

基于 LC-MS/MS 的肉类食品中 11 种 B 族维生素同步测定方法

朱钦雅¹, 廖卢艳¹, 张喻¹, 张佳玉¹, 陈弘², 吴卫国^{1*}

(1. 湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南长沙 410128)

(2. 湖南农业大学公共管理与法学学院, 湖南长沙 410128)

摘要: B 族维生素是人体必需的水溶性微量营养素, 肉类是其重要膳食来源, 但复杂基质(高蛋白、高脂)导致传统检测方法选择性差、基质干扰严重。为了满足复杂基质肉类样品中多种 B 族维生素同步检测的需求, 本试验建立了一种基于固相萃取结合 LC-MS/MS 技术同时测定猪肉、牛肉、鱼肉中 11 种 B 族维生素的分析方法。样品经酶解(复合酶, pH 值 5.5, 37 °C, 1.5 h)和缓冲液提取后, 采用 Captiva EMR-Lipid 固相萃取柱净化, 以 0.2% (V/V) 甲酸-10 mmol L⁻¹ 乙酸铵溶液和乙腈为流动相, 经 Agilent HILIC Plus (2.1×100 mm, 3.5 μm) 色谱柱分离, 在电喷雾正离子多反应监测模式下进行检测, 外标法定量。结果显示, 11 种目标物线性良好 ($R^2>0.999\ 0$), 其中 8 种维生素线性范围为 5~1 000 ng mL⁻¹, 泛酸为 10~1 000 ng mL⁻¹, 叶酸和维生素 B₁₂ 为 15~1 000 ng mL⁻¹; 方法检出限为 0.1~2.8 μg·kg⁻¹, 定量限为 0.5~9.8 μg·kg⁻¹。在猪肉、牛肉、鱼肉基质中 3 个加标水平下的平均加标回收率为 85.72%~107.17%, 相对标准偏差 (RSD) 为 1.13%~6.56%, 基质效应为 2.38%~18.47%, 均满足 GB/T 27404-2026 的定量要求。该方法可为肉类食品营养评估及质量控制提供理论与技术支持。

关键词: B 族维生素; LC-MS/MS; 基质效应; 肉类; 高通量

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.7.0720

Simultaneous Determination of 11 B Vitamins in Meat Products by LC-MS/MS

ZHU Qinya¹, LIAO Luyan¹, ZHANG Yu¹, ZHANG Jiayu¹, CHEN Hong², WU Weiguo^{1*}

(1.College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

(2.College of Public Administration and Law, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: B vitamins are essential water-soluble micronutrients for humans, and meat is an important dietary source. However, the complex matrix of meat samples (high protein and high fat) leads to poor selectivity and severe matrix interference in traditional analytical methods. To meet the demand for simultaneous determination of multiple B vitamins in complex meat matrices, an analytical method based on solid-phase extraction (SPE) coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was established for the simultaneous determination of 11 B vitamins in pork, beef, and fish. Samples were subjected to enzymatic hydrolysis (compound enzymes, pH 5.5, 37 °C, 1.5 h) followed by buffer extraction. The extracts were purified using a Captiva EMR-Lipid SPE cartridge. Chromatographic separation was achieved on an Agilent HILIC Plus column (2.1×100 mm, 3.5 μm) using 0.2% (V/V) formic acid-10 mmol L⁻¹ ammonium acetate solution and acetonitrile as the mobile phase. Detection was performed under electrospray ionization in positive mode with multiple reaction monitoring (MRM), and quantification was conducted using an external standard method. The results showed that all 11 target analytes exhibited good linearity ($R^2>0.999\ 0$). The linear ranges were 5~1 000 ng mL⁻¹ for eight vitamins, 10~1 000 ng mL⁻¹ for pantothenic acid, and 15~1 000 ng mL⁻¹ for folic acid and vitamin B₁₂. The limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) were 0.1~2.8 μg kg⁻¹ and 0.5~9.8 μg kg⁻¹, respectively. The average recoveries ranged from 85.72% to 107.17% at three spiking levels in pork, beef, and fish matrices, with relative standard deviations (RSDs) of 1.13%~6.56%. The matrix effects ranged from 2.38% to 18.47%. All performance parameters met the quantitative requirements of GB/T 27404-2026. This method provides theoretical and technical support for the nutritional evaluation and

收稿日期: 2026-05-12; 修回日期: 2026-08-03; 接受日期: 2026-08-03

基金项目: 湖南省科技创新计划资助项目 (2023ZJ1070)。

作者简介: 朱钦雅 (2001-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品检测, E-mail: 3101163502@qq.com

通讯作者: 吴卫国 (1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 粮油食品加工工程, E-mail: 1061051403@qq.com

quality control of meat products.

Key words: B vitamins; LC-MS/MS; matrix effect; meat; high-throughput

B 族维生素是一类重要的水溶性微量营养素^[1], 在人体能量代谢^[2]、神经系统调节^[3]及造血功能^[4]等生理过程中发挥着关键作用, 包括维生素 B₁ (Thiamine, VB₁)、维生素 B₂ (Riboflavin, VB₂)、烟酸 (Nicotinic Acid)、烟酰胺 (Nicotinamide)、泛酸 (Pantothenic Acid)、吡哆醇 (Pyridoxine)、吡哆醛 (Pyridoxal)、吡哆胺 (Pyridoxamine)、生物素 (Biotin)、叶酸 (Folic Acid) 及维生素 B₁₂ (Cyanocobalamin, VB₁₂) 等。由于人体对 B 族维生素的储存能力有限^[5], 需持续通过膳食摄入以维持正常生理功能。

肉类食品是居民膳食中 B 族维生素的重要来源^[6], 其中猪肉、牛肉和鱼肉消费量大、营养价值高, 但其基质组成复杂, 蛋白质和脂质含量较高, 检测其 B 族维生素含量时易产生严重的基质效应^[7], 干扰目标物的提取、净化和仪器响应。目前, 食品中 B 族维生素的检测主要采用高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)^[8]、超高效液相色谱法 (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC)^[9]以及液相色谱-串联质谱法 (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)^[10]等。其中, HPLC 方法多依赖紫外或荧光检测器^[11], 在单一或少数组分检测中应用较多^[12], 在复杂基质和多组分同步分析时, LC-MS/MS 技术以高灵敏度、高选择性和多反应监测的优势^[13-15], 能弥补 HPLC 选择性不足、检测灵敏度有限等问题, 更适用于复杂食品中痕量营养成分的准确定量。

目前, 我国已针对单一 B 族维生素建立了较为完善的国家标准检测体系。其中 VB₁ 采用 GB 5009.84-2016 (HPLC 法/荧光光度法)^[16]、VB₂ 采用 GB 5009.85-2016 (HPLC 法/荧光分光光度法)^[17]、烟酸和烟酰胺采用 GB 5009.89-2023 (HPLC 法/微生物法)^[18]、泛酸采用 GB 5009.210-2023 (LC-MS/MS 法/微生物法)^[19]、VB₆ 采用 GB 5009.154-2023 (LC-MS/MS 法/HPLC 法/微生物法)^[20]、生物素采用 GB 5009.259-2023 (LC-MS/MS 法/微生物法)^[21]、叶酸采用 GB 5009.211-2022 (微生物法)^[22]、VB₁₂ 采用 GB5009.285-2022 (HPLC 法/LC-MS/MS 法/微生物法)^[23], 上述国标方法在各自适用范围内具有方法成熟、可操作性强等优势, 为食品中 B 族维生素的合规性检测提供了重要技术支撑。

本试验以猪肉、牛肉和鱼肉为研究对象, 采用酶解提取、固相萃取净化结合 LC-MS/MS 技术, 建立 11 种 B 族维生素同步测定方法。通过优化酶解体系、提取溶剂、净化材料、色谱条件及质谱参数, 提高目标物释放效率、检测灵敏度及分析通量, 对于提升肉类食品营养数据质量、保障居民膳食营养评估的可靠性具有重要意义, 同时也为肉类食品相关标准方法的完善和质量控制提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

猪肉、牛肉、鱼肉样品均随机采样于市售渠道, 采集完成后, 可食部分用组织研磨机均质, 混匀。装入聚丙烯盒中, 标记密封, -20 °C 避光保存。

VB₁ (纯度≥98%)、VB₂ (纯度≥98%)、烟酸 (纯度≥99.5%)、烟酰胺 (纯度≥99.5%)、泛酸钙 (纯度≥98%)、吡哆醇盐酸盐 (纯度≥98%)、吡哆醛盐酸盐 (纯度≥99%)、吡哆胺二盐酸盐 (纯度≥98%)、生物素 (纯度≥99%)、叶酸 (纯度≥97%)、VB₁₂ (纯度≥98%), 以上标准品均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

甲醇、乙腈、甲酸、乙酸铵 (均为色谱纯), 抗坏血酸、二硫苏糖醇 (Dithiothreitol, DTT), 均购自德国 Merck 公司。酸性磷酸酶 (10 U mg⁻¹)、木瓜蛋白酶 (100 U mg⁻¹), 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; Captiva EMR-Lipid 净化柱 (6 mL) 购自美国 Agilent 公司。

缓冲液: 含 1% (m/V) 抗坏血酸、0.1% (m/V) DTT 的 10 mmol L⁻¹ 乙酸铵缓冲液。避光保存, 现配现用。

1.2 仪器与设备

Nexera LC-40 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; AB SCIEX Triple Quad 5500+ 三重四极杆液质联用仪, 美国 AB SCIEX 公司; Milli-Q 型纯水仪, 美国 Merck Millipore 公司; Multifuge X₁R 型高速冷冻离心机, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; KQ-800DE 型数控超声波清洗器, 中国昆山市超声仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理

准确称取均质后的试样 5.000 0 g (精确至 0.000 1 g) 于 50 mL 离心管中, 立即加入 10 mL 缓冲液 (pH 值 5.5), 涡旋振荡均匀后, 加入 5 mL 复合酶解液 (含木瓜蛋白酶 1 000 U、酸性磷酸酶 500 U, 用 pH 值 5.5 缓冲液现配), 于 37 °C 水浴摇床中 150 r min⁻¹ 避光酶解 1.5 h。再加入 20 mL 提取缓冲液 (pH 值 4.5), 于 4 °C 下避光超声萃取 20 min。萃取液于 4 °C、10 000 r min⁻¹ 条件下离心 5 min, 取上清液 5 mL 通过已活化的 Captiva EMR-Lipid 净化柱 (6 mL), 收集全部流出液, 氮吹浓缩至 1 mL, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后上机检测。全程低温避光操作。

