

# Simultane Bestimmung der Vitamine B1, B2 und B6 in Säuglingsnahrung mittels LC-MS/MS

Schneller, selektiver, genauer als mit separaten HPLC-Läufen



Unsere Autoren: **Oliver Meier** und **Andrea Thellmann**,  
Institut Kirchhoff Berlin;  
**Harald Möller-Santner**, AB Sciex Deutschland GmbH,  
Darmstadt

Industriell hergestellte Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis stellt weltweit einen Ersatz für Muttermilch dar und liefert alle notwendigen Nährstoffe für Neugeborene und Kleinkinder. Damit sind diese Produkte essentiell für Gesundheit und Entwicklung von Säuglingen bei einer muttermilchfreien Ernährung und unterliegen strengen Qualitätskontrollen. Ein besonderer Schwerpunkt liegt dabei in der Bestimmung der Vitamine.

Thiamin (Vitamin B1), Riboflavin (Vitamin B2) und die Vitamin B6 – Formen Pyridoxin, Pyridoxal und Pyridoxamin gehören zur Gruppe der wasserlöslichen Vitamine. In den DIN-Methoden<sup>[1],[2],[3]</sup> zur Bestimmung von Vitamin B1, B2 und B6 in Lebensmitteln erfolgt eine Extraktion durch Säureaufschluss mit anschließender enzymatischer Hydrolyse für mindestens 16 Stunden. Die Bestimmung mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion erfolgt für alle drei Vitamine mit separaten chromatographischen Methoden, für Vitamin B1 muss für die Detektion eine aufwendige Derivatisierung durchgeführt werden. Dementsprechend ist die Analytik zur Bestimmung aller Vitamine mit einem hohen apparativen und zeitlichen Aufwand verbunden. Die Störung der Detektion bei komplexen Matrices ist häufig problematisch.



Die hier vorgestellte Methode setzt sich zusammen aus einem stark vereinfachten Extraktionsverfahren und einer simultanen Erfassung in einem chromatographischen System. Die Detektion erfolgt mittels MS/MS nach Elektrosprayionisation (ESI) innerhalb einer Gesamtlaufzeit von 15 Minuten.

## Versuchsanordnung

### Probenvorbereitung

4 g Probe werden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 0,25 g Taka-Diastase und 1 ml saurer Phosphata-

selösung (6 mg/ml) versetzt und auf 40 g mit 50 mM Natriumacetatpuffer (pH=4,5) aufgefüllt. Nach 3 h Inkubation unter regelmäßigem Schütteln bei 37 °C wird der Ansatz für 30 min auf 60 °C erhitzt. Im Anschluss wird die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt, zentrifugiert und feinfiltriert. Ein Aliquot des Extrakts wird mit isotope-markierten Standards versetzt und in Eluent A verdünnt.

### LC Bedingungen

Säule: C18 Core-Shell 50 x 3,0 mm / 2,7 µm

Säulentemperatur: 20 °C Flussrate: 0,5 ml/min  
 Eluent A: 20 mM Ammoniumformiat in Wasser, 10 % Methanol mit 0,1 % Ameisensäure

