

SIMULTÁNNÍ STANOVENÍ VITAMINŮ B₁, B₂ A B₆ METODOU KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE S HMOTNOSTNÍ DETEKCÍ

MARIE POKORNÁ BARTOŠKOVÁ,
JANA RYSOVÁ a JITKA PINKROVÁ

Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i., Radiová
1285/7, 102 00 Praha
marie.pokorna@vupp.cz

Došlo 26.8.19, přijato 16.12.19.

Klíčová slova: simultánní stanovení, tandemová hmotnostní spektrometrie, kapalinová chromatografie, vitaminy B

Úvod

Vitaminy jsou esenciální složky potravin. Jde o organické exogenní biokatalyzátory heterotrofních organismů, které si organismus neumí sám syntetizovat z jednoduchých sloučenin a musí je přijímat potravou. Vitaminy mají rozmanité chemické vlastnosti a mohou být citlivé na různé fyzikálně-chemické vlivy, jako jsou teplota či světlo, při výrobě potravin tudíž může docházet k jejich ztrátám^{1,2}.

Obecně se vitaminy dělí do dvou skupin na rozpustné ve vodě a rozpustné v tucích. Vitaminy skupiny B patří mezi rozpustné ve vodě a mají velký význam pro lidské zdraví. Jsou obsaženy v potravinách rostlinného i živočiš-

ného původu, především v obilovinách, mléce, játrech či droždí^{1,2}. Vitaminy B₁, B₂ a B₆ se v potravinách vyskytují volně jako thiamin (B₁), riboflavin (B₂) a vitamery vitamínu B₆ pyridoxin, pyridoxal a pyridoxamin nejčastěji ve formě hydrochloridů pro lepší rozpustnost. V potravinové matrici se vitaminy skupiny B vyskytují často vázané ve formě fosfátů na bílkovinném řetězci jako kofaktory enzymů³. S výjimkou thiaminu jsou tyto vitaminy termostabilní. V případě riboflavinu dochází k rozkladu vlivem světla¹, proto je nutné při analýzách zamezit přístupu světla, aby nedocházelo k degradaci a tím k ovlivnění výsledků. Na schématu 1 jsou zobrazeny strukturální vzorce vitaminů B₁, B₂ a B₆.

V literatuře je možné najít mnoho metod ke společnému stanovení skupin hydrofilních a lipofilních vitaminů. K separaci a detekci se často využívá spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV detekcí, ale stále častěji se vyskytuje spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS), případně tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS)^{4–10}. Při simultánní analýze více vitaminů bývá nejčastějším problémem uvolnění jednotlivých forem vitaminů z matrice tak, aby nedocházelo ke snížení výtěžnosti jednotlivých analytů. U analýzy vitaminů B₁, B₂ a B₆ lze relativně snadno pomocí kyselých hydrolyzy a enzymu diastasy odštěpit z vázaných forem vitaminy B₁ a B₂, zatímco pro uvolnění vitamery B₆ je třeba využít kyselou hydrolyzu a následně enzymatickou hydrolyzu kyselou fosfatasou¹¹.

V dnešní době je možné získat většinu vitaminů z vyvážené stravy, avšak v důsledku nevhodných stravovacích návyků a dietních omezení může docházet k nedostatku určitých skupin vitaminů. Existuje proto mnoho doplňků stravy a potravin fortifikovaných vitaminy, díky kterým lze deficit snadno doplnit. Tato práce je zaměřena především na produkty deklarující obsah přida-

