甲酸铵, 开发出快速灵敏的分析方法。

本文使用的 Agilent 1200 系列液相色谱 (LC) 系统和亚-2-微米填料色谱柱用于快速高分离度分离。该 LC 系统设计降低了延迟体积, 增加了压力范围和柱温。将该 LC 系统通过 G1948B 电喷雾离子源与 Agilent 6410 三重串联四极杆质谱仪 (QQQ) 相连接。目标化合物采用加入甲酸铵的水-甲醇梯度在 ZORBAX AQ 1.8 μm 色谱柱上实现分离。

测定水溶性维生素的普通的 LC/MS 方法是在流动相溶剂中加入七氟丁酸作为离子对试剂, 其分析时间长达 30 分钟。我们开发出快速、灵敏的 LC/MS/MS 方法用于水溶性维生素的测定, 该法采用高效 1.8 μm 色谱柱在低扩散、600 bar LC/MS 配置下将允许筛选和定量的运行时间周期低至 10 分钟。质谱仪的线性



Agilent Technologies

响应超过三个数量级，除吡哆醇外的所有被测物具有 0.5 pg/μL 的定量限。吡哆醇的分析具有良好的灵敏度，但良好的线性恰好被局限在三个数量级之内。对于除吡哆醇之外的所有化合物得出了浓度介于

0.5 ~ 500 pg/μL 之间（吡哆醇介于 0.5 ~ 250 pg/μL 之间）的校正曲线和色谱图。

B 族维生素的结构示于图 1。

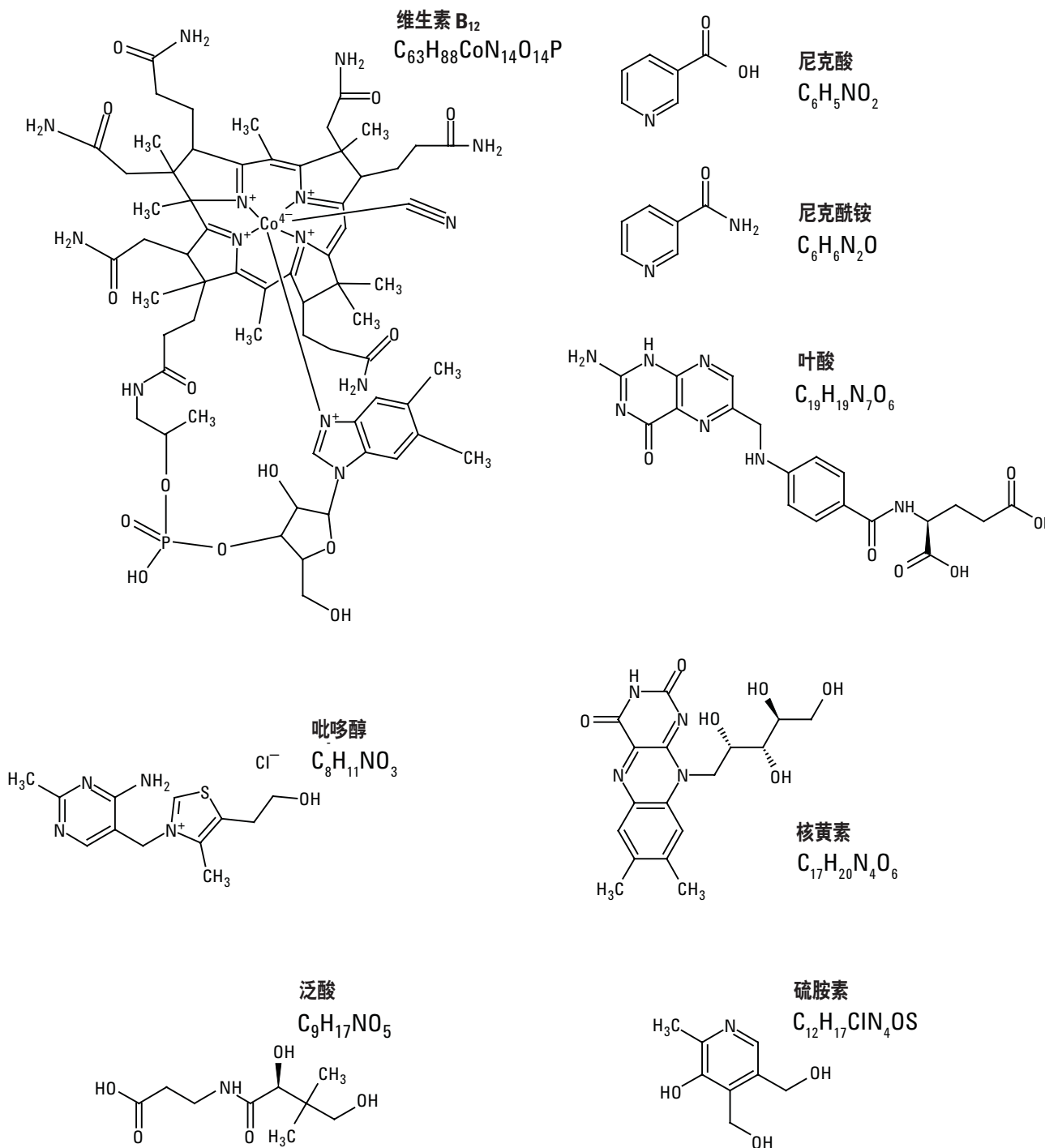


图 1. 本文所分析的 B 族维生素的结构

实验部分

样品制备

含有所有八种化合物的混标甲醇溶液由 ConAgra 食品公司提供，使用含 20 mM 甲酸铵和 0.1% 甲酸的 10% 甲醇水溶液稀释至如下浓度：500、250、100、50、5 和 0.5 pg/mL。这些稀释液用于未知样品的定量测定。

再提供一种按下列方法制备的添加 B 族维生素的样品，制备方法如下：

1. 使用搅拌器将早餐麦片研磨均匀；
2. 称取 1 克研匀的样品转入 50 mL 样品瓶中；

3. 加入 25 mL 0.1 M HCl，在 100 °C 水浴中加热 20 分钟，以溶解维生素；
4. 冷却至室温；
5. 用去离子水调整体积至 1 L；
6. 用 0.45 µm 玻璃微纤维素膜过滤。