固相萃取柱活化: 依次用 3 mL 甲醇、3 mL 超纯水活化小柱, 再用 3 mL 0.2% (V/V) 甲酸水溶液平衡, 弃去流出液, 备用。

1.3.2 标准曲线的制作

单一标准储备液: 准确称取各维生素标准品 (固体粉末) 100 mg (精确至 0.1 mg), 分别置于 100 mL 棕色容量瓶中, 其中叶酸先加入 10 mL 5% (V/V) 氨水溶液助溶, 生物素先加 10 mL 50% (V/V) 乙醇水溶液助溶, 其余组分直接加入适量含 0.2% (V/V) 甲酸的 10 mmol L⁻¹ 乙酸铵溶液, 超声助溶完全后, 全部用含 0.2% (V/V) 甲酸的 10 mmol L⁻¹ 乙酸铵溶液定容至刻度, 摇匀, 配制成质量浓度为 1.0 mg mL⁻¹ 的单一标准储备液。储备液于 4 °C 密封避光保存。所有单一标准储备液保存期不超过 1 个月。

混合标准工作液: 临用前, 分别吸取各单标储备液适量, 混合后用含 0.2% (V/V) 甲酸的 10 mmol L⁻¹ 乙酸铵溶液逐级稀释, 配制成系列混合标准工作液。混合标准工作液中, VB₁、VB₂、烟酸、烟酰胺、吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺、生物素浓度范围为 5、10、15、20、50、100、500、1 000 ng mL⁻¹, 泛酸浓度范围为 10、15、20、30、50、100、500、1 000 ng mL⁻¹, 叶酸和 VB₁₂ 浓度范围为 15、20、30、50、100、200、500、1 000 ng mL⁻¹, 各工作溶液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 转移至棕色进样瓶中, 供 LC-MS/MS 分析。

1.3.3 质谱条件

配制 500 ng mL⁻¹ 的标准混合工作溶液, 通过蠕动泵以 10 μL·min⁻¹ 的流速直接注入离子源, 在电喷雾电离正离子模式 (Electrospray Ionization Positive, ESI+) 下, 通过全扫描模式获得 11 种 B 族维生素的母离子参数, 然后分别对 11 种 B 族维生素的母离子进行碎击, 通过产物离子扫描模式寻找各化合物的子离子, 选择 2 个不被干扰、响应高的离子为子离子, 其中最高响应的离子为定量离子, 次高为定性离子, 对于相对分子质量相近的目标物, 再注入单一标准溶液验证离子对特异性。在多反应监测模式 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 下, 分别优化子离子的去簇电压 (Declustering Potential, DP) 和碰撞能量 (Collision Energy, CE), 通过对比不同电压和碰撞能量下的离子丰度选择最佳 DP 和 CE 参数, 最后建立 MRM 采集模式。

其他固定参数: 离子源温度 (Temperature, TEM) 550 °C, 干燥气 (Heating Gas, GS2) 55 psi, 气帘气 (Curtain Gas, CUR) 25 psi, 雾化气 (Nebulizing Gas, GS1) 55 psi, 碰撞气 (Collisionally Activated Dissociation Gas, CAD) 9; 入口电压 (Entrance Potential, EP) 10 V, 碰撞池出口电压 (Collision Cell Exit Potential, CXP) 10 V, 正离子模式下喷雾电压 (IonSpray Voltage, IS) 5.5 kV。

1.3.4 色谱条件

色谱柱: Agilent HILIC Plus (2.1×100 mm, 3.5 μm); 流速: 0.3 mL min⁻¹; 流动相: A 为 0.2% (V/V) 甲酸-10 mmol L⁻¹ 乙酸铵溶液, B 为乙腈; 梯度洗脱程序为: 0~2.5 min, 5%~20% B; 2.5~4.0 min, 20%~40% B; 4.0~4.1 min, 40%~5% B; 4.1~5.0 min, 5% B。进样量: 5 μL; 柱温: 35 °C。

1.3.5 计算结果与表达

$$X = \frac{C \times V \times f}{10 \times m} \quad (1)$$

式中:

X——为样品中目标物的含量, μg/100 g,

C——为试样溶液的质量浓度, ng mL⁻¹;

V——为试样溶液定容体积, mL;

m——为称样量, g;

f ——为样液稀释倍数,未稀释时 $f=1$ 。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留2位有效数字。

1.3.6 数据处理与分析

所有实验均设置三个平行重复,数据以平均值及相对标准偏差(Relative Standard Deviation, RSD)表示,并使用SPSS软件采用单因素方差分析(ANOVA)及Tukey多重比较进行组间显著性分析($P<0.05$)。采用PeakView & Analyst软件进行数据处理、分析,采用Origin软件对数据进行作图。

2 结果与讨论

2.1 仪器条件优化

2.1.1 质谱参数优化结果

采用ESI+模式,MRM模式;优化后的11种B族维生素在MRM模式下的质谱检测参数如表1所示,其中“*”为定量离子,11种B族维生素的一级、二级质谱图见图1、图2。

进一步对11种B族维生素的裂解途径进行分析。在ESI+电离模式下,11种B族维生素主要以质子化后的准分子离子 $[M+H]^+$ 进入碰撞池,经碰撞诱导解离(Collision-Induced Dissociation, CID)后产生特征碎片离子。根据各目标物母离子与子离子质荷比的差异推测可能的裂解途径如图3所示。

总体来看,小分子中性丢失(如 H_2O 、 NH_3 、 CO_2)是主要的初始裂解方式,其次为侧链断裂及官能团脱离;对于含多官能团或大分子结构(如 VB_2 和 VB_{12}),则表现出多通道裂解特征。以 VB_2 为例,在ESI+模式下, VB_2 被 H^+ 质子化生成准分子离子 $[C_{17}H_{21}N_4O_6]^+$ (m/z 377.1),准分子离子在CID过程中首先发生侧链核糖醇部分的裂解,其中侧链H可能通过六元环过渡态向氧迁移并形成新的O-H键,同时诱导侧链C-C键与C-O键协同断裂,核糖醇部分以中性分子 $C_5H_{10}O_4$ (134 Da)形式脱离,生成碎片离子 $[C_{12}H_{11}N_4O_2]^+$ (m/z 243.1,作定量离子),随后, $[C_{12}H_{11}N_4O_2]^+$ 中异咯嗪环可能经分子内H迁移及结构重排诱导环上C-N键断裂,脱去中性分子HNCO(43 Da),生成中间碎片离子 $[C_{11}H_{10}N_3O]^+$ (m/z 200.1), $[C_{11}H_{10}N_3O]^+$ 进一步脱去一分子CO(28 Da),最终生成碎片离子 $[C_{10}H_{10}N_3]^+$ (m/z 172.1,作定性离子)。

其他目标物也表现出与其结构特征相关的裂解行为: VB_1 主要发生亚甲基桥断裂,生成稳定的子结构离子,烟酸和烟酰胺以脱羧反应为主,生成特征吡啶离子,吡哆醇易发生连续脱水反应,吡哆醛和吡哆胺以侧链断裂为主,泛酸和生物素主要发生酰胺键或脲键断裂,叶酸则以谷氨酸侧链断裂为主并保留蝶呤骨架,而 VB_{12} 由于含有金属中心及大环结构,其裂解以配体脱离及侧链逐步断裂为主,产生相对较高 m/z 的碎片离子。上述结果表明,不同维生素的特征碎片离子与其分子骨架密切相关,可为定性分析及多组分高选择性检测方法的建立提供依据。

此外,Wilson等^[24]研究发现 VB_2 光解及气相质谱裂解行为,鉴定出色素、光黄素、甲酰甲基黄素等光解产物及一个核黄素-光色素复合物中间体。Kahoun等^[25]研究发现,烟酸和烟酰胺的前体离子在碰撞后无法产生稳定的产物离子,最终对这两种物质选择SIM选择离子监测模式进行检测。Erşan等^[26]研究发现,ESI+模式下叶酸多聚谷氨酸会发生源内碎裂,经中性丢失谷氨酸残基产生特征碎片离子,通过控制源内CID并结合LC分离,可实现准确定量。

表1 11种维生素质谱检测参数

Table 1 Mass spectrometry detection parameters of 11 vitamins

化合物	分子式	CAS号	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	DP/V	CE/V	电离模式
VB_1	$C_{12}H_{17}ClN_4OS$	59-43-8	265.1	122.2*	59	28	+
				144.1	60	31	
VB_2	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	83-88-5	377.1	243.1*	122	34	+
				172.1	114	54	
烟酸	$C_6H_5NO_2$	59-67-6	124.1	80.1*	84	29	+
				53.1	88	41	
烟酰胺	$C_6H_6N_2O$	98-92-0	123.1	80.6*	84	29	+
				96.2	92	40	

泛酸	$C_9H_{17}NO_5$	79-83-4	220.1	90.1 [*]	67	19	
				202.1	70	17	+
吡哆醇	$C_8H_{11}NO_3$	65-23-6	170.1	152.1 [*]	73	20	+
				134.1	66	30	
吡哆醛	$C_8H_9NO_3$	66-72-8	168.1	150.1 [*]	58	18	+
				94.1	63	33	
吡哆胺	$C_8H_{12}N_2O_2$	85-87-0	169.1	152.4 [*]	58	19	+
				121.1	61	30	
生物素	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	58-85-5	245.1	227.1 [*]	80	23	+
				97.1	84	38	
叶酸	$C_{19}H_{19}N_7O_6$	59-30-3	442.2	295.0 [*]	67	27	+
				176.1	71	54	
VB ₁₂	$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$	68-19-9	678.6	147.1 [*]	25	74	+
				359.1	43	33	

