

АНАЛИЗ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-СПЕКТРО- МЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Аналитические решения
Markets and Applications Programs



Agilent Technologies

Authorized Partner Laboratory

Авторы

А.В. Пирогов
(Andrey Pirogov)
А.А. Бендрышев,
(Alexandr Bendryshev)

Московский государственный
университет имени М.В.
Ломоносова, Химический
факультет.

Е.Б. Пашкова (Elena Pashkova)
ООО "Бион"



Разработан способ одновременного определения водорастворимых витаминов (14 витаминов) в объектах со сложной матрицей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием в режиме электрораспылительной ионизации с регистрацией положительных ионов.

Время анализа 20 мин. Пределы обнаружения: аскорбиновая кислота 250 мкг/л, остальные витамины 3–50 мкг/л.

Введение

При анализе сложных объектов спектрофотометрическое детектирование не всегда может обеспечить необходимую селективность и чувствительность определения витаминов, а флуориметрическое детектирование не может применяться для большинства витаминов. Поэтому, для определения витаминов на фоне сложных матриц целесообразно использовать масс-спектрометрическое детектирование. При этом следует учитывать некоторые особенности. Использование фосфатных (как и других нелетучих) буферных растворов в качестве элюентов с масс-спектрометрическим детектором невозможно. Необходимо подобрать легколетучий водно-органический буферный раствор, в котором можно максимально разделить все водорастворимые витамины.



Экспериментальная часть

Оборудование

Наименование	Кат номер, модель
1200 Бинарный насос	G1312A
1200 Дегазатор	G1379A
1200 Автосамплер	G1313A
1200 Термостат колонок	G1316A
1200 Диодно-матричный детектор	G1315B
Квадрупольный масс-спектрометр LC/MSD серии SL	G1956B

Условия хроматографирования

Параметр	Значение
Колонка	ZORBAX Eclipse XDB C18, 150x4.6 мм.
Элюирование	Градиентное
Элюент А	Водный раствор уксусной кислоты с pH 2.9
Элюент В	Ацетонитрил
Программа градиента	0–4.6 мин 0% В, 10–17.8 мин 18% В, 18.4–19.0 мин 60% В, 19.6–22 мин 0% В.
Скорость потока элюента	0,8 мл/мин
Температура термостата	30 °С
Объем пробы	20 мкл
Промывка иглы автосамплера	2 сек ацетонитрилом
Режим квадруполя	Положительный, электрораспылительная ионизация
V _{cap}	4000 В
Фрагментор	Программируемое изменение (см. табл. 1)
Распылитель	40 psig
Скорость потока газа осушителя	6 л/мин
Температура газа-осушителя	300 °С
Ионы	см.табл. 2
Скорость сбора данных	20 Hz

Растворы и реактивы

Витамины предоставлены фирмой Sigma, США с чистотой не менее 99.8%), ледяная уксусная кислота (Reag.Ph.Eur., 99,7%, Panreac, Испания). Ацетонитрил, квалификации чистоты «gradient grade» был получен из Biosolve Chemie, Нидерланды. Деионизованная вода получена с помощью Milli-Q Integral system, Миллипор, США.

Программное обеспечение

Agilent ChemStation 35900 A/D, версия A.10.02.

Результаты и обсуждение

Поскольку масс селективный детектор обладает исключительной селективностью, нет необходимости добиваться полного разделения всех витаминов. Достаточно добиться отделения пиков витаминов от неустойчивых и слабоустойчивых соединений, элюирующихся с малыми временами удерживания и элюирования витаминов хотя бы несколькими группами. Отсутствие необходимости полностью хроматографически разделять все витамины позволяет, применять колонки меньшего размера, сократить время анализа и улучшить пределы обнаружения за счет возросшей эффективности. Наилучших результатов (по сравнению с неподвижными фазами Synergi Hydro-RP и Luna C18(2)) удалось добиться при использовании колонки ZORBAX Eclipse XDB C18 в градиентном режиме при низких pH. Наилучшие результаты разделения витаминов на колонке ZORBAX Eclipse XDB C18 в градиентном режиме достигаются при использовании водного раствора уксусной кислоты (pH 2.9) и ацетонитрила.

Хорошее разделение витаминов наблюдается и при увеличении pH ацетатно-аммонийных буферных растворов до 4–7, однако при этом пики некоторых витаминов раздваиваются (пиридоксамин, тиамин, фолиевая кислота, никотинамид, рибофлавинфосфат). При дальнейшем увеличении pH наблюдается значительное снижение эффективности, пики витаминов становятся несимметричными.

При анализе реальных объектов использование трифторуксусной кислоты в качестве добавки в элюент зачастую приводит к образованию дополнительных пиков и артефактов на хроматограмме (по-видимому, за счет образования ионных пар). Кроме того, трифторуксусная кислота может приводить к сокращению срока службы и порче прибора.