Eluent B: 20 mM Ammoniumformiat in Methanol mit 0,1 % Ameisensäure

Gradient: Zeit (min)	%A	%B
0,0	100	0
8,0	45	55
8,1	100	0
15,0	100	0

Gesamtlaufzeit: 15 min Injektionsvolumen: 20 µl

### MS Parameter

MS System: SCIEX QTRAP® 6500 LC-MS/MS System

Modus: Turbo V™ Quelle, ESI Positiv

Software: Analyst® 1.6.2

Datenakquisition: Scheduled MRM Algorithmus

Curtaingas: 45 CAD Gas: high

Spannung (IS): 3500 V

Gas 1: 40 Gas 2: 55 Temperatur: 450 °C

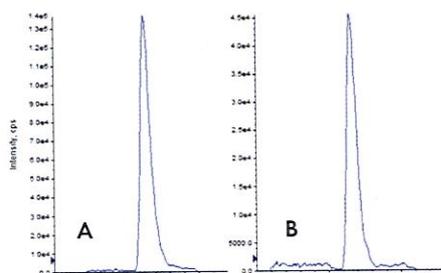


### MRM Übergänge:

Analyt	Q1	Q3	DP	CE
Vitamin B1	265,1	122,1	40	20
	265,1	144,0	40	45
Vitamin B2	377,1	243,1	56	33
	377,1	198,2	56	51
Pyridoxin	170,4	134,0	40	30
	170,4	152,2	40	17
Pyridoxal	168,3	150,1	25	10
	168,3	122,1	25	30
Pyridoxamin	169,4	152,2	32	18
	169,4	134,1	32	30

### Chromatogramme:

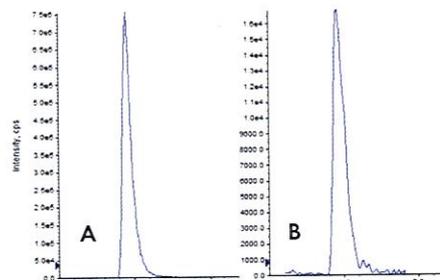
Im Folgenden werden Beispielchromatogramme und die Ergebnisse der Validierung für die Untersuchung von Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis vorgestellt. Bei dem verwendeten Untersuchungsmaterial handelt es sich um gängige Anfangs- bzw. Folgemilch. Als Referenz wurde die Milchpulverprobe ei-



**Vitamin B1** MRM 265.1 > 122.1

A: Standardlösung 0,25ng/ml

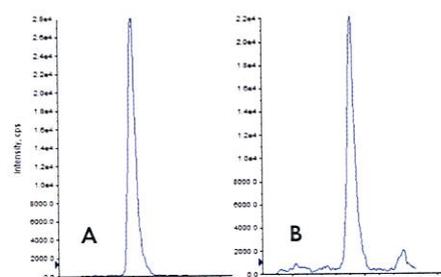
B: Milchpulverprobe 30µg/100g



**Pyridoxin** MRM 170.4 > 134.0

A: Standardlösung 0,5ng/ml

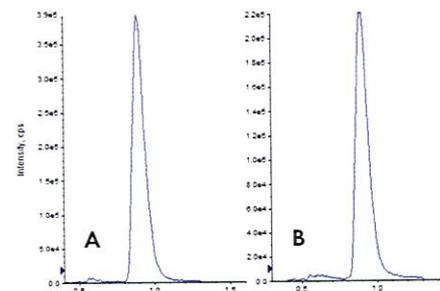
B: Milchpulverprobe 60µg/100g



**Vitamin B2** MRM 377.1 > 243.1

A: Standardlösung 0,5ng/ml

B: Milchpulverprobe 30µg/100g



**Pyridoxal** MRM 169.4 > 150.1

A: Standardlösung 0,5ng/ml

B: Milchpulverprobe 140µg/100g

ner Laborvergleichsuntersuchung<sup>[4]</sup> verwendet.

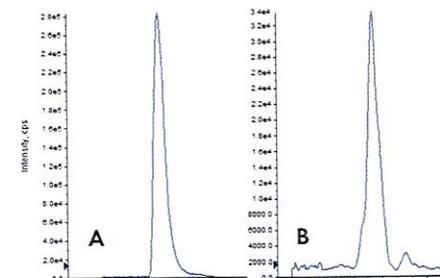
### Ergebnisse

#### Richtigkeit

Zur Überprüfung der Richtigkeit wurde ein Milchpulver aus einer Laborvergleichsuntersuchung<sup>[4]</sup> analysiert. Außerdem wurde eine reale Milchpulverprobe, dessen Gehalt über einen Zeitraum von 10 Monaten 90 Mal nach den DIN-Methoden<sup>[1],[2],[3]</sup> bestimmt wurde, untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und 2 aufgeführt.