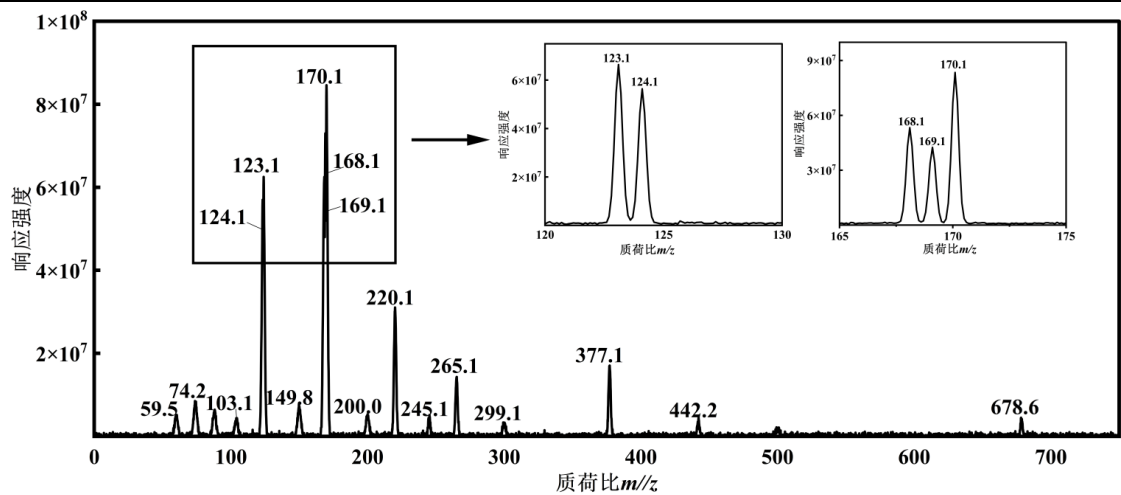


图 1 11 种 B 族维生素一级质谱图

Fig.1 Full-scan mass spectra of 11 B vitamins

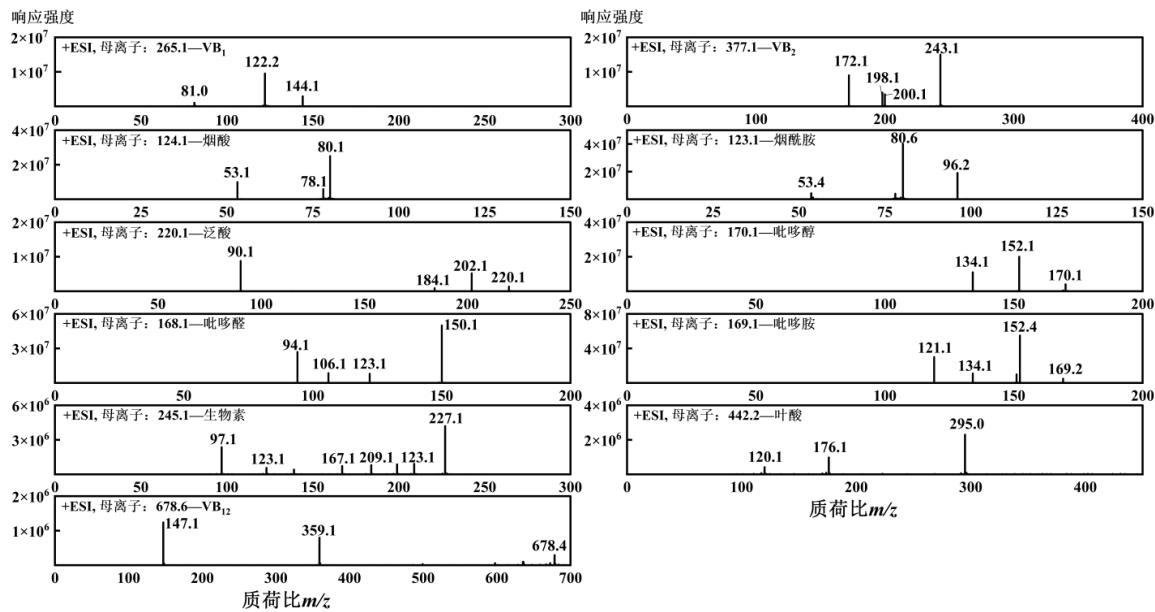


图 2 11 种 B 族维生素二级质谱图

Fig.2 Tandem mass spectra (MS/MS) of 11 B vitamins

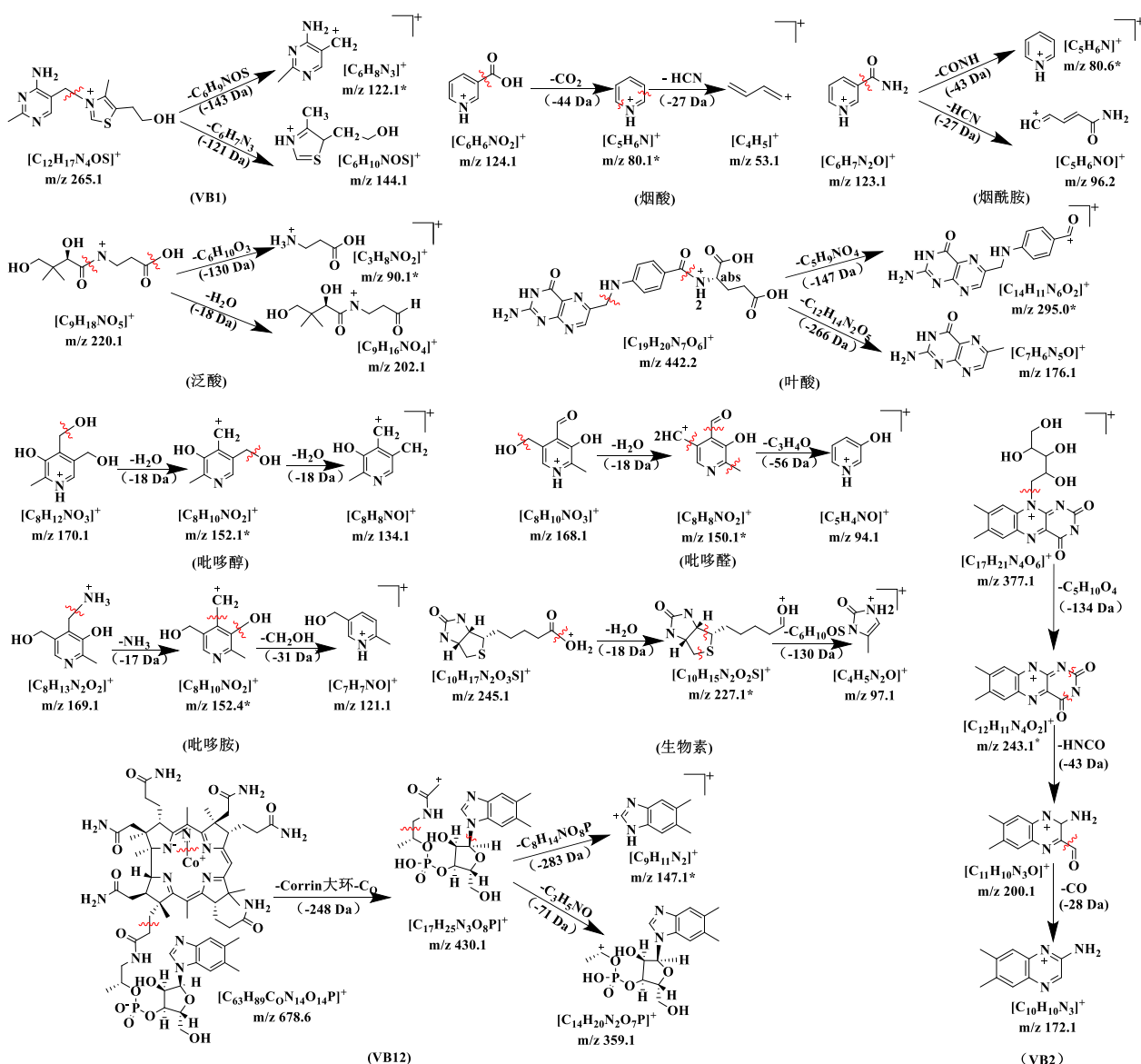


图3 11种B族维生素裂解途径

Fig.3 Fragmentation Pathways of 11 B Vitamins

2.1.2 色谱柱的选择

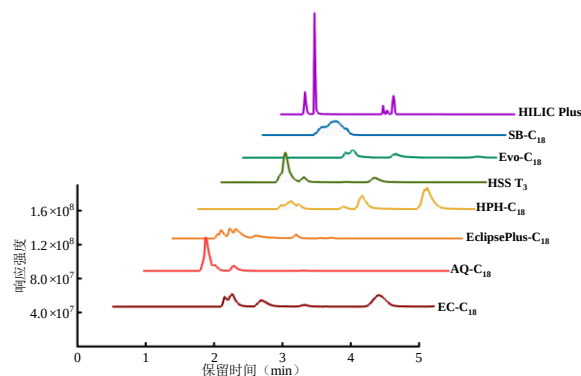


图4 8种色谱柱分离11种维生素的总离子流图

Fig.4 Total ion chromatogram of 8 types of chromatographic columns separating 11 vitamins

试验考察了 HILIC Plus 及 SB-C₁₈、Evo-C₁₈、HSS T₃、HPH-C₁₈、EclipsePlus-C₁₈、AQ-C₁₈ 及 EC-C₁₈ 7 种 C₁₈

类反相色谱柱同时检测 11 种 B 族维生素的分离情况。结果如图 4 所示,在相同的检测参数及洗脱程序下,反相色谱柱对多数目标物保留不足,表现为洗脱速度快、峰型展宽、拖尾、不对称;而 HILIC Plus 色谱柱对 11 种维生素均表现出较好的保留能力和峰形特征,且整体离子响应强度显著高于其他 7 种色谱柱,故选择 HILIC Plus 色谱柱作为 11 种 B 族维生素的分离柱。

此外,Dhale 等^[27]在采用 RP-HPLC 同时分析多种 B 族维生素时,指出由于各维生素极性差异较大,传统反相色谱柱通常需借助离子对试剂才能改善保留与分离效果。但本方法规避了离子对试剂对质谱离子源的污染风险,在无需离子对试剂的条件下,在 5 min 内即可有效保留并分离 11 种 B 族维生素。

2.1.3 流动相的选择

固定有机相为乙腈,试验考察了不同水相对 B 族维生素的分离与响应的影响,结果如图 5 所示。0.2% (V/V) 甲酸-10 mmol L⁻¹ 乙酸铵溶液条件下,各目标物均能获得较完整的色谱峰,峰形较好且响应稳定;0.2% (V/V) 甲酸-10 mmol L⁻¹ 甲酸铵溶液虽对多数化合物具有一定响应,但叶酸未检出;0.01 mol L⁻¹ 磷酸氢二钾溶液条件下,多个组分响应偏低且峰形展宽或拖尾明显,可能由于磷酸盐对电喷雾电离具有显著抑制作用且易污染质谱系统;0.2% (V/V) 甲酸水溶液虽可检出多数化合物,但整体响应和峰形稳定性不及乙酸铵体系。综合考虑灵敏度、峰形及方法稳定性,故选择 0.2% (V/V) 甲酸-10 mmol L⁻¹ 乙酸铵水溶液-乙腈作为最佳流动相体系。

