

同位素稀释-超高压液相色谱-串联质谱法测定 维生素营养液中的泛酸含量

李洪燕¹, 李秀英¹, 陈俊禧², 刘冬虹¹, 林森煜¹, 卢宇靖², 黄金凤^{1*}

(1. 广州质量监督检测研究院, 广州 511400; 2. 广东工业大学轻工化工学院, 广州 510006)

摘要: **目的** 建立测定维生素营养液中泛酸含量的同位素稀释-超高压液相色谱-串联质谱法(ID-UHPLC-MS/MS)。**方法** 样品经高氯酸水溶液涡旋提取和除杂、超纯水稀释后,以HSS T3色谱柱和0.1%(v/v)甲酸水溶液-乙腈进行梯度洗脱分离,以串联质谱的多反应监测模式检测,内标法定量。**结果** 泛酸在5~1000 μg/L范围内具有良好的线性关系,相关系数(R^2)为0.9998;方法检出限为0.02 mg/100 g,定量限为0.07 mg/100 g,3个添加水平的回收率为93.4%~105%,相对标准偏差($n=6$)为2.3%~4.4%,日间相对标准偏差($n=3$)为2.72%。**结论** 本方法操作简便、分析速度快、灵敏度高、重复性好,为维生素营养液中泛酸含量的定性定量分析提供了可靠的依据。**关键词:** 泛酸;超高压液相色谱-串联质谱法;同位素稀释;维生素营养液

Determination of pantothenic acid in multivitamin supplement solution by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotope dilution

LI Hong-Yan¹, LI Xiu-Ying¹, CHEN Jun-Xi², LIU Dong-Hong¹, LIN Sen-Yu¹,
LU Yu-Jing², HUANG Jin-Feng^{1*}

(1. Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 511400, China;
2. Guangdong University of Technology, Guangzhou, 510006, China)

ABSTRACT: Objective To develop a simple and rapid method for determination of pantothenic acid in multivitamin supplement by ultra high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry with isotope dilution (ID-UHPLC-MS/MS). **Methods** The sample was extracted and purified by perchloric acid solution, and separated on an HSS T3 UPLC column with acetonitrile and 0.1% formic acid solution as mobile phase under gradient elution mode, then detected with tandem mass spectrometry under ESI at positive and multiple reaction monitoring (MRM) mode. Stable isotope was used as an internal standard for quantification. **Results** Pantothenic acid has a good linear relationship in the range of 5~1000 μg/L, the limit of detection (LOD) and quantitation (LOQ) of the method was 0.02 mg/100 g and 0.07 mg/100 g respectively. The fine recovery (93.4%~105%), the relative standard deviation (2.3%~4.4%, $n=6$) and inter-day with RSD (2.72%, $n=3$) of this method were also obtained. **Conclusion** The proposed method was successfully applied to determine pantothenic acid in multivitamin supplement. Compared with the standard method, the proposed method was sensitive, rapid, and accurate. It provides a rapid approach for the analysis of pantothenic acid in complex matrix multivitamin supplement solution.

*通讯作者: 黄金凤, 高级工程师, 主要研究方向为食品及食品相关产品检测, 仪器分析技术。E-mail: 82309762@qq.com

*Corresponding author: HUANG Jin-Feng, Senior Engineer, Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 511400, China. E-mail: 82309762@qq.com

KEY WORDS: pantothenic acid; ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; isotope dilution; multivitamin supplement solution

1 引言

泛酸又称维生素 B₅、遍多酸,是一种水溶性维生素,几乎存在于所有活细胞中。泛酸是生物机体正常生理代谢所必需的营养素,在机体内能转变成辅酶 A(Co A)或酰基载体蛋白(ACP),参与脂肪酸代谢反应;也是脂肪酸合成类固醇所必需的物质,可参与类固醇紫质、褪黑激素和亚铁血红素的合成;还是体内胆碱乙酰化、柠檬酸循环、合成抗体等代谢所必需的中间物。此外,泛酸及其衍生物还可以减轻抗生素等药物引起的毒副作用,参与多种营养成分的吸收和利用^[1-3]。由于维生素在食物中含量不均,人们通过膳食难以保证其摄入量,服用维生素补充剂可以弥补膳食摄入不足。目前市场上标榜原装进口的维生素营养液倍受家长青睐,因此,建立准确测定其营养成分的方法,对于监测该类产品的质量情况具有重要意义。

