

高压液相色谱法检测饮料中维生素 B₆

何珊丽*, 胡燕玲, 梁波

(广东省中山市质量计量监督检测所, 中山 528403)

摘要: **目的** 建立饮料中维生素 B₆ 含量的高压液相色谱检测方法。**方法** 饮料样品经稀释、过滤后, 用高压液相色谱仪进行测定, 测定结果与 GB/T 5009.154-2003《食品中维生素 B₆的测定》比较。**结果** 浓度范围内线性关系良好, 相关系数 r 均在 0.999 以上。本方法的检出限($S/N \geq 3$)为吡哆醇 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、吡哆醛 13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、吡哆胺 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。平均回收率为 98.9%~99.5%, 相对标准偏差为 0.88%~1.05%。使用高压液相色谱法测定饮料中维生素 B₆ 的含量与使用微生物方法检测得到的数据一致, 而高压液相色谱法所用时间比微生物法要短得多。**结论** 高压液相色谱法测定饮料中维生素 B₆ 灵敏度高, 值得在实验室的日常检测中推广。

关键词: 高压液相色谱(荧光检测器); 维生素 B₆; 饮料

Detection of vitamin B₆ in beverage by high pressure liquid chromatography

HE Shan-Li*, HU Yan-Ling, LIANG Bo

(Zhongshan Supervision Testing Institute of Quality & Metrology, Zhongshan 528403, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid and effective method for the detection of vitamin B₆ in beverage by high pressure liquid chromatography (HPLC). **Methods** After dilution and filtration, samples was measured by high pressure liquid chromatography with fluorescence detector, and the data was compared with that obtained by the national standard microbial method. **Results** The method showed a good linearity with r 0.999. The LODs of pyridoxine, pyridoxal and pyridoxmine were 15, 13, 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The recoveries were 98.9%~99.5% and the relative standard deviations were 0.88%~1.05%. The data of vitamin B₆ content in beverage detected by HPLC was consistent with that obtained by microbial method. But the detection time of HPLC was much shorter than that of the microbial method. Moreover, the operation of HPLC was simple, and the repeatability and accuracy of data were much higher as well. **Conclusion** HPLC is a sensitive method for the detection of vitamin B₆ in beverage, and it could be applied to the daily detection in laboratory.

KEY WORDS: high pressure liquid chromatography (HPLC); vitamin B₆; beverage

1 引言

随着国民生活水平的提高及保健意识的加强, 人们希望更加容易地从日常的饮食中补充营养。许多功能性的饮料(如维生素饮料)由此而生。维生素 B 族能加强身体能量代谢, 提高身体的协调和反应能力,

且属于水溶性维生素, 因而经常被添加到饮料中供人饮用, 从而补充人体所需的 B 族维生素。但在检测方法方面, 现行国家标准 GB/T 5009.154-2003《食品中维生素 B₆的测定》规定的方法是微生物法, 需时约 2~3 周。而使用液相色谱方法的只有 GB/T 5413.13-2010《食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳

*通讯作者: 何珊丽, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: sannyl@tom.com

*Corresponding author: HE Shan-Li, Engineer, Zhongshan Supervision Testing Institute of Quality & Metrology, No.268, Zhongshan 3rd Road, Zhongshan 528403, China. E-mail: sannyl@tom.com

品中维生素 B₆ 的测定》, 关于饮料中维生素 B₆ 的检测并没有国家标准。为找出更快捷、准确的检测方法, 本文采用高压液相色谱(荧光检测器)测定饮料中维生素 B₆ 的含量, 并与使用微生物方法检测得到的数据进行比较, 为饮料中维生素 B₆(指吡哆醛或吡哆醇或吡哆胺)检测方法的研究提供参考。

2 材料与方法

2.1 试剂与仪器

甲醇、辛烷磺酸钠(色谱纯); 盐酸(0.5%)、三乙胺、冰乙酸(优级纯); 盐酸吡哆醇标准品(纯度 99.99%)(德国 Dr.Ehrenstorfer 公司); 盐酸吡哆醛标准品、盐酸吡哆胺标准品(纯度 99.99%)(美国 Chem Service 公司); 样品为某品牌的维生素饮料。