此外,陈美君等^[28]研究发现,在 BEH C₁₈ 色谱柱上,选用 0.1% (V/V) 甲酸溶液作为流动相时各 B 族维生素的分离效果较好。这体现了流动相与色谱柱的适配性,表明在使用 HILIC Plus 色谱柱时,仅以甲酸水溶液作为流动相可能因缓冲能力不足,无法维持稳定的水化层,进而导致峰形和响应的不稳定。

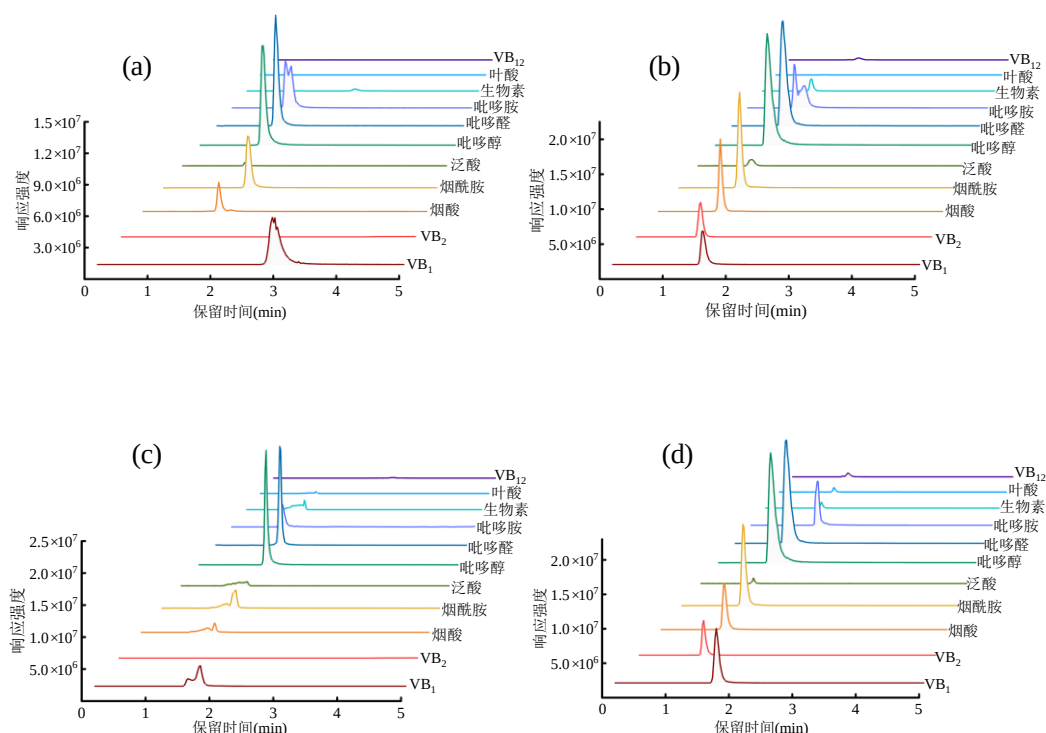


图 5 不同流动相体系各维生素出峰情况

Fig.5 Peak profiles of B vitamins with different mobile phase systems

注:图(a)为 0.2% (V/V) 甲酸水溶液-乙腈; (b) 为 0.2% (V/V) 甲酸-10 mmol L⁻¹ 甲酸铵溶液-乙腈; (c) 为 10 mmol L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液-乙腈; (d) 为 0.2% (V/V) 甲酸-10 mmol L⁻¹ 乙酸铵溶液-乙腈。

2.2 前处理条件优化

2.2.1 酶解体系优化

由表 2 可知,与对照组相比,各单酶体系(木瓜蛋白酶、酸性磷酸酶)均能不同程度提高猪肉中 11 种 B 族

维生素检测值,说明酶解处理有助于打破基质结构、促进结合态维生素的释放。复合酶体系在此基础上则呈现出协同增效的作用,各类维生素含量均达到最高水平,例如 VB₁、烟酰胺及吡哆醛等均显著高于单酶体系,分别为 581.55、4 856.74、428.35 μg/100 g。故选择复合酶作为最优酶解体系。

此外, Cao 等^[29]研究发现,若仅使用简单溶剂提取,小麦籽粒中 7 种结合态 B 族维生素的释放效率有限,必须在提取过程中采用多酶处理才能得以充分释放。而本试验结果印证了猪肉基质中存在相当比例的结合态维生素,表明多酶协同可同时作用于蛋白结合、磷酸酯键及其他结合形式,提高整体释放效率。

表 2 不同酶解体系下 11 种维生素检测平均值 (μg/100 g)

Table 2 Contents of 11 vitamins under different enzymatic hydrolysis systems (μg/100 g)								
化合物/检测值	对照组	RSD/%	木瓜蛋白酶	RSD/%	酸性磷酸酶	RSD/%	复合酶	RSD/%
VB ₁	302.76	4.32	483.16	2.56	414.67	3.73	581.55	3.55
VB ₂	129.84	3.65	175.83	3.02	181.84	2.37	211.76	3.67
烟酸	1 071.98	2.73	1 496.93	3.74	1 303.67	3.66	1 784.03	2.40
烟酰胺	3 136.32	4.09	4 436.72	3.24	4 062.04	2.94	4 856.74	2.62
泛酸	159.82	2.49	192.73	3.67	189.67	2.59	232.43	2.84
吡哆醇	53.52	4.15	78.04	2.73	104.92	4.39	127.01	2.56
吡哆醛	231.74	2.92	326.41	4.52	384.67	3.92	428.35	3.95
吡哆胺	107.84	4.14	143.89	2.87	182.35	3.87	208.52	2.71
生物素	13.87	2.43	22.26	3.45	16.39	3.11	23.70	2.90
叶酸	27.57	3.28	31.64	2.24	28.65	3.06	35.76	4.43
VB ₁₂	1.89	2.81	3.05	2.84	2.47	2.93	3.37	3.27

2.2.2 酶用量优化

在酶解体系确定的基础上,固定酸性磷酸酶用量为 100 U g⁻¹样品,考察不同木瓜蛋白酶用量对猪肉中 11 种 B 族维生素检测值的影响。由表 3 可知,随着木瓜蛋白酶用量由 50 U g⁻¹增至 200 U g⁻¹,各维生素检测值总体升高,其中生物素检测值上升幅度最大,从 14.63 μg/100 g 提高至 22.50 μg/100 g,其次为吡哆胺、VB₁、VB₁₂,检测值分别由 155.16、414.39、2.23 μg/100 g 增至 222.82、593.86、3.16 μg/100 g。当酶活力继续由 200 U g⁻¹增大至 400 U g⁻¹时,多数维生素检测值增长幅度放缓,VB₁、烟酸、吡哆醇仍保持小幅上升,分别达到峰值 605.67、1 890.06、125.69 μg/100 g;而 VB₂、烟酰胺、泛酸、吡哆醛、吡哆胺、生物素、叶酸及 VB₁₂ 均出现不同程度回落。酶用量进一步提高至 800 U g⁻¹后,11 种维生素检测值均下降,可能与过度酶解导致基质干扰增强或部分维生素稳定性降低有关。综合考虑检测效果与经济性,选择木瓜蛋白酶最适用量为 200 U g⁻¹。

此外,赵佳伟等^[30]发现不同来源的高峰淀粉酶对饮料中的 VB₂ 测定结果影响显著,实测值与理论值的最大差异可超过 10 倍,因此根据特定的样品基质优化酶用量参数至关重要。本试验观察到木瓜蛋白酶用量由 50 U g⁻¹增至 200 U g⁻¹时,各维生素检测值总体升高,而继续增加至 400 U g⁻¹或 800 U g⁻¹时,多数维生素检测值出现不同程度回落。这一“先升后降”的变化规律表明,酶用量并非越高越好,存在一个最优区间。该现象在现有文献中较少被系统报道。

表 3 不同木瓜蛋白酶用量下 11 种维生素检测平均值 (μg/100 g)

Table 3 Average detected values of 11 vitamins under different papain dosages (μg/100 g)										
化合物/检测值	50 U g ⁻¹ 样品	RSD/%	100 U g ⁻¹ 样品	RSD/%	200 U g ⁻¹ 样品	RSD/%	400 U g ⁻¹ 样品	RSD/%	800 U g ⁻¹ 样品	RSD/%
VB ₁	414.39	2.81	537.80	3.98	593.86	2.75	605.67	3.46	587.13	2.40
VB ₂	164.73	3.22	191.95	3.41	224.53	2.43	216.34	4.16	209.08	3.27
烟酸	1 480.95	2.89	1 640.04	3.11	1 872.42	2.23	1 890.06	2.93	1 774.25	3.92
烟酰胺	3 955.41	2.33	4 407.67	2.05	4 693.01	3.49	4 552.22	3.32	3 775.35	2.57
泛酸	182.52	2.76	221.09	2.36	242.13	2.32	216.32	3.67	195.81	2.13
吡哆醇	90.65	3.24	106.73	3.79	118.68	2.88	125.69	3.15	114.69	3.86
吡哆醛	348.15	2.69	394.29	3.98	445.78	2.93	428.4	2.79	417.85	4.32
吡哆胺	155.16	3.11	187.7	4.92	222.82	3.97	205.9	3.14	182.94	2.76

化合物/检测值	50 U g ⁻¹ 样品	RSD/%	100 U g ⁻¹ 样品	RSD/%	200 U g ⁻¹ 样品	RSD/%	400 U g ⁻¹ 样品	RSD/%	800 U g ⁻¹ 样品	RSD/%
生物素	14.63	3.67	18.43	2.84	22.50	4.51	21.09	3.82	20.57	2.32
叶酸	31.12	3.02	34.98	3.25	36.16	2.55	30.83	4.25	27.52	3.53
VB ₁₂	2.23	3.48	2.83	3.60	3.16	3.42	2.62	2.75	2.39	2.66

2.2.3 酶解 pH 值优化

在酶解体系、酶用量确定的基础上，考察酶解 pH 值为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5 时猪肉中 11 种 B 族维生素的检测值。由表 4 可知，多数维生素在 pH 值 5.5 条件下达到较高水平，其中 VB₁、烟酸、泛酸、吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺、生物素及 VB₁₂ 的测定值分别为 587.43、1 822.68、236.59、150.18、514.95、251.72、22.84、2.81 μg/100 g；VB₂、烟酰胺在 pH 值 6.0 时检测值较高，分别为 215.21、4 861.11 μg/100 g；叶酸在 pH 值 5.0 时表现较优，检测值为 37.81 μg/100 g。综合考虑多组分检测结果及酶活性适宜范围，选择 pH 值 5.5 作为酶解最优条件。

