

# 超高效液相色谱-同位素稀释质谱法同时测定 婴幼儿配方奶粉中 10 种水溶性维生素

严 华, 崔凤云, 别 玮, 齐鹤鸣, 冯 鑫, 张朝晖\*

(北京海关技术中心, 北京 100026)

**摘 要:** **目的** 建立超高效液相色谱-同位素稀释质谱法(ultra performance liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry, UPLC-IDMS)同时检测婴幼儿配方奶粉中 10 种水溶性维生素(维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、烟酸、烟酰胺、吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺、泛酸、生物素、叶酸)的方法。**方法** 样品用水溶解后, 加入同位素内标, 用 1 mol/L 盐酸溶液调节 pH 至 1.7, 再用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 4.5, 经 Agilent ZORBAX SB-AQ C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm×3.0 mm, 1.8 μm)分离, 正离子模式下以 0.2% 甲酸水溶液和甲醇-乙腈(4:6, V:V)为流动相, 负离子模式下以水和甲醇-乙腈(4:6, V:V)为流动相梯度洗脱, 采用电喷雾离子源, 分别在正、负离子模式下进行多反应监测模式测定, 内标法定量。**结果** 10 种水溶性维生素在 10~5000 ng/mL 内具有良好的线性关系, 相关系数( $r^2$ )大于 0.99, 加标回收率为 85.7%~115.8%, 相对标准偏差为 1.82%~9.67%。**结论** 该方法简便、快速、灵敏、准确, 可满足婴幼儿配方奶粉中水溶性维生素的检测要求。

**关键词:** 婴幼儿配方奶粉; 水溶性维生素; 超高效液相色谱-同位素稀释质谱法; 内标法

## Simultaneous determination of 10 kinds of water soluble vitamins in infant formula by ultra performance liquid chromatography–isotope dilution mass spectrometry

YAN Hua, CUI Feng-Yun, BIE Wei, QI He-Ming, FENG Xin, ZHANG Zhao-Hui\*

(Beijing Customs Technology Center, Beijing 100026, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for simultaneous determination of 10 water soluble vitamins (vitamin B<sub>1</sub>, vitamin B<sub>2</sub>, niacin, niacinamide, pyridoxin, pyridoxal, pyridoxamine, pantothenic acid, biotin, and folic acid) in infant formula by ultra performance liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry (UPLC-IDMS). **Methods** Samples were dissolved in water and spiked isotope internal standard, the pH value was adjusted to 1.7 by 1 mol/L HCl solution and then adjusted pH to 4.5 by 1 mol/L NaOH solution, then separated with Agilent ZORBAX SB-AQ C<sub>18</sub> column (100 mm×3.0 mm, 1.8 μm) in gradient elution using 0.2% formic acid solution and methanol-acetonitrile (4:6, V:V) as mobile phase at positive ionization mode, and using H<sub>2</sub>O and methanol-acetonitrile (4:6, V:V) as mobile phase at negative ionization mode. Mass spectrometry data was acquired

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1605100)

Fund: Supported by National Key R & D Program of China (2019YFC1605100)

\*通讯作者: 张朝晖, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: zhangzhaohuibiqtc@163.com

\*Corresponding author: ZHANG Zhao-Hui, Ph.D, Professor, Beijing Customs Technology Center, No.6, Tianshuiyuan Street, Chaoyang District, Beijing 100026, China. E-mail: zhangzhaohuibiqtc@163.com

by multiple reaction monitoring (MRM) mode using electrospray ionization at both positive and negative ionization mode. The quantification analysis was carried out by internal standard method. **Results** The results showed a good linear calibration in the range of 10–5000 ng/mL with correlation coefficients ( $r^2$ ) above 0.99, the recoveries of 10 vitamins ranged from 85.7% to 115.8%, with relative standard deviations of 1.82%–9.67%. **Conclusion** This method is simple, rapid, sensitive and accurate, and can meet the determination requirements of water soluble vitamins in infant formula.

**KEY WORDS:** infant formula; water soluble vitamins; ultra performance liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry; internal standard method

## 1 引言

维生素对促进人体的生长发育以及维持身体健康有重要作用,根据维生素的溶解性质不同,可分为脂溶性维生素和水溶性维生素。水溶性维生素主要包括维生素 B<sub>1</sub>(VB<sub>1</sub>)、维生素 B<sub>2</sub>(VB<sub>2</sub>)、烟酸、烟酰胺、维生素 B<sub>6</sub>(吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺)(VB<sub>6</sub>)、泛酸(VB<sub>5</sub>)、生物素(VB<sub>7</sub>)、叶酸(VB<sub>9</sub>)、维生素 B<sub>12</sub>(VB<sub>12</sub>)以及抗坏血酸(VC)。现行国标对水溶性维生素的测定方法主要以单一维生素的检测为主<sup>[1-8]</sup>,其中 VB<sub>5</sub> 第一法、VB<sub>7</sub>、VB<sub>9</sub> 以及 VB<sub>12</sub> 为微生物法,VB<sub>1</sub>、VB<sub>2</sub>、烟酸、烟酰胺、VB<sub>5</sub> 第二法、VB<sub>6</sub>、VC 为高效液相色谱法。烟酸、烟酰胺为紫外检测器检测,VB<sub>6</sub> 为荧光检测器检测。VB<sub>1</sub> 和 VB<sub>2</sub> 需要酶解,VB<sub>1</sub> 还需要衍生才能用荧光检测器检测。实际检测过程中一个样品需要多个流程和仪器才能完成水溶性维生素的检测,检测效率较低。