При использовании ацетатно-аммонийного буферного раствора и ацетонитрила в качестве подвижной фазы в масс-спектрах исследуемых соединений, снятых в режиме регистрации положительных ионов, присутствовали протонированные молекулы, ионы, соответствующие аддуктам с аммонием, различные фрагментарные ионы определяемых соединений и многозарядные ионы (для ЭРИ). Преобладающим являлся аддукт состава $[M+H]^+$. Наилучшего соотношения сигнал/шум для большинства водорастворимых витаминов удалось достигнуть в режиме электрораспылительной ионизации с регистрацией положительных ионов. Хроматограмма модельной смеси четырнадцати витаминов с использованием программного режима при масс-спектрометрическом детектировании представлена на рис. 1. Для достижения лучших пределов обнаружения следует использовать программное изменение напряжения на фрагменторе (табл. 1).

Количественные характеристики хроматографического определения витаминов с использованием масс-селективного детектирования представлены в табл. 2.

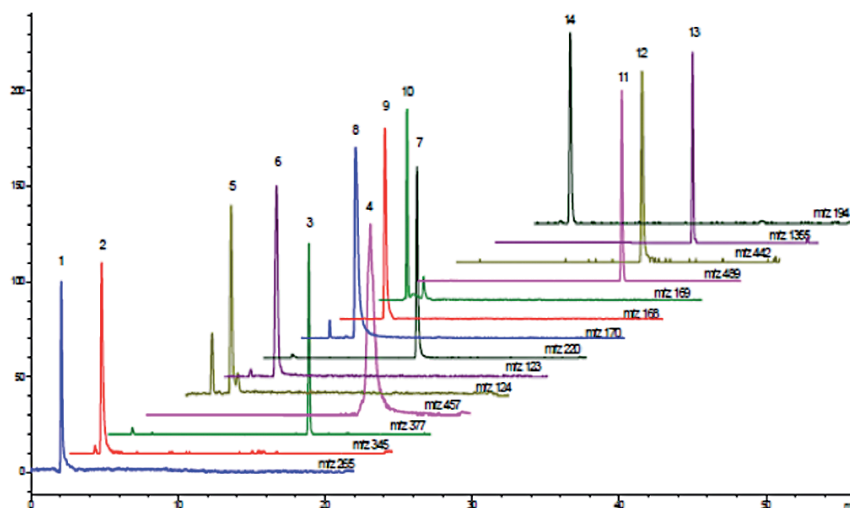


Рис. 1. Реконструкция хроматограммы модельной смеси водорастворимых витаминов по выделенным ионам.

Пики: (1) — тиамин, (2) — тиаминфосфат, (3) — рибофлавин, (4) — рибофлавинфосфат, (5) — никотиновая кислота, (6) — никотинамид, (7) — пантотеновая кислота, (8) — пиридоксин, (9) — пиридоксаль, (10) — пиридоксамин, (11) — биотин, (12) — фолиевая кислота, (13) — цианокобаламин, (14) — аскорбиновая кислота.

Условия. Колонка: ZORBAX Eclipse XDB C18 150 4.6 мм, 5 мкм; элюент:

А — уксусная кислота (pH 2.9), В — ацетонитрил; скорость потока 0.8 мл/мин; градиентное элюирование (0–4.6 мин 0% В, 10–17.8 мин 18% В, 18.4–19.0 мин 60% В, 19.6–22 мин 0% В); электрораспылительная ионизация, режим регистрации положительно заряженных ионов, масс-селективное детектирование по заданным ионам.

Витамин	Время, мин	Напряжение фрагмента, В
Тиамин	0,0-9,0	100
Тиаминфосфат		
Никотиновая кислота		
Никотинамид		
Пиридоксин		
Пиридоксаль		
Пиридоксамин		
Аскорбиновая кислота		
Пантотеновая кислота	9,0-11,5	150
Фолиевая кислота	11,5-12,5	250
Рибофлавин	12,5-14,2	100
Биотин		
Цианокобаламин		
Рибофлавинфосфат	14,2-22,0	200

Таблица 1. Параметры программирования режима фрагмента при масс-спектрометрическом детектировании витаминов.

Витамин	m/z	Козфф, коррел, R ²	Диапазон линейности, мг/л	Предел обнаружения	
				мкг/л	нг
Тиамин	265	0,999	0,150–50	50	1
Тиаминфосфат	345	0,999	0,1–50	30	0,6
Рибофлавин	377	0,999	0,01–5	3	0,06
Рибофлавинфосфат	457	0,996	0,06–50	20	0,4
Никотиновая кислота	124	0,998	0,05–50	15	0,3
Никотинамид	123	0,999	0,04–50	12	0,2
Пантотеновая кислота	220	0,999	0,06–50	20	0,4
Пиридоксин	170	0,998	0,01–50	3	0,06
Пиридоксаль	168	0,999	0,03–50	10	0,2
Пиридоксамин	169	0,997	0,09–50	30	0,6
Биотин	489	0,999	0,05–50	16	0,3
Фолиевая кислота	295	0,998	0,06–50	20	0,4
Цианокобаламин	1355	0,999	0,150–50	50	1
Аскорбиновая кислота	194	0,999	0,8–150	250	5

Таблица 2. Количественные характеристики хроматографического определения водорастворимых витаминов с масс-селективным детектированием.