此外，Bajaj 等^[31]研究不同 pH 值对 VB₁₂ 的降解动力学时发现，偏酸性环境（pH 值 4.0）与中性环境（pH 值 6.0）时 VB₁₂ 的稳定性显著降低。酶解 pH 值过低或过高时，部分维生素检测值略有下降，可能与酶活性受抑或部分维生素稳定性降低有关。

表 4 不同酶解 pH 值下 11 种维生素检测平均值（μg/100 g）

Table 4 Average values of 11 vitamins at different enzymatic hydrolysis pH (μg/100 g)										
化合物/测定值	pH 值 4.5	RSD/%	pH 值 5.0	RSD/%	pH 值 5.5	RSD/%	pH 值 6.0	RSD/%	pH 值 6.5	RSD/%
VB ₁	575.02	2.55	579.21	3.14	587.43	3.45	583.64	2.26	570.49	2.96
VB ₂	205.77	3.97	209.88	2.23	213.76	2.87	215.21	3.63	209.83	3.33
烟酸	1 779.54	2.82	1 790.40	3.78	1 822.68	3.51	1 813.06	2.50	1 802.72	2.57
烟酰胺	4 827.38	3.42	4 840.16	2.77	4 854.53	3.20	4 861.11	2.15	4 838.55	3.82
泛酸	211.54	3.26	224.58	2.59	236.59	2.74	226.74	3.33	204.18	3.88
吡哆醇	124.09	3.18	143.79	3.67	150.18	3.46	141.43	2.97	136.14	3.12
吡哆醛	501.74	2.14	511.28	3.04	514.95	3.63	503.42	4.33	492.39	3.24
吡哆胺	215.43	3.78	237.57	2.14	251.72	2.67	240.36	3.56	229.57	3.35
生物素	17.69	2.92	21.50	3.62	22.84	4.12	19.36	2.72	16.09	2.71
叶酸	32.69	2.38	37.81	2.67	36.59	3.21	30.35	4.57	27.58	2.91
VB ₁₂	2.21	3.30	2.57	3.21	2.81	2.81	2.39	3.34	1.91	2.42

2.2.4 提取溶剂的选择

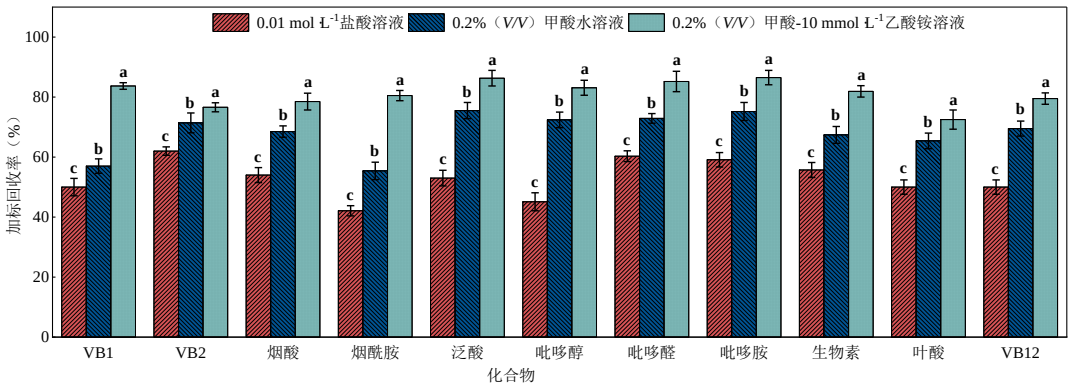


图 6 不同提取溶剂各维生素加标回收率（%）

Fig.6 Spiked recovery rates (%) of vitamins with different extraction solvents

注：同一维生素下，不同小写字母（a、b、c）表示组间差异显著（ $P<0.05$ ），相同字母表示差异不显著（ $P\geq0.05$ ）。下图同。

基于 B 族维生素在弱酸性条件下稳定性较好的特性^[32]，试验考察 0.01 mol L⁻¹ 盐酸溶液、0.2%（V/V）甲酸水溶液、0.2%（V/V）甲酸-10 mmol L⁻¹ 乙酸铵溶液作为提取溶剂时对 11 种 B 族维生素加标回收率的影响。结果如图 6 所示，根据 GB/T 27404-2026《实验室质量控制规范 食品理化检测》^[33]回收率（60%~120%）的要求，0.01 mol L⁻¹ 盐酸溶液不适合作为 B 族维生素的提取溶剂，0.2%（V/V）甲酸水溶液对 VB₁ 和烟酰胺的加标回收率低于 60%，

也不符合要求, 0.2% (V/V) 甲酸-10 mmol L⁻¹ 乙酸铵溶液的提取效果最优, 各目标物加标回收率中 VB₁ 为 83.7%, VB₂ 为 76.6%, 烟酸为 78.5%, 烟酰胺为 80.5%, 泛酸为 86.3%, 吡哆醇为 83.1%, 吡哆醛为 85.2%, 吡哆胺为 86.5%, 生物素为 81.9%, 叶酸为 72.5%, VB₁₂ 为 79.5%。故选用 0.2% (V/V) 甲酸-10 mmol L⁻¹ 乙酸铵溶液作为提取溶剂。

此外, Hassan 等^[34]在果汁基质中采用甲酸铵缓冲体系实现了 9 种 B 族维生素的高通量常规质控分析, 其基质效应引起的比例偏差控制在 80%~115%之间, 而本试验采用乙酸铵缓冲体系实现了 11 种 B 族维生素的检测分析, 表明缓冲体系在 B 族维生素多组分同时分析中具有良好的适用性。

2.2.5 提取溶剂 pH 值优化

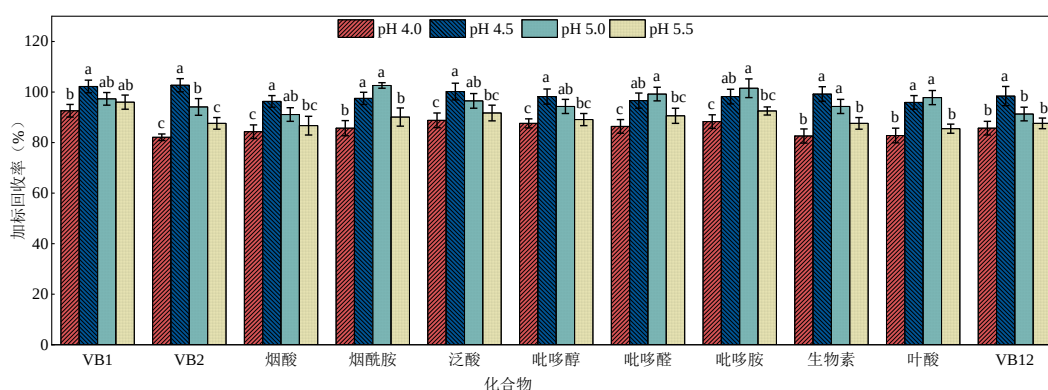


图 7 不同提取溶剂 pH 值各维生素加标回收率 (%)

Fig.7 Spiked recoveries (%) of B vitamins at different pH values of extraction solvents

在选用 0.2% (V/V) 甲酸-10 mmol L⁻¹ 乙酸铵溶液 (pH 值约为 3.0) 作为提取溶剂的基础上, 通过调节甲酸添加量对提取溶剂的 pH 值进行优化, 考察 pH 值 4.0、4.5、5.0、5.5 时各目标物的加标回收率。结果如图 7 所示, pH 4.5 条件下多数目标物回收率处于较高水平, 如 VB₁、VB₂ 及泛酸分别达到 102.2%、102.7%和 100.2%, 烟酸、生物素及 VB₁₂ 也分别达到 96.3%、99.2%和 98.4%; 而烟酰胺和吡哆胺在 pH 值 5.0 时达到最高值, 分别为 102.6% 和 101.5%。比较而言, pH 值 4.0 和 pH 值 5.5 条件下各化合物回收率普遍偏低, 其中 VB₂ 和叶酸在 pH 值 4.0 时仅为 82.1%和 82.8%。此外, 李婕筠^[35]以 0.05 mol L⁻¹ 醋酸钠溶液 (pH 值 4.5) 作为提取介质, 提取小麦中的 VB₁ 和 VB₂, 而本试验拓展至 11 种 B 族维生素的提取, 综合考虑回收率水平及稳定性, 选择 pH 值 4.5 为 10 mmol L⁻¹ 乙酸铵溶液提取的最佳 pH 条件。

2.2.6 固相萃取小柱的选择

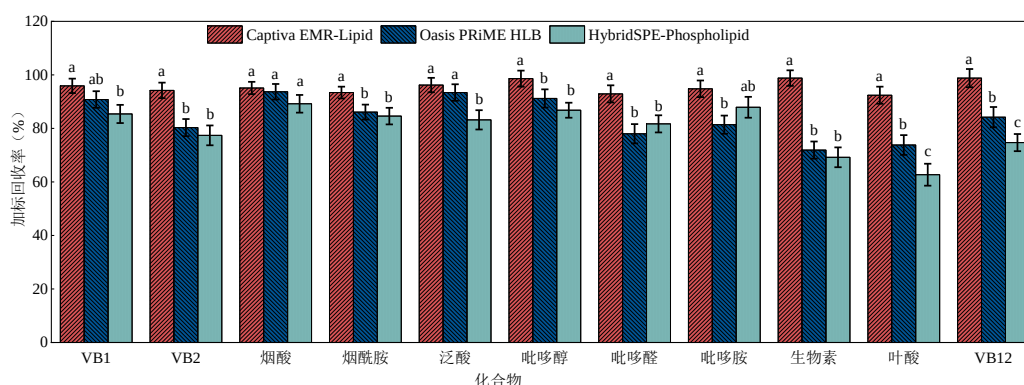


图 8 不同固相萃取小柱对各维生素加标回收率的影响 (%)

Fig.8 Effects of different solid-phase extraction cartridges on spiked recoveries of B vitamins (%)