文献报道了多种水溶性维生素同时检测的方法,主要包括高效液相色谱法<sup>[9-11]</sup>和高效液相色谱-串联质谱法<sup>[12-17]</sup>。高效液相色谱法比较难以实现多种维生素的同时测定,主要原因是紫外检测器选择性较差,易受基质干扰,而且部分化合物灵敏度较低,如泛酸没有生色团,用紫外检测器灵敏度低<sup>[17]</sup>,VB<sub>2</sub> 和 VB<sub>6</sub> 需要用荧光检测器才能满足灵敏度的要求。质谱检测器在选择性、准确性和灵敏度方面优势明显,容易实现多种维生素的同时测定,但也面临基质干扰影响定量结果准确性的问题<sup>[16]</sup>。同位素稀释质谱法可有效扣除基质干扰,是目前多维生素检测中准确度最高的方法,如 Goldschmidt 等<sup>[16]</sup>应用该方法分析美国国家标准与技术研究院(national institute of standards and technology, NIST)标准参考物质婴幼儿配方粉中 7 种水溶性维生素(VB<sub>1</sub>, 烟酰胺, 吡哆醇, VB<sub>5</sub>、VB<sub>9</sub>、VB<sub>2</sub> 和 VB<sub>7</sub>)的含量。Phinney 等<sup>[17]</sup>应用该方法分析营养补充剂和婴幼儿配方粉中 7 水溶性维生素(VB<sub>1</sub>、VB<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>、B<sub>5</sub>、B<sub>6</sub>)的含量。但由于同位素内标费用较高,该方法目前还未得到普及。

本研究建立了一次提取 10 种水溶性维生素(VB<sub>1</sub>、VB<sub>2</sub>、烟酸、烟酰胺、吡哆醇、吡哆醇、吡哆胺、VB<sub>5</sub>、

VB<sub>7</sub>、VB<sub>9</sub>)的样品前处理方法及超高效液相色谱-同位素稀释质谱检测法,采用适合分离极性化合物的 Agilent ZORBAX SB-AQ C<sub>18</sub> 色谱柱,将 10 种水溶性维生素分别在正、负离子 2 种模式进行质谱检测,内标法定量。经方法学验证,该方法准确性高、重复性好,线性范围宽,可通过一个实验流程实现婴幼儿配方粉中 10 种水溶性维生素的分析测试,大大提高了检测效率,为监管部门的日常检测大批量工作提供参考。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

SHIMADZU 超高效液相色谱仪系统(配备 LC-30AD、SIL-30AC 自动进样器、CTO-20AC 柱温箱,日本岛津公司); AB SCIEX QTRAP 6500 四极杆-线性离子阱串联质谱仪(配备电喷雾离子源、正、负离子扫描模式,美国 AB SCIEX 公司); Memmert 恒温振荡器(德国 Memmert 公司); Sigma 3K15 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); N-EVAP-24 氮吹仪(美国 Organomation 公司); Milli-Q 纯水器(美国 Millipore 公司); IKA MS3 涡旋混匀器(德国 IKA 公司)。

维生素 B<sub>1</sub>(VB<sub>1</sub>, 纯度 98%)、维生素 B<sub>2</sub>(VB<sub>2</sub>, 纯度 98%)、烟酸(纯度 98%)、烟酰胺(纯度 98%)、吡哆醇(纯度 98%)、吡哆醛(纯度 98%)、吡哆胺(纯度 98%)、生物素(VB<sub>7</sub>, 99%)、泛酸钙(VB<sub>5</sub>, 纯度 94.3%)、叶酸(VB<sub>9</sub>, 91.3%)(德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司); 内标 VB<sub>1</sub>-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>(纯度 97%)、内标 VB<sub>2</sub>-<sup>13</sup>C<sub>4</sub><sup>15</sup>N<sub>2</sub>(纯度 95%)、内标烟酸-D<sub>4</sub>(纯度 98%)、内标烟酰胺-D<sub>4</sub>(纯度 98%)、内标吡哆醇-D<sub>3</sub>(纯度 94%)、内标 VB<sub>5</sub>-<sup>13</sup>C<sub>3</sub><sup>15</sup>N(纯度 97%)、内标生物素-D<sub>4</sub>(纯度 95%)、内标叶酸-D<sub>4</sub>(纯度 97%)(加拿大 Toronto Research Chemical 公司); 甲醇、乙腈、正己烷、醋酸铵(色谱纯,美国 Fisher Chemical 公司); 吡哆醇与吡哆胺以吡哆醇-D<sub>3</sub> 为内标。

实际样品为北京市售婴幼儿配方粉。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 溶液配制

分别精确称取标准品至 10 mL 棕色容量瓶中,烟酸、

烟酰胺、吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺、泛酸钙(VB<sub>5</sub>)、生物素(VB<sub>7</sub>)、叶酸(VB<sub>9</sub>)用甲醇溶解定容至刻度, VB<sub>1</sub> 用 0.01 mol/L 盐酸溶解, VB<sub>2</sub> 用盐酸超声溶解后, 用水定容至刻度, 配制标准储备液。准确吸取适量上述维生素标准储备液, 用水稀释配制混合标准中间液, 浓度为 10 μg/mL。再用水逐级稀释成浓度为 10、20、50、100、250、500、1000、2000、4000 ng/mL 的混合标准工作液, 以上标准工作溶液均添加一定体积的内标溶液, 使内标溶液的最终浓度为 10 ng/mL。

