

# 液相色谱-质谱联用法检测特殊医学配方食品中泛酸的含量

黎小兰\*, 叶少文, 邱青莲, 梁嘉敏, 陈彩云

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

**摘要: 目的** 建立一种快速准确高效的方法检测特殊医学配方食品中泛酸的含量。**方法** 试样中的泛酸, 用酸碱沉淀杂质, 水超声提取, 经 Agilent Eclipse XDB-phenyl 柱分离, 以甲醇和 0.1%甲酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速为 0.4 mL/min, 柱温 40 °C, 采用液相色谱-质谱法检测。**结果** 泛酸在 0.4~7.6 µg/mL 的浓度范围内, 线性关系良好, 相关系数  $r$  均大于 0.99。平均回收率在 90.79%~106.93%之间, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 6.3%, 且在 6 h 内含量保持稳定, 精密度的相对标准偏差(RSD)为 1.5%。**结论** 液质联用法能准确快速高效检测特殊医学配方食品中的泛酸含量, 能对特殊医学用途配方食品中泛酸的含量起到质量控制的目的。

**关键词:** 特殊医学配方; 液质联用; 泛酸; 酸碱沉淀

## Determination of pantothenic acid in special medical formula food by high performance liquid chromatography

LI Xiao-Lan\*, YE Shao-Wen, QIU Qing-Lian, LIANG Jia-Min, CHEN Cai-Yun

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a rapid, accurate and efficient method for the detection of pantothenic acid in special medical formula foods for health products. **Methods** Pantothenic acid in the sample was precipitated by acid and alkali and ultrasonically extracted by water, then separated by Agilent Eclipse XDB-phenyl column at 40 °C with methanol and 0.1% formic acid solution as mobile phase at a flow rate of 0.4 mL/min, and detected by liquid chromatography-mass spectrometry. **Results** The linear relationship of pantothenic acid in the concentration range of 0.4–7.6 µg/mL was good, and the correlation coefficient  $r$  was more than 0.99. The average recovery was between 90.79% and 106.93%, the relative standard deviation (RSD) was 6.3%. The content remained stable within 6 hours, and the relative standard deviation (RSD) of precision was 1.5%. **Conclusion** Liquid-mass spectrometry can accurately and quickly detect the pantothenic acid content in special medical formula foods, and can control the content of pantothenic acid in formulas for special medical products.

**KEY WORDS:** special medical formula; high performance liquid chromatography-mass spectrometry; pantothenic acid; acid-base precipitation

\*通讯作者: 黎小兰, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 475079345@qq.com

\*Corresponding author: LI Xiao-Lan, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 475079345@qq.com

## 1 引言

泛酸又称维生素 B5、遍多酸, 是由泛解酸和  $\beta$ -丙氨酸组成的一种化合物。其偏酸性并广泛存在于多种食物中, 尤其在肉类含量很高, 是辅酶 A(Coenzyme A, COA)和酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)生物合成的重要前体物质<sup>[1,2]</sup>, 参与人体中类固醇、褪黑激素、抗体和亚铁血红素的合成<sup>[3]</sup>, 对维持人体和动物体内的正常生理机能不可或缺<sup>[4,5]</sup>。人体无法自行合成泛酸, 需从食物中获取<sup>[6]</sup>, 因此, 在保健品和食品行业中, 泛酸会作为添加剂或者营养成分添加到产品中。而随着社会发展, 人们的饮食习惯和结构都有所改变, 各类的慢性病患数量也随之上升, 一些患者在生理机能上的需求跟普通人存在一定的差异, 普通的食物已经不能满足, 所以特殊医学配方食品便迎合了他们的需求。特殊医学配方食品在使用时需要遵守医生或营养师的建议和指导, 以特定的疾病患者为使用人群<sup>[7]</sup>, 因而其在产品管理和配方上有一定的特殊性, 该类产品的建立在医学和营养学的基础之上, 需要科学的依据来证明它的安全性和有效性<sup>[8,9]</sup>。

目前检测泛酸含量的方法主要有液相色谱-质谱联用法<sup>[10]</sup>、荧光光度法<sup>[11]</sup>、高效液相色谱-紫外检测器法<sup>[12]</sup>、微生物法和气相色谱-质谱联用法<sup>[13-16]</sup>。由于特殊医学配方食品所含的成分比较复杂, 且蛋白质脂肪含量高, 在利用高效液相色谱法检测泛酸时受到杂峰的干扰大, 色谱柱损耗率高。