标准储备液: 精密称取吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺标准品各 0.05 g(精确至 0.0001 g), 分别置于 50 mL 容量瓶中, 用水溶解定容, 配制成浓度为 1 mg/mL 的储备液。

混合标准中间液: 分别吸取吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺标准储备液各 1 mL, 置于 50 mL 容量瓶中, 用水定容, 浓度为 20 μg/mL。

高压液相色谱仪(带荧光检测器)(Agilent Technologies 1260, 美国安捷伦公司); 分析天平(BS-224S, 德国 Sartorius 公司): 感量为 0.0001 g 和 0.01 g (sar-

torius BS 2202S); 离心机(3-18K, 美国 Sigma 公司): 转速不低于 6000 r/min; 50 mL。

2.2 色谱条件

C₁₈ 色谱柱, 4.6 mm×150 mm 或同等性能色谱柱; 流动相, 甲醇: 离子对试剂缓冲液 = 85:15(准确称取辛烷磺酸钠 2.0 g、三乙胺 2.5 mL, 用水定容至 1 L, 用冰乙酸调 pH 至 3.0±0.1); 流速, 1.0 mL/min; 柱温, 30 °C; 荧光检测器条件: 激发波长 293 nm, 发散波长 395 nm; 进样量, 10 μL。

2.3 样品处理方法

准确称取摇匀后的样品(质量见表 2), 用流动相定容至 25 mL, 摇匀后将稀释液经过 0.45 μm 滤膜过滤后直接测定。

3 结果与讨论

3.1 实验方法

精密称取吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺标准品各 0.0500g, 用纯水定容至 50mL(浓度为 1 mg/mL)作为标准储备液。再将标准储备液稀释至浓度为 20mg/mL 作为混合标准中间液。按照优化的色谱条件(2.2 节)及 3.2 节的方法得到维生素 B₆(吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺)标准品色谱图如图 1 所示。