目前,文献报道的泛酸的检测方法有微生物法^[4-5]、高效液相色谱法^[6-10]、气相色谱-质谱联用法^[11]、高效毛细管电泳法^[12]、超临界流体色谱法^[13]和液相色谱串联质谱法^[14-16]等。微生物法是测定泛酸的经典方法,但该方法操作复杂、检验时间长、对环境条件要求高。高效液相色谱法是检测泛酸比较常用的方法,检出限约为 1 mg/L^[6-10],但该方法抗干扰能力不强,在定性方面存在不足。液相色谱串联质谱法定性准确,且具有较高灵敏度和较强分离能力,可以在短时间内分析含量低、组分复杂的样品,结合同位素可以有效地校正基质干扰和质谱电离带来的误差,国内外已有报道利用此法测定乳粉中的泛酸^[14-16]。

对于维生素营养液,成分复杂,通常会加入果糖、黄原胶等添加剂来调节风味和乳化保鲜,这些成分给泛酸的准确定性定量带来极大的干扰。因此,研究除去这些基质干扰成为泛酸测定的关键点。鉴于此,本研究通过实验优化,利用高氯酸溶液氧化除杂,结合串联质谱的特异性和同位素内标的消减基质效益的作用,建立维生素营养液中泛酸的测定方法。本方法简单灵敏,为维生素营养液中泛酸的定性定量分析提供了可靠的依据,同时也可作为营养保健品的市

场监管提供技术支持。

2 材料与方法

2.1 主要仪器与试剂

超高压液相色谱-串联质谱联用仪(Agilent 1290/6490, 美国 Agilent 公司); Acquity[®]HSS T3 柱(美国 Waters 公司); 高速冷冻离心机(3K 15, 美国 Sigma 公司); 万分之一天平(BSA224S, 德国 Sartorius 公司); 涡旋仪(MS3, IKA 公司)。

泛酸钙(纯度 98.0%, 德国 Dr Ehrenstorfer GmbH 公司); 泛酸钙-[¹³C₆, ¹⁵N₂](纯度 99.5%, 美国 Iso Sciences 公司); 甲酸(色谱纯, 安谱公司); 乙腈(色谱纯, 美国 Merck 公司); 高氯酸(70%~72%, 广州化学试剂厂); 实验用水为超纯水。

2.2 标准溶液的配制

泛酸标准溶液(200 μg/mL): 称取泛酸钙 54.5 mg, 加水溶解至 250 mL(泛酸钙换算成泛酸的系数为 0.92), 4 °C 保存。

泛酸同位素标准溶液(200 μg/mL): 称取泛酸钙-[¹³C₆, ¹⁵N₂] 10 mg, 加水溶解至 50 mL, 4 °C 保存。

高氯酸溶液(0.5 mol/L): 在 500 mL 烧杯中加入 300 mL 超纯水, 加入 50 g 高氯酸, 搅拌均匀, 转移至 1 L 容量瓶中, 用超纯水定容至刻度。

2.3 样品前处理

称取维生素营养液样品 1.0 g(精确至 0.0001 g)于 10 mL 棕色比色管中, 加入 5 mL 高氯酸溶液, 涡旋振摇均匀后以高氯酸溶液定容, 涡旋提取 2 min, 取部分溶液于 12000 r/min 离心 2 min, 取上清液 0.5 mL 于 50 mL 比色管中, 加入泛酸同位素标准溶液 25 μL, 用超纯水定容, 涡旋振荡 1 min, 过 0.22 μm 滤膜, 滤液供 UHPLC-MS/MS 分析。

2.4 UHPLC-MS/MS 检测条件

色谱柱: Waters HSS T3 柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流速 0.45 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 2 μL; 流动相 A: 0.1%(v:v)甲酸溶液; 流动相 B: 乙腈。梯度洗脱条件见表 1。