本研究通过与 GB5413.17 方法测定数据对比, 并对其前处理进行优化, 选用了酸碱法沉淀蛋白质, 并选用高灵敏度、高选择性的液质联用仪检测特殊用途配方食品中泛酸的含量, 以期建立检测高蛋白质脂肪含量的产品中泛酸含量的方法, 从而降低实验室耗材的损耗率和提高产品质量的控制力度。

## 2 材料与方 法

### 2.1 仪器与试剂

1260 型高效液相色谱仪-带紫外检测器(美国安捷伦公司); 1260 型液相色谱-API3200 型质谱联用仪(美国安捷伦公司-美国 AB Sciex); EQ-500 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Agilent Eclipse XDB-phenyl 色谱柱(4.6 mm $\times$ 100 mm, 3.5  $\mu$ m, 美国安捷伦公司); PHS-3C pH

计(上海仪电科学仪器股份有限公司)。

甲醇(色谱纯, 德国 CNW 科技公司)、一级用水、甲酸(色谱纯, 德国 CNW 科技公司); 盐酸(分析纯, 广州化学试剂厂); 氢氧化钠(分析纯, 广州化学试剂厂); 硫酸锌(分析纯, 广州化学试剂厂); 磷酸二氢钾(分析纯, 广州化学试剂厂); 泛酸钙(中国食品药品检定研究院, 批号: 100370-201402, 纯度: 97.5%)。

特殊医学配方粉(主要成分为蛋白质、低聚果糖、多种维生素、DHA、EPA 等, 汤臣倍健股份有限公司)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 液相色谱法仪器条件

色谱柱: Phenomenex, Kinetex, XB-C<sub>18</sub> (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m); 柱温: 30  $^{\circ}$ C; 流动相: 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液 900 mL, 甲醇 100 mL, 混匀后经 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤; 进样量: 10.0  $\mu$ L; 检测波长: 200 nm。

#### 2.2.2 液相质谱法仪器条件

液相条件: 色谱柱: Phenomenex, Kinetex, XB-C<sub>18</sub>, 100 mm $\times$ 4.6mm, 3.5  $\mu$ m; 柱温: 40  $^{\circ}$ C; 流动相 A: 0.1 % 甲酸溶液, 流动相 B: 甲醇; 梯度洗脱程序见表 1; 进样量: 2.0  $\mu$ L。

表 1 液相质谱法流动相条件

Table 1 Mobile phase conditions of liquid mass spectrometry

时间/min	流速/(mL/min)	A/%	B/%
0.00	0.5	92	8
3.00	0.5	92	8
5.00	0.5	10	90
8.00	0.5	10	90
8.10	0.5	92	8
10.00	0.5	92	8

质谱条件: 离子模式: ESI+模式; 质谱条件见表 2; 运行时间: 10 min。

#### 2.2.3 标准曲线

取泛酸钙对照品 10 mg, 精密称定, 置 50 mL 容量瓶中, 加水超声溶解定容, 得对照品储备液。取对照品储备液用水稀释 100 倍, 得对照使用液。对照使用液分别进样 0.5、1、2、4、8  $\mu$ L, 用液相色谱法和液相质谱法分别测定, 以浓度 C( $\mu$ L/mL)为横坐标(X), 峰面积 A 为纵坐标(Y), 绘制标准工作曲线。

表 2 液相质谱法质谱条件

Table 2 Conditions of mass spectrometry

泛酸	母离子 碎片 Q1	子离子 碎片 Q3	扫描时间 /msec	去簇电压 /V	入口电压 /V	碰撞电压 /V	碰撞室射出 电压/V	气帘气 /psi	碰撞气 /psi	离子源 电压/V	辅助加热 气温度/ $^{\circ}$ C	雾化气 /psi	辅助 加热气/psi
定量离子	220.1	90.0	31.0	31.0	4.0	18	3	22	7	5500	600	60	20
定性离子	220.1	184.1	31.0	31.0	4.0	15	3	22	7	5500	600	60	20

### 2.2.4 液相色谱法前处理

精密称取均匀试样适量(约含泛酸 0.05 mg), 置于 150 mL 的三角瓶中, 加入 30 mL 40 °C~50 °C 温水, 振荡溶解后, 超声(功率 500 W, 频率 50 kHz) 20 min, 待室温后, 用 0.1 mol/L 盐酸溶液调节 pH 至 4.5±0.1, 加入 5 mL 15 g/100 mL 充分混合, 转入 50 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度, 摇匀, 用滤纸过滤后, 过 0.45 μm 滤膜, 即得样品供试液, 在 2.2.1 分析方法的条件下, 进行分析测定。