EMR-Lipid、HLB 与 HybridSPE-Phospholipid 是目前肉类样品前处理中广泛用于去除脂质和磷脂基质干扰的主流固相萃取技术, 但现有方法在肉类基质中 B 族维生素同时测定时的适用性缺乏系统比较。如图 8 所示, 从加标回收率和精密度结果来看, Captiva EMR-Lipid 小柱整体表现最优, 各目标物回收率在 90%~100%之间, RSD 值均小于 3.5%。比较而言, Oasis PRiME HLB 对部分维生素如生物素、叶酸等存在明显损失, 回收率最低仅为 71.9%; HybridSPE-Phospholipid 的回收率整体偏低, 其中叶酸和生物素的回收率分别仅为 62.7%和 69.2%, 说明该方法在

多组分维生素分析中存在较大的局限性。综合比较三种方法, Captiva EMR-Lipid 固相萃取小柱在回收率和稳定性方面均具有明显优势, 更适合用于肉类基质中 11 种 B 维生素的前处理净化。

与此同时, Muz 等^[36]比较了脂质去除柱 (EMR-Lipid 和 HLB 柱) 与冷冻脱脂法对三文鱼和猪肉总提取物的净化效果, 结果表明 EMR-Lipid 小柱能有效降低分析生物样本时脂质共提物的干扰; Wang 等^[37]比较了不同净化技术对猪肉组织中磺胺类兽药残留分析的影响, 结果表明 EMR-Lipid 和 HLB 柱的基质效应显著低于传统 n-己烷液液萃取法, 表明其脂质去除效果更好。

2.3 线性关系和检出限

由表 5 可知, 各目标物在相应浓度范围内均表现出良好的线性关系 ($R^2>0.999\ 0$), 其中多数维生素线性范围为 5~1 000 ng mL⁻¹, 泛酸为 10~1 000 ng mL⁻¹, 叶酸和 VB₁₂ 为 15~1 000 ng mL⁻¹。

参照 GB 5009.295-2023《食品安全国家标准 化学分析方法验证通则》^[38]检出限和定量限估算方法, 采用标准溶液逐级稀释法与信噪比 (S/N) 法相结合确定方法检出限 (S/N≥3) 和定量限 (S/N≥10)。方法检出限为 0.1~2.8 μg·kg⁻¹, 定量限为 0.5~9.8 μg·kg⁻¹。其中吡哆醇、吡哆醛和吡哆胺检出限较低 (0.1 μg·kg⁻¹), VB₁₂ 和叶酸相对较高, 可能与其离子化效率及基质干扰程度有关。

表 5 11 种维生素的线性范围及检出限

Table 5 Linear ranges and limits of detection of 11 vitamins							
化合物	线性范围/(ng mL ⁻¹)	线性回归方程	R ²	检出限/(μg·kg ⁻¹)	定量限/(μg·kg ⁻¹)	RSD (LOD) /%	RSD (LOQ) /%
VB ₁	5~1 000	y=8.225 7e4x-3 251.513 6	0.999 14	0.5	1.7	2.3	2.8
VB ₂	5~1 000	y=4.544 95e4x-4 805.736 67	0.999 03	1.0	3.5	2.7	2.1
烟酸	5~1 000	y=7.187 6e4x-2 514.616 2	0.999 11	1.5	5.0	1.9	2.5
烟酰胺	5~1 000	y=1.524 7e5x+3 784.374 6	0.999 07	0.8	2.8	3.0	2.5
泛酸	10~1 000	y=1.024 8e4x-1 880.026 1	0.999 15	1.5	5.0	3.1	2.8
吡哆醇	5~1 000	y=2.173 1e5x+3 172.896 0	0.999 45	0.1	0.5	2.0	2.6
吡哆醛	5~1 000	y=2.417 1e5x+3 058.305 8	0.999 12	0.1	0.5	2.2	2.0
吡哆胺	5~1 000	y=1.430 0e5x+2 271.163 4	0.999 17	0.1	0.5	2.1	2.6
生物素	5~1 000	y=4.330 9e4x-4 439.128 0	0.999 08	1.4	4.8	2.4	2.8
叶酸	15~1 000	y=8 696.613 8x+3 304.336 4	0.999 11	2.2	7.6	2.9	3.1
VB ₁₂	15~1 000	y=9 756.829 9x-1 103.472 1	0.999 20	2.8	9.8	3.3	2.4

2.4 精密度和加标回收率

选取猪肉、牛肉、鱼肉 3 种样品, 在各目标物低、中、高 (1、3、6 倍定量限) 3 个加标水平下进行加标回收试验 (n=3), 由表 6 可知, 11 种维生素在三种基质中的平均加标回收率为 85.72%~107.17%, RSD 值为 1.13%~6.56%, 均符合 GB/T 27404-2026^[33]对回收率 (60%~120%) 和精密度 (≤15%) 的要求, 表明方法具有良好的准确度和精密度。从不同加标水平来看, 各化合物回收率随加标量变化波动较小, 表明方法在较宽浓度范围内具有良好的稳定性。不同基质间比较发现, 鱼肉基质中部分化合物 (如 VB₂、吡哆醛) 回收率略高, 而牛肉基质中个别指标回收率略低, 但整体差异较小, 说明该方法具有较好的基质适用性。可满足实际样品中多种 B 族维生素的定量分析要求。

表 6 回收率及相对标准偏差

Table 6 Recoveries and relative standard deviations (n=3)							
化合物	加标量/(μg·kg ⁻¹)	平均回收率/%			RSD/%		
		猪肉	牛肉	鱼肉	猪肉	牛肉	鱼肉
VB ₁	2	86.97	85.72	94.23	4.12	5.74	4.86
	5	93.11	92.24	102.18	2.87	3.23	4.43
	10	97.89	88.18	97.69	3.48	3.17	3.63
VB ₂	4	88.32	89.90	106.96	4.41	5.14	4.22

现代食品科技	Modern Food Science and Technology					2027, Vol.43, No.7	
	10	92.64	87.53	102.72	4.24	5.52	3.94
	21	98.68	90.56	95.25	2.55	3.43	2.80
烟酸	5	88.25	91.34	104.36	6.31	3.94	5.77
	15	94.76	97.82	94.24	4.99	4.13	4.25
	30	97.43	98.23	97.83	3.33	2.37	4.54
烟酰胺	3	93.29	86.34	89.45	3.95	3.72	5.27
	8	93.98	91.59	96.22	4.76	3.34	3.71
	17	104.28	95.78	94.89	3.40	4.56	3.95
泛酸	5	94.54	89.84	93.65	5.43	6.21	4.35
	15	87.32	91.35	90.31	5.62	3.32	3.57
	30	89.61	94.36	98.56	3.86	2.86	3.42
吡哆醇	0.5	93.35	92.82	102.48	4.58	3.62	3.37
	1.5	97.39	93.17	98.23	5.11	2.48	3.46
	3	105.72	90.63	99.53	1.35	1.89	2.74
吡哆醛	0.5	94.76	103.33	96.39	5.22	1.54	2.17
	1.5	95.63	93.20	105.73	4.23	3.94	1.13
	3	97.69	94.64	107.17	4.85	2.53	3.26
吡哆胺	0.5	92.87	88.34	98.42	5.98	4.26	2.63
	1.5	98.44	91.52	95.21	3.17	2.84	3.57
	3	99.65	93.77	95.79	3.56	2.56	3.32
生物素	5	86.83	88.62	90.97	3.10	3.11	3.91
	14	93.94	89.41	93.23	4.33	3.71	2.61
	29	90.12	92.85	95.75	5.91	1.65	2.49
叶酸	8	91.42	87.48	100.23	3.62	3.33	6.56
	23	89.56	89.54	97.52	4.13	3.96	2.75
	46	96.84	94.15	98.36	2.68	3.17	3.25
VB ₁₂	10	93.25	89.29	94.78	5.26	4.34	4.13
	29	98.38	93.03	87.42	1.74	3.46	3.57
	59	99.77	94.82	92.18	3.62	2.52	4.17

2.5 基质效应评估

采用标准加入法^[39]，分别在待测的猪肉、牛肉、鱼肉样品提取液中加入系列浓度的标准溶液，配制成 15、20、30、50、100、200、500、1 000 ng mL⁻¹的标准加入工作液，同时用含 0.2%（V/V）甲酸的 10 mmol L⁻¹乙酸铵溶液配制相同浓度梯度的溶剂标准工作液。以目标物的质量浓度为横坐标，定量离子对的响应值为纵坐标绘制纯溶剂标准曲线和标准加入曲线，得到线性方程和相关系数。

比较纯溶剂标准曲线斜率与标准加入曲线的斜率，计算基质效应（Matrix Effect，ME）^[40]。

$$Q=\left(\frac{A}{B}-1\right)\times100\%$$

(2)

式中：
Q——为基质效应 ME，%；
A——为标准加入曲线的斜率；
B——为溶剂标准曲线的斜率。

若-20%<ME<20%，认为基质干扰较弱；若 ME≤-20%或 ME≥20%，表示基质干扰较强。
结果如图 9 所示，11 种 B 族维生素在猪肉、牛肉、鱼肉中的 ME 范围为 2.38%~18.47%，均处于基质干扰较

弱水平。但不同基质之间表现出一定差异：VB₁、烟酸、吡哆醇及吡哆醛在鱼肉基质中的 ME 值相对较高，而猪肉与牛肉基质间差异较小；烟酰胺、吡哆胺、生物素及叶酸在三种基质中的变化幅度较小，表现出较好的基质适应性；此外，VB₁₂ 在不同基质中的差异较为明显，其在牛肉中的 ME 显著低于猪肉和鱼肉，表明不同基质组成对维生素的离子化过程具有一定影响。

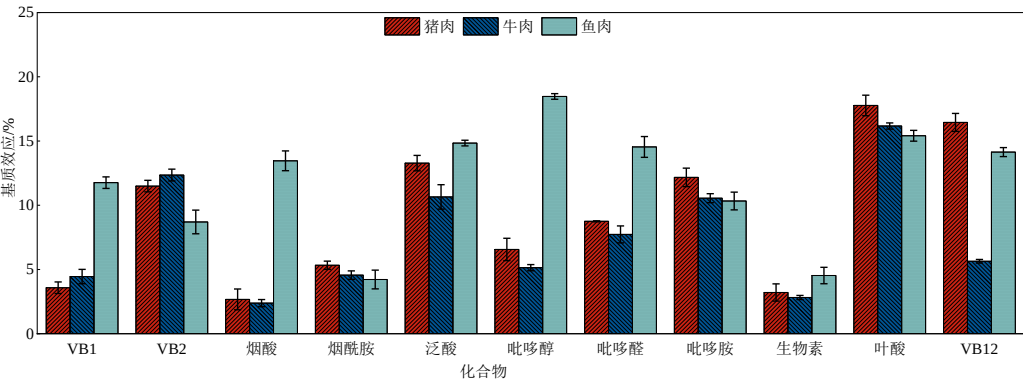


图 9 11 种 B 族维生素在猪肉、牛肉、鱼肉中的基质效应 (%)