### 2.2.2 样品前处理

精密称取 5.00 g 配方奶粉样品于 50 mL 具盖离心管中, 加入 25 mL 40~50 °C 水, 使配方奶粉充分溶解, 加入 50 μL 浓度为 10 μg/mL 混合内标溶液, 用 1 mol/L 盐酸溶液调节 pH 至 1.7, 静置 5 min, 再用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 4.5, 用纯水定容至 50 mL。8000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 过 0.2 μm 滤膜, 上机检测。

### 2.2.3 液相色谱-串联质谱条件

#### (1) 液相色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-AQ C<sub>18</sub> 色谱柱(3.0 mm×100 mm, 1.8 μm)。

正离子模式下流动相: A 为 0.2% 甲酸水溶液, B 为甲醇-乙腈(4:6, V:V)。流速: 250 μL/min; 柱温: 40 °C; 进样量: 5 μL。梯度洗脱程序: 0~1.0 min, 5% B, 1.0~3.0 min, 5% B~30% B, 3.0~3.5 min, 30%~90% B, 3.5~9.0 min, 90% B, 9.0~9.1 min, 90%~5% B, 9.1~12 min, 5% B。

负离子模式下流动相: A 为 H<sub>2</sub>O, B 为甲醇-乙腈(4:6, V:V)。流速: 250 μL/min; 柱温: 40 °C; 进样量: 5 μL。梯度洗脱程序: 0~1.0 min, 5% B, 1.0~3.0 min, 5% B~30% B, 3.0~3.5 min, 30%~90% B, 3.5~9.0 min, 90% B, 9.0~9.1 min, 90%~5% B, 9.1~12 min, 5% B。

#### (2) 质谱条件

正离子模式多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)分析条件: 电喷雾电压: 5500.0 V; 雾化气流速: 50.0 L/min; 气帘气流速: 20.0 L/min; 辅助气流速: 50.0 L/min; 离子源温度: 500 °C;

负离子模式 MRM 分析条件: 电喷雾电压: -4500.0 V; 雾化气流速: 50.0 L/min; 气帘气流速: 20.0 L/min; 辅助气流速: 50.0 L/min; 离子源温度: 500 °C;

## 3 结果与分析

### 3.1 前处理条件优化

比较现行国标检测维生素 B 族的方法, 发现 VB<sub>1</sub>、VB<sub>2</sub>、烟酸、烟酰胺、吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺、VB<sub>5</sub> 的前处理方法的共同特点是先对样品进行酸化, 再用 NaOH 调节 pH 至 4.0~6.0。为能同时提取多种水溶性维生素, 设

计实验方案为先用盐酸调节 pH 至 1.7, 再用 NaOH 调节 pH 至 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5。经实验发现, 调节 pH 至 5.5 以上, 溶液较难过滤, 调节 pH 至 4.0~5.5 之间时, 10 种水溶性维生素均可被提取出来, 因此最终选择调节 pH 至 4.5。

调节样品溶液 pH 值后, 因样品中的蛋白发生了沉淀, 需要将沉淀去除, 比较过滤和离心 2 种方式去除沉淀的效果, 发现 2 种方法均能达到去除沉淀的目的, 但部分样品过滤时速度较慢, 滤纸容易被沉淀堵塞。采用离心的方式即可以有效将沉淀与上清液分离, 并且操作更加方便, 无需溶液转移等步骤, 因此选择离心的方法去除沉淀。

### 3.2 质谱条件优化

文献报道的质谱检测方法均在正离子模式下检测。本实验采用四极杆-线性离子阱串联质谱系统, 分别在 ESI 正、负离子模式下, 对 VB<sub>1</sub>、VB<sub>2</sub>、烟酸、烟酰胺、VB<sub>5</sub>、吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺、VB<sub>7</sub>、VB<sub>9</sub> 的标准品溶液(浓度为 100 ng/mL)进行母离子扫描, 发现 VB<sub>1</sub>、VB<sub>2</sub>、烟酸、烟酰胺、吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺、VB<sub>7</sub> 在正离子模式下质谱信号强, VB<sub>5</sub>、VB<sub>9</sub> 在正离子模式下质谱信号较差, 在负离子模式下质谱信号强, 且同位素内标的质谱响应符合相同规律。根据质谱响应, 将 10 种水溶性维生素分成正、负离子 2 种电离模式进行检测。在子离子扫描模式下, 通过施加一定碰撞能量, 使各个化合物母离子碎裂产生子离子, 获得子离子信息, 再在多反应监测模式(MRM 模式)下, 对特征离子对的去簇电压和碰撞能量进行优化, 选择特征离子对的丰度值最强的去簇电压和碰撞能量。选用响应值最高的子离子作为定量离子, 响应值较低的作为定性离子。优化得到的质谱检测参数如表 1 所示。

10 种水溶性维生素及 8 种内标的母离子、定量/定性离子对、驻留时间、碰撞能量及去簇电压等质谱参数见表 1。

### 3.3 色谱条件优化

VB<sub>1</sub>、VB<sub>2</sub>、烟酸、烟酰胺、VB<sub>6</sub> 属于强极性化合物, 在普通反相色谱柱上的保留能力较差, 高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)常用的流动相为 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-乙腈体系<sup>[11]</sup>, 刘娜等<sup>[9]</sup>在磷酸盐水溶液中添加 1 mmol/L 七氟丁酸以延长 VB<sub>1</sub>、VB<sub>5</sub>、VB<sub>6</sub> 几种物质的保留时间, 但这些体系均不适合质谱检测系统。本研究通过选择对极性化合物有较强保留的 SB AQ 色谱柱(3.0 mm×100 mm, 1.8 μm), 使 10 种维生素得到了有效保留和分离。在正离子模式下采用 0.2% 甲酸水溶液-甲醇-乙腈(4:6, V:V), 负离子模式下采用纯水-甲醇-乙腈(4:6, V:V)体系, 梯度洗脱。10 种水溶性维生素及其内标的定量离子提取离子流色谱图见图 1。

