

超高效液相色谱-质谱联用测定食品中叶酸含量

刘进玺, 钟红舰*, 董小海

(农业部农产品质量监督检验测试中心(郑州), 河南 郑州 450002)

摘要: 建立食品中叶酸含量的超高效液相色谱质谱联用测定方法。样品提取后以 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱(2.1mm × 50mm, 1.7 μm)为色谱柱分离, 以电喷雾电离串联质谱在正离子选择反应监测模式下进行测定。以乙腈-0.1% 甲酸溶液(5:95, V/V)为流动相、流速 0.25mL/min、色谱柱温度 40℃、进样量 2 μL, 母离子 m/z 442.3、定量离子 m/z 295.1、定性离子 m/z 176.0, 碰撞能量为 14eV。对空白试样进行 3 个添加水平 4 个重复的添加结果表明: 回收率 80.7%~89.7%, 相对标准偏差 2.90%~3.85%。该方法检出限 1ng/mL, 线性范围 0.001~1.000 μg/mL。该方法具有样品预处理简单、检测周期短、灵敏度较高等优点。

关键词: 叶酸; 食品; 测定; 超高效液相色谱-质谱

Determination of Folic Acid in Food by UPLC-MS/MS

LIU Jin-xi, ZHONG Hong-jian*, DONG Xiao-hai

(Center of Inspection and Testing for Agricultural Products(Zhengzhou), Ministry of Agriculture, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: A method for the determination of folic acid in food by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (UPLC-MS/MS) has been established. Sample extract was separated on Acquity UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) using a mobile phase consisting of acetonitrile and 0.1% formic acid (5:95, V/V) at a flow rate of 0.25 mL/min, and analyzed by electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) in a positive-ion selective reaction monitoring (SRM) mode at a collision energy of 14 eV using m/z 442.3, m/z 295.1 and m/z 176.0 as the parent, quantitative and qualitative ions, respectively. The column temperature and the injection volume were set as 40 °C and 2 μL, respectively. The average blank spike recoveries for 4 replicate determinations across three spike levels were in the range of 80.7%—89.7% with RSD of 2.90%—3.85%. The limit of detection was 1 ng/mL. An excellent linear relationship was achieved in the range of 0.001—1.000 μg/mL. The method was characterized by simple operation, time saving and high sensitivity.

Key words: folic acid; food; determination; ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (UPLC-MS/MS)

中图分类号: TS207.3; O657

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)08-0233-03

叶酸(folic acid)又称 VM、VB₉, 是一种重要的 B 族维生素, 具有促进泌乳、健美皮肤、防止白发、增进食欲和防治口腔溃疡的功效, 是维持生物体正常生命过程所必须的一类有机物质。叶酸天然存在于部分食物当中, 也作为添加剂被适量加入到一些营养强化食品、保健食品中, 准确测定叶酸含量对产品的生产加工、功效评价等有重要意义^[1]。目前对叶酸的测定标准仅有复合预混合饲料中的高效液相色谱法^[2]和婴幼儿食品和乳品中的微生物法^[3], 一般食品中叶酸的检测方法还未见。虽然有一些食品中叶酸含量检测方法的报道^[4-15], 包括微生物分析法、高效液相色谱法、比色法、薄层层析

法、荧光光度法等, 但在实际工作中, 以上几种检测方法均有比较明显的缺点。微生物法用于检测叶酸灵敏度高, 但也存在许多局限性, 如实验周期长、重复性差、检测结果不能区分各叶酸盐形式等; 对于高压液相色谱法, 由于一般食品中叶酸含量较低, 紫外检测器几乎检测不出来, 与杂质峰也很难分开, 只能检测食品添加剂、药等一些杂质成分较少、叶酸含量较高的物质^[16]; 比色法、薄层层析法和荧光光度法较费时费力。因此研发一种快速、灵敏、适合于食品中叶酸的检测方法成为当务之急, 这也是食品企业和科研机构近年来的一个研究热点。本实验利用超高效液相色谱质谱联用法

收稿日期: 2011-04-20

作者简介: 刘进玺(1981—), 女, 助理研究员, 硕士, 研究方向为分析方法与检测技术。E-mail: liujinxi1020@163.com

* 通信作者: 钟红舰(1971—), 男, 副研究员, 硕士, 研究方向为农(兽)药残留分析和相关代谢。E-mail: 80456811@163.com

测定叶酸的含量, 结合超高效液相色谱和质谱的优点, 分析速度快, 灵敏度高, 适用范围宽。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

叶酸标准品 中国药品生物制品检定所; 乙腈、甲酸(均为色谱纯); 乙酸、抗坏血酸、碳酸钠、氨水(均为分析纯); 水(超纯水)。

KQ-500DE 型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; Acquity 超高效液相色谱仪 美国 Waters 公司; TSQ-Quantum 质谱仪 美国 Thermo 公司。