应该指出，提供的添加样品是为测试仪器的灵敏度而研制，以向顾客演示为目的。一种典型的未添加样品的提取由以下步骤组成：取 1 克研匀的样品用酶消化处理以将天然存在的维生素从其结合形式中释放出来，定容至 10 mL，取其体积的 1/100 用于本研究所分析的添加样品。在较高的浓度下，可看到盐和其它基质成分对某些维生素的分析产生干扰。因此，可以采用进一步稀释的办法调节这些样品中的基质效应。

表 1. 多反应监测 (MRM) 模式参数

区段	化合物	MRM 转变	裂解电压 (V)	碰撞能量 (V)
1	硫胺素	265.2 > 122.0	85	10
	泛酸	220.2 > 90.0	110	13
	吡哆醇	170.1 > 152.1	100	10
	尼克酸	124.1 > 80.0	100	27
	尼克酰胺	123.1 > 80.0	100	25
2	维生素 B ₁₂	678.6 > 146.7	130	35
	叶酸	442.2 > 295.1	120	10
	核黄素	377.2 > 243.1	110	25

LC/MS 方法

LC 条件

Agilent 1100 系列二元泵、脱气机、多孔板进样器和柱温箱

色谱柱：Agilent ZORBAX RRHT SB - Aq, 3.0 mm × 100 mm, 1.8 µm (部件号：828975 - 314)

柱温：35 °C

流动相：A = 20 mM 甲酸铵和 0.1% 甲酸水溶液
B = 20 mM 甲酸铵和 0.1% 甲酸甲醇溶液

流速：0.5 mL/min

进样量：10 µL

梯度：

时间 (分)	%B
0.0	10
8.0	55
8.1	10

停止时间：10 min

进样针冲洗：75 : 25 甲醇/水 (冲洗口 20 秒)

MS 条件

MS 条件

操作模式：使用 Agilent G1948B 离子源，ESI 正离子模式

喷雾器：30 psig

干燥气流速：10 L/min

干燥气温度：350 °C

V_{cap}：1850 V

分辨率 (FWHM)：Q1 = 低分辨；Q2 = 低分辨

驻留时间 (对所有 MRM)：200 毫秒

维生素 B12 母离子的质量 (m/z 678.6) 大约是图 1 中给出的该化合物实验式 ($C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$) 计算值的一半。相信此化合物不太稳定，在离子化过程中发生了裂解。