### 2.2.5 液相质谱法样品前处理

精密称取均匀试样适量(约含泛酸 0.05 mg), 置于 250 mL 的烧杯中, 加入 30 mL 水, 摇匀, 30 °C 超声(功率 500 W, 频率 50 kHz) 5 min, 用 0.1 mol/L 盐酸溶液和 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调样品溶液 pH 至 3.0~6.0 之间(使样品中的蛋白质出现絮凝即可), 然后转移样品溶液至 50 mL 容量瓶中用水定容至刻度, 摇匀, 然后转移至离心管中, 8000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 过 0.45 μm 滤膜, 即得样品供试液, 进样 2 μL, 在 2.2.1 分析方法的条件下, 进行分析测定。质谱条件见表 2。

### 2.2.6 数据处理

试样中泛酸的含量按如下公式计算:

$$X = \frac{C \times V \times 0.92 \times K}{m}$$

式中: X—试样中泛酸的含量/%;

V—试样稀释的体积/mL;

C—试样溶液中泛酸钙的浓度/mmol/L;

m—试样的质量/g;

K—单位转换系数, K=0.1;

0.92—泛酸钙换成泛酸的转换系数。

### 2.2.7 加标回收实验

精密称取约 2.5 g 样品 9 份(已知样品的泛酸含量: 2.14 mg/100g)于 250 mL 烧杯中, 分成 3 组, 每组 3 份, 各组分别精密加入泛酸对照液(浓度: 0.19 mg/mL) 0.2、0.4、0.6 mL, 然后加入 30 mL 水, 摇匀, 30 °C 超声(功率 500 W, 频率 50 kHz) 5 min, 用 0.1 mol/L 盐酸溶液和 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调样品溶液 pH 至 3.0~6.0 之间(使样品中的蛋白

质出现絮凝即可), 然后转移样品溶液至 50 mL 容量瓶中用水定容至刻度, 摇匀, 然后转移至离心管中, 8000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 过 0.45 μm 滤膜, 即得样品加标供试液。用液相质谱法测定泛酸含量, 计算加标回收率。

## 3 结果与分析

### 3.1 液相质谱法与液相色谱法对比

液相色谱法与液相质谱法测定结果比对见表 3, 由结果可知, 液相质谱法与液相色谱法相比, 准确度更高。

本研究主要是针对测定特殊医学配方粉中泛酸检测进行研究。对于其蛋白质含量较高、添加的成分复杂种类的特殊医学配方粉, 采用了酸碱沉淀法, 沉淀样品中的蛋白质后, 达到了净化提取目标成分以及保护仪器和色谱柱, 而利用液相色谱法进行检测时, 色谱柱主峰受到杂质峰干扰, 导致检测存在的不确定度的因素多, 为了提高检测准确度, 本研究选择取上清液, 再经液相-串联质谱分析, 外标法定量。结果表明, 利用质谱检测特殊医学配方粉中泛酸含量会比色谱法有更高的准确度。液相色谱法色谱图见图 1; 质谱图见图 2。

表 3 液相色谱法与液相质谱法测定结果对比  
Table 3 Comparison of detection results between liquid chromatography and liquid mass spectrometry

方法	含量/(mg/100g)	RSD/%
液相色谱法	2.302	10.6
	2.125	
	1.864	
液相质谱法	2.124	2.0
	2.108	
	2.187	

