

三重四极杆质谱法测定功能饮料中的维生素 B12 的含量

LCMSMS-111

摘要：本文建立了一种使用岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 测定功能饮料中的维生素 B12 的方法。前处理采用 C18 固相萃取法，样品处理时间短。使用岛津 UHPLC LC-30A 二元高压梯度系统利用 C18 色谱柱在 5 min 内实现快速分离。实验结果表明：线性范围 5 μg/L ~ 500 μg/L，相关系数为 0.9997；维生素 B12 标样的仪器检出限为 0.19 μg/L，仪器定量限为 0.6 μg/L；5 μg/L、50 μg/L 和 500 μg/L 三个浓度标样 6 次连续进样的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.11~0.13% 和 0.85~2.12% 之间；5 μg/L 功能饮料样品加标回收率为 92.8%。

关键词：B12 UHPLC 功能饮料 固相萃取法

维生素 B12 (英文名 vitamin B12, B12; CAS: 68-19-9) 又称钴胺素，是一种由含钴的卟啉类化合物组成的 B 族维生素，又被称为造血维生素，具有肌肤再生的优越效果，细胞再生与造血都少不了它，是促进人体新陈代谢的重要成分。自然界中的维生素 B12 都是微生物合成的，高等动植物不能制造维生素 B12。维生素 B12 的主要生理功能是参与制造骨髓红细胞，防止恶性贫血；防止大脑神经受到破坏。人体维生素 B12 需要量极少，只要饮食正常，就不会缺乏。维生素 B12 是人体内每天需要量最少的一种，过量的维生素 B12 会产生毒副作用，可出现哮喘、荨麻疹、湿疹、面部浮肿、寒颤等过敏反应，也可能相发神经兴奋、心前区痛和心悸。维生素 B12 摄入过多还可导致叶酸的缺乏。

功能饮料是指通过调整饮料中营养素（营养成分为各种维生素组成）的成分和含量比例，在一定程度上调节人体功能的饮料，现在消费者也称为维生素饮料，具有提神抗疲劳之作用。

本文参考《GB/T 5009 217-2008 保健食品中维生素 B12 的测定》，使用岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 检测，建立了一种分析功能饮料中维生素 B12 的含量快速检测方法，供相关检测人员参考。

实验条件

1.1 仪器

本实验使用岛津高效液相色谱仪 LC-30A 串联三重四极杆质谱 LCMS-8040。具体配置为 LC-30AD 输液泵，DGU-20A5R 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，SPD-20A 紫外检测器，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱，LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack XR-ODS III 2.0 mm i.d. × 150 mm., 2.2 μm

流动相：A - 0.2% 甲酸水溶液；B - 甲醇

流速：0.4 mL/min

进样体积：10 μL

柱温：45°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 15%，时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	15
1.50	Pumps	Pump B Conc.	95
2.00	Pumps	Pump B Conc.	95
2.01	Pumps	Pump B Conc.	15
5	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8040

离子源：ESI，正离子

离子源接口电压：4.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250°C

加热模块温度：450°C

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：180 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：MRM 分组采集，见表 2

表2 MRM参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
B12	678.9	147.0*	-40	-49	-28
		457.4	-40	-24	-38

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制：用 5% 乙腈水溶液配制 500 mg/L B12 标准储备液。用水将标准储备液稀释成 5 μg/L、10 μg/L、50 μg/L、100 μg/L、200 μg/L、500 μg/L 不同浓度的维生素 B12 校准曲线工作液。

样品前处理方法：取 150 mL 功能饮料溶液，超声脱气 10 min 后，加入 100 mL 水，超声 15 min 定容于 250 mL 容量瓶中。C18 固相萃取柱活化后，将上述处理过的试样加到固相萃取柱上。上样后，用 5 mL 5% 乙腈溶液作为洗脱溶剂将干扰物质洗脱出来，最后用 25% 乙腈溶液将维生素 B12 洗脱，收集洗脱液 0.5 mL，过 0.45 μm 滤膜后，上机测试。