结果与讨论

所有八个化合物的校正曲线示于图 2A ~ 2H。只有化合物吡哆醇在 500 ppb 水平没有得到良好的线性，本实验未加内标。

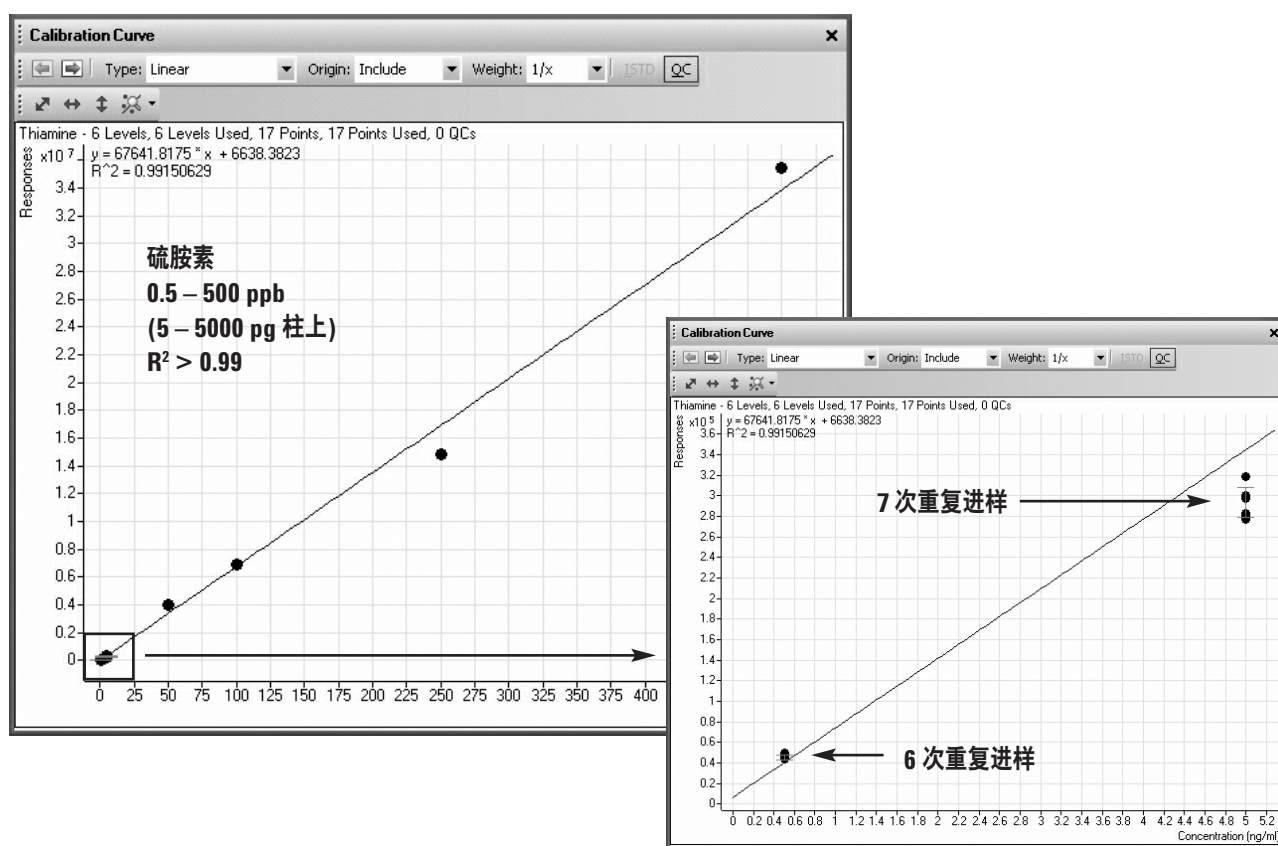


图 2A. 硫胺素超过三个数量级的线性关系

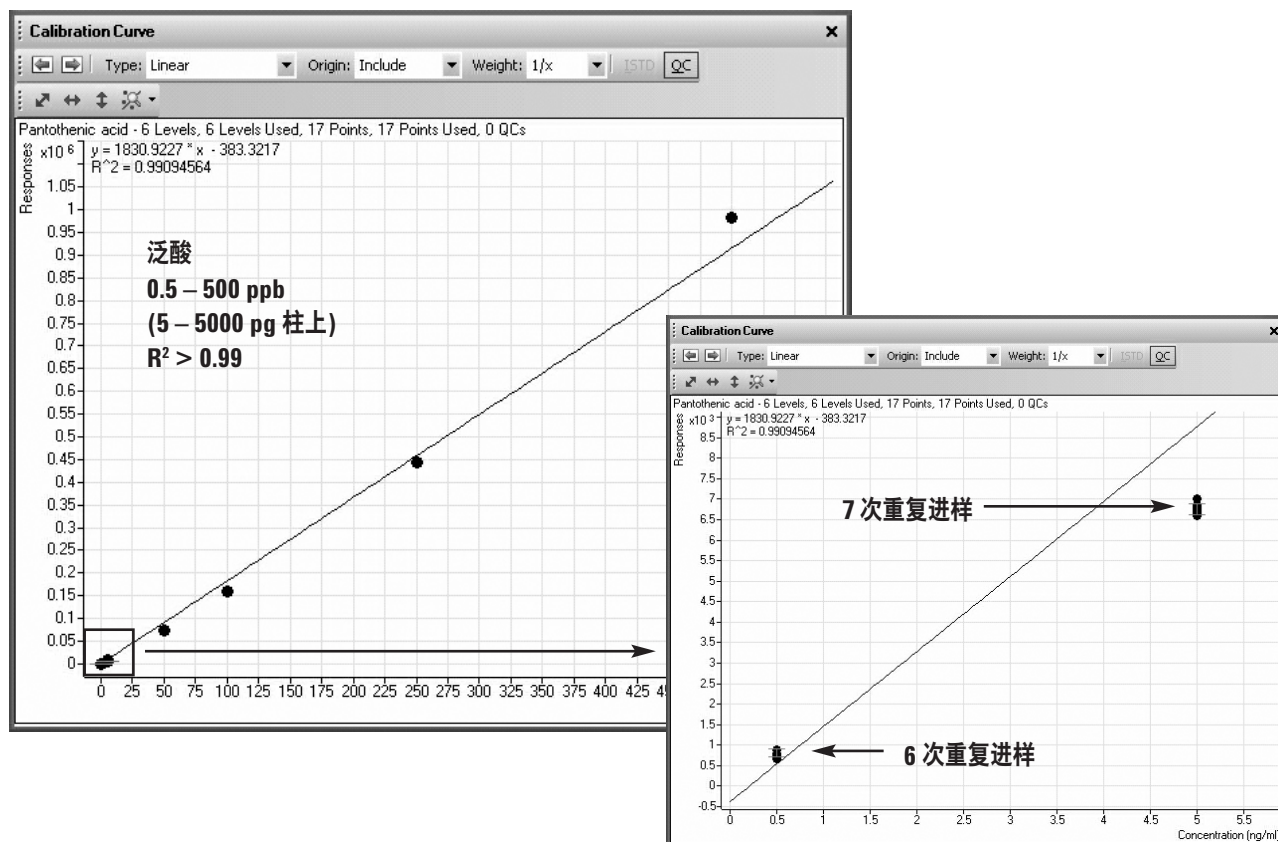


图 2B. 泛酸超过三个数量级的线性关系

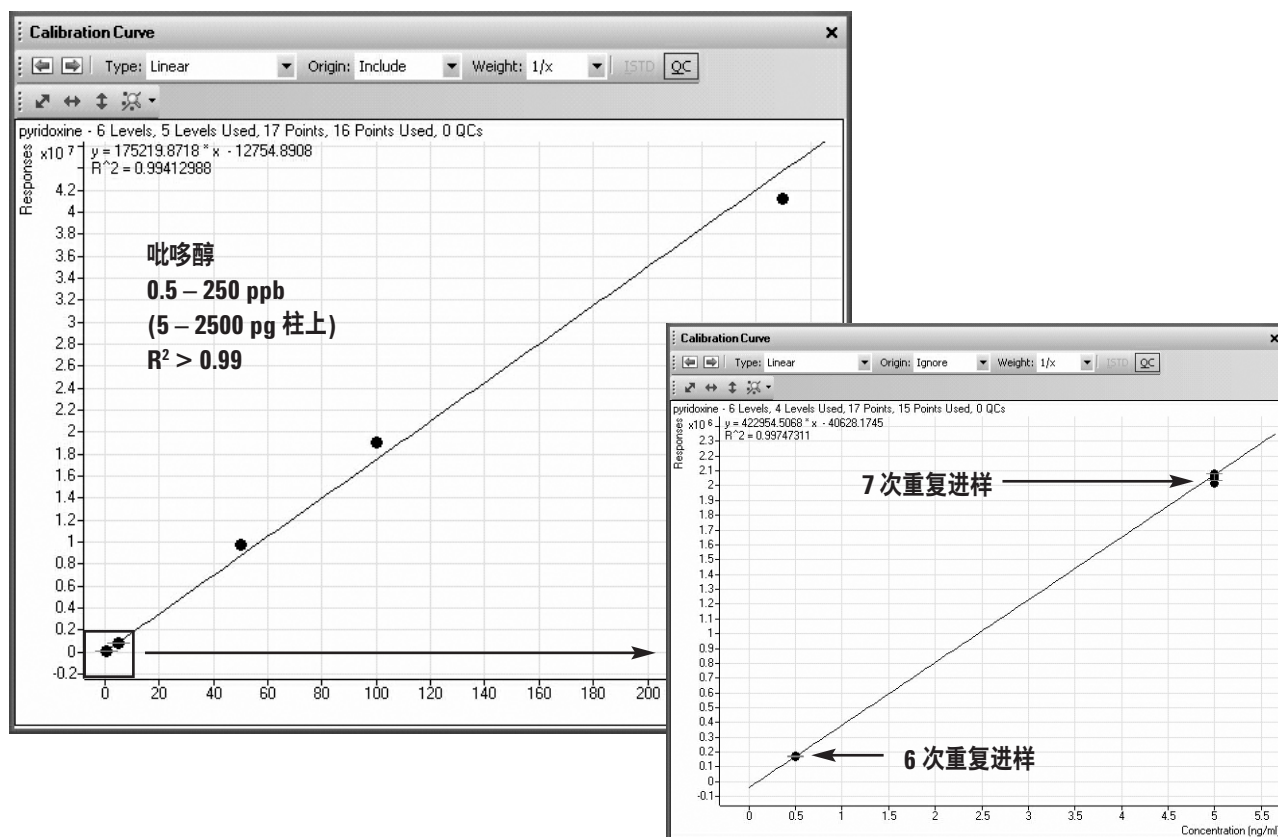