1.2 仪器条件

1.2.1 液相色谱条件

色谱柱: BEH C₁₈ 柱(2.1mm × 50mm, 1.7 μm); 色谱柱温度: 40℃; 流动相: 乙腈-0.1% 甲酸溶液(5:95, V/V); 流速: 0.25 mL/min; 进样量: 2 μL。

1.2.2 质谱条件

电喷雾正离子电离(ESI⁺); 锥孔电压: 4000V; 分辨率: 0.7; 母离子 m/z 442.3; 定量离子 m/z 295.1; 定性离子 m/z 176.0; 碰撞能量 14eV。

1.3 标准溶液配制

精确称取叶酸标准品 0.01g(精确至 0.0001g), 用 Na₂CO₃ 溶液(0.1mol/L)溶解, 用 1mol/L 盐酸溶液调至 pH7.0, 用水定容至 100mL, 制得 100 μg/mL 标准溶液, 备用。临用前根据需要用流动相稀释成不同质量浓度的标准工作液。

1.4 样品前处理

1.4.1 称量

准确称取 5~10g 样品于 100mL 容量瓶中, 加入 0.5g 抗坏血酸, 70mL 氨水溶液(质量分数 0.5%)溶解, 40℃ 水浴超声 10min。

1.4.2 脱脂和去蛋白

加入 2mL 质量分数 5% 的乙酸溶液, 再用氨水溶液(质量分数 0.5%)定容。无脂和蛋白样品可不作此步骤。

1.4.3 离心与过滤

对于较混浊样品, 需高速离心, 取上清液过 0.45 μm 滤膜, 待上机。

2 结果与分析

2.1 前处理条件的确定

叶酸在碱性条件下特别稳定, 见光和受热不会分解^[17], 而其他水溶性维生素则在酸性条件下稳定, 故溶解样品时用质量分数为 0.5% 氨水溶液, 可以避免其它水溶性维生素的干扰。在实验中分别对常温、30、40℃ 提取效果比较, 结果表明 40℃, 提取 10min 的条件可以得

到满意的效果。经过对乙腈、甲醇、高氯酸、硫酸铜、乙酸等溶剂进行筛选^[18], 发现质量分数为 3% 高氯酸和 0.1% 乙酸对样品的去脂去蛋白效果较好, 且按 1.4 节步骤处理叶酸标准品后, 其回收率均可达 80% 以上。但考虑到实验的方便及对柱子的影响, 最终确定样品前处理溶剂为质量分数为 0.1% 乙酸。

2.2 流动相组成优化实验

采用不同比例的乙腈-0.1% 甲酸溶液进行实验, 当乙腈-0.1% 甲酸溶液的体积比为 5:95 时, 叶酸与杂质分离效果好, 分析时间适当, 所以选用乙腈-0.1% 甲酸溶液(5:95, V/V)作为流动相。

2.3 质谱条件优化

配制质量浓度 0.5 μg/mL 的标准品溶液, 在全扫描方式下通过六通阀进样, 调节电离源各个参数得到较强的[M+H]⁺峰。在该条件下, 对选定的母离子进行子离子扫描, 优化碰撞能量等参数, 将两个响应较强的子离子作为检测的碎片离子, 选择其中多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)色谱图峰形好、响应值高的 1 个离子用于定量计算, 确定定量离子 m/z 295.1, 定性离子 m/z 176.0。叶酸的离子流色谱图和离子扫描质谱图见图 1、2。