表1 流动相梯度洗脱条件
Table 1 Gradient program for PA

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	92	8
2.2	80	20
2.4	50	50
4.0	50	50
4.1	92	8
7.0	92	8

电喷雾离子源, 正离子模式; 多反应监测(MRM)模式; 毛细管电压 1.5 kV; 离子源气温 150 °C; 气流 14 L/min, 鞘气温度 250 °C; 鞘气流量(氮气)11 L/min; 毛细管电压 3000 V。泛酸及其同位素内标的定量和定性离子对、碰撞池加速电压、碰撞能量等参数见表 2。

3 结果与讨论

3.1 样品处理的优化

维生素营养液的成分复杂, 水为主要基质, 同时添加各种维生素, 还添加了果糖、黄原胶等添加剂起到调节风味和乳化增稠的效果, 而脂肪、蛋白质的含量几乎为零。果糖、黄原胶均具有极强的亲水性, 在进行质谱分析前, 必须将样品中的果糖、黄原胶等大分子干扰物去除, 以免损伤色谱柱或堵塞质谱锥孔。黄原胶对酸碱十分稳定, 能溶于多种酸溶液而不被降解, 可被强氧化剂, 如高氯酸、过硫酸等降解。因此考察高氯酸、乙酸铵、乙腈和甲醇的除杂效果。在样品中加入适量的泛酸同位素内标, 考察了 50%(v:v) 甲醇水溶液、50%(v:v) 乙腈水溶液、0.5 mol/L 高氯酸溶液和乙酸铵溶液(pH 3.8) 的沉淀除杂效果。结果表明(如图 1 示): 样品不使用沉淀剂, 直接稀释 1250 倍后进行分析, 泛酸回收率仅 68%; 而以 50%(v:v) 甲醇水溶液或 50%(v:v) 乙腈水溶液作为提取剂时, 均可较快得到澄清液, 但泛酸的回收率亦不理

想, 分别是 86% 和 75%, 可能是因为加入了有机相, 虽然很好地使样品中的杂质变性沉淀, 但是却降低了泛酸在提取液中的溶解度, 导致回收率低; 以 0.5 mol/L 高氯酸溶液或乙酸铵溶液(pH 3.8) 作为提取剂, 沉淀效果不明显, 放置 10 min 后可获得澄清液, 或经过高速冷冻离心后可获得澄清液, 但以此两种溶液提取的泛酸回收率最高, 分别是 92% 和 89%。综合实验结果, 选择 0.5 mol/L 高氯酸溶液作为提取剂。

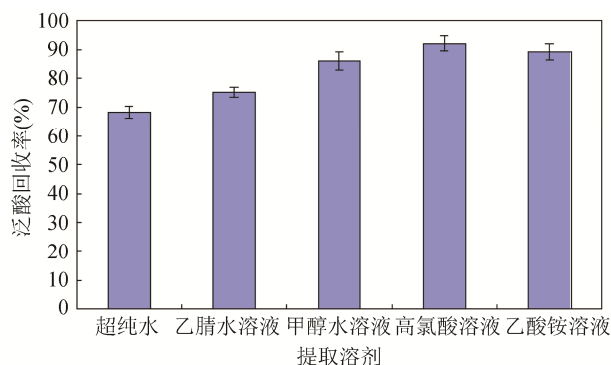


图1 不同提取溶剂提取回收率的比较

Fig. 1 Comparison of various solvent on recoveries

3.2 色谱与质谱条件的优化

泛酸学名为 α, γ -二羟基- β, β -二甲基丁酰- β -丙氨酸, 是极性较强的化合物, 在 C_{18} 柱上保留较弱, 峰形也较差。而 HSS T3 柱对极性化合物有特殊的保留能力, 实验选用 HSS T3 柱获得较好的分离效果和良好的色谱峰形。泛酸在质谱中容易电离产生 $[M+H]^+$ 的分子离子峰, 在流动相中加入适量的酸更有利于其电离, 因此在水相中加入 0.1%(v:v) 甲酸。