实验结果

2.1 标准样品的色谱图

维生素 B12 的前体离子与产物离子质谱图如图 1~2 所示，5 μg/L 维生素 B12 标准样品的色谱如图 3 所示，保留时间为 1.882 min。

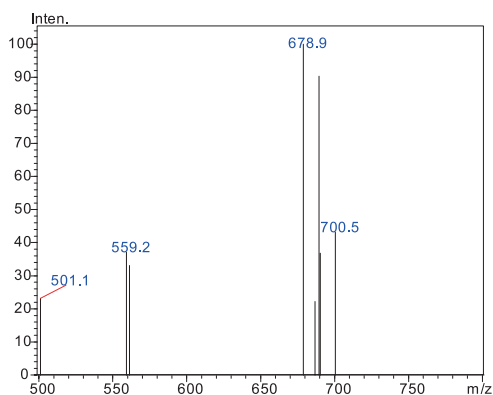


图1 维生素B12前体离子质谱图

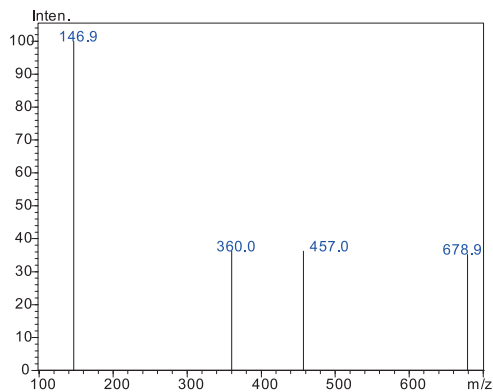


图2 维生素B12产物离子质谱图 (-30V)

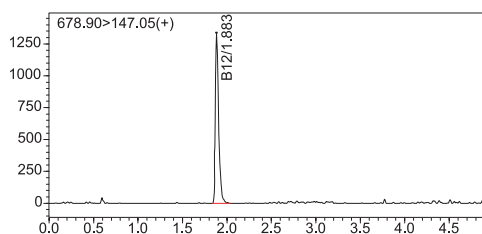


图3 5 μg/L维生素B12标准溶液的色谱图

2.2 线性关系

将 7 个不同浓度的标准工作液，按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，如图 4 所示。线性方程为 $Y = (619.08) X$ ，线性范围 5~ 500 μg/L，相关系数大于 0.9997，线性关系良好。

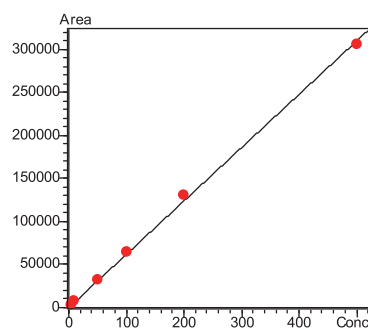


图4 维生素 B12 的标准工作曲线

2.3 检出限和定量限

5 μg/L 的维生素 B12 标样色谱图如图 3 所示，按照 ASTM 计算信噪比，信噪比为 77.95。以 3 倍信噪比为检测限，计算得到仪器的检出限为 0.19 μg/L，定量限为 0.6 μg/L。

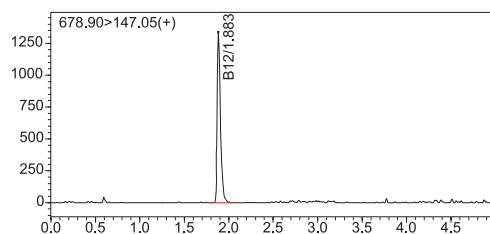


图3 5 μg/L维生素B12标准溶液的色谱图

2.4 精密度实验

取维生素 B12 标准工作液中 5 μg/L、50 μg/L 和 200 μg/L 三个浓度，分别平行进样 6 次，目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.11~ 0.13% 和 0.85~2.12% 之间，仪器精密度良好。

表4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

浓度(μg/L)	保留时间 RSD	峰面积 RSD
5	0.13%	2.12%
50	0.11%	1.16%
200	0.13%	0.85%

2.5 基质加标实验

按照 1.3 中样品制备方法，在功能饮料样品中添加标样，加标含量为 5 $\mu\text{g/L}$ 。功能饮料样品中检出维生素 B12 浓度为 0.510 $\mu\text{g/L}$ ，维生素 B12 加标回收率为 92.8%。功能饮料样品的色谱图如图 4 所示，0.5 $\mu\text{g/L}$ 维生素 B12 加标样品的色谱图如图 5 所示。

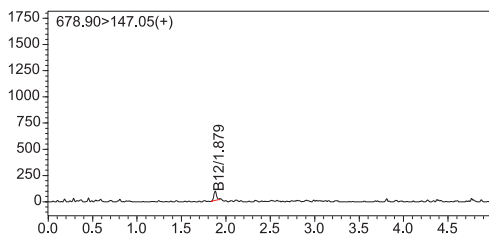


图4 功能性饮料样品维生素B12的色谱图

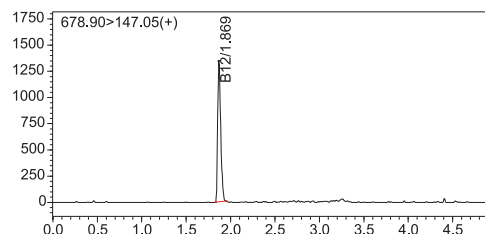


图5 5 $\mu\text{g/L}$ 维生素B12加标样品的色谱图

实验总结和讨论

本方法参考《GB/T 5099 217-2008 保健食品中维生素 B12 的测定》，采用岛津三重四极杆质谱 LCMS-8040 建立了一种测试功能饮料中的维生素 B12 的方法，在 5 min 内完成分析，灵敏度高，可用于功能饮料中维生素 B12 含量的测定