表 1 10 种水溶性维生素及 8 种同位素内标质谱参数  
Table 1 Mass spectrometry parameters of 10 kinds of water-soluble vitamins and 8 isotopes

维生素名称	母离子( $m/z$ )	定量/定性离子( $m/z$ )	驻留时间/ms	碰撞能量/V	去簇电压/V
维生素 B <sub>1</sub>	265.0	144.2*/122.3	10	18.7*/15.0	40
维生素 B <sub>2</sub>	377.0	243.0*/198.0	10	30.0*/46.8	100
烟酸	124.0	80.0*/53.0	10	26.0*/40.5	40
烟酰胺	123.0	80.0*/53.0	10	24.9*/38.2	40
吡哆醇	170.0	152.0*/134.0	10	17.4*/28.8	40
吡哆醛	168.0	150.0*/94.0	10	15.7*/29.5	40
吡哆胺	169.0	152.0*/134.0	10	17.0*/30.0	40
维生素 B <sub>7</sub>	245.0	227.0*/167.2	10	23.4*/17.3	40
维生素 B <sub>1</sub> - <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	268.2	147.2*/122.2	10	17.3*/17.0	40
烟酸-D <sub>4</sub>	128.2	84.0*/54.1	10	28.6*/40.1	40
烟酰胺-D <sub>4</sub>	127.0	84.0*/56.0	10	26.2*/41.0	40
吡哆醇-D <sub>3</sub>	173.3	155.1*/136.1	10	18.0*/28.0	40
维生素 B <sub>7</sub> -D <sub>4</sub>	249.2	231.0*/171.0	10	13.7*/19.0	40
维生素 B <sub>2</sub> - <sup>13</sup> C <sub>4</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	383.2	249.1*/202.2	10	30.5*/47.7	100
维生素 B <sub>5</sub>	218.2	146.1*/87.8	10	-15.5*/-20.0	-50
维生素 B <sub>9</sub>	440.1	422.1*/311.2	10	-25.1*/-30.6	-50
维生素 B <sub>5</sub> - <sup>13</sup> C <sub>3</sub> <sup>15</sup> N	222.0	147.0*/91.8	10	-22.8*/-17.1	-50
维生素 B <sub>9</sub> -D <sub>4</sub>	444.3	426.4*/315.4	10	-26.3*/-30.0	-50

注: \*为定量离子。

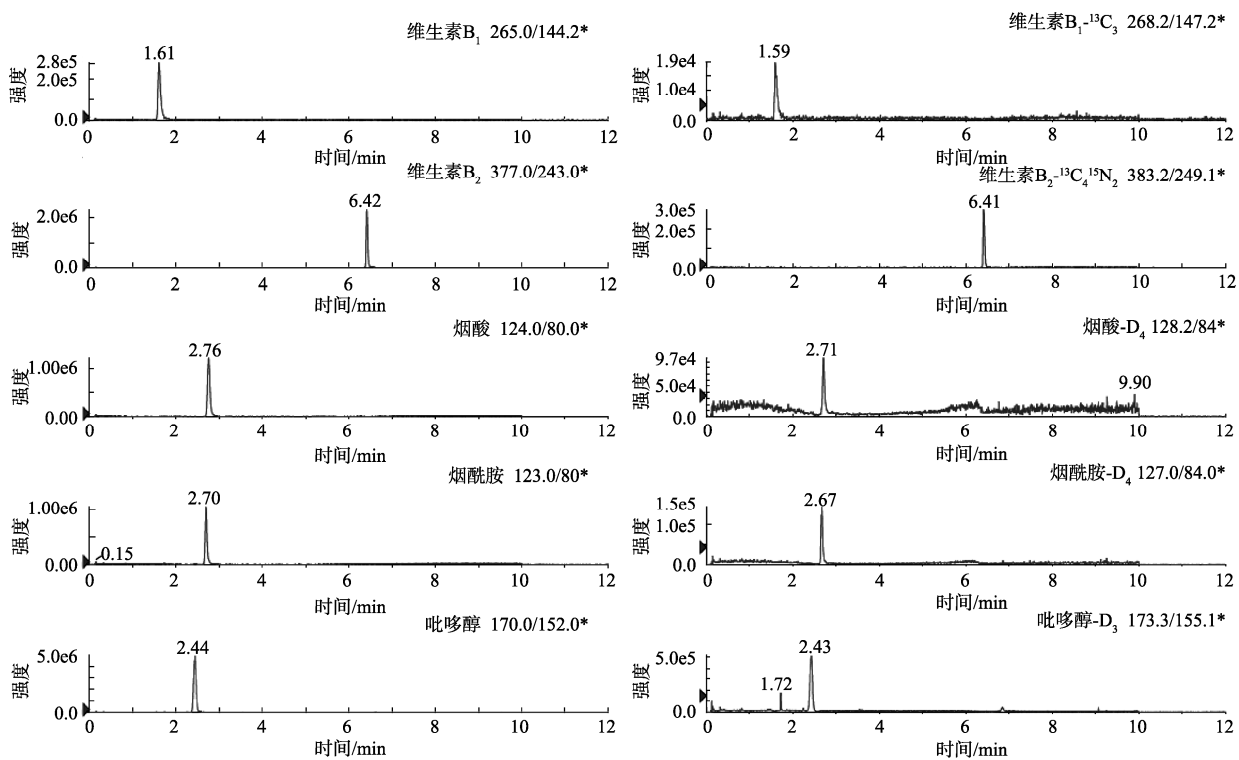
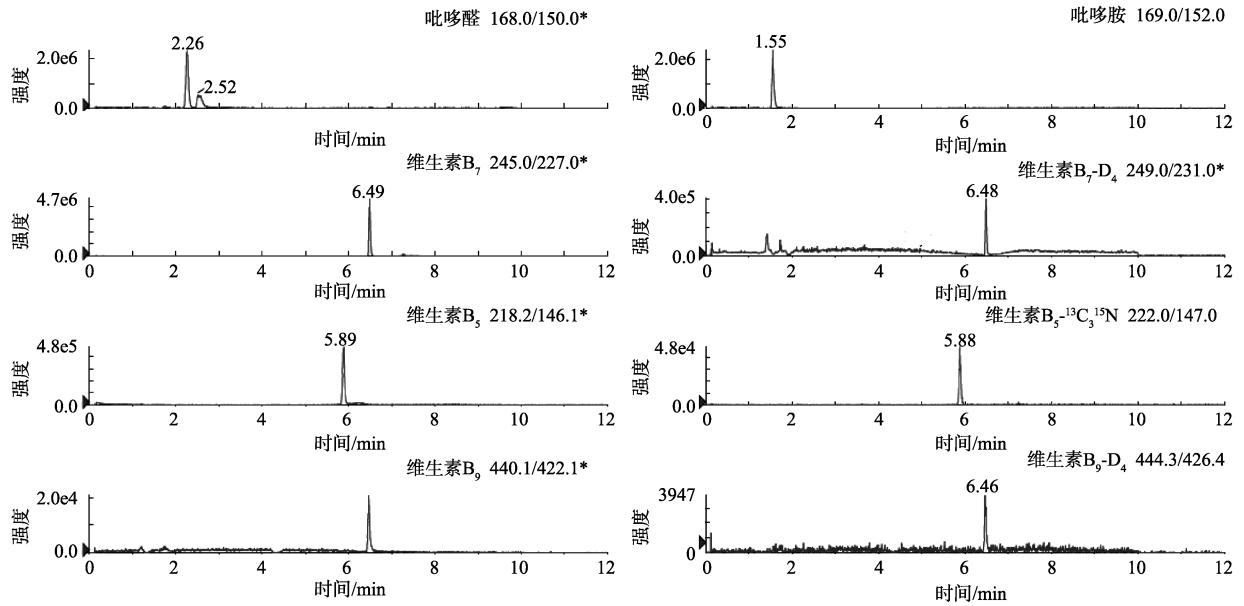