#### Linearität

Die Linearität wurde an einer Milchpulvermatrix durch Dotierung der Analyten auf drei ver-



**Pyridoxamin** MRM 169.4 > 152.2

A: Standardlösung 0,5ng/ml

B: Milchpulverprobe 120µg/100g

schiedenen Konzentrationsniveaus überprüft. Bestimmt wurden der Verfahrensvariationskoeffizient (Vk) der Regressionsgeraden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Analyt	Vitamin B1	Vitamin B2	Pyridoxin
Abweichung vom Zielwert [%]	+12	-1	-4
Z-Score	0,8	-0,1	-0,2

Tabelle 1: Übersicht der Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchung

Analyt	Vitamin B1	Vitamin B2	Pyridoxin
Vergleich zur DIN Abweichung [%]	+6	+8	-3

Tabelle 2: Abgleich mit DIN-Methoden

Analyt	B1	B2	Pyridoxin	Pyridoxal	Pyridoxamin
Verfahrensvariationskoeffizient [%]	2,3	2,8	2,2	0,5	4,8

Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Prüfung der Linearität

### Präzision

Zur Bestimmung der Präzision wurde eine reale Milchpulverprobe unter Wiederhol- und unter Vergleichsbedingungen analysiert. Für die Wiederholpräzision wurden mindestens 6 Werte betrachtet, die Vergleichspräzision wurde über einen Zeitraum von 8 Monaten aus mindestens 10 Einzelwerten ermittelt. Für Pyridoxal und Pyridoxamin wurde aus den Dotierungen zur Prüfung der Linearität die Wiederholpräzision bestimmt und daraus die Vergleichspräzision berechnet. Die Messunsicherheit setzt sich zusammen aus der Vergleichspräzision und der Standardunsicherheit der Auswertung der Laborvergleichsuntersuchung <sup>[5]</sup>.

### Empfindlichkeit

Die Bestimmungsgrenzen (BG) wurden über eine Grundkalibrierung\* abgeschätzt und über 6-fach-Dotierung auf eine analytische Milchpulvermatrix überprüft. Die Bestimmungsgrenze wurde für alle Analyten vereinheitlicht. Da das Verhältnis von Signal zu Rauschen bei gleicher Konzentration sehr unterschiedlich ausfällt, ist bei einigen Analyten eine deutlich niedrigere Bestimmungsgrenze möglich.

\*: 10 Konzentrationsniveaus in äquidistanten Abständen in einem Bereich von 0.05-0.5 ng/ml bzw. 0.1-1.0 ng/ml

### Fazit

Die Ergebnisse der Validierung zeigen, dass das Verfahren innerhalb einer Messunsicherheit<sup>[5]</sup> von maximal 20% richtige und präzise Messdaten liefert. Die vorgestellte Methode ist diesbezüglich mit den DIN-Methoden<sup>[1],[2],[3]</sup> äquivalent. Zusätzlich konnte die Effizienz gegenüber den etablierten Verfahren deutlich gesteigert werden. Das einfache Extraktionsverfahren ohne Säureaufschluss gewährleistet eine effektive Erfassung aller 5 Vitamine, die kurze Inkubationszeit der enzymatischen Reaktion ist ausreichend für eine vollständige Freisetzung der Analyten. Durch die simultane Detektion in einem chromatographischen System mittels hochspezifischer MS/MS-Detektion ist der apparative Umfang und Aufwand vergleichsweise gering und die Selektivität im Vergleich zur LC-UV und LC-FLD Detektion deutlich höher. Das Resultat ist eine Methode, die mit geringem zeitlichen, personellen und instrumentellen Aufwand einen hohen Probendurchlauf ermöglicht.

### Referenzen

<sup>[1]</sup> DIN EN 14122:2014 „Bestimmung von Vitamin B1 in Lebensmitteln mit HPLC“

Analyt	Vitamin B1	Vitamin B2	Pyridoxin	Pyridoxal	Pyridoxamin
Wiederholpräzision RSD [%]	2,3	3,0	1,0	0,6	4,7
Vergleichspräzision RSD [%]	7,0	6,1	4,9	0,9	7,1
Messunsicherheit [%]	15	15	15	20	20