配制一定浓度的泛酸和泛酸同位素内标溶液, 通过仪器自带的自动优化软件对目标分析物母离子及子离子进行扫描, 并对碰撞能、碰撞池加速电压等质谱参数进行优化。在最佳的色谱-质谱条件下获得各离子对的响应, 以响应较强的离子对作为定量离子对。泛酸及其同位素的多反应监测色谱图见图 2。

表2 泛酸及其同位素内标的定性和定量离子对、碰撞池加速电压和碰撞能量

Table 2 Qualitative and quantitative ion pairs, cell accelerator voltages and collision energy for PA and PA-Internal Standard

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量(V)	碰撞池加速电压(V)
泛酸	220.1	89.9*	9	4
	220.1	72.0	17	4
泛酸- $[^{13}C_6, ^{15}N_2]$	224.2	94.1*	10	4

注: *定量离子对

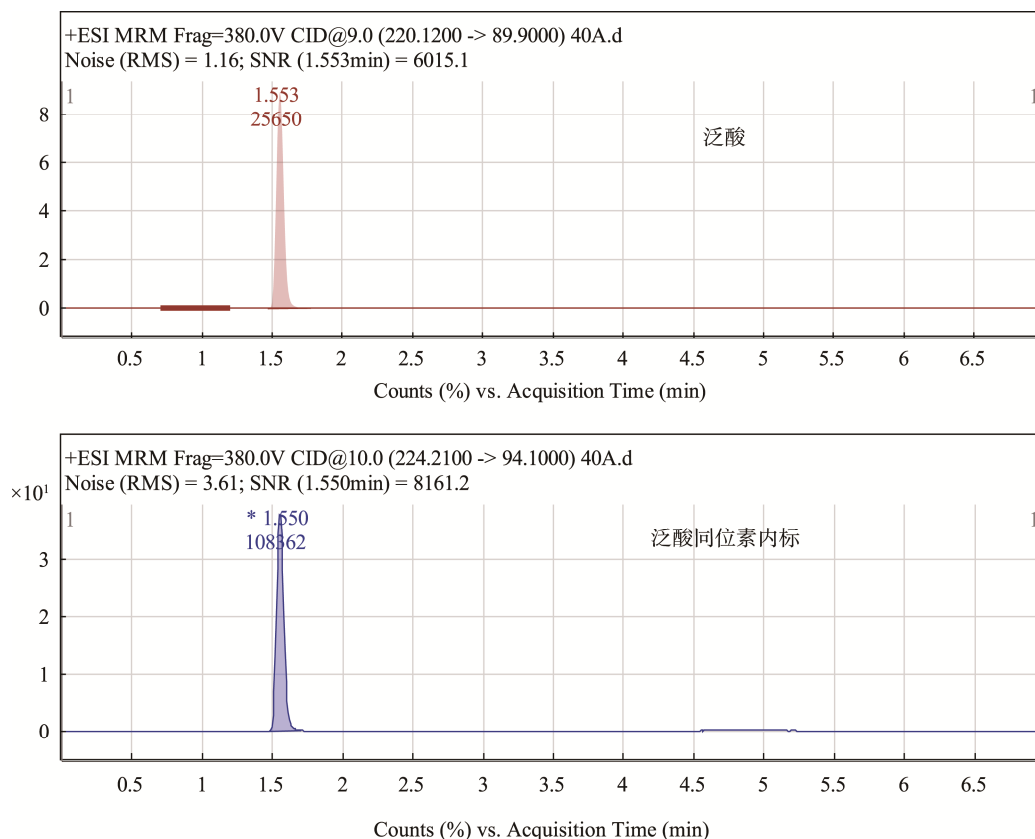


图 2 泛酸和泛酸同位素的 MRM 色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of PA and PA internal standard