图 1 10 种水溶性维生素及 8 种同位素内标的提取离子色谱图

Fig.1 Extracted ion chromatograms of 10 kinds of water-soluble vitamins and 8 isotopes



续图 1 10 种水溶性维生素及 8 种同位素内标的提取离子色谱图

Fig.1 Extracted ion chromatograms of 10 kinds of water-soluble vitamins and 8 isotopes

### 3.4 线性范围与定量下限

由于婴幼儿配方奶粉中不同水溶性维生素的含量差异较大, 从  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  到  $\text{mg}/100\text{ g}$  不等。以某品牌婴幼儿奶粉标示值为例,  $\text{VB}_1$  为  $500\ \mu\text{g}/100\text{ g}$ ,  $\text{VB}_2$   $1600\ \mu\text{g}/100\text{ g}$ ,  $\text{VB}_6$ (吡哆醇) $400\ \mu\text{g}/100\text{ g}$ , 烟酸  $5000\ \mu\text{g}/100\text{ g}$ , 叶酸  $65\ \mu\text{g}/100\text{ g}$ , 泛酸  $3500\ \mu\text{g}/100\text{ g}$ , 生物素  $20\ \mu\text{g}/100\text{ g}$ , 理论上机浓度最低值为生物素  $20\ \text{ng}/\text{mL}$ , 最高值为烟酸  $5000\ \text{ng}/\text{mL}$ 。因此对仪器的检测灵敏度和线性范围要求较

高。实验根据婴幼儿配方奶粉中各水溶性维生素的大致浓度范围, 确定标准曲线的范围。

研究表明,  $\text{VB}_1$ 、 $\text{VB}_2$ 、烟酸、烟酰胺、吡哆醇、吡哆胺、吡哆醛、 $\text{VB}_5$ 、 $\text{VB}_7$ 、 $\text{VB}_9$  在  $10\sim 5000\ \text{ng}/\text{mL}$  的浓度范围内, 线性关系良好, 曲线  $r^2 > 0.99$ 。以 3 倍和 10 倍基线噪音所对应的维生素浓度分别计算方法的检出限和定量限, 测得 10 种水溶性维生素的线性范围、相关系数、检出限和定量限, 结果见表 2。

表 2 10 种水溶性维生素的检出限、定量限、线性范围、线性方程及相关系数

Table 2 Limits of detection (LOD), limits of quantitation (LOQ), linear ranges, the linear equations, correlation coefficients of the 10 kinds of water soluble vitamins