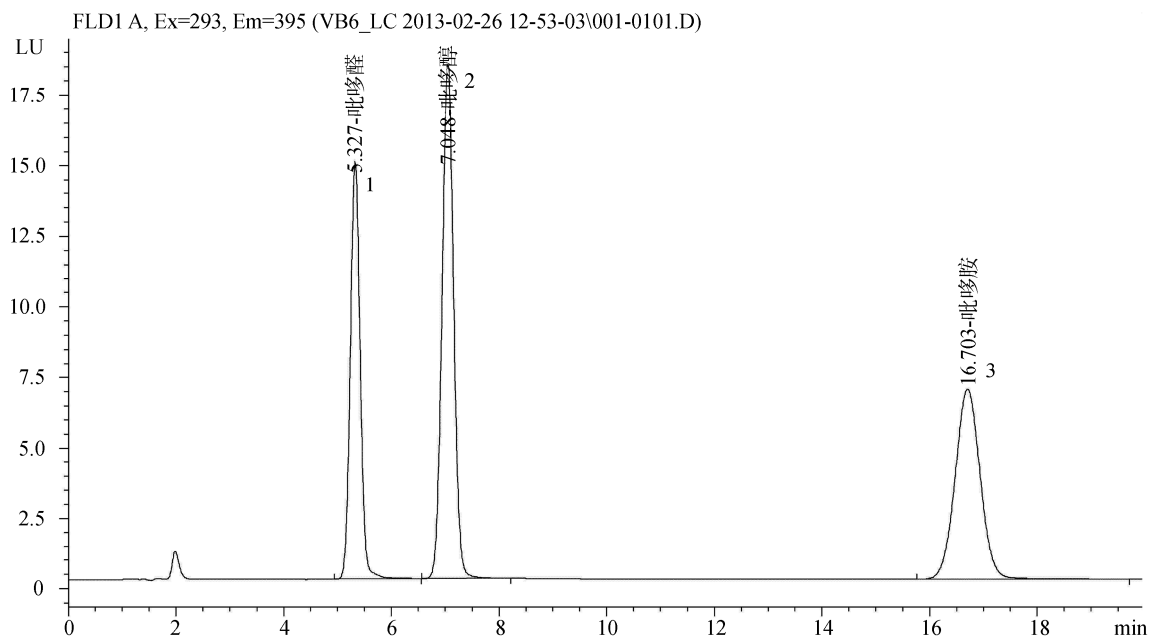


图 1 混合标准品(吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of mixed standard solution (pyridoxine, pyridoxal and pyridoxamine)
1 吡哆醛 2 吡哆醇 3 吡哆胺 (1 pyridoxal 2 pyridoxine 3 pyridoxamine)

3.2 方法的线性范围和检出限

准确吸取吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺标准中间液 0.0、1.0、2.0、3.0、5.0 mL, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 配制浓度为 0.00、0.20、0.40、0.60、1.00 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标液。以色谱峰面积(A)为纵坐标, 对应的浓度(C, $\mu\text{g/mL}$)为横坐标, 绘制标准曲线。在 0.015~2.00 $\mu\text{g/mL}$ 线性范围内, 线性方程为:

$A_{\text{吡哆醛}}=9.4296C-0.0001$, $A_{\text{吡哆醇}}=13.599C-5E-05$, $A_{\text{吡哆胺}}=10.769C-4E-05$ 检出限(S/N=3)为: 吡哆醇 15 $\mu\text{g/kg}$ 、吡哆醛 13 $\mu\text{g/kg}$ 、吡哆胺 16 $\mu\text{g/kg}$ 。相关系数 r 均大于 0.999。

3.3 方法回收率与精密度

称取测试样品约 10 g, 分别向样品中加入浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺标准溶液各 1 mL,

按 2.3 节的方法对加标样品进行回收率实验, 重复 5 次, 结果见表 1。3 种组分的平均回收率为 98.9%~99.5%, 相对标准偏差为 0.88%~1.05%, 表明该方法具有较好的准确度和精密度, 满足检测的要求。

3.4 样品的测定

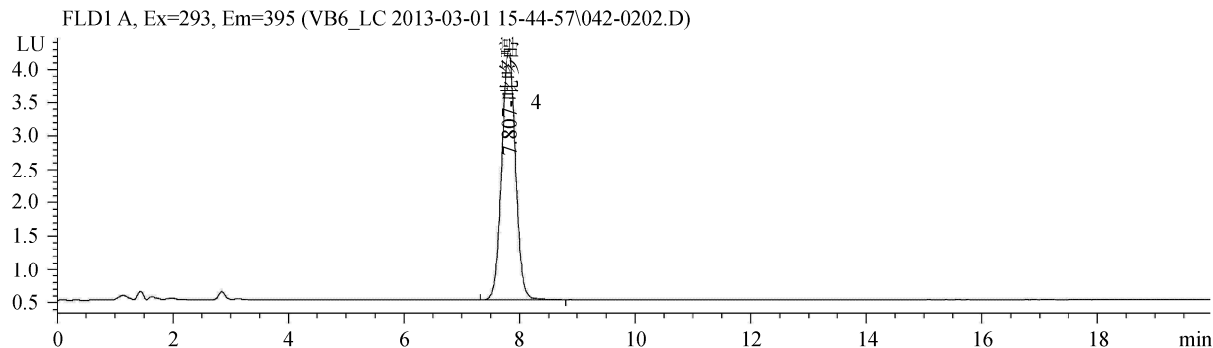
待测样品经 2.3 节方法处理, 用高压液相色谱仪进行测定, 色谱图见图 2 所示, 样品中维生素的含量见表 2。平行实验 ($n=6$) 样品的平均值 $X=6.40$ mg/kg。