3.3 方法的验证

3.3.1 线性范围、检出限和定量限

在优化条件下,对泛酸的系列混合标准工作液(均含有 100 $\mu\text{g/L}$ 同位素内标)进行 UHPLC-MS/MS 分析,记录定量离子峰面积(A)和内标的色谱峰面积 A_i ,以 A 和 A_i 的比值 Y 对相应的目标物质量浓度(X, $\mu\text{g/L}$)进行回归分析。结果表明,泛酸在 5~1000 $\mu\text{g/L}$ 范围内具有良好的线性关系,线性回归方程为 $Y = 1.22X - 0.0197$,相关系数 (R^2)为 0.9998。根据仪器的检出限(定量离子 $S/N=3$)及定量下限(定量离子 $S/N=10$),结合样品的前处理过程,计算得到方法检出限和方法定量限,分别为 0.02 mg/100 g 和 0.07 mg/100 g。

3.3.2 回收率

取婴幼儿多种维生素营养液进行添加回收试验,添加量为样品中泛酸含量的 40%、80%和 130%,每个水平重复测定 6 次,计算加标回收率和相对标准偏差,结果见表 3。3 个加标水平的回收率在 93.4%~105%,相对标准偏差在 2.3%~4.4%。

3.3.3 方法稳定性

取婴幼儿多种维生素营养液按照 1.3 所述方法,连续测量 3 天,每天平行测定 6 次,考察方法的稳定性,结果见表 4。可见,日内相对标准偏差在 2.07%~2.52%,日间相对标准偏差为 2.72%,表明本方法稳定性良好。婴幼儿多种维生素营养液样品的 MRM 色谱图见图 3。

3.3.4 与国标方法的对比

分别使用本方法与现行国家标准方法 GB/T 22246-2008《保健食品中泛酸钙的测定》测定 3 个维生素营养液样品的泛酸含量,结果(见表 5)显示国标方法的检测结果偏低,本方法的检测结果更接近明示值。国标方法是将试样用水在超声波振荡下提取、定容,离心后取上清液过滤膜,滤液经高效液相色谱分离,紫外检测器检测,外标法定量。由于试样含有复杂的添加剂,只经超纯水提取,干扰较多,因而检测结果误差较大。而本方法能除去黄原胶等大部分基质干扰,结合同位素内部的基质效应的校正,以及 UHPLC-MS/MS 的抗干扰能力,可以实现不同含量样品的准确定量分析。

表3 泛酸加标回收试验结果

Table 3 Recoveries and relative standard deviations of PA

本底值(mg/100 g)	加标量(mg/100 g)	回收率(%)						平均回收率(%)	相对标准偏差(%)
38.0	15.0	94.2	99.3	96.4	99.5	97.9	100	97.9	2.3
	30.0	101	97.1	105	104	93.4	98.6	99.8	4.4
	50.0	96.7	100	104	94.8	100	97.3	98.8	3.3

表4 样品中泛酸的稳定性试验结果 (n=6)

Table 4 Results of stability experiment of PA in samples (n=6)

测定时间	测定值 (mg/100 g)						平均值 (mg/100 g)	日内相对标准偏差(%)	日间相对标准偏差(%)
day 1	25.2	25.8	26.3	26.6	26.9	26.0	26.1	2.32	2.72
day 2	24.8	25.2	24.9	24.7	25.8	26.3	25.3	2.52	
day 3	25.3	26.4	26.1	26.8	25.9	26.6	26.2	2.07	