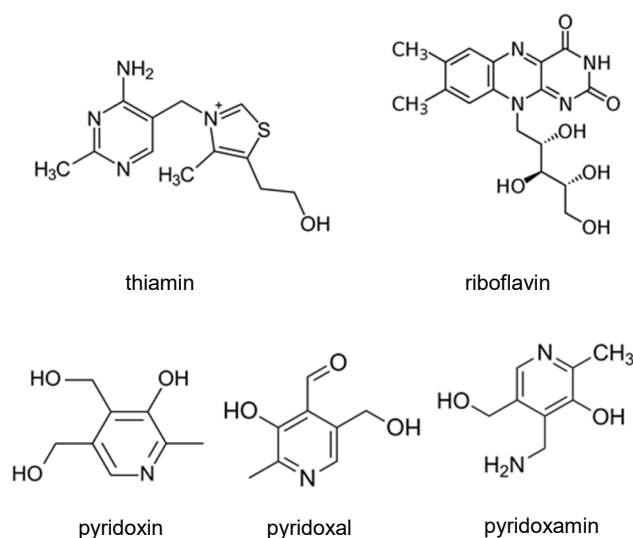


Schéma 1. Strukturální vzorce vitaminů B₁, B₂ a B₆

Tabulka I
Podmínky LC-MS/MS analýzy

| Parametr | Hodnota | |
|----------------|--|---|
| Teplota kolony | 30 °C | |
| Objem nástřiku | 1 µl | |
| Mobilní fáze | A | B |
| | demi-voda + 25 mM HCOONH ₄ + 0,1% HCOOH | CH ₃ OH + 25 mM HCOONH ₄ + 0,1% HCOOH |
| Doba analýzy | 10 min | |
| Gradient | čas [min] | % B |
| | 0 | 5 |
| | 5 | 60 |
| | 6 | 60 |
| | 6,1 | 5 |
| | 7 | 5 |

ných vitaminů B₁, B₂ a B₆. Jedná se o doplňky stravy a nápoje, které jsou volně prodejné a dostupné. V těchto přípravcích se vyskytují především volné formy vitaminů, na kterých mohla být ověřena vhodnost metodiky stanovení.

Experimentální část

Přístroje a metody

LC-MS/MS analýza byla vyvinuta a optimalizována na kapalinovém chromatografu Agilent 1260 UHPLC ve spojení s hmotnostním detektorem 6460 Triple Quad MS s elektrosprejem jako zdrojem ionizace, který je pro analýzy podobného typu často využíván^{12,13}. Pro separaci byla využita kolona Agilent ZORBAX RRHT SB-Aq, 3,0 mm × 100 mm, 1,8 µm. Podmínky analýzy jsou uvedeny v tabulkách I a II, v tabulce III jsou uvedeny MRM (multiple reaction monitoring) přechody jednotlivých analytů.

Chemikálie

K analýze byl použit methanol v kvalitě HPLC-grade firmy Merck a demineralizovaná voda ze zařízení Milli-Q od firmy Merck Millipore. Standard mravenčanu amonného (≥ 99,0%) byl od firmy Sigma-Aldrich a mravenčí ky-

selina (≥ 97,5%) od firmy Honeywell. Standardy thiaminu (≥ 99,0%) a riboflavinu (≥ 99,0%) byly dodány firmou Fluka, pyridoxin (neat) s pyridoxaminem (≥ 98,0%) byly získány od firmy Sigma-Aldrich a pyridoxal (≥ 99,0%) byl dodán firmou Merck.

Ze standardů jednotlivých vitaminů byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 0,1 mg ml⁻¹, z nichž byl dále připraven směsný roztok všech pěti analytů. Thiamin byl rozpuštěn v 0,1 M H₂SO₄. Riboflavin je ve vodě pouze slabě rozpustný, proto byl nejprve rozpuštěn v malém množství 1 M NaOH a poté zneutralizován 10% roztokem

Tabulka III
MRM přechody jednotlivých vitaminů

| Analyt | Prekursorový iont | Produktový iont |
|-------------|-------------------|-----------------|
| Thiamin | 265,1 | 122,0 |
| | | 144,0 |
| | | 113,0 |
| | | 81,0 |
| Riboflavin | 377,2 | 243,0 |
| | | 198,0 |
| | | 172,1 |
| | | 152,0 |
| Pyridoxin | 170,1 | 134,0 |
| | | 106,0 |
| | | 80,1 |
| | | 77,1 |
| Pyridoxal | 168,1 | 150,0 |
| | | 122,0 |
| | | 106,0 |
| | | 94,1 |
| Pyridoxamin | 169,1 | 134,0 |
| | | 152,0 |
| | | 77,1 |

Tabulka II
Podmínky MS

| Parametr | Hodnota |
|-----------------------------|------------------------|
| Typ iontového zdroje | ESI-JET |
| Mód iontového zdroje | pozitivní |
| Teplota sušícího plynu | 260 °C |
| Průtok sušícího plynu | 6 l min ⁻¹ |
| Tlak při nebulizaci | 40 psi |
| Teplota kolizní cely | 380 °C |
| Průtok plynu v kolizní cele | 12 l min ⁻¹ |

octové kyseliny a doplněn 0,1 M H₂SO₄. Roztoky vitamínů B₆ byly připraveny jak v demineralizované vodě, tak v 0,1 M citrátovém pufru o pH 4,5. Ze směšného standardu bylo naředěno celkem 6 kalibračních úrovní vitaminů v rozsahu 0,5–500 ng ml⁻¹. Tato kalibrace byla proměřována vždy na začátku i na konci sekvence měření reálných vzorků, ale také validačních charakteristik.