化合物	线性范围/(ng/mL)	线性方程	$r^2$	LOD/( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )	LOQ/( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )
维生素 B <sub>1</sub>	10-5000	$Y=1.9488 X+0.7592$	0.9978	5	15
维生素 B <sub>2</sub>	10~5000	$Y=0.5928X+3.0010$	0.9988	5	15
烟酸	10~5000	$Y=0.7306X+0.9524$	0.9999	5	15
烟酰胺	10~5000	$Y=1.3551X-3.2371$	0.9991	5	15
维生素 B <sub>5</sub>	10~5000	$Y=0.7062X+3.5745$	0.9996	5	15
吡哆醇	10~5000	$Y=0.7246X+4.9842$	0.9967	5	15
吡哆醛	10~5000	$Y=1.3461X+0.0386$	0.9990	5	15
吡哆胺	10~5000	$Y=0.4290X+0.3910$	0.9999	5	15
维生素 B <sub>7</sub>	10~5000	$Y=1.0276X+3.4915$	0.9996	5	15
维生素 B <sub>9</sub>	10~5000	$Y=0.7482X-0.5334$	0.9993	5	15

### 3.5 方法重复性与精密度

采用牛奶作为空白基质,通过加标回收的方式考察方法的准确度和精密度。根据配方奶粉样品的各水溶性维生素的含量范围,设定 VB<sub>1</sub>、VB<sub>2</sub>、烟酸、吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺、VB<sub>7</sub>、VB<sub>9</sub> 的添加水平为 100、200、300 μg/100 g,烟酰胺、VB<sub>5</sub> 的添加水平为 1000、2000、3000 μg/100 g,每个水平重复实验 6 次,实验结果见表 3。加标回收率为 85.7%~115.8%,相对标准偏差(relative standard deviation,

RSD,  $n=6$ )为 1.82%~9.67%。实验结果表明,10 种水溶性维生素的添加回收率高,精密度好,证明该方法准确、可靠。

### 3.6 质控婴幼儿配方奶粉的测定

采用超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪对婴幼儿配方奶粉质控样品中水溶性维生素进行内标法定量检测。质控婴幼儿配方奶粉样品实测值与参考值对照见表 4。从表中结果可以看出,实测结果与参考值非常接近,进一步证明本方法的结果准确、可靠。

表 3 奶粉中 10 种水溶性维生素在 3 个不同水平下的回收率和相对标准偏差( $n=6$ )

Table 3 Recovery rates and the relative standard deviations of the 10 kinds of water soluble vitamins spiked in milk powder ( $n=6$ )

化合物	添加水平/(μg/100 g)	检测浓度/(μg/100 g)	回收率/%	RSD/%
维生素 B <sub>1</sub>	100	100.8±6.27	100.8±6.27	6.21
	200	214.6±20.8	107.3±10.4	9.67
	300	332.9±23.4	111.0±7.81	7.04
维生素 B <sub>2</sub>	100	115.8±7.41	115.8±7.41	6.40
	200	229.3±16.6	114.7±8.29	7.23
	300	339.6±19.7	113.2±6.56	5.79
烟酸	100	113.0±9.23	113.0±9.23	8.17
	200	226.6±7.21	113.3±3.60	3.18
	300	321.2±7.65	107.1±2.55	2.38
烟酰胺	1000	967.8±71.0	96.8±7.10	7.33
	2000	2247.8±78.9	112.4±3.95	3.51
	3000	3170.1±184.7	105.7±6.16	5.82
维生素 B <sub>5</sub>	1000	931.1±57.5	93.1±5.75	6.17
	2000	1715.0±65.0	85.7±3.25	3.79
	3000	2638.6±63.2	88.0±2.11	2.40
吡哆醇	100	101.1±6.55	101.1±6.55	6.48
	200	196.2±8.32	98.1±4.16	4.24
	300	321.5±16.5	107.2±5.51	5.14
吡哆醛	100	104.0±7.29	104.0±7.29	7.00
	200	172.2±10.5	86.1±5.28	6.13
	300	259.6±12.7	86.6±4.22	4.88
吡哆胺	100	108.8±7.30	108.8±7.30	6.71
	200	177.7±12.5	88.8±6.25	7.04
	300	264.8±11.6	88.3±3.88	4.39
维生素 B <sub>7</sub>	100	105.3±8.79	105.3±8.79	8.35
	200	207.5±13.6	103.7±6.82	6.58
	300	316.0±20.4	105.3±6.81	6.47
维生素 B <sub>9</sub>	100	108.5±4.07	108.5±4.07	3.75
	200	219.2±3.99	109.6±2.00	1.82
	300	334.1±9.27	111.3±3.09	2.77

表 4 质控婴幼儿配方奶粉样品实测值与参考值对照表  
Table 4 Comparison between measured values and reference values of quality control infant formula sample

维生素种类	实测值	参考值
维生素 B <sub>1</sub>	(0.997±0.0577) mg/100 g	0.916 mg/100 g
维生素 B <sub>2</sub>	(1.473 ± 0.019) mg/100 g	1.500 mg/100 g
维生素 B <sub>6</sub>	(480.8 ± 13.8) μg/100g	574.0 μg/100 g
烟酸	(4.590 ± 0.0565) mg/100 g	5.148 mg/100 g
泛酸	(4.315 ± 0.082) mg/100 g	5.080 mg/100 g
叶酸	(141.2 ± 7.66) μg/100 g	142.0 μg/100 g
生物素	(25.4 ± 0.98) μg/100 g	26.00 μg/100 g

