

京:中国标准出版社,2003.

[10] 国家质量监督检验检疫总局. GB 1535—2003 大豆油[S]. 北京:中国标准出版社,2003.

[11] 国家质量监督检验检疫总局. GB 1536—2004 菜籽油[S]. 北京:中国标准出版社,2004.

[12] 国家质量监督检验检疫总局. GB 8233—2008 芝麻油[S]. 北京:中国标准出版社,2008.

[13] 国家质量监督检验检疫总局. GB 19111—2003 玉米油[S]. 北京:中国标准出版社,2003.

### 实验技术与方法

## 液相色谱-串联质谱法测定保健食品中维生素 B<sub>12</sub>

林宏琳, 华永有, 黄宏南

(福建省疾病预防控制中心, 福建 福州 350001)

**摘要:**目的 建立测定保健食品中维生素 B<sub>12</sub> 的液相色谱-串联质谱法。方法 样品添加内标人参皂苷 Re 溶液, 固相萃取法 (SPE) 对试样进行富集、净化, 以甲醇 (A) 和纯水 (B) 为流动相经 Bio Basic-18 PIONEER 柱 (150 mm × 2.1 mm, 5 μm) 梯度洗脱分离, 串联离子阱质谱在电喷雾电离正离子 (ESI+) -全扫描 (full) -二级质谱 (MS/MS) 模式下按内标法测定。结果 维生素 B<sub>12</sub> 在 50 ~ 500 ng/ml 范围内具有良好的线性, 相关系数  $r = 0.992$ , 回收率 75.2% ~ 89.5%, 精密度 3.6% ~ 5.9%, 检出限为 5 ng/g, 定量限为 16 ng/g。结论 本法可应用于保健食品的检测或产品质量控制。

**关键词:** 保健食品; 维生素 B<sub>12</sub>; 液相色谱-串联质谱法

中图分类号: Q563.4 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2011)05-0432-03

### Determination of vitamin B<sub>12</sub> in function foods by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry

Lin Honglin, Hua Yongyou, Huang Hongnan

(Fujian Center For Disease Control & Prevention, Fujian Fuzhou 350001, China)

**Abstract: Objective** To establish a method of determining vitamin B<sub>12</sub> in health food products by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** After mixing samples with internal standard solution of ginsenoside Re, the mixtures of samples were extracted by solid phase extraction, and separated on a Bio Basic-18 PIONEER column (150 mm × 2.1 mm, 5 μm) by a mobile phase of methanol (A) + water (B) with the gradient elution program. Detection was carried out by a liquid chromatography coupled electrospray ionization and ion trap mass spectrometry with ESI+, MS/MS and full scan mode. **Results** Calibration curve was linear within the range of 50-500ng/ml with a correlation coefficient of more than 0.99; the limit of detection (LOD) was 5 ng/g and the limit of quantification (LOQ) was 16 ng/g. The extraction recoveries were 75.2%-88.5%, RSDs were 3.6%-5.9%. **Conclusion** This method could meet the requirements of domestic and international laws and regulations, and could be used in the determination of VB<sub>12</sub> in health food products or for the quality control of the products.

**Key words:** Health foods; vitamin B<sub>12</sub>; liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry

维生素 B<sub>12</sub> (vitamin B<sub>12</sub>, VB<sub>12</sub>), 即氰钴胺素 (cyanocobalamine), 是一种重要的生物活性物质, 主

要存在于动物食品中, 人体需要的 VB<sub>12</sub> 的量很少, 使用过量可能引起过敏反应, 严重过量可能造成神经中毒。VB<sub>12</sub> 在食品中含量很低, 为 10<sup>-9</sup> 级, 在强化食品中按标准要求也仅大于或等于 1.2 ng/g<sup>[1]</sup>, 要准确测定相当困难。目前许多保健食品中含有添加的 VB<sub>12</sub>, 为了规范保健食品中 VB<sub>12</sub> 的使用量, 需要建立灵敏度高、特异性强、简便易行的检测 VB<sub>12</sub> 的分析方法。

收稿日期: 2011-02-21

作者简介: 林宏琳 女 主管技师 研究方向为营养与食品安全  
E-mail: erianlin@sina.com

通信作者: 黄宏南 男 博士 主任技师 研究方向为营养与食品安全  
E-mail: hhn666666@163.com

目前维生素 B<sub>12</sub>的测定方法主要采用微生物分析法和化学分析方法,微生物分析法步骤繁琐,培养时间长,重复性差,并且不能区分 VB<sub>12</sub>及其类似物,最终造成测定结果偏高<sup>[2]</sup>;化学分析方法主要有导数分光光度法、高效毛细管电泳法(HPCE)、化学发光分析法、高效液相色谱法等<sup>[3]</sup>。前二者检出限过高,化学发光分析法则由于仪器购置费用昂贵,不适用于普通实验室。而采用国标 GB/T 5009.217—2008《保健食品中维生素 B<sub>12</sub>的测定》<sup>[4]</sup>方法,当取样量为 2.0 g 时,方法检出限为 1.0 μg/g,只适用于基质简单或含量高的样品,对于基质复杂的样品检测灵敏度低,不能满足检测要求。本研究采用液相色谱-串联离子阱质谱法(LC-MS/MS),检出限可达 5 ng/g,可以满足对灵敏度的要求,且采用内标法定量,保证了分析结果的准确度。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器