图 2C. 吡哆醇几乎超过三个数量级的线性关系

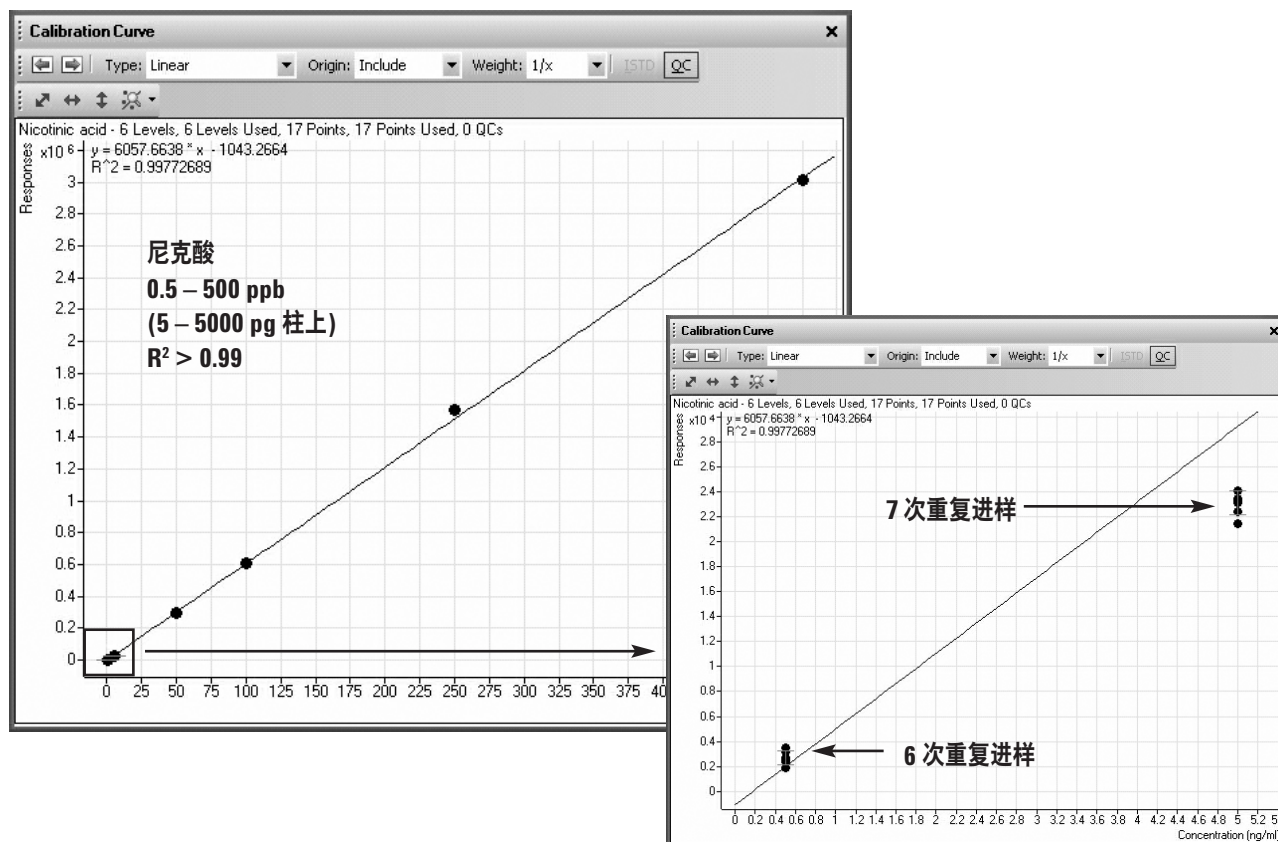


图 2D. 尼克酸超过三个数量级的线性关系

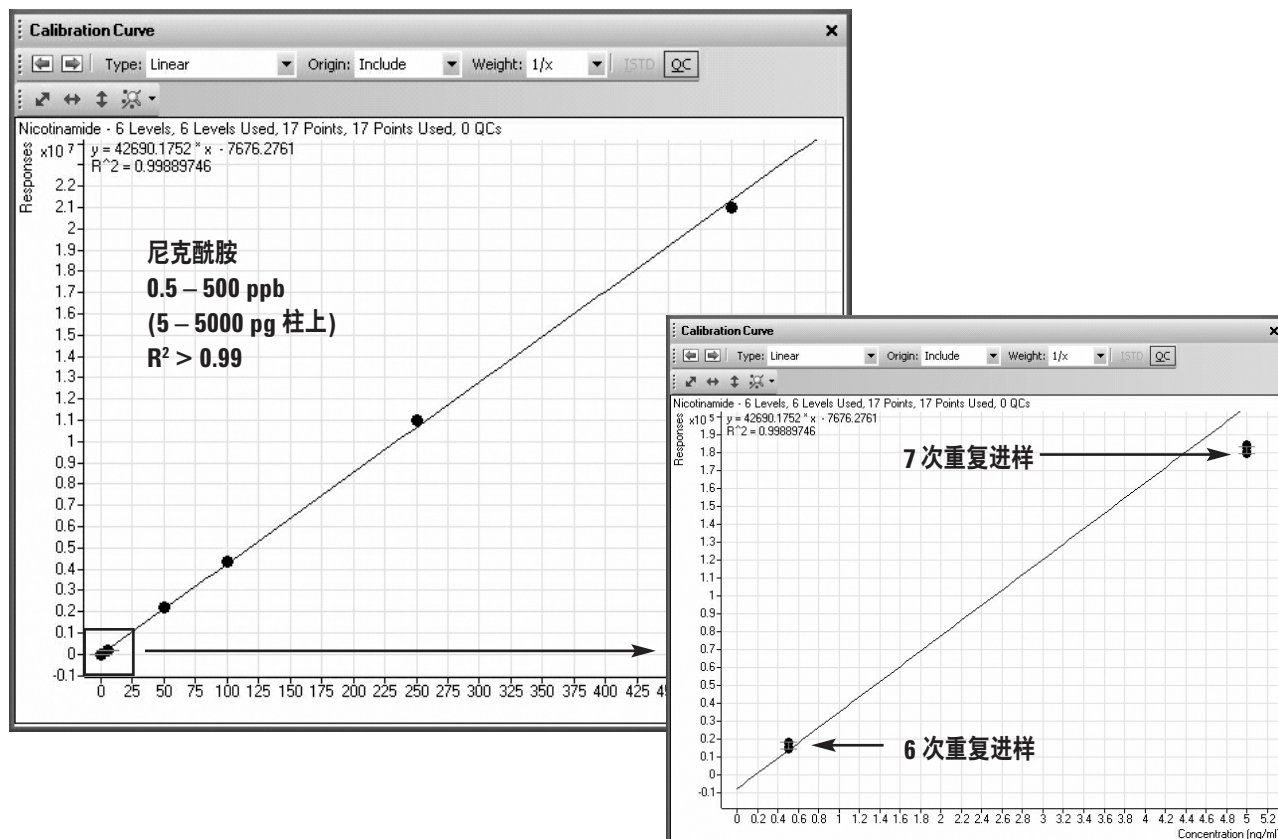


图 2E. 尼克酰胺超过三个数量级的线性关系

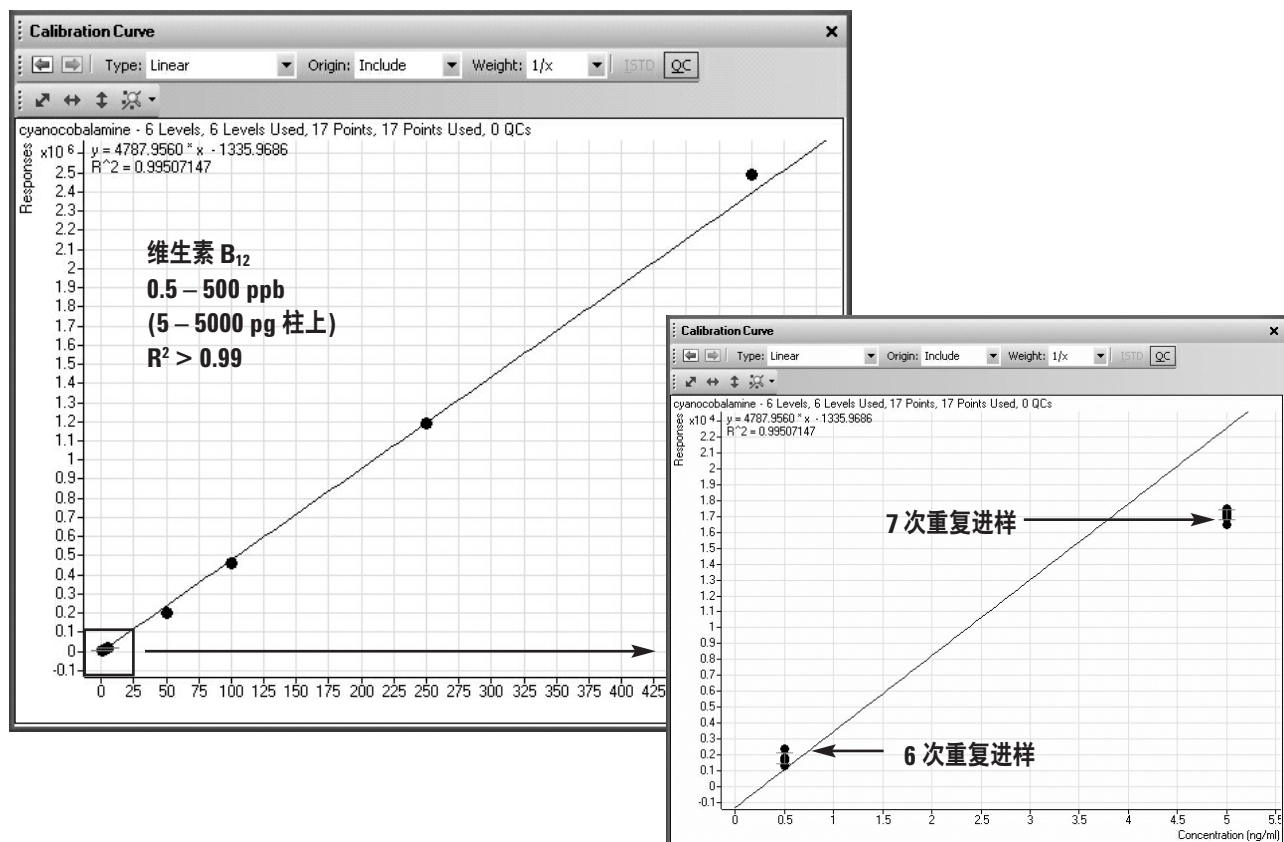


图 2F. 维生素 B₁₂ 超过三个数量级的线性关系