### 3.7 实际样品的测定

采用本方法对 27 个市售北京婴幼儿配方奶粉中水溶性维生素的含量进行测定分析, 实测值、标示值以及实测

值/标示值比值 *R* 见表 5。根据 GB 28050-2011《食品安全国家标准 预包装食品营养标签通则》对能量和营养成分的规定, 婴幼儿配方奶粉中维生素(除维生素 A 和维生素 D)的实际含量不应低于标示值的 80%。检测结果发现, 27 份婴幼儿配方奶粉中有 2 个样品的 VB<sub>2</sub>、4 个样品中的烟酸以及 10 个样品中的生物素实测值低于标示值的 80%, 其余样品中水溶性维生素的含量符合标准要求。

### 4 结 论

本研究建立了婴幼儿配方奶粉中水溶性维生素的检测方法。通过简单、快速的样品前处理, 结合超高效液相色谱-串联质谱检测、内标法定量, 实现了水溶性维生素的准确定量分析, 将国家标准中水溶性维生素检测覆盖的 7 个实验流程改进为 1 个实验流程, 大大提高了检测效率。方法可满足实际婴幼儿配方奶粉中 10 种水溶性维生素的检测要求。

表 5 实际样品中水溶性维生素实测值与标示值比对  
Table 5 Comparison of measured and labelled values of water soluble vitamins in actual samples

	维生素 B <sub>1</sub>			维生素 B <sub>2</sub>			维生素 B <sub>3</sub>			维生素 B <sub>6</sub>			维生素 B <sub>7</sub>			维生素 B <sub>5</sub>			维生素 B <sub>9</sub>		
	实测值 /(μg/ 100 g)	标示值 /(μg/ 100 g)	<i>R</i> /%	实测值 /(μg/ 100 g)	标签值 /(μg/ 100 g)	<i>R</i> /%	实测值 /(μg/ 100 g)	标签值 /(μg/ 100 g)	<i>R</i> /%	实测值 /(μg/ 100 g)	标签值 /(μg/ 100 g)	<i>R</i> /%	实测值 /(μg/ 100 g)	标签值 /(μg/ 100 g)	<i>R</i> /%	实测值 /(μg/ 100 g)	标签值 /(μg/ 100 g)	<i>R</i> /%	实测值 /(μg/ 100 g)	标签值 /(μg/ 100 g)	<i>R</i> /%
1	907	477	1.90	923	760	1.21	2046	2520	0.81	357	285	1.25	14.3	12.6	1.13	6400	2800	2.29	235	84	2.80
2	912	420	2.17	1537	1051	1.46	5070	3850	1.32	350	270	1.30	15.8	16	0.99	7372	3769	1.96	302	116	2.60
3	1168	500	2.34	1165	1035	1.13	4473	4500	0.99	489	400	1.22	17.9	15	1.19	6596	3250	2.03	169	78	2.17
4	1014	590	1.72	916	766	1.20	3732	4500	0.83	648	524	1.24	18.0	18	1.00	6494	3212	2.02	123	50	2.47
5	860	385	2.23	650	1359	0.48	1930	3850	0.50	618	336	1.84	15.0	13.5	1.11	3300	2520	1.31	222	59	3.76
6	724	350	2.07	733	570	1.29	3559	3409	1.04	560	280	2.00	10.5	9.1	1.15	2795	2300	1.22	166	56.8	2.93
7	679	280	2.43	1433	510	2.81	3650	3500	1.04	338	345	0.98	10.0	15	0.67	4631	2640	1.75	128	65.5	1.95
8	912	600	1.52	1030	810	1.27	3197	4000	0.80	757	415	1.82	13.1	17	0.77	5475	2520	2.17	161	75.7	2.13
9	1064	550	1.93	1121	750	1.49	3380	3500	0.97	434	400	1.09	13.5	19	0.71	5855	2800	2.09	106	55	1.94
10	996	550	1.81	882	600	1.47	3735	4000	0.93	417	420	0.99	12.7	16	0.80	5926	2850	2.08	153	65	2.35
11	718	430	1.67	839	610	1.38	4979	3600	1.38	444	500	0.89	13.5	20	0.67	8963	5000	1.79	166	85	1.96
12	790	500	1.58	567	1250	0.45	3980	5400	0.74	394	360	1.09	12.2	11	1.11	4836	4800	1.01	78.6	81	0.97
13	839	520	1.61	684	700	0.98	3314	3500	0.95	288	230	1.25	6.73	11	0.61	4776	2600	1.84	111	70	1.58
14	741	510	1.45	1020	800	1.27	5159	5400	0.96	592	640	0.93	14.2	22	0.65	8176	5000	1.64	248	140	1.77
15	513	285	1.80	429	368	1.17	2174	2847	0.76	483	285	1.70	3.21	10.4	0.31	1829	1833	1.00	59.7	42	1.42
16	1183	800	1.48	992	950	1.04	3211	3500	0.92	459	300	1.53	14.9	16	0.93	7098	4000	1.77	141	110	1.29
17	749	428	1.75	1131	702	1.61	4742	4210	1.13	360	351	1.03	7.23	11.24	0.64	4916	2830	1.74	187	105.62	1.77
18	1019	680	1.50	1515	1000	1.52	4337	3400	1.28	371	460	0.81	35.9	26	1.38	5003	3600	1.39	105	85	1.24
19	1256	940	1.34	1078	835	1.29	4345	4700	0.92	587	564	1.04	23.5	18.8	1.25	6721	2820	2.38	123	75.2	1.64
20	797	443	1.80	989	1014	0.98	3632	3690	0.98	336	347	0.97	12.7	10.42	1.22	4456	2431	1.83	181	93.1	1.95
21	630	367	1.72	1732	1007	1.72	2811	2878	0.98	260	288	0.90	12.0	9.4	1.28	4870	2518	1.93	108	57.6	1.87
22	606	380	1.60	902	700	1.29	3011	3500	0.86	321	280	1.15	11.4	11.6	0.99	3892	2600	1.50	97.9	70	1.40
23	1169	800	1.46	1094	950	1.15	3486	3500	1.00	499	300	1.66	17.9	16	1.12	8114	4000	2.03	134	110	1.22
24	733	421	1.74	955	691	1.38	3024	3500	0.86	345	345	1.00	10.3	11.05	0.93	3868	2783	1.39	158	104	1.52
25	1319	947	1.39	1794	842	2.13	3382	4700	0.72	534	568	0.94	16.4	18.9	0.87	6796	2841	2.39	132	75.8	1.74
26	890	446	1.99	1249	1015	1.23	3895	3770	1.03	375	268	1.40	18.2	27	0.67	5129	2284	2.25	84.9	46	1.85
27	940	700	1.34	1357	1100	1.23	4466	4000	1.12	522	450	1.16	6.83	12	0.57	6752	4700	1.44	147	82	1.79