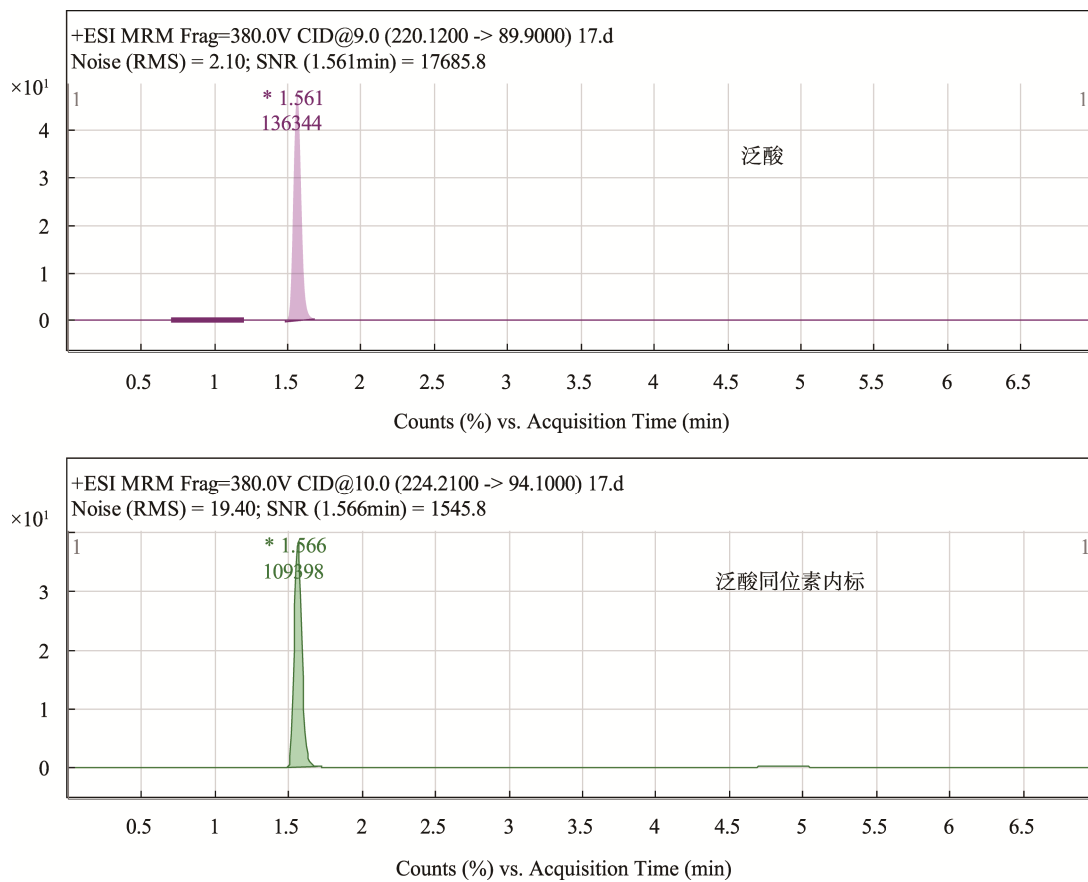


图3 婴幼儿维生素营养液样品的MRM色谱图

Fig. 3 MRM chromatograms of sample

表5 本方法与国标法检测结果的比较

Table 5 Comparison of the proposed method and the standard method

样品	本法(mg/100 g)	国标方法(mg/100 g)	明示值(mg/100 g)
1	42	36	40
2	36	23	33
3	68	56	70

4 结论

本研究基于 UHPLC-MS/MS 的高分离能力和高灵敏度, 以及同位素标记的优点, 通过对样品前处理和色谱质谱条件的优化, 建立一种适用于基质复杂的维生素营养液中泛酸含量的检测方法。本方法操作简单、结果准确、灵敏度高、稳定性好, 适用于维生素营养液中泛酸的准确定量分析。