3.5 方法比较

依据 GB/T 5009.154-2003《食品中维生素 B₆的测定》用微生物法对一样品中维生素 B₆的含量进行测定, 结果见表 3。不同检测方法对结果比较, 见表 4 所示。

表 1 回收率实验结果($n=5$)
Table 1 Recovery of experiment results ($n=5$)

| 样品中维生素 B ₆ 的组分 | 加标量 (μg) | 回收率平均值(%) | 相对标准偏差 (%) |
|---------------------------|-----------------------|-----------|------------|
| 吡哆醛 | 20 | 99.5 | 0.92 |
| 吡哆醇 | 20 | 99.2 | 1.05 |
| 吡哆胺 | 20 | 98.9 | 0.88 |



4 吡哆醇 pyridoxine

图 2 样品的高压液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of sample

表 2 高压液相色谱法测定样品中维生素 B₆的含量 ($n=6$)
Table 2 HPLC determination of the content vitamin B₆ in samples ($n=6$)

| 样品的质量 (g) | 样品中维生素 B ₆ 的浓度 ($\mu\text{g/mL}$) | 样品中维生素 B ₆ 的含量 X(mg/kg) |
|-----------|--|------------------------------------|
| 18.28 | 4.6726 | 6.39 |
| 15.22 | 3.8963 | 6.40 |
| 13.57 | 3.4793 | 6.41 |
| 15.65 | 4.0064 | 6.40 |
| 14.89 | 3.8059 | 6.39 |
| 13.92 | 3.5691 | 6.41 |

表3 微生物法测定同一样品中维生素 B₆ 的含量
Table 3 Content of vitamin B₆ in the same sample determined by microbial method

| 编号 | 体积(mL) | 每 mL 测定液维生素 B ₆ (吡哆醇)含量的平均值(ng) | 相对偏差(%) | 总平均值(ng) | 试样中维生素 B ₆ 的含量(μg/100 g) |
|----|--------|--|---------|----------|-------------------------------------|
| 1 | 0.05 | 66.2125 | 1.6 | 64.3956 | 643.3175 |
| 2 | 0.10 | 63.3309 | 1.0 | | |
| 3 | 0.15 | 65.1673 | 0.8 | | |
| 4 | 0.20 | 62.8717 | 0.9 | | |

表4 高压液相色谱法和微生物法的比较
Table 4 Comparison of HPLC method and microbiological method

| 同一实验样品的检测结果(mg/kg) | 实验所耗用的总时长 | 实验的偏差(%) | 能同时检验出维生素 B ₆ 的化学形式 | 选择性及干扰性 | |
|--------------------|-----------|----------|--------------------------------|---------|--------------|
| 高压液相色谱法 | 6.40 | 约 4 h | 0.003~0.016 | 吡哆胺 | 选择性高 |
| | | | | 吡哆醛 | 能排除大部分 |
| | | | | 吡哆醇 | 物质的干扰 |
| 微生物法 | 6.43 | 约 2~3 周 | 0.8~1.6 | 吡哆醇 | 培养期间易受其他物质干扰 |

由上表可以得出如下结论:

(1)两种方法检测出的同一样品中维生素 B₆ 含量基本一致;

(2)微生物法只对维生素 B₆ 的一种组分吡哆醇进行检测, 而使用高压液相色谱法可同时对维生素 B₆ 的 3 种化学形式(吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺)进行检测, 检测结果更加全面;

(3)微生物法检验所需时间约为 2~3 周, 而高压液相色谱法仅需 4 h, 大大缩短了检测时间, 更快捷, 操作更简便, 尤其是对于检测饮料中维生素 B₆ 的优势更为突出;

(4)使用高压液相色谱法(带荧光检测器), 由于荧光检测器具有高选择性, 只对荧光物质或者当试样组分具有荧光性能时才有响应的特点, 能排除大部分其他物质的干扰; 而微生物法的操作步骤繁琐, 要进行微生物的培养, 培养过程中易受其他微生物的干扰。

综上所述, 高压液相色谱(带荧光检测器)测定饮料中维生素 B₆ 含量的方法灵敏度高, 测定结果准确可靠, 方法精密度高。使用该方法检测饮料中维生素 B₆ 能大大提高日常检测工作效率, 值得在实验室的日常检测中应用推广。

参考文献

[1] GB 5413.13-2010 婴幼儿食品和乳品中维生素 B₆ 的测定[S].