Vzorky

Pro ověření měřicí metody byly vybrány vzorky multivitaminových potravinových doplňků, nápojů s přidanými vitaminy, multivitaminových džusů a nápojů pro děti, které mají výrobcem deklarované složení. K analýze byly vybrány 3 druhy multivitaminových šumivých tablet různých výrobců (Vitar, Mivolis a Additiva), energetický nápoj s obsahem kofeinu (Redbull), 2 nápoje s přidanými vitaminy (Magnesia Red brusinka, DrWitt Relax), 3 druhy multivitaminových džusů a nápojů pro děti (Relax, Kubík a Capri-Sun) a také Alpro mandlový nápoj. Podle deklarovaného obsahu jednotlivých vitaminů byly vzorky nápojů naředěny demineralizovanou vodou a v případě potřeby byly dále filtrovány přes nylonový stříkačkový filtr (0,45 μm). Vzorky multivitaminových doplňků ve formě tablet byly nejprve rozpuštěny v demineralizované vodě a následně naředěny tak, aby se očekávané výsledky pohybovaly v lineárním pracovním rozsahu metody.

Příprava vzorků probíhala v temnu, aby nedocházelo k degradaci riboflavinu a vzorky byly připraveny do šroubovacích vialek z hnědého skla a ihned po přípravě byly

vzorky analyzovány na kapalinovém chromatografu s hmotnostní detekcí.

Výsledky a diskuse

Validace metody

Metoda byla ověřena změřením validačních charakteristik. Byla vyhodnocena opakovatelnost a výtěžnost metody, nejistota měření a limity detekce a kvantifikace. Všechny parametry byly měřeny na třech kalibračních úrovních v sériích po deseti opakováních. Opakovatelnost metody je dána relativní směrodatnou odchylkou výsledků (RSD). Výtěžnost byla měřena v matici ovocného nápoje na vybrané koncentrační hladině ve středu kalibračního rozsahu. Limity detekce (*LOD*) a stanovitelnosti (*LOQ*) byly získány analýzou dat z kalibračních závislostí a nejistota měření byla vypočtena z analýzy rozptylu v Excelu (ANOVA) jako odhad kombinované nejistoty. Na obr. 1 je znázorněn chromatografický záznam píku pyridoxinu včetně hmotnostního spektra z vyhodnocovacího softwaru MassHunter. Výsledky validačních charakteristik jsou uvedeny v tab. IV.

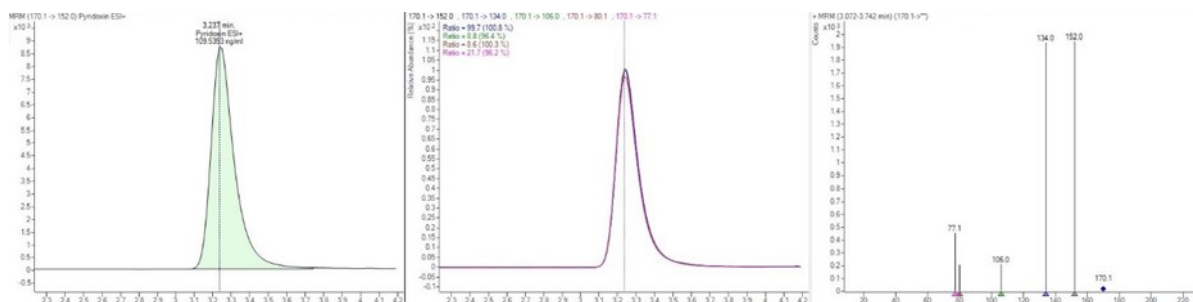
Testování stability směšného roztoku standardů

Pro zajištění opakovatelných výsledků bylo provedeno také testování stability směšného roztoku standardů vitaminů B₁, B₂ a B₆ v demineralizované vodě a také směšného standardu vitaminu B₆ v 0,1 M citrátovém pufru

Tabulka IV

Validační charakteristiky LC-MS/MS metody na stanovení vitaminů B₁, B₂ a B₆

| Sloučenina | Opakovatelnost RSD [%] | Výtěžnost [%] | <i>LOD</i> [ng ml ⁻¹] | <i>LOQ</i> [ng ml ⁻¹] | Nejistota měření [%] |
|-------------|---------------------------|------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| Thiamin | 0,66 | 88,4 | 0,071 | 0,213 | 7,71 |
| Riboflavin | 1,62 | 96,4 | 0,142 | 0,426 | 2,52 |
| Pyridoxin | 1,42 | 89,4 | 0,087 | 0,262 | 19,58 |
| Pyridoxal | 1,38 | 94,9 | 0,074 | 0,222 | 20,47 |
| Pyridoxamin | 0,41 | 96,3 | 0,056 | 0,168 | 6,27 |