Fig.9 Matrix effect of 11 B vitamins in pork, beef and fish (%)

2.6 实际样品检测

在农贸市场、商超等流通渠道采集了 30 批次样品进行检测，每批次样品均进行三水平加标试验和三平行试验。检测时，按照 1.3.1 所述前处理方法处理样品，对于预估含量较高的样品，使用 0.2% (V/V) 甲酸-10 mmol L⁻¹ 乙酸铵溶液进行适当稀释，使进样浓度控制在 5~1 000 ng mL⁻¹ 线性范围内。每个样品均在其线性范围内完成检测，并据此计算样品中维生素的实际含量。

结果由表 7 至表 9 可知，30 批次不同品种的猪肉、牛肉和鱼肉中均检测出 11 种 B 族维生素。此外，各样品中未检出明显干扰峰，保留时间 RSD<0.5%，加标回收率均在 85%~110% 范围内，加标回收率 RSD<10%，说明该方法在不同复杂基质中具有较好的精密度。

从检测结果来看，不同肉类样品中 B 族维生素含量存在一定差异，其中猪肉中 VB₁、烟酸及烟酰胺含量相对较高，牛肉中泛酸、吡哆胺及叶酸含量较为丰富，鱼肉中 VB₁₂ 含量相对较高。上述结果与已有文献报道的肉类食品中 B 族维生素分布规律基本一致^[41]，表明本方法检测结果具有良好的可靠性。

综上，该方法适用于猪肉、牛肉及鱼肉等多种肉类食品中 B 族维生素的同时测定，具有良好的实际应用价值。

表 7 不同品种猪肉中 11 种 B 族维生素含量平均值 (μg/100 g)

Table 7 Average Contents of 11 B Vitamins in Different Varieties of Pork (μg/100 g)											
品种	VB ₁	VB ₂	烟酸	烟酰胺	泛酸	吡哆醇	吡哆醛	吡哆胺	生物素	叶酸	VB ₁₂
1 号	487.24	218.22	2 653.18	4 602.64	274.61	103.73	421.73	202.40	22.93	22.57	2.19
2 号	793.39	271.38	1 767.19	4 686.02	321.37	193.27	190.26	121.63	31.99	40.35	4.26
3 号	512.71	235.77	2 205.64	5 223.83	156.52	206.98	269.90	218.20	12.55	31.23	3.13
4 号	739.13	311.51	1 786.39	3 411.94	230.05	142.29	427.00	170.52	24.13	35.64	3.58
5 号	635.86	195.26	1 710.28	4 970.17	241.69	97.89	142.54	198.14	30.28	43.95	1.48
6 号	422.72	255.49	1 378.44	5 887.65	452.94	156.23	277.61	92.40	16.93	27.56	1.25
7 号	579.56	276.46	1 973.07	3 905.68	277.11	246.55	220.02	139.97	25.29	38.44	3.43
8 号	590.25	341.95	2 482.88	5 405.22	429.45	117.27	368.56	245.94	11.56	26.12	4.65
9 号	603.29	191.60	2 859.26	3 869.57	198.21	132.70	229.03	162.57	15.96	10.73	4.11
10 号	584.77	201.42	1 267.65	4 363.96	372.83	205.38	139.08	225.64	13.89	41.68	2.82

表 8 不同品种牛肉中 11 种 B 族维生素含量平均值 (μ g/100 g)

Table 8 Average Contents of 11 B Vitamins in Different Varieties of Beef (μg/100 g)

品种	VB ₁	VB ₂	烟酸	烟酰胺	泛酸	吡哆醇	吡哆醛	吡哆胺	生物素	叶酸	VB ₁₂
1 号	96.63	146.73	908.64	2 418.94	315.34	140.97	261.83	244.99	23.68	60.33	2.81
2 号	92.97	86.56	1 191.85	3 332.12	187.28	156.64	557.21	198.32	10.72	53.38	1.86
3 号	135.76	42.73	802.89	3 209.15	255.89	280.99	377.46	187.02	12.21	24.86	1.24
4 号	72.34	163.61	685.75	3 381.47	438.62	128.94	565.71	131.09	29.87	36.52	4.42
5 号	159.63	61.47	1 424.42	2 950.19	317.22	242.13	163.71	178.64	22.95	68.20	3.53
6 号	75.17	79.25	1 408.26	2 633.82	149.58	102.06	202.67	304.02	26.13	47.91	4.91
7 号	83.82	123.89	1 226.63	2 103.13	247.91	205.61	573.51	262.22	12.25	32.31	2.33
8 号	61.53	80.97	608.98	2 369.26	271.34	236.76	466.01	185.64	25.34	39.78	4.55
9 号	114.77	91.32	1 170.79	2 698.87	363.75	87.35	288.74	259.99	31.10	45.64	2.16
10 号	58.25	94.60	878.08	2 544.46	329.30	201.35	511.79	210.03	13.75	32.46	1.58

表 9 不同品种鱼肉中 11 种 B 族维生素含量平均值 (μ g/100 g)

Table 9 Average Contents of 11 B Vitamins in Different Varieties of Fish (μg/100 g)

品种	VB ₁	VB ₂	烟酸	烟酰胺	泛酸	吡哆醇	吡哆醛	吡哆胺	生物素	叶酸	VB ₁₂
1 号	26.84	133.80	381.23	1 990.71	69.56	119.82	152.62	111.37	19.85	12.16	4.28
2 号	23.26	262.04	206.68	3 093.12	49.34	73.28	224.18	78.81	23.14	38.83	3.61
3 号	39.98	130.62	169.74	1 938.49	60.82	69.48	140.14	73.75	15.33	26.89	1.99
4 号	17.13	173.24	305.26	2 020.21	62.75	64.94	292.93	52.81	26.53	20.32	7.15
5 号	28.30	187.86	370.96	2 347.64	76.45	87.29	158.35	86.55	33.53	33.23	1.92
6 号	19.34	125.12	390.17	2 522.13	72.05	76.97	201.79	96.17	8.76	47.80	2.65
7 号	15.97	211.86	326.69	1 625.08	59.12	80.14	189.71	101.98	12.81	37.94	3.52
8 号	21.43	252.07	453.14	2 070.49	72.81	72.83	124.88	73.73	16.17	44.88	3.72
9 号	15.32	119.27	329.61	1 405.76	78.59	75.82	169.96	88.93	34.08	49.61	2.41
10 号	32.58	137.25	315.32	1 979.70	82.44	63.21	139.52	63.87	7.21	29.43	4.63

2.7 方法对比分析

2.7.1 实际样品对比试验

选取猪肉、牛肉、鱼肉各 1 批次（共 3 批次）代表性实际样品，分别采用优化后的 LC-MS/MS 法与各指标现行国家标准方法进行平行测定（ $n=3$ ）。其中 VB₁ 采用 GB 5009.84-2016 第一法（HPLC 法）^[16]、VB₂ 采用 GB 5009.85-2016 第一法（HPLC 法）^[17]、泛酸采用 GB 5009.210-2023 第二法（LC-MS/MS 法）^[19]、吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺采用 GB 5009.154-2023 第一法（LC-MS/MS 法）^[20]、VB₁₂ 采用 GB5009.285-2022 第二法（LC-MS/MS 法）^[23]。

由表 10 可知，两种方法在猪肉、牛肉、鱼肉三种基质中的测定结果相对偏差为-7.57%~+8.63%，满足 GB/T 27404-2026《实验室质量控制规范 食品理化检测》^[33]对方法比对验证的要求（±10%以内）。表明优化后的 LC-MS/MS 方法在保证准确性的前提下，可实现多组分同步测定。

表 10 不同方法样品含量的测定平均值 (μ g/100 g)

Table 10 Average Determination Contents of Samples by Different Methods (μg/100 g)

品种	检测方法	VB ₁	VB ₂	泛酸	吡哆醇	吡哆醛	吡哆胺	VB ₁₂
猪肉	本方法	487.24	218.22	274.61	103.73	421.73	202.40	2.19
	国标方法	469.52	221.04	282.15	108.36	433.56	215.69	2.35
	偏差/%	+3.77	-1.28	-2.67	-4.27	-2.73	-6.16	-6.81
牛肉	本方法	96.63	146.73	315.34	140.97	261.83	244.99	2.81
	国标方法	93.14	138.26	326.87	152.07	248.01	250.48	3.04

现代食品科技		Modern Food Science and Technology						2027, Vol.43, No.7
	偏差/%	+3.75	+6.13	-3.53	-7.30	+5.57	-2.19	-7.57
	本方法	26.84	133.80	69.56	119.82	152.62	111.37	4.28
鱼肉	国标方法	28.67	125.42	66.23	128.54	141.38	103.24	3.94
	偏差/%	-6.38	+6.68	+5.03	-6.78	+7.95	+7.87	+8.63

2.7.2 方法关键性能对比

如表 11 所示，与现行国家标准方法相比，在检测通量方面，优化后的方法单次进样（5 min）可同步测定 11 种 B 族维生素，而国标方法需参照多项标准逐一测定，累计分析时间显著增加。在灵敏度方面，优化后的方法检出限（0.1~2.8 μg·kg⁻¹）和定量限（0.5~9.8 μg·kg⁻¹）整体优于国标方法，其中泛酸检出限较 GB 5009.210-2023^[19]降低约 167 倍，VB₁ 和 VB₂ 检出限分别为 GB 5009.84-2016^[16]和 GB 5009.85-2016^[17]的 1/20 和 1/5。然而，GB 5009.285-2022（VB₁₂）^[23]采用免疫亲和柱净化，检出限（0.5 μg·kg⁻¹）优于本方法（2.8 μg·kg⁻¹），表明针对单一目标物的特异性富集方法在痕量检测中仍具优势。

在准确度和精密度方面，优化后的方法加标回收率为 85.72%~107.17%，RSD 为 1.13%~6.56%，均满足或优于国标方法要求（回收率 80%~110%，RSD<10%~20%）。因此，本论文建立的方法以前处理高效、多组分同步分析为优势，显著提升了检测效率和灵敏度。

表 11 方法与各类国标方法的关键性能对比

Table 11 Comparison of key performance parameters between the proposed method and various national standard methods