Tabelle 4: Wiederhol- und Vergleichspräzision bzw. Messunsicherheit

Analyt	Vitamin B1	Vitamin B2	Pyridoxin	Pyridoxal	Pyridoxamin
Präzision an BG RSD [%]	3,3	2,9	3,2	7,1	11
Signal-Rausch-Verhältnis	1 : 800	1 : 800	1 : 400	1 : 50	1 : 50
Bestimmungsgrenze [µg/100g]	50	50	50	50	50

Tabelle 5: Bestimmungsgrenzen

<sup>[2]</sup> DIN EN 14152:2014 „Bestimmung von Vitamin B2 in Lebensmitteln mit HPLC“

<sup>[3]</sup> DIN EN 14663:2006 „Bestimmung von Vitamin B6 in Lebensmitteln mit HPLC“

<sup>[4]</sup> Laborvergleichsuntersuchung „Vitamine (2015)“ der LVU, 79336 Herbolzheim Die Durchführung und die Auswertung der Laborvergleichsuntersuchung „Vitamine“ erfolgte nach „The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories: Pure & Applied Chemistry 78, 145-196 (2006)“ unter Berücksichtigung der wesentlichen Elemente von ISO 17043:2010 und ISO 13528:2005.

<sup>[5]</sup> „Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement“ (gum), 1. Edition 1993, korrigiert und gedruckt 1995, Genf

<sup>[6]</sup> „Determination of Vitamin B12 in Infant Formula and Adult Nutritionals by HPLC: First Action 2011.10“ Schimpf et al. : Journal of AOAC INTERNATIONAL Vol. 95, No. 2, 2012

<sup>[7]</sup> „HPLC Analysis of Vitamin B6 in Foods“ Velimatti Ollilainen, Department of Applied Chemistry and Microbiology PO Box 24, FIN-00014 University of Helsinki, Finland

<sup>[8]</sup> „Quantitative Analysis of Water-Soluble B-Vitamins in Cereal Using Rapid Resolution LC/MS/MS“ Agilent Technologies, Inc. 2008

- Erhöhung von Selektivität und Empfindlichkeit der Detektion durch Messung mittels LC-MS/MS

### Vortrag auf dem 7. Berliner LC-MS/MS Symposium am 14.3.2017, ESTREL Hotel Berlin

Die erste öffentliche Präsentation der beschriebenen Vitamin Multimethode erfolgte auf dem Deutschen Lebensmittelchemikertag 2016 in Freising. Welche Erfahrungen Institut Kirchhoff mit der Methode in der Routine gemacht hat, welche Erweiterungen um zusätzliche Vitamine und Lebensmittelmatrices für sinnvoll und möglich erachtet werden, wird Mitte März 2017 in einem Vortrag von der Autorin dieses Artikels Andrea Thellmann zu hören sein.

Frau Thellmann wird auf Einladung der Firma AB Sciex Deutschland GmbH am Nachmittag des 14.3.2017 in der Session zur Lebensmittelanalytik im Rahmen des 7. Berliner LC-MS/MS Symposiums sprechen. Der Titel ihres Vortrags lautet: Entwicklung einer Methode zur simultanen Bestimmung der Vitamine B1, B2 und B6 in Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis.

Die Sciex-Veranstaltung besteht aus einer Plenarsitzung am Vormittag und 6 parallelen am Nachmittag des 14. März 2017 und beinhaltet auch eine Poster-Session sowie eine Industrieausstellung zu Produkten rund um die LC-MS/MS. Am Vortrag gibt es die Möglichkeit, an kostenpflichtigen Trainingskursen teilzunehmen. Am Tag nach dem Symposium, also am 15.3.2017, schließt sich dann noch ein Vormittag mit Diskussionsveranstaltungen zu Teilgebieten der Lebensmittelanalytik an.

Mehr Informationen erhalten Sie unter [www.sciex.com/berlin2017](http://www.sciex.com/berlin2017)

### Zusammenfassung

Es wurde eine LC-MS/MS basierte Methode für 5 wasserlösliche Vitamine entwickelt und validiert, die folgende Vorteile ausweist:

- Einfaches Extraktionsverfahren
- Erfassung in einem HPLC-Lauf