### 3.2 标准曲线

泛酸的标准曲线, 如表 4 所示, 相关系数  $r$  为 0.9991, 大于 0.99, 能达到检测要求。

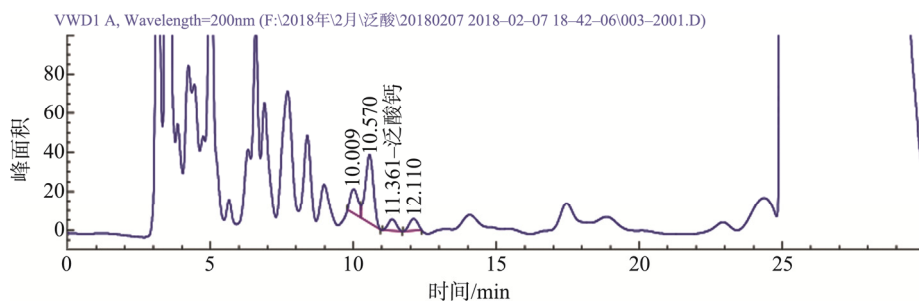


图 1 特殊医学配方粉中泛酸的液相色谱图

Fig.1 Chromatogram of liquid of pantothenic acid in special medical formula food

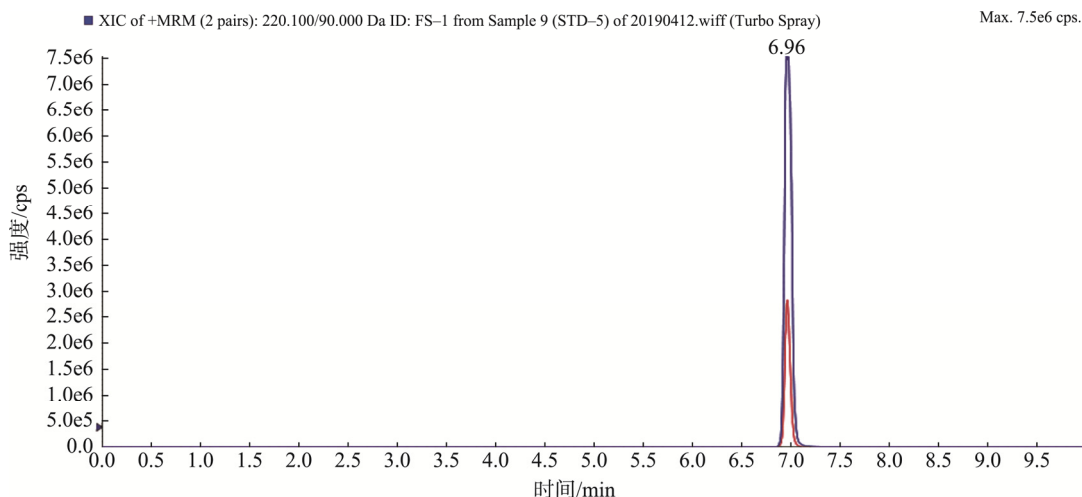


图 2 特殊医学配方粉中泛酸的质谱图  
Fig.2 Mass spectrogram pantothenic acid in special medical formula food

表 4 标准曲线  
Table 4 Standard curve

标准序号	浓度 C/( $\mu\text{g/mL}$ )	峰面积(A)
STD1	0.475	60500
STD2	0.950	122000
STD3	1.900	259000
STD4	3.800	539000
STD5	7.600	1000000
线性方程	$A=133000C+4910$	
相关系数(r)	0.9991	

### 3.3 专属性实验

不加样品, 按照 2.2.4、2.2.5 试样制备方法处理, 按照

2.2.1 色谱、质谱条件测定空白溶液, 与泛酸标准工作液的出峰时间对比, 实验结果如图 2、3 所示, 按照 2 种处理方法进行了空白试验, 表明样品试验信号的主峰无干扰。

### 3.4 检出限和定量限

当信噪比(S/N)为 3 时, 泛酸检出限为 1.9  $\text{ng/mL}$ ; 样品取样量 2.5 g, 定容 50 mL 时, 该方法的泛酸检出限为 38  $\mu\text{g/kg}$ 。当信噪比(S/N)为 10 时, 泛酸定量限为 6.3  $\mu\text{g/mL}$ ; 样品取样量 2.5 g, 定容 50 mL 时, 方法的泛酸定量限为 126  $\mu\text{g/kg}$ 。

### 3.5 精密度试验

精密称取 6 份样品, 按照 2.2.4、2.2.5 试样制备方法处理样品, 检测样品含量, 计算其 RSD(%), 试验数据见下表 5。6 份样品泛酸含量的 RSD 为 1.5%, 表明该方法有较好的精密度。