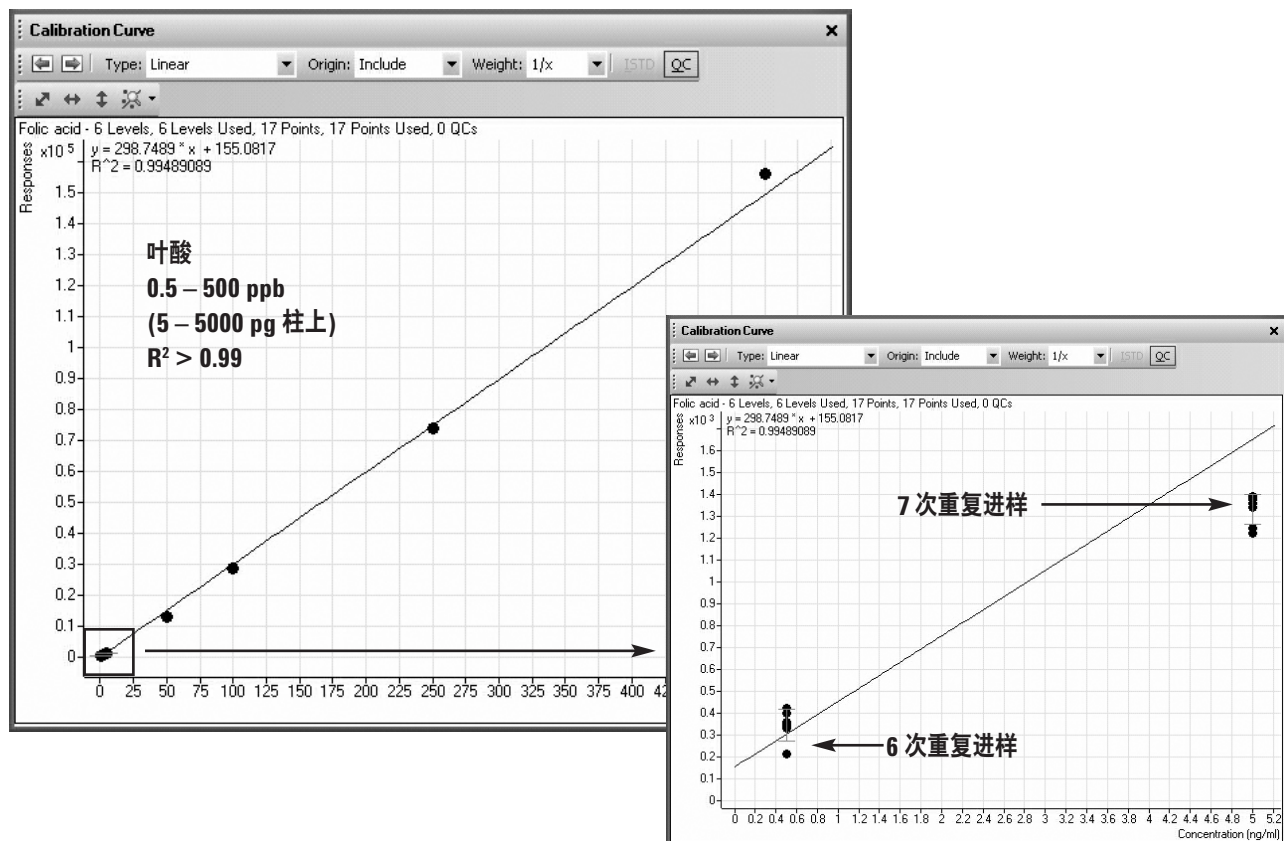


图 2G. 叶酸超过三个数量级的线性关系

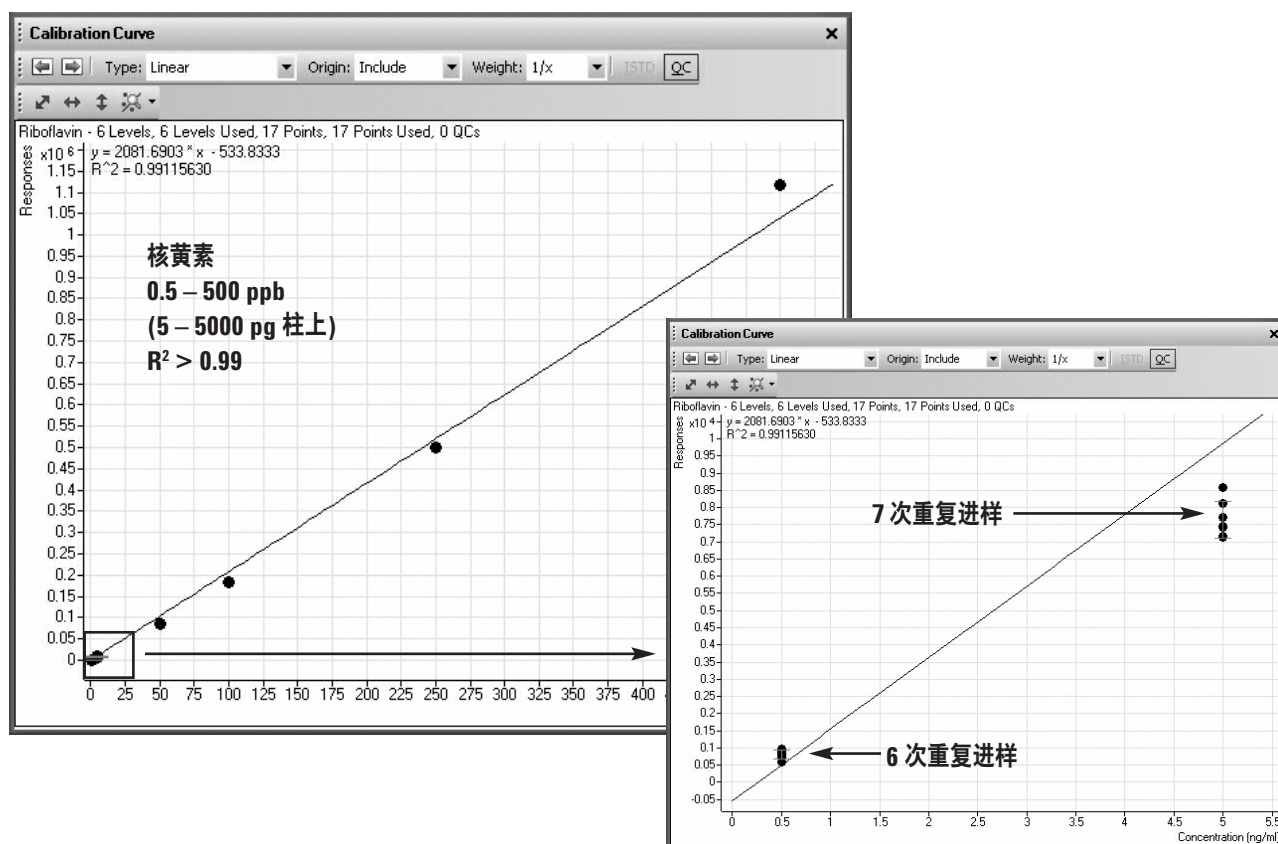


图 2H. 核黄素超过三个数量级的线性关系

所有数据的曲线拟合按线性完成，忽略原点且按 $1/x$ 加权。

以 0.5 ppb 水平的吡哆醇为例，其重现性示于图 3。所有化合物在 0.5 ppb 水平上的峰面积 % RSD 值列于表 2。