GB 5413.13-2010 Determination of vitamin B₆ in foods for infants and young children, milk and milk products [S].

[2] GB/T 5009.154-2003 食品中维生素 B₆ 的测定[S].

GB/T 5009.154-2003 Determination of vitamin B₆ in foods [S].

[3] 杨祖英. 食品安全检测手册[M]. 北京: 化学工业出版社.

Yang ZY. Food safety testing manual [M]. Beijing: Chemical Industry Press.

[4] International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man [M]. Geneva, 1971-1982.

[5] 任一平, 黄百芬, 铁晓威, 等. LC-MS / MS 测定染色海洋杂鱼中的碱性橙的含量[C]. 第十五次全国色谱学术报告会, 2005.

Ren YP, Huang BF, Tie XW, et al. Determination of basic orange in ocean fishes by LC-MS/MS [C]. The 15th national chromatographic academic report, 2005.

[6] 李碧琳, 宋晓东. 用反相离子对色谱分离和检测水溶性维生素十二烷基磺酸钠做离子对试剂[J]. 分析化学, 1991, 19(8): 886-890.

Li BL, Song XD. Separating and Detecting Water-soluble Vitamins by Reversed-phase Ion-pair Liquid Chromatography-Using Sodium Dodecyl Sulfate as an Ion-pair Reagent [J]. Chin J Anal Chem, 1991, 19(8): 886-890.

[7] 成志强, 孙成军, 黎源倩. 反相高效液相色谱法同时测定食品和多维片中 8 种水溶性维生素[J]. 分析化学, 2001, 29(9):