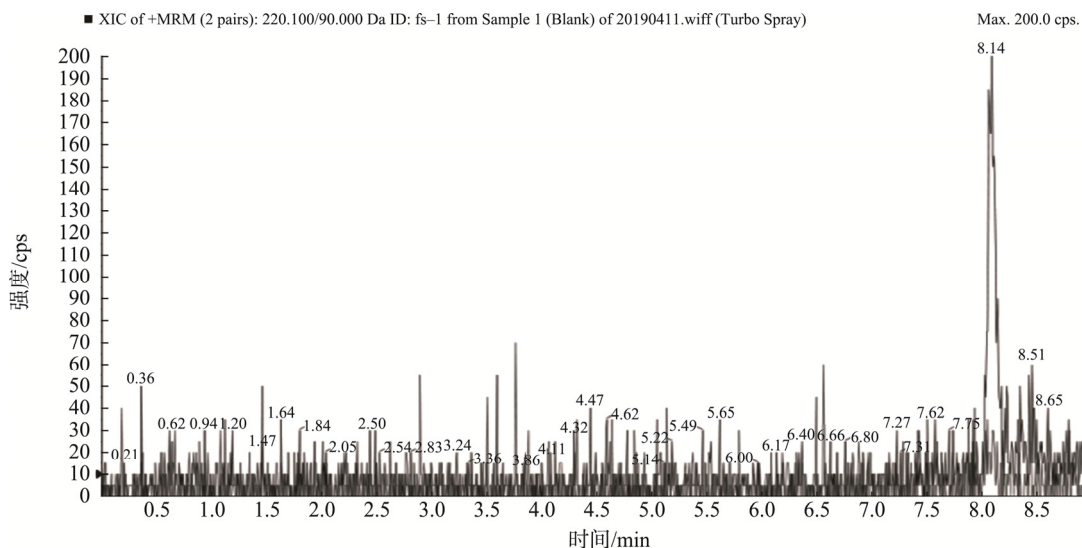


图 3 空白质谱图  
Fig.3 Blank mass spectrogram

表 5 精密度结果  
Table 5 Precision result

序号	含量/(mg/100g)	平均含量/(mg/100g)	RSD/%
1	2.124		
2	2.108		
3	2.187		
4	2.136	2.14	1.5
5	2.162		
6	2.111		

### 3.6 耐用性试验(稳定性实验)

将样品供试液分别在室温下放置 0、1、2、3、4、6 h 后,按 2.2.2 条件测定浓度,计算其 RSD(%).试验数据见表 6。样品供试液分别在室温下放置 0、1、2、3、4、6 h 后, RSD 为 0.4%,表明样品供试液在室温下 6 h 内的稳定性良好。

表 6 耐用性实验结果  
Table 6 Stability result

放置时间/h	0	1	2	3	4	6
浓度/( $\mu\text{g/mL}$ )	1.351	1.353	1.344	1.345	1.351	1.354
RSD/%			0.4			

### 3.7 回收率实验

加标回收实验结果如表 7。平均回收率为 97.4%,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 6.3%,说明该方法检测泛酸有良好的准确性。

表 7 回收率结果  
Table 7 Recovery rate result

序号	加标量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1		106.93		
2	0.038	96.82		
3		106.2		
4		93.85		
5	0.076	98.05	97.4	6.3
6		99.71		
7		91.89		
8	0.114	90.79		
9		91.59		

## 4 结 论

本研究建立了一种酸碱沉淀法沉淀蛋白质后,经液相-

串联质谱检测特殊医学配方食品中泛酸含量的方法。结果表明,用液相色谱条件法检测时,样品中的泛酸能在 10 min 内实现快速分离检测,并无杂质干扰,实现对目标物的针对性检测。通过对该方法的检出限、空白试验、稳定性试验、线性确认、回收率试验等确认,证明该方法能准确快速地检测特殊医学配方食品中的泛酸含量,具有快速、简单、准确、灵敏等特点,有助于实验室的分析效率,确保产品质量,降低成本,为特殊医学配方食品中泛酸含量的测定提供参考。