方法	检测对象	前处理	仪器方法	LOD/(μg·kg ⁻¹)	LOQ/(μg·kg ⁻¹)	加标回收率/%	RSD 值/%	分析时间/min
本方法	11 种	酶解+酸性缓冲溶液提取	LC-MS/MS	0.1~2.8	0.5~9.8	85~107	1~6	5
GB 5009.210-2023	泛酸	水解+酶解+甲苯萃取	LC-MS/MS	250	500	80~110	<10	12
GB 5009.154-2023	VB ₆ （吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺）	酸水解+酶解	LC-MS/MS	吡哆醇 30 吡哆醛 30 吡哆胺 30	吡哆醇 100 吡哆醛 100 吡哆胺 100	80~110	<10	12
GB 5009.285-2022	VB ₁₂	酶解+氧化转化+免疫亲和柱净化浓缩	LC-MS/MS	0.5	2.0	80~110	<15	6
GB 5009.84-2016	VB ₁	酸水解+酶解+碱性铁氰化钾衍生+萃取	HPLC-FLD	300	1 000	80~110	<10	10
GB 5009.85-2016	VB ₂	酸水解+酶解	HPLC-FLD	200	500	80~110	<10	10
GB 5009.89-2023	烟酸/烟酰胺	酸水解+无菌操作+菌种培养	分光光度计	——	12 500	80~110	<15	——
GB 5009.259-2023	生物素	酸水解+无菌操作+菌种培养	分光光度计	——	25	80~110	<20	——
GB 5009.211-2022	叶酸	缓冲液水解+酶解+无菌操作+菌种	分光光度计	10	20	80~110	<15	——

3 结论

本试验建立了固相萃取结合 LC-MS/MS 同时测定猪肉、牛肉、鱼肉中 11 种 B 族维生素的方法。通过优化酶解（复合酶，pH 值 5.5，37 °C，1.5 h）和提取（10 mmol L⁻¹ 乙酸铵，pH 值 4.5）及 Captiva EMR-Lipid 净化条件，有效降低了基质干扰。采用 HILIC Plus 柱分离，ESI+ 及 MRM 模式检测，11 种目标物在各自浓度范围内线性良好（ $R^2 > 0.999\ 0$ ），检出限为 0.1~2.8 μg·kg⁻¹，定量限为 0.5~9.8 μg·kg⁻¹。在猪肉、牛肉、鱼肉中三个加标水平下的平均回收率为 85.72%~107.17%，RSD 为 1.13%~6.56%，符合 GB/T 27404-2026 要求。基质效应为 2.38%~18.47%，基质干扰较弱。实际样品检测显示，各品种猪肉、牛肉、鱼肉中均可检出全部 11 种 B 族维生素，加标回收率符合常规定量要求。实际样品平行对比试验表明，本方法与国标方法在猪肉、牛肉、鱼肉中的测定结果相对偏差均小于 10%，方法间具有良好的定量一致性。该方法前处理高效、灵敏度高，适用于多种肉类中 B 族维生素的同步定量分析，可为肉类营养评估及标准方法完善提供理论与技术支持。

参考文献

- [1] HANNA M, JAQUA E, NGUYEN V, et al. B vitamins: functions and uses in medicine [J]. The Permanente Journal, 2022, 26(2): 89-97.
- [2] KENNEDY D O. B vitamins and the brain: mechanisms, dose and efficacy—a review [J]. Nutrients, 2016, 8(2): 68.
- [3] CALDERÓN-OSPINA C A, NAVA-MESA M O. B Vitamins in the nervous system: current knowledge of the biochemical modes of action and synergies of thiamine, pyridoxine, and cobalamin [J]. CNS Neuroscience & Therapeutics, 2020, 26(1): 5-13.
- [4] ALI M A, HAFEZ H A, KAMEL M A, et al. Dietary vitamin B complex: orchestration in human nutrition throughout life with sex differences [J]. Nutrients, 2022, 14(19): 3940.
- [5] PAPARELLA R, PANVINO F, LEONARDI L, et al. Water-Soluble vitamins: hypo- and hypervitaminosis in pediatric population [J]. Pharmaceuticals, 2025, 17(1): 118.
- [6] 甄宗圆,李志杰,梁迪,等.超高压技术在肉类杀菌及品质改善中的应用进展[J].现代食品科技,2021,37(8):350-356,374.
- [7] 李智,周灿,费华熙,等.液相色谱-串联质谱法测定畜禽肉和鸡蛋中氨基酸含量[J].食品与发酵工业,2023,49(3):314-321.
- [8] PORTER K, LODGE J K. Determination of selected water-soluble vitamins (thiamine, riboflavin, nicotinamide and pyridoxine) from a food matrix using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B, 2021, 1171: 122541.
- [9] NGUYEN Q H, HOANG A Q, TRUONG T M H, et al. Development of simple analytical method for B-group vitamins in nutritional products: enzymatic digestion and UPLC-MS/MS quantification [J]. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2021, 2021: 5526882.
- [10] ZAMANI KALAJAHI M, ABOLHASSANI A, HAMIDI S, et al. Determination of vitamins B₁ and B₆ in infant formula and food supplement samples using magnetic layered double hydroxide nanoadsorbent before liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2022, 45(17-20): 227-236.
- [11] FATIMA Z, WANG L, CUI M, et al. Fast, sustainable, and simultaneous analysis of water- and fat-soluble vitamins by the two-dimensional microcarbon fiber fractionation system hyphenated with MS detection [J]. Analytica Chimica Acta, 2024, 1295: 342288.
- [12] 江汝泳,陈瑾,周家昌,等.一种用于同时检测咖啡因和 B 族维生素的 HPLC-DAD 方法的开发和验证[J].食品工业,2026,47(2):301-306.
- [13] MAEABA W, SINGH P, PRASAD S. Simultaneous determination of water-soluble vitamins (B₂, B₃, B₆, B₉ and C) in guava fruit by HPLC-PDA [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2025, 144: 107569.
- [14] CHUTKOWSKI M, ZIOBROWSKI P, PRZYWARA M, et al. Studies on the effects of process conditions on separation of B₁, B₂ and B₃ vitamin mixture using HILIC and RPLC chromatography [J]. AgriEngineering, 2022, 4(3): 566-591.
- [15] 王兴龙,刘少颖,姚远,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定植物蛋白中 9 种水溶性维生素[J].卫生研究,2025,54(5):820-826,832.
- [16] GB 5009.84-2016.食品安全国家标准 食品中维生素 B₁ 的测定[S].
- [17] GB 5009.85-2016.食品安全国家标准 食品中维生素 B₂ 的测定[S].
- [18] GB 5009.89-2023.食品安全国家标准 食品中烟酸和烟酰胺的测定[S].
- [19] GB 5009.210-2023.食品安全国家标准 食品中泛酸的测定[S].
- [20] GB 5009.154-2023.食品安全国家标准 食品中维生素 B₆ 的测定[S].

- [21] GB 5009.259-2023.食品安全国家标准 食品中生物素的测定[S].
- [22] GB 5009.211-2022.食品安全国家标准 食品中叶酸的测定[S].
- [23] GB 5009.285-2022.食品安全国家标准 食品中维生素 B₁₂ 的测定[S].
- [24] WILSON S A, ALSALEM A, BERDEN G, et al. Spectroscopic characterization of the photolysis of riboflavin (vitamin B₂) via time-resolved mass spectrometry and IRMPD spectroscopy [J]. The Journal of Physical Chemistry A, 2025, 129(23): 5082-5091.
- [25] KAHOUN D, FOJTÍKOVÁ P, VÁCHA F, et al. Development and validation of an LC-MS/MS method for determination of B vitamins and some its derivatives in whole blood [J]. PLOS ONE, 2022, 17(7): e0271444.
- [26] ERŞAN S, CHEN Y, PARK J O. Comprehensive profiling of folates across polyglutamylation and one-carbon states [J]. Metabolomics: Official Journal of the Metabolomic Society, 2025, 21(3): 71.
- [27] DHALE M, SINGH R, SHARMA R, et al. Quantification of all B vitamins in a single run using ion-pair modified liquid chromatography with UV detection [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2023, 123: 105602.
- [28] 陈美君,王旻,亢美娟,等.超高压液相色谱-串联质谱法同时测定婴幼儿配方乳粉中 11 种 B 族维生素[J].食品科学,2016,37(4):144-153.
- [29] CAO D, HEUGHEBAERT L, BOFFEL L, et al. Simultaneous quantification of seven B vitamins from wheat grains using UHPLC-MS/MS [J]. Food Chemistry, 2024, 453: 139667.
- [30] 赵佳伟,松尾雪,富需恒,等.高峰淀粉酶活性对饮料中维生素 B₂ 测定结果的影响[J].中国食品卫生杂志,2023,35(7):993-999.
- [31] BAJAJ R S, SINGHAL S R. Degradation kinetics of vitamin B₁₂ in model systems of different pH and extrapolation to carrot and lime juices [J]. Journal of Food Engineering, 2020, 272: 109800.
- [32] DHALE M, SINGH R, SHARMA R, et al. Analytical approaches for estimation of B vitamins in food: a review on the shift from single to multi-vitamin analysis [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2025, 19(8): 1-15.
- [33] GB/T 27404-2026.实验室质量控制规范 食品理化检测[S].
- [34] HASSAN Z, FISCHBACH N, HOF SOMMER M, et al. Development and validation of HPLC-MS/MS method for simultaneous analysis of B vitamins present naturally or after fortification in fruit juices [J]. LWT, 2023, 184: 115103.
- [35] 李婕筠.普通小麦维生素 B 含量及全基因组关联分析[D].北京:中国农业科学院,2017.
- [36] MUZ M, ROJONIETO E, JAHNKE A. Removing disturbing matrix constituents from biota extracts from total extraction and silicone-based passive sampling [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2021, 40(10): 2693-2704.
- [37] WANG J, HU Q, LI P, et al. Comparison of three different lipid removal cleanup techniques prior to the analysis of sulfonamide drug residues in porcine tissues [J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7(9): 3006-3016.
- [38] GB 5009.295-2023.食品安全国家标准 化学分析方法验证通则[S].
- [39] 周仁客.基于液质联用的食品中维生素 B6 定量检测方法的建立[D].杭州:浙江大学,2020.
- [40] KATSA M, PAPALOUKA N, MAVROGIANNI T, et al. Comparative study for the determination of fat-soluble vitamins in rice cereal baby foods using HPLC-DAD and UHPLC-APCI-MS/MS [J]. Foods, 2021, 10(3): 648.
- [41] 杨月欣.中国食物成分表(标准版)(第6版)[M].北京:北京大学医学出版社,2018.