Finnigan LCQ XP MAX LC/MS 液相色谱串联离子阱质谱仪(美国 Thermo); Direct-Q UV 超纯水系统;XW280A 旋涡混合器;KQ-250DE 超声波清洗器;固相萃取装置(美国 Phenomenex); Allegra X-12R 离心机。

### 1.2 试剂

乙腈、甲醇均为色谱纯;VB<sub>12</sub>对照品,批号 1002482 200801(中国药品生物制品检定所);内标人参皂苷 Re 对照品,批号 117054/2008(中国药品生物制品检定所);样品:V9 夹心糖葡萄味、香橙味、蜜瓜味、草莓味 4 种各 3 批次。

标准储备液:用 5% 乙腈配得浓度为 0.20 mg/ml 的 VB<sub>12</sub>溶液至棕色容量瓶中,避光贮存于 2~4 °C 条件下。

VB<sub>12</sub>标准溶液:用 25% 乙腈配制含内标人参皂苷 Re 480 ng/ml,VB<sub>12</sub>浓度范围为 50~500 ng/ml。

内标人参皂苷 Re 溶液:用超纯水配得浓度为 2.4 mg/ml 的 Re 溶液,贮存于 2~4 °C 条件下。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 样品前处理

样品添加适量内标人参皂苷 Re 溶液,前处理按 GB/T 5009.217—2008《保健食品中维生素 B<sub>12</sub>的测定》的固相萃取法试样处理操作,对试样提取液中的 VB<sub>12</sub>进行富集并去除部分杂质。

#### 1.3.2 色谱条件

色谱柱 Bio Basic-18 PIONEER (150 mm × 2.1 mm, 5 μm);柱温 30 °C;流动相:甲醇(A)和水

(B);流速 0.2 ml/min;进样量 10 μl;梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

| 时间 (min) | 甲醇 (%) | 超纯水 (%) |
|----------|--------|---------|
| 0        | 45     | 55      |
| 3.5      | 45     | 55      |
| 5.5      | 90     | 10      |
| 5.6      | 45     | 55      |
| 7.0      | 45     | 55      |

#### 1.3.3 质谱条件

离子源 ESI(+);喷雾电压 4 kV;鞘气流速 30 Arb;辅助气流速 5 Arb;毛细管温度 350 °C;扫描模式 MS/MS;扫描类型全扫描(full),VB<sub>12</sub>和人参皂苷 Re 的碰撞能量百分比分别为 35% 和 38%。

## 2 结果与分析

### 2.1 液相色谱条件的选择

本研究分别选用含 0.1% 甲酸水溶液和纯水、乙腈与甲醇作为流动相,以不同比例梯度分离待测物。结果表明,用 0.1% 甲酸水溶液存在离子抑制效应,乙腈对本仪器影响较大。因此,水/甲醇流动相体系中被选用,以 VB<sub>12</sub>(200 ng/ml)和内标人参皂苷 Re(480 ng/ml)对照品溶液试验流动相不同的流速、配比和梯度程序,找到最佳条件,获得良好的分离和峰形。色谱图见图 1,VB<sub>12</sub>和内标人参皂苷 Re 保留时间分别约为 2.5 和 5.0 min。

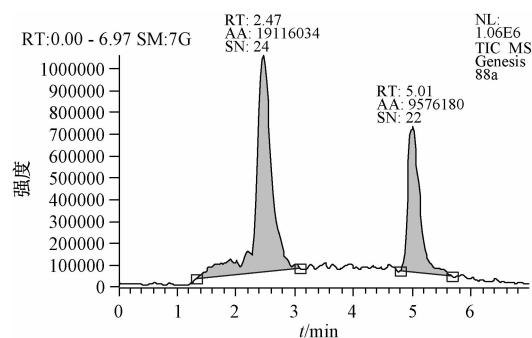


图 1 VB<sub>12</sub>(200 ng/ml)和人参皂苷 Re(480 ng/ml)对照品色谱图

Figure 1 Chromatogram of standard VB<sub>12</sub>(200 ng/ml) and ginsenoside Re reference substance(480 ng/ml)

### 2.2 质谱条件的优化

在用 LC-MS/MS 进行检测时,使用 ESI(+ )模式的各组分响应值比使用 ESI(- )模式时明显增强,灵敏度提高。分别对各质谱条件进行优化,通过全扫描方式观察总离子流图,得到分子离子峰,逐级增加碰撞能量,进一步获得碎片离子。结果表明,VB<sub>12</sub>的分子离子峰为 [M + H]<sup>+</sup> (m/z1356.1),

其 MS/MS 质谱图见图 2,选择子离子  $m/z$ 1209.4 和  $m/z$  997.4 分别作为定量离子和辅助定性离子;Re 的分子离子峰为  $[M + Na]^+$  ( $m/z$  970.1),其 MS/MS 质谱图见图 3,选择子离子  $m/z$  789.5 作为定量离子。