### 参考文献

- 田浩,王志伟,顾文佳,等.微生物法测定食品中叶酸、泛酸、生物素、维生素 B12 注意事项和实践[J].检测与认证,2018,(9):127-130.  
Tian H, Wang ZW, Gu WJ, et al. Matters needing attention and practical experience for microbiological method determination of folic acid, pantothenic acid, biotin and vitamin B<sub>12</sub> in foods [J]. Chin Qual Certific, 2018, (9): 127-130.
- 张小涛,章云飞,侯宏卫,等.液相色谱-串联质谱法测定尿液中的泛酸[J].分析测试学报,2017,36(6):809-811,816.  
Zhang XT, Zhang YF, Hou HW, et al. Determination of pantothenic acid in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2017, 36(6): 809-811, 816.
- 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 Lif, 2008, 28(4): 448-452.
- 李静静,范菲,杨会鸽.高效液相色谱法测定多维元素片中泛酸钙的含量[J].化学与黏合,2017,39(3):234-236.  
Li JJ, Fan F, Yang HG. Determination of calcium pantothenate content in multivitamins and elements tablets HPLC [J]. Chem Adhes, 2017, 39(3): 234-236.
- 韩秀山. D-泛酸钙生产现状及市场分析[J].精细与专用化学品,2005,13(19):28-29.  
Han XS. Determination of free amino acids of kelp by 2D valve-switching ion chromatography [J]. Fine Spec Chem, 2005, 13(19): 28-29.
- 尹烁,杨懿,李永新,等.高效液相色谱法同时测定乳制品中的泛酸和生物素[J].现代预防医学,2018,45(4):708-711.  
Yin S, Yang Y, Li YX, et al. Simultaneous determination of pantothenic acid and biotin in dairy products by high-performance liquid chromatography [J]. Mod Prev Med, 2018, 45(4): 708-711.
- 宁俊,张茜,王新明,等.国内外特殊医学用途配方食品发展概况[J].生物产业技术,2018,6(11):68-74.  
Ning J, Zhang Q, Wang XM, et al. The development of foods for special medical purpose at home and abroad [J]. Biotechnol Bus, 2018, 6(11): 68-74.
- FDA. Guidance for industry: frequently asked question about medical foods [Z].
- 李美英,李雅慧,姜雨,等.浅析我国特殊医学用途配方食品监管概况[J].食品工业科技,2016,(18):387-390.  
Li MY, Li YH, Jiang Y, et al. Analysis of the regulation of foods for special medical purpose in China [J]. Sci Technol Food Ind, 2016, (18): 387-390.
- 王凤玲,刘爱国,孙佳佳,等.高效液相色谱-质谱法同时测定婴幼儿

- 配方奶粉中叶酸、VB<sub>12</sub>和生物素[J]. 食品科学, 2013, 34(22): 269-272.
- Wang FL, Liu AG, Sun JJ, *et al.* Simultaneous determination of folic acid, vitamin B<sub>12</sub> and biotin in infant formula by HPLC-MS-MS [J]. *Sci Food*, 2013, 34(22): 269-272.
- [11] 陈素明, 章竹君, 杨春艳, 等. 流动注射-电化学氧化荧光法测定叶酸[J]. 分析实验室, 2006, 25(11): 15-19.
- Chen SM, Zhang ZJ, Yang CY, *et al.* Determination of folic acid by flow injection-electrochemical oxidation fluorescence method [J]. *Chin J Anal Lab*, 2006, 25(11): 15-19.
- [12] 任丹丹, 谢云峰, 刘佳佳, 等. 高效液相色谱法同时测定食品中 9 中水溶性维生素[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, (53): 660-663.
- Reng DD, Xie YF, Liu JJ, *et al.* Simultaneous determination of nine water-soluble vitamins in foods by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(3): 660-663.
- [13] Andrieux P, Fontannaz P, Kilinc T, *et al.* Pantothenic acid (vitamin B<sub>5</sub>) in fortified foods: Comparison of a novel ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method and a microbiological assay [J]. *J Aoac Int*, 2012, 95(1): 143-148.
- [14] Kiyoshi B, Masayuki M, Shingo H, *et al.* Simultaneous determination of pantothenic acid and hopantenic acid in biological samples and natural products by gas chromatography-mass fagmentography [J]. *J Chromatogr*, 1990, (525): 255-264.
- [15] 刘志楠, 喻东威, 宋晓东, 等. 盐酸和泛酸不同方法检测的对比[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(11): 90-93.
- Liu ZN, Yu DW, Song XD, *et al.* The comparison of rhe different methods to test nicotinic acid and pantothenic acid [J]. *Food Res Dev*, 2011, 32(11): 90-93.
- [16] 张施敬, 李姣, 林耀文, 等. 微生物法测定婴幼儿配方粉中泛酸质量分数的不确定度评定[J]. 中国乳品工业, 2014, 42(12): 37-40.
- Zhang SJ, Li J, Lin YW, *et al.* Uncertainty evaluation for microbiological determination of pantothenic acid in infant milk powder [J]. *Chin Dair Ind*, 2014, 42(12): 37-40.

(责任编辑: 陈雨薇)

### 作者简介



黎小兰, 主要研究方向为保健食品的质量检测。

E-mail: 475079345@qq.com