- 1068-1070.
- Cheng ZQ, Sun CJ, Li YQ. Simultaneous Determination of Eight Water soluble Vitamins in Foods and Multivitamin Tablets by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography [J]. Chin J Anal Chem, 2001, 29(9): 1068-1070.
- [8] 徐焯, 顾鑫荣, 王瑞菲, 等. 反相高效液相色谱法同时测定功能饮料中六种 B 族维生素[J]. 理化检验(化学分册), 2010, (05): 497-502.
- Xu Y, Gu XR, Wang RF, et al. Simultaneous Determination of Six B-Group Vitamins in Functional Drinks by HPLC [J]. Phys Test Chem Anal B (Chem Anal), 2010, (5): 497-502.
- [9] 蒋守花, 张剑韵, 黄龙全. 采用高效液相色谱技术分析茶树体内维生素 B₆[J]. 茶叶科学, 2010, (02): 79-82.
- Jiang SH, Zhang JY, Huang LQ. Analysis of Vitamin B₆ Derivatives in Tea Plant with High Performance Liquid Chromatography [J]. J Tea Sci, 2010, (02): 79-82.
- [10] 申颖, 陈国章. HPLC 法测定五维葡钙口服溶液中四组份的含量 [J]. 中国药品标准, 2011, (6): 427-429.
- Shen Y, Chen GZ. Determination of the Content of Four components in Five Vitamins and Calcium Gluconate Oral Solution by HPLC [J]. Drug Stand China, 2011, (6): 427-429.
- [11] 王为黎, 马景宏, 张旭. 运用微生物法测定保健食品中的维生素 B₆ [J]. 中国微生物学杂志, 2006, (4): 291-292, 295.
- Wang WL, Ma JH, Zhang X. The measurement of vitamin B₆ in health foods by microbiological method [J]. Chin J Microecol, 2006, (4): 291-292, 295.
- [12] 胡媛. 食品药品中对维生素 B₆ 分析方法的研究进展[J]. 安徽医药, 2008, (2): 171-173.
- Hu Y. Research progress of vitamin B₆ analysis method In the food and drug [J]. Anhui Med Pharm J, 2008, (2): 171-173.
- [13] 张旭, 胡英, 马景宏. 从维生素 B₆ 含量测定浅析国家标准检验方法的统一化[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, (06): 1441.
- Zhang X, Hu Y, Ma JH. The analysis of national standard testing method unification From the determination of vitamin B₆ content [J]. Chin J Health Lab Technol, 2009, (06): 1441.
- [14] 郭巧珍, 魏萍, 关勇彪. 高效液相色谱法同时测定维生素 B₆ 中两种生物活性成分[J]. 解放军药学学报, 2010, (1): 68-69.
- Guo QZ, Wei P, Guan YB. Determination of Two Active Ingredients in Vitamin B₆ Formulations by High Performance Liquid Chromatography [J]. Pharm J Chin People's Lib Army, 2010, (1): 68-69.
- [15] 王琛, 陈彬彬, 邹梅娟. HPLC 法同时测定多维元素胶囊中烟酰胺、维生素 B₆、维生素 B₁ 和维生素 B₂ 的含量[J]. 海峡药学, 2010, (3): 52-55.
- Wang S, Chen BB, Zhou MJ. Determination of the contents of nicotinamide, pyridoxine hydrochloride, thiamine hydrochloride and riboflavin in oil-and water-soluble vitamins with minerals capsule by HPLC [J]. Strait Pharm J, 2010, (3): 52-55.
- [16] 王浩, 刘艳琴, 杨红梅. HPLC 法同时测定婴幼儿配方奶粉中 5 种水溶性维生素[J]. 中国乳品工业, 2009, (10): 56-58.
- Wang H, Liu YQ, Yang HM. Study on simultaneous detection of 5 water-soluble vitamins in infant milk powder by HPLC [J]. China Dairy Ind, 2009, (10): 56-58.
- [17] 张志清, 白琦, 湛珺雯, 等. RP-HPLC 法测定功能性饮料水溶性维生素含量[J]. 食品科学, 2010, (14): 212-215.
- Zhang ZQ, Bai Q, Zhan JW, et al. RP-HPLC Determination of Water-soluble Vitamins in Functional Beverages [J]. Food Sci, 2010, (14): 212-215.
- [18] 王荣艳, 贾丽, 钱春燕. HPLC-PDA 法同时测定功能性饮料中 9 种水溶性维生素[J]. 现代科学仪器, 2010, (4): 98-101.
- Wang RY, Jia L, Qian CY. HPLC-PDA Determination 9 Water-soluble Vitamins in Functional Drinks [J]. Mod Sci Instrum, 2010, (4): 98-101.
- [19] 杨玲娟, 谢天柱, 赵素瑞. 离子对反相高效液相色谱法同时测定功能性饮料中的 B 族维生素[J]. 中国酿造, 2009, (8): 140-142.
- Yang LJ, Xie TZ, Zhao SR. Simultaneous determination of vitamins B in functional drinks by Ion-Pair reversed-phase HPLC [J]. China Brewing, 2009, (8): 140-142.
- [20] 王浩, 刘艳琴, 杨红梅, 等. HPLC 法测定功能性饮料中维生素 B₆ 的研究[J]. 食品科技, 2007, (8): 228-230.
- Wang H, Liu YQ, Yang HM, et al. Study on HPLC analysis of VB₆ in functional drinks [J]. Food Sci Technol, 2007, (8): 228-230.
- [21] 徐焯, 顾鑫荣, 张秀娟, 等. 同步荧光法测定功能饮料中维生素 B₂ 和 B₆ 的研究[J]. 分析实验室, 2008, (07): 85-87.
- Xu Y, Gu XR, Zhang XJ, et al. Study on determination of vitamin B₂ and B₆ in functional drink by synchronous fluorometry [J]. Chin J Anal Lab, 2008, (07): 85-87.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



何珊丽, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: sannyl@tom.com