参考文献

- [1] 杨延辉, 肖春玲. 泛酸的功能和生物合成[J]. 生命的化学, 2008, 28(4): 448-452.
Yang YH, Xiao CL. The functions and biosynthesis of pantothenate [J]. Chem Life, 2008, 28(4): 448-452.
- [2] 那海秋, 高广慧, 赵飞, 等. 高效液相色谱法测定多维元素片中泛酸的含量[J]. 西北药学杂志, 2014, 29(2): 145-147.
Na HQ, Gao GH, Zhao F, *et al.* Determination of pantothenic acid in vitamins with minerals tablets by HPLC [J]. Northwest Pharm J, 2014, 29(2): 145-147.
- [3] 李延志, 陈韵正, 李少旦, 等. 高效液相色谱法同时测定多维营养片中维生素 B₆、烟酰胺和泛酸钙[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(11): 1927-1928, 1988.
Li YZ, Chen YZ, Li SD, *et al.* Simultaneous determination of vitamin B₆, nicotinamide calcium and pantothenate by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Health Lab Technol, 2007, 17(11): 1927-1928, 1988.
- [4] 张艳, 霍胜楠, 胡明燕, 等. 婴幼儿乳粉中泛酸测定的不确定度研究[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(9): 92-95.
Zhang Y, Huo SN, Hu MY, *et al.* Uncertainty evaluation for pantothenic acid determination in infant formula [J]. Food Res Devel, 2014, 35(9): 92-95.
- [5] Tsukatani T, Suenaga H, Ishiyama M, *et al.* Determination of water-soluble vitamins using a colorimetric microbial viability assay based on the reduction of water-soluble tetrazolium salts [J]. Food Chem, 2011, 127(2): 711-715.
- [6] Shibata K, Nakai T, Fukuwatari T. Simultaneous high-performance liquid chromatography determination of coenzyme A, dephospho-coenzyme A, and acetyl-coenzyme A in normal and pantothenic acid-deficient rats [J]. Anal Biochem, 2012, 430(2): 151-155.
- [7] Ciulu M, Solinas S, Floris I, *et al.* RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey [J]. Talanta, 2011, 83(3): 924-929.
- [8] Takahashi K, Fukuwatari T, Shibata K. Fluorometric determination of pantothenic acid in human urine by isocratic reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with post-column derivatization [J]. J Chromatogr B, 2009, 877(22): 2168-2172.
- [9] Jin PF, Xia LF, Li Z, *et al.* Rapid determination of thiamine, riboflavin, niacinamide, pantothenic acid, pyridoxine, folic acid and ascorbic acid in Vitamins with Minerals Tablets by high-performance liquid chromatography with diode array detector [J]. J Pharm Biomed Anal, 2012, 70: 151-157.
- [10] Woollard DC, Indyk HE, Christiansen SK. The analysis of pantothenic acid in milk and infant formulas by HPLC [J]. Food Chem, 2000, 69(2): 201-208.
- [11] Banno K, Matsuoka M, Horimoto S, *et al.* Simultaneous determination of pantothenic acid and hopantenic acid in biological samples and natural products by gas chromatography-mass fragmentography [J]. J Chromatogr B: Biomed Sci Appl. 1990, 525: 255-264.
- [12] 张强, 邱娟, 廖年生. 高效毛细管区带电泳法同时测定泛酸钙、β-丙氨酸钙和γ-丁内酯[J]. 分析实验室, 2001, 20(1): 91-92.
Zhang Q, Qiu J, Liao NS. Simultaneous determination of calcium pantothenate and calcium-amino propionate and γ-butyrolactone by high performance capillary zone electrophoresis [J]. Chin J Anal Lab, 2001, 20(1): 91-92.
- [13] 程劫, 谢建春, 苏晓鸥. 饲料中 D-泛酸钙的超临界流体色谱测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(4): 418-420.
Cheng J, Xie JC, Su XO. Determination of D-calcium pantothenate in animal feeds by supercritical fluid chromatography [J]. J Instrum Anal, 2010, 29(4): 418-420.
- [14] Mittermayr R, Kalman A, Trisconi MJ, *et al.* Determination of vitamin B₅ in a range of fortified food products by reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization [J]. J Chromatogr A, 2004, 1032(1-2): 1-6.
- [15] Chen Z, Chen B, Yao S. High-performance liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry for simultaneous determination of taurine and 10 water-soluble vitamins in multivitamin tablets [J]. Anal Chimica Acta, 2006, 569(1-2): 169-175.
- [16] 渠岩, 崔亚娟, 李全霞, 等. 超高效液相色谱-同位素稀释质谱法测定配方奶粉中的泛酸[J]. 食品科学, 2014, 35(8): 212-216.
Qu Y, Cui YJ, Li QX *et al.* Determination of pantothenic acid in formula milk powder using ultra performance liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry [J]. Food Sci, 2014, 35(8): 212-216.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



李洪燕, 工程师, 主要研究方向为食品营养分析检测技术。

E-mail: 1105664207@qq.com



黄金凤, 高级工程师, 主要研究方向为食品及食品相关产品检测, 仪器分析技术。

E-mail: 82309762@qq.com