Предложенные подходы использовали при анализе реальных объектов. Во время пробоподготовки твердых образцов экстракцию витаминов проводили 1% раствором фосфорной кислоты, а для осаждения белков в молочных продуктах использовали смесь фосфорной и трихлоруксусной кислот. Предложенный осадитель позволяет более эффективно (по сравнению с традиционными) коагулировать белки не прибегая к нагреванию. Объем пробы, вводимый в хроматограф, составляет всего 20-30 мкл, а содержание фосфорной

кислоты в вытяжке сопоставимо с содержанием в ней экстрагируемых из образцов нелетучих соединений. Эксплуатация хромато-масс-спектрометра в течение нескольких месяцев не выявила никаких проблем, возникающих вследствие использования такого количества фосфорной кислоты в пробах.

Результаты определения витаминов в некоторых объектах приведены ниже, в табл. 3 и 4. Полученные результаты хорошо согласуются с паспортными данными.

Витамин	Сок Тонус		Сух, Завтрак «СНОСА»		Печень «Расти Большой»	
	Найдено, мг/л	Паспорт, мг/л	Найдено, мг/100г	Паспорт, мг/100г	Найдено, мг/100г	Паспорт, мг/100г
Тиамин	1,03±0,07	1,1	0,76±0,05	0,7	2,2±0,2	2,2±0,22
Рибофлавин	1,23±0,04	1,2	0,82±0,05	0,8	2,36±0,06	2,3±0,23
Никотинамид	13,8±0,8	13,5	9,1±0,3	9,0	21±1	21,0±1,05
Пантотеновая кислота	4,6±0,3	4,5	3,0±0,2	3	1,7±0,3	–
Пиридоксин	1,5±0,1	1,5	1,06±0,06	1,0	3,1±0,1	3,1±0,31
Биотин	0,12±0,01	0,11	0,07±0,01	0,075	н.о.	-
Фолиевая кислота	0,16±0,01	0,15	0,11±0,01	0,1	0,45±0,03	-
Цианокобаламин	н.о.	0,0008	н.о.	0,00075	н.о.	-
Аскорбиновая кислота	34±4	45	29±2	30	32,8±0,5	34,0±6,8

Таблица 3. Результаты определения витаминов в соке, сухих завтраках и печени ($n = 3$, $P = 0,95$).

«н.о.» – ниже предела обнаружения

«-» – нет данных

Витамин	Детская смесь «Агуша»		Препарат «Ундевит»		Корм «Финишер»	
	Найдено, мг/1000г	Паспорт, мг/1000г	Найдено, мг/драже	Паспорт, мг/драже	Найдено, мг/100г	Паспорт, мг/100г
Тиамин	0,40±0,04	0,4	1,9±0,1	2	1,04±0,08	1
Рибофлавин	0,62±0,03	0,6	2,0±0,1	2	1,3±0,3	1
Никотинамид	4,1±0,1	4	19±1	20	26±2	25
Пантотеновая кислота	3,0±0,2	3	3,0±0,1	3	5,11±0,08	5
Пиридоксин	0,42±0,03	0,4	3,1±0,1	3	5,2±0,5	5
Фолиевая кислота	0,06±0,01	0,06	0,07±10,003	0,07	0,04±0,01	0,03
Аскорбиновая кислота	62±3	60	73±3	75	44±3	50
Биотин	-	-	-	-	0,05±0,01	0,05
Цианокобаламин	-	-	0,0020±0,0006	0,002	-	-

Таблица 4. Результаты определения витаминов в молочной смеси «Агуша», витаминном препарате «Ундевит» и кормовой добавке «Финишер» (n = 3, P = 0,95).

Следует отметить, что результаты определения витаминов в тех же объектах, полученные с использованием спектрофотометрического детектирования, совпадали с полученными при масс спектрометрическом детектировании в случае объектов с простой матрицей (фармпрепараты, кормовая добавка и т.п.), однако были завышены для целого ряда витаминов в случае анализа объектов с более сложной матрицей (сок, молоко и т.п).

Заключение

Разработан способ селективного и чувствительного одновременного определения водорастворимых витаминов (14 витаминов) в объектах со сложной матрицей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в режиме электрораспылительной ионизации с регистрацией положительных ионов. Правильность анализов подтверждена результатами определения витаминов в реальных объектах и методом «введено-найдено». Для извлечения водорастворимых витаминов из сложных матриц (соки, молоко и др.) с последующим хромато-масс-спектрометрическим определением предложено использовать 0,5% фосфорную кислоту.

Контакты: Agilent MAPs:
maps_agilent@agilent.com

Дополнительная информация:
<http://www.your-analytical-solution.com>

This information is subject to change without notice.

© Agilent Technologies, Inc. 2013
Published in USA, November 1, 2013
5991-3523RURU

The Measure of Confidence



Agilent Technologies