## 参考文献

- [1] GB 5009.84-2016 食品安全国家标准 食品中维生素 B<sub>1</sub>的测定[S].  
GB 5009.84-2016 National food safety standard-Determination of vitamin B<sub>1</sub> in foods [S].
- [2] GB 5009.85-2016 食品安全国家标准 食品中维生素 B<sub>2</sub>的测定[S].  
GB 5009.85-2016 National food safety standard-Determination of vitamin B<sub>2</sub> in foods [S].
- [3] GB 5009.89-2016 食品安全国家标准 食品中维生素烟酸和烟酰胺的测定[S].  
GB 5009.89-2016 National food safety standard-Determination of niacin acid and niacinamide in foods [S].
- [4] GB 5009.154-2016 食品安全国家标准 食品中维生素 B<sub>6</sub>的测定[S].  
GB 5009.154-2016 National food safety standard-Determination of vitamin B<sub>6</sub> in foods [S].
- [5] GB 5009.211-2016 食品安全国家标准 食品中叶酸的测定[S].  
GB 5009.211-2016 National food safety standard- Determination of folic acid in foods [S].
- [6] GB 5009.210-2016 食品安全国家标准 食品中泛酸的测定[S].  
GB 5009.210-2016 National food safety standard-Determination of pantothenic acid in foods [S].
- [7] GB 5009.259-2016 食品安全国家标准 食品中生物素的测定[S].  
GB 5009.259-2016 National food safety standard-Determination of biotin in foods [S].
- [8] GB 5413.14-2010 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中维生素 B<sub>12</sub>的测定[S].  
GB 5413.14-2010 National food safety standard-Determination of vitamin B<sub>12</sub> in foods [S].
- [9] 刘娜, 陈大舟, 汤桦, 等. 婴儿配方奶粉中 8 种水溶性维生素的高效液相色谱同时测定[J]. 分析测试学报, 2008, 27(4): 408-411.  
Liu N, Chen DZ, Tang Y, *et al.* Simultaneous determination of eight water-soluble vitamins in baby milk powder by high performance liquid chromatography [J]. J Instrum Anal, 2008, 27(4): 408-411.
- [10] 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 种水溶性维生素[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(3): 899-904.  
Ren 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): 899-904.
- [11] 郭建博, 宋莉, 牟霄, 等. 超高效液相色谱法快速测定复合维生素产品中的 10 种水溶性维生素[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(5): 1794-1799.  
Guo JB, Song L, Mou X, *et al.* Simultaneous determination of 10 kinds of water-soluble vitamins in multivitamin products by ultra performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(5): 1794-1799.
- [12] 王一红, 冯家力, 潘振球, 等. 液相色谱-串联质谱法分析 10 种水溶性维生素[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(7): 1160-1162.  
Wang YH, Feng JL, Pan ZQ, *et al.* Analysis of 10 water soluble vitamins by liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. Chin J Heal Lab Technol, 2007, 17(7): 1160-1162.
- [13] 陶保华, 黄焘, 赖世云, 等. 超高压液相色谱-串联质谱法同时测定人乳中的硫胺素、核黄素、烟酰胺、泛酸和吡哆醛[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(7): 2087-2094.  
Tao BH, Huang T, Lai SY, *et al.* Determination of thiamin, riboflavin, nicotinamide, antothenic acid and pyridoxal in human milk by UPLC-MS/MS [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(7): 2087-2094.
- [14] Gentili A, Caretti F, D'Ascenzo G, *et al.* Simultaneous determination of water-soluble vitamins in selected food matrices by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectr, 2008, 22: 2029-2043.
- [15] Hälvin K, Paalme T, Nisamedtinov I. Comparison of different extraction methods for simultaneous determination of B complex vitamins in nutritional yeast using LC/MS-TOF and stable isotope dilution assay [J]. Anal Bioanal Chem, 2013, 405: 1213-1222.
- [16] Goldschmidt RJ, Wolf WR. Simultaneous determination of water-soluble vitamins in SRM 1849 infant/adult nutritional formula powder by liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry [J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 397: 471-481.
- [17] Phinney KW, Rimmer CA, Thomas JB, *et al.* Isotope dilution liquid chromatography - mass spectrometry methods for fat- and water-soluble vitamins in nutritional formulations [J]. Anal Chem, 2011, 83: 92-98.

(责任编辑: 韩晓红)

## 作者简介



严 华, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。  
E-mail: 56431978@QQ.com



张朝晖, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。  
E-mail: zhangzhaohuibiqtc@163.com