表 2. 每种化合物在最低定量水平，即 0.5 ppb 下的峰面积重现性

化合物	峰面积 (%RSD)
硫胺素	5.6
泛酸	11.6
吡哆醇	2.6
尼克酸	12.9
尼克酰胺	10.1
维生素 B ₁₂	19.4
叶酸	13.4
核黄素	17.1

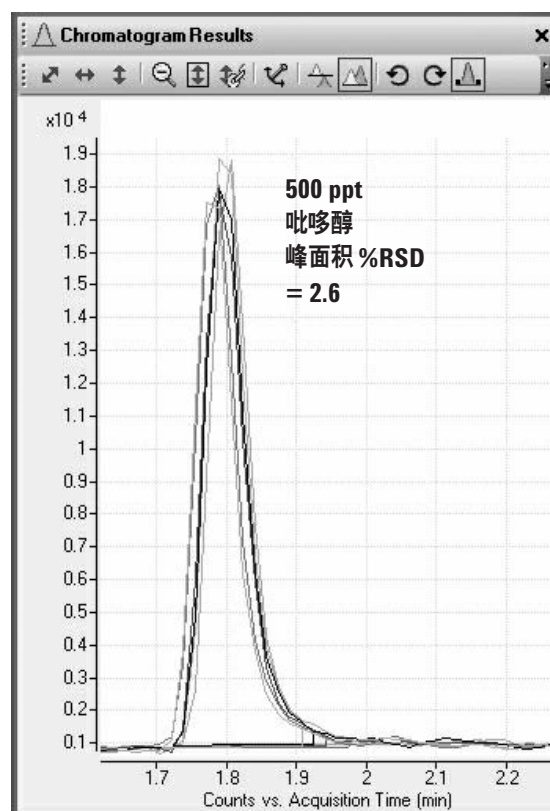


图 3. 吡哆醇在 500 ppt 下的峰面积重现性，进样 6 次

使用如前所述的稀释混合标样，对添加麦片提取物也进行了分析和定量。使用 MassHunter 定量分析得出批处理结果的实例示于图 4。存在于样品中的尼克酰胺的浓度计算为 111.6 pg/μL。

所有化合物在添加提取物中的浓度计算结果列于表 3。

检测添加提取物中八种化合物相应的色谱洗脱图谱示于图 5。

表 3. 添加麦片提取物中每种化合物的计算浓度

化合物	计算浓度 (pg/μL)
硫胺素	24.0
泛酸	1.2
吡哆醇	15.5
尼克酸	43.5
尼克酰胺	111.6
维生素 B ₁₂	0.4*
叶酸	2.6
核黄素	8.6