Obr. 1. Chromatografický záznam pyridoxinu s hmotnostním spektrem ze softwaru MassHunter

Tabulka V

Stabilita směsného roztoku vitaminů B₁, B₂ a B₆ v demineralizované vodě/citrátovém pufru

| Den | Plocha píku [AU·min] | | | | |
|------------------|----------------------|------------|--------------|--------------|-------------|
| | thiamin | riboflavin | pyridoxin | pyridoxal | pyridoxamin |
| 0 | 227445 | 1541 | 91108/118256 | 75654/122645 | 80343/57992 |
| 28 | 221666 | 1353 | 82590/115377 | 51654/121111 | 77958/58163 |
| Pokles odezvy, % | 2,54 | 12,19 | 9,35/4,75 | 31,72/2,64 | 2,97/-0,25 |

(pH 4,5) za účelem stanovení doby skladovatelnosti roztoků. Koncentrace jednotlivých analytů ve směsi byla 100 ng ml⁻¹. Z testování vyplývá, že roztok vitaminu B₆ je stabilnější v citrátovém pufru, ve kterém dochází v průběhu měsíčního skladování pouze k minimálním odchylkám, kdežto v demineralizované vodě dochází u pyridoxalu k více než třetinovému poklesu odezvy. U ostatních analytů nedochází ke ztrátám vyšším než 15 %, viz tab. V.

Měření reálných vzorků

Každý vzorek byl měřen v pěti paralelních stanoveních. U vitaminu B₆ byla počítána suma jednotlivých vitaminů. Výsledky byly přepočítány na mikrogramy na 100 ml vzorku a porovnány s hodnotami deklarovanými na obalech výrobků. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tab. VI.

S výjimkou jediného vzorku bylo ve všech vybraných vzorcích nalezeno stejné nebo vyšší množství vitaminů B, než jaké uvádí výrobce. Legislativa udává, že přípustná odchylka obsahu vitaminů v doplňcích stravy může být od +50 % do -20 % od deklarovaného obsahu a u ostatních typů potravin může být odchylka +50 % až -35 % (cit.¹⁴). Z tohoto hlediska je tedy obsah vitaminu u většiny vzorků ve shodě s deklarací na obale výrobku. U vzorku šumivých tablet Additiva Multivitamin byl detegován riboflavin

pouze v množství 3,1 % výrobcem deklarovaného obsahu. Vzorek byl připraven celkem třikrát a opakovaně změřen vždy se stejným výsledkem. Obsahy vitaminů B₁ a B₆ v tomto vzorku odpovídaly uvedeným hodnotám.

Závěr

V této práci byla vyvinuta a testována metoda LC-MS/MS pro simultánní stanovení vitaminů B₁, B₂ a B₆. Analýza je rychlá, citlivá a spolehlivá. Získané hodnoty validačních charakteristik jsou srovnatelné s dosud publikovanými výsledky měření vitaminů skupiny B. Výhodou LC-MS/MS metody jsou nízké limity detekce a stanovitelnosti a dobrá opakovatelnost. Touto metodou byly stanoveny obsahy vitaminů B₁, B₂ a B₆ ve vzorcích šumivých multivitaminových tablet, multivitaminových nápojích pro děti, energetickém nápoji, nápojích s přidanými vitaminy a také v mandlovém nápoji. Metoda je vhodná pro stanovení sledovaných analytů ve vzorcích nápojů v koncentraci nejméně 2,1·10⁻⁵ mg/100 ml pro thiamin, 4,3·10⁻⁵ mg/100 ml pro riboflavin, 2,6·10⁻⁵ mg/100 ml pro pyridoxin, 2,2·10⁻⁵ mg/100 ml pro pyridoxal a 1,7·10⁻⁵ mg/100 ml pro pyridoxamin. Další práce bude zaměřena na stanovení vázaných vitaminů skupiny B v komplexních potravinových maticích typu cereálních a masných výrobků.