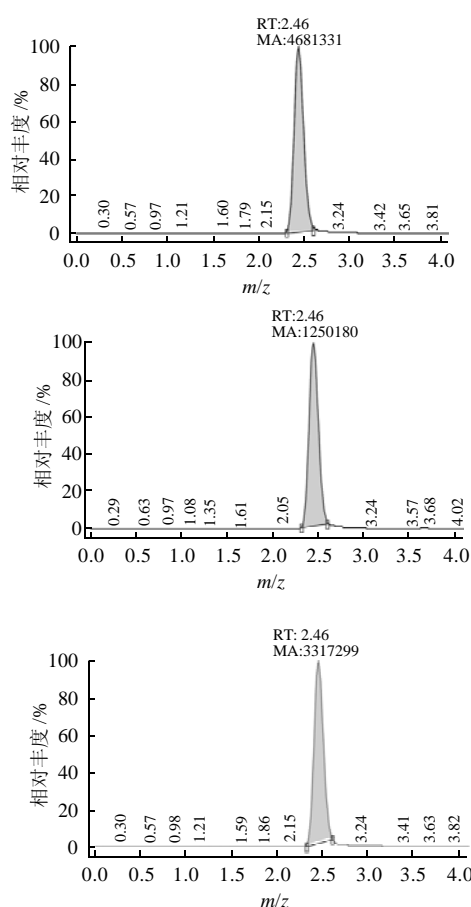


图1 叶酸空白加标 0.1 μg/mL 的总离子流图

Fig.1 Chromatogram of blank samples spiked with 0.1 μg/mL folic acid

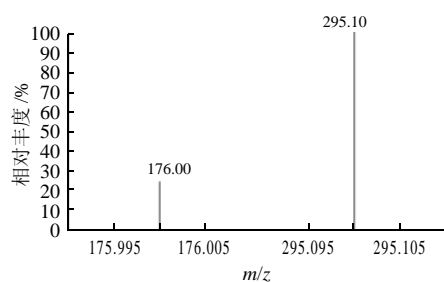


图2 叶酸离子扫描质谱图
Fig.2 Mass spectrum of folic acid

2.4 方法线性范围与检出限

准确移取叶酸储备液,用流动相依次稀释,配制0.001、0.005、0.010、0.100、0.500、1.000 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液,以叶酸的质量浓度和峰面积为纵、横坐标,绘制线性关系曲线。结果可得线性回归方程为 $Y = 4.301 \times 10^{-8}A - 0.0244$,相关系数 $r = 0.9996$,表明叶酸在0.001~1.000 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,叶酸的质量浓度和峰面积线性关系良好,适合做定量分析。

对空白样品进行不同水平的加标实验,按1.4节对样品进行前处理后,检测结果表明当 $R_{SN} > 3$ 时检出限为1 ng/mL 。

2.5 回收率与精密度

向不含叶酸的空白试样中添加10、50、200 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 三个水平的叶酸标样溶液,分别进行4次平行测定,结果见表1。由此可见,叶酸回收率在80.7%~89.7%,相对标准偏差为2.90%~3.85%,说明本方法比较准确。

表1 叶酸的回收率与精密度

Table 1 Recovery rates and determination precision (RSD) of folic acid

加标量/ $(\mu\text{g}/100\text{g})$	回收率/%				平均回收率/%	RSD/%
10	77.8	80.4	85.2	79.2	80.7	3.45
50	92.3	91	85.4	90.1	89.7	2.90
200	85.4	80.7	87.3	89.7	85.8	3.85

参考文献:

- [1] 罗建波. 保健食品中叶酸的高效液相色谱测定法[J]. 职业与健康, 2003, 19(9): 36-37.
- [2] 国家质量技术监督局. GB/T17813—1999 复合预混料中烟酸、叶酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.
- [3] 中华人民共和国卫生部. GB 5413.16—2010 婴幼儿食品和乳品中叶酸(叶酸盐活性)的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [4] 汪锦邦, 顾鹏, 章德宏, 等. 叶酸分析方法的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2000(3):49-53.
- [5] PAINE C J, EICHNER E R, DICKSON V. Concordance of radioassay and microbiological assay in the study of the ethanolinduced fall in serum folate level[J]. Am J Med Sci, 1973, 266(2): 134-138.
- [6] PANDRANG I S, LABORDE L F. Optimization of microbiological assay of folic acid and determination of folate content in spinach[J]. Int J Food Sci Technol, 2004, 39(5): 525-532.
- [7] KOHASHI M, INOUE K, SOTOBAYASHI H, et al. Microdetermination of folate monoglutamates in serum by liquid chromatography with electrochemical detection[J]. J Chromatogr, 1986, 382(31): 303-307.
- [8] 刘莉治, 罗晓燕, 周洪伟, 等. 高效液相色谱法测定婴幼儿食品中的叶酸[J]. 中国卫生检验, 2007, 17(7): 1179-1180.
- [9] FINGLAS P M, WIGERTZ K, VAHTERISTO L, et al. Standardisation of HPLC techniques for the determination of naturally-occurring folates in food[J]. Food Chemistry, 1999, 64(2): 245-255.
- [10] 蒋萍, 刘红菊, 郝晓花. 反相高效液相色谱法同时测定9种水溶性维生素[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(3): 339-341.
- [11] ZHANG Guofang, STOROZHENKO S, Van DERSTRAETEN D, et al. Investigation of the extraction behavior of the main monoglutamate folates from spinach by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2005, 1078(1/2): 59-66.
- [12] 蒋俊树, 赵彬. 高效液相色谱法测定能量饮料中多种水溶性维生素[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 635-637.
- [13] 战英, 刘思洁, 顾小莉, 等. 高效液相色谱法测定保健食品中的叶酸[J]. 中国卫生工程学, 2007, 6(5): 289-290.
- [14] 任一平, 张爱珍, 朱黎炎, 等. 高效液相色谱法测定食品中的叶酸[J]. 食品与发酵工业, 2007, 29(10): 46-49.
- [15] 郭健, 李敏, 孟妍. 荧光分光光度法测定食品中叶酸的含量[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(10): 1259.
- [16] 刘波, 王晓工, 王心祥, 等. 高压液相色谱法测定婴幼儿配方乳粉中叶酸[J]. 中国乳品工业, 2003, 31(3): 39-41.
- [17] 王存芳. 高效液相法测定注射用亚叶酸钙中的有关物质[J]. 中华中西医杂志, 2004, 5(19): 11-12.
- [18] 赵雯玮, 陈祥贵, 杨潇, 等. 高效液相色谱法测定液态奶中的叶酸[J]. 中国乳品工业, 2009, 37(12): 51-53.