* 超出定量限

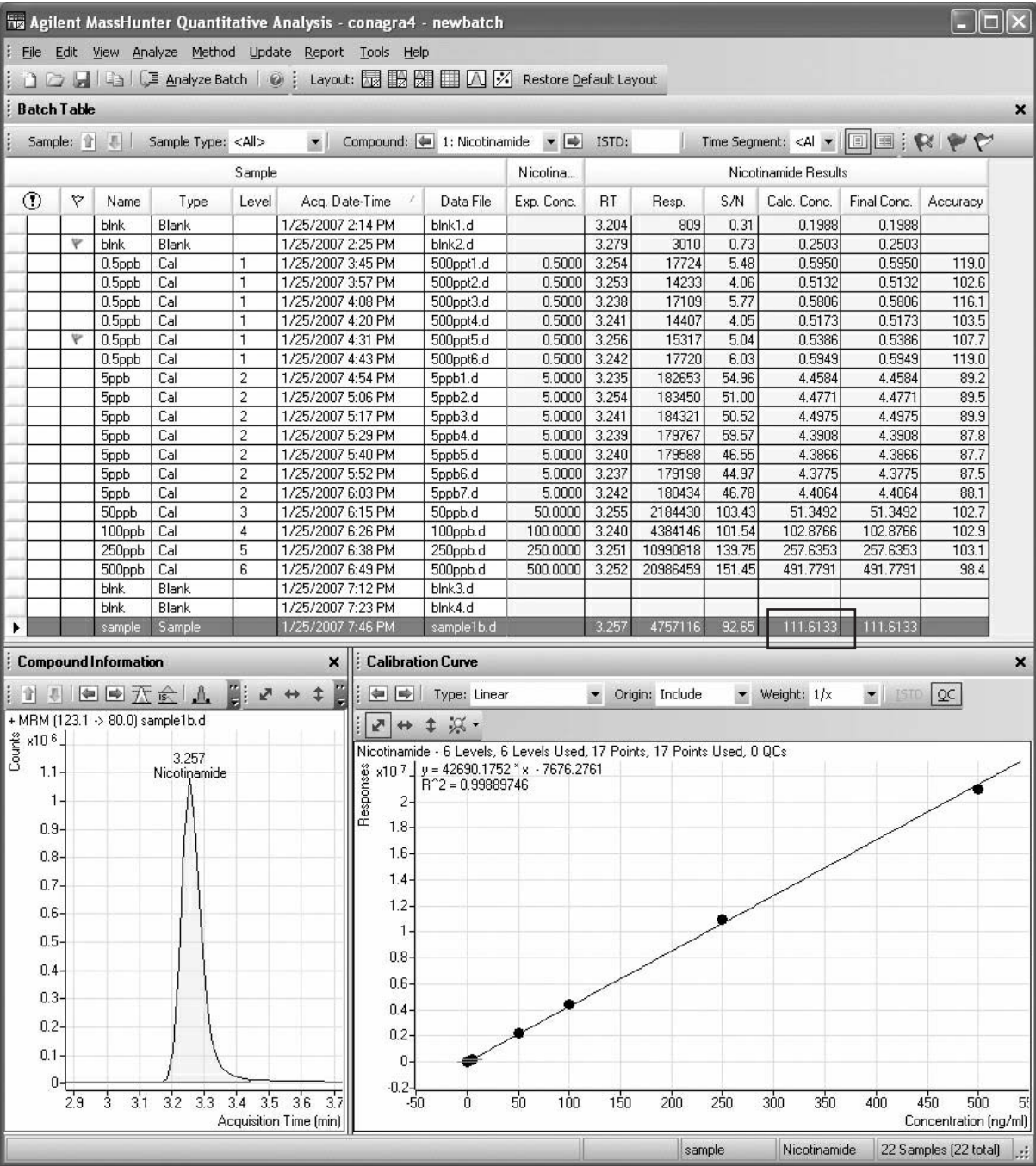


图 4. 样品中尼克酰胺的定量批处理结果。浓度计算为 111.6 pg/μL（突出显示）

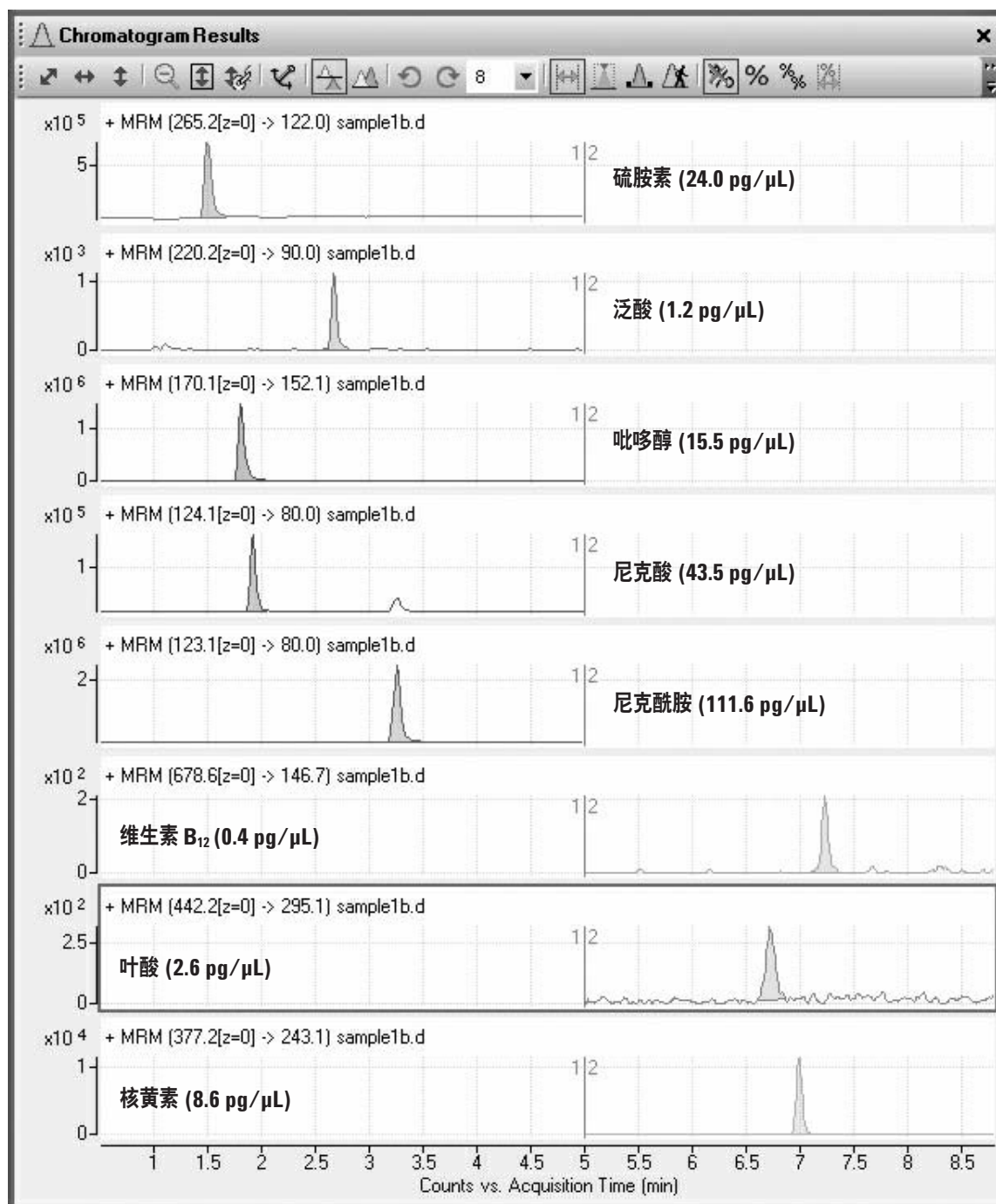


图 5. 添加提取物中各化合物的色谱图和浓度计算结果

结论

采用 LC/MS/MS 成功分析了水溶性 B 族维生素。本方法对所有化合物表现出超过三个数量级的良好线性， $R^2 > 0.99$ 。在最低定量浓度下测定吡哆醇的重现性低至 2.5% RSD。成功分析了一种添加样品提取物，仅维生素 B12 的浓度低于定量限。

更多信息

欲了解本公司产品和服务的更多信息，请访问本公司网址 www.agilent.com/chem/cn。

欲了解本应用相关细节，请于 Agilent 科技公司的 Michael Zumwalt 联系。

安捷伦对本资料中的错误，及因使用本资料所引发的相关损失不承担责任。

本资料中的信息、说明和性能指标如有更改，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司，2007

中国印刷
2007 年 7 月 25 日
5989-7084CHCN



Agilent Technologies