Tabulka VI

Výsledky stanovení vitaminů B₁, B₂ a B₆ v reálných vzorcích multivitaminových potravinových doplňků, nápojů a džusů metodou LC-MS/MS

| Analyzovaný produkt | B ₁ | | B ₂ | | B ₆ | |
|-------------------------|----------------|------------------------|----------------|------------------------|----------------|------------------------|
| | μg/100 ml | podíl ^a [%] | μg/100 ml | podíl ^a [%] | μg/100 ml | podíl ^a [%] |
| Mivolis Multivitamin | 1299 ± 36 | 118,1 | 1479 ± 48 | 105,6 | 1689 ± 30 | 120,6 |
| Vitar Multivitamin | 1242 ± 31 | 112,9 | 1787 ± 29 | 127,7 | 2084 ± 46 | 148,8 |
| Additiva Multivitamin | 2263 ± 17 | 102,9 | 85,41 ± 0,58 | 3,1 | 3140 ± 47 | 112,1 |
| DrWitt RELAX | 201,1 ± 2,5 | 121,9 | – | – | 266,8 ± 2,0 | 127,0 |
| Magnesia Red brusinka | – | – | – | – | 220,2 ± 1,1 | 104,9 |
| Redbull Original | – | – | – | – | 2570,2 ± 7,1 | 128,5 |
| Relax multivitamin | 188,1 ± 5,8 | 114,0 | 225,1 ± 4,8 | 107,2 | 255,1 ± 7,0 | 121,5 |
| Kubik 100% multivitamin | – | – | – | – | 242,0 ± 2,6 | 115,2 |
| Capri-Sun multivitamin | 196 ± 12 | 115,5 | – | – | 251,6 ± 3,5 | 119,8 |
| Alpro mandlový nápoj | – | – | 219,2 ± 3,8 | 104,4 | – | – |

^a Podíl stanoveného obsahu k hodnotě deklarované výrobcem (%)

Vypracováno s finanční podporou projektu výzkumné infrastruktury METROFOOD-CZ, grant MŠMT: LM2018100 a s podporou Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO0318.

LITERATURA

1. Davídek J., Janíček G., Pokorný J., v knize: *Chemie potravin*, kapitola 7, str. 138. SNTL/ALFA, Praha 1983
2. Freed M. (ed.), v knize: *Methods of Vitamin Assay*, kapitola 2, str. 23–25. 3. vyd. Interscience Publishers, New York 1966.
3. Vyhláška č. 225/2008 Sb., kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin. Sbírka zákonů 2008, částka 71, str. 3234.
4. Jedlička A., Klimeš J.: *Chem. Listy* 59, 202 (2005).
5. Cortés-Herrera C., Artavia G., Leiva A., Granados-Chinchilla F.: *Foods* [online] 8, 1 (2019).
6. Cellar N. A., McClure S. C., Salvati L. M. a Reddy T. M.: *Anal. Chim. Acta* 934, 180 (2016).
7. Phillips M. M.: *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 2965 (2015).
8. Gentili A., Caretti F., D'Aascenzo G., Marchese S., Perret D., Di Corcia D., Rocca L. M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 2029 (2008).
9. Nurit E., Lyan B., Piquet A., Branlard G., Pujos-Guillot E.: *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 3471 (2015).
10. Kucukkolbasi S., Bilber O., Ayyildiz F. H., Kara H.: *Quim. Nova* 36, 1044 (2013).
11. Ndaw S., Bergaentzle M., Aoudé-Werner D., Hasselmann C.: *Food Chem.* 71, 129 (2000).
12. Agilent Technologies: Quantitative Analysis of Water-Soluble B-Vitamins in Cereal Using Rapid Resolution LC/MS/MS 2008 (USA).
13. Agilent Technologies: Rapid, Sensitive and Cost-effective Detection of B Vitamins in Foods by UHPLC/MS/MS 2012 (UK).
14. https://www.potravinainfo.cz/33/stanoveni-pripustnych-odchylek-od-nutricnich-hodnot-uvedenych-na-etikete-uniqueidgOke4NvrWuMEMvw3uZDmFj-to9kmN1BY7yUXgS7_ZjQ/, staženo 16. 7. 2019.

M. Pokorná Bartošková, J. Rysová, and J. Pinkrová (Food Research Institute Prague, Prague): Simultaneous Determination of Vitamins B₁, B₂ and B₆ by Liquid Chromatography with MS Detection

Vitamins are essential for human health and their main source is food. At present, both dietary supplements and multivitamin drinks that may supplement these vitamins are increasingly offered in the market. In this work, we have focused on the analysis of such products, including multivitamin beverages for children, especially group B vitamins, namely vitamin B₁ (thiamine), vitamin B₂ (riboflavin) and vitamin B₆ (pyridoxine, pyridoxal and pyridoxamine). A method based on LC-MS/MS has been developed allowing simultaneous quantification of vitamins B₁, B₂, and vitamers of B₆.

Keywords: simultaneous determination, tandem mass spectrometry, liquid chromatography, B vitamins

Acknowledgements

We acknowledge financial support from research infrastructure METROFOOD-CZ, grant from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Grant number LM2018100) and support from the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (institutional support MZE-RO0318).