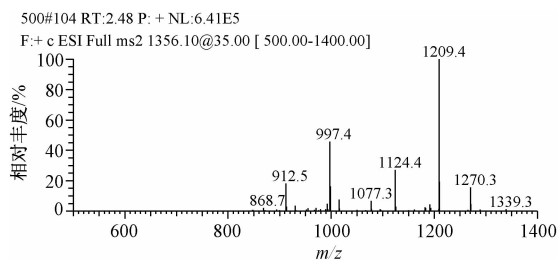


图 2 VB<sub>12</sub>(200 ng/ml)对照品 MS/MS 质谱图  
Figure 2 MS/MS spectrum of standard VB<sub>12</sub>(200 ng/ml)

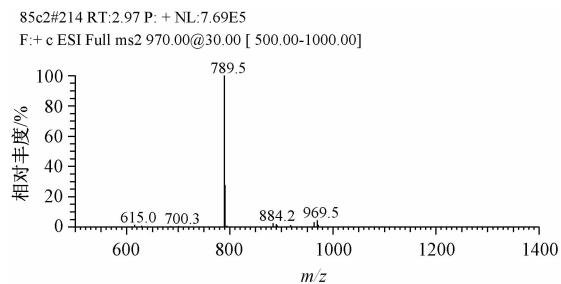


图 3 人参皂苷 Re(480 ng/ml)对照品 MS/MS 质谱图  
Figure 3 MS/MS spectrum of ginsenoside Re(480 ng/ml) reference substance

### 2.3 方法的线性范围、相关性及检出限

将含内标 Re 480 ng/ml 的浓度为 50 ~ 500 ng/ml VB<sub>12</sub> 标准系列,依次进样,进样量均为 10 μl,采用内标法,以样品峰面积与内标峰面积之比( $y$ )为纵坐标,VB<sub>12</sub> 浓度( $x$ )为横坐标,用加权( $W = 1/C^2$ )最小二乘法进行回归,计算得直线回归方程为: $y = 14916x - 161429$ ,线性相关系数  $r = 0.992$ 。当取样量为 2.0 g,信噪比  $S/N \geq 3$  时,检出限 LOD 为 5 ng/g,信噪比  $S/N \geq 10$  时,定量限 LOQ 为 16 ng/g。

### 2.4 样品测定

避光操作。按本文方法,取对照品溶液和供试品溶液各 10 μl,分别进样测定分析,测得 V9 夹心糖 VB<sub>12</sub> 含量平均为 85.9 ng/g,结果符合制造商标明的产品含量(VB<sub>12</sub>  $\geq 80$  ng/g)。样品色谱图见图 4,

各组分保留时间与对照品基本一致,其 MS/MS 质谱图也与对照品相一致。

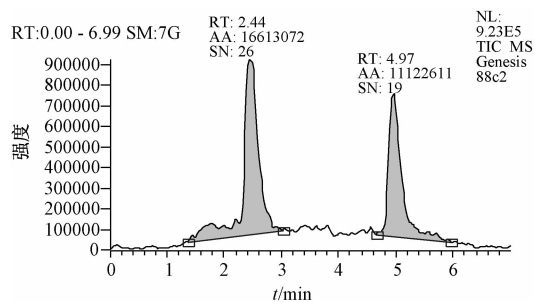


图 4 样品中 VB<sub>12</sub> 和人参皂苷 Re 色谱图

Figure 4 Chromatogram of VB<sub>12</sub> and ginsenoside Re in sample

### 2.5 光线影响

按 2.4 试验,但未采取避光措施,测得样品 VB<sub>12</sub> 结果  $\leq 30.6$  ng/g,表明光线对 VB<sub>12</sub> 影响较大,故本试验采取避光操作。

### 2.6 回收率和精密度

取已知含量(85.6 ng/g)的样品分别添加 50、100、200 ng/ml 标准溶液,每个水平作 5 个平行实验,通过分析和工作曲线的计算,统计各添加水平的平均数和标准差,得到平均回收率在 75.2% ~ 89.5%,精密度在 3.6% ~ 5.9%。

## 3 结论

本法应用内标法对保健食品中的 VB<sub>12</sub> 进行检测,降低了由于前处理过程中目标化合物的损失所带来的定量结果的偏差,提高了定量的准确性。实践证明,该检测方法快速高效、灵敏度高,符合日常检测的要求,可应用于保健食品的检测或产品质量控制。

### 参考文献

- [1] 周迅雷,张志国,褚庆环,等. 食品中 VB<sub>12</sub> 检测方法研究进展[J]. 食品与发酵工业,2008,34(11):131-134.
- [2] 鲁杰,杨大进,王竹天. 固相萃取-高效液相色谱法测定保健食品中维生素 B12 的研究[J]. 中国食品卫生杂志,2004,16(4):324-328.
- [3] 鲁杰,杨大进,王竹天. 维生素 B<sub>12</sub> 化学分析法研究概况[J]. 中国食品卫生杂志,2003,15(3):248-252.
- [4] 卫生部. GB/T 5009.217—2008 保健食品中维生素 B<sub>12</sub> 的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2008.