

# 高效液相色谱法测定婴幼儿配方米粉和乳粉中烟酸和烟酰胺含量

胡玉霞<sup>1</sup>, 汪立明<sup>1</sup>, 王静<sup>1</sup>, 徐琴瑶<sup>1</sup>, 章柳柱<sup>1</sup>, 郝云彬<sup>2\*</sup>

(1. 临安市产品质量监测中心, 临安 311300; 2. 江南大学食品学院, 无锡 214122)

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱法测定婴幼儿配方米粉和乳粉中烟酸和烟酰胺的提取分析方法。**方法** 婴幼儿配方米粉和乳粉以 10%甲醇+0.1%磷酸水溶液为提取液, 超声提取, 离心去除杂质, 取上清液并用微孔滤膜(0.2 μm)过滤, 以十二烷基硫酸钠(SDS)缓冲液-乙腈(74:26, V:V)为流动相, 利用高效液相色谱分析, 外标法定量。**结果** 该方法经过验证在 0.20~30 mg/L 质量浓度范围内, 线性关系良好, 烟酸、烟酰胺相关系数大于 0.999, 回收率在 99.07%~110.33%之间, RSD 小于 5%。**结论** 与现行标准方法相比, 本方法前处理方法简单、基质干扰小, 测定结果准确度高、重现性好, 尤其对米粉中烟酸及烟酰胺的提取效率更高, 可用于婴幼儿配方米粉和乳粉中烟酸及烟酰胺含量测定的快速、批量分析。

**关键词:** 烟酸; 烟酰胺; 高效液相色谱法; 米粉; 奶粉

## Determination of nicotinic acid and nicotinamide in infant formula milk powder and rice powder by high performance liquid chromatography

HU Yu-Xia<sup>1</sup>, WANG Li-Ming<sup>1</sup>, WANG Jing<sup>1</sup>, XU Qin-Yao<sup>1</sup>, ZHANG Liu-Zhu<sup>1</sup>, HAO Yun-Bin<sup>2\*</sup>

(1. Lin'an Products Quality Inspection Center, Lin'an 311300, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the detection of nicotinic acid and nicotinamide in infant formula rice powder and milk powder by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Nicotinic acid and nicotinamide in infant formula powder and milk powder were extracted by 10% methanol and 0.1% phosphoric acid solution. After ultrasonic extraction, the samples were centrifuged to remove impurity. Then the extraction was filtered by syringe filter (0.2 μm), measured by HPLC with sodium dodecyl sulfate (SDS) buffer acetonitrile (74:26, V:V) as mobile phase and external standard method was used for quantification. **Results** The method showed a good linearity ranged from 0.20 to 30 mg/L of nicotinic acid and nicotinamide concentration with correlation coefficients above 0.999. The recovery was 99.07%~110.33% and RSD was less than 5%. **Conclusion** Compared with the current standard method, this method is simple, and has low matrix interference, high accuracy, reproducibility, and high extraction efficiency, which is suitable for the rapid and batch determination of nicotinic acid and nicotinamide in infant formula rice powder and milk powder.

**KEY WORDS:** nicotinic acid; nicotinamide; high performance liquid chromatography; rice powder; milk powder

\*通讯作者: 郝云彬, 高级工程师, 主要研究方向为水产品质量安全。E-mail: yunbinhao@163.com

\*Corresponding author: HAO Yun-Bin, Senior Engineer, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China. E-mail: yunbinhao@163.com

## 1 引言

烟酸和烟酰胺统称为维生素 B<sub>3</sub>, 是人体必需的维生素之一, 在人体生长、代谢、发育过程中发挥着重要的作用<sup>[1-3]</sup>。烟酸和烟酰胺有同样的生理功能, 烟酸在人体内转化为烟酰胺, 烟酰胺是辅酶 I 和辅酶 II 的组成部分, 而辅酶 I、辅酶 II 是许多脱氢酶的辅酶, 在体内氧化还原反应中起着传递氢的作用, 它与糖酵解, 脂肪代谢, 丙酮酸代谢, 高能磷酸键的生成有密切关系, 并在维持皮肤和消化器官正常功能中起着重要作用<sup>[4-9]</sup>。烟酸和烟酰胺是婴幼儿配方米粉和乳粉中重要的营养成分, 它与蛋白质的代谢及儿童智力发育关系密切, 对婴幼儿成长发育起着重要作用<sup>[10-12]</sup>。GB 10765-2010《食品安全国家标准 婴儿配方食品》规定烟酸(烟酰胺)在婴儿配方食品中的限量为 70~360 g/100 kJ, GB10767-2010《食品安全国家标准 较大婴儿和幼儿配方食品》规定烟酸(烟酰胺)在较大婴儿和幼儿配方食品中的含量最小值为 110 g/100 kJ<sup>[13,14]</sup>。因此, 在婴幼儿配方米粉和乳粉中, 生产商会添加烟酸、烟酰胺等多种维生素以满足婴幼儿营养需要<sup>[15]</sup>。为确保婴幼儿配方米粉和乳粉中添加的维生素符合产品标准要求, 保障消费者利益, 有必要研究建立快速、高效、准确的配方米粉和乳粉中烟酸和烟酰胺含量检测方法。

目前, 食品中烟酸和烟酰胺的检测方法主要包括超临界流体色谱法<sup>[16]</sup>、离子色谱法<sup>[17]</sup>、液相色谱法<sup>[18]</sup>、高效液相色谱法<sup>[19-21]</sup>、液相色谱串联质谱法<sup>[22, 23]</sup>和微生物法<sup>[24, 25]</sup>等。液相色谱法由于具有灵敏度高、定量准确等优点, 成为近年来应用较为广泛的检测方法<sup>[26]</sup>, 我国国家标准 GB 5413.15 采用高效液相色谱法作为检测婴幼儿食品和乳品中烟酸和烟酰胺的第一测定方法。但是在实际应用检测中发现, 现有国标检测方法的样品前处理采用 2 次调 pH, 耗时, 不利于大批量样品的检测, 且保留时间易偏离、峰形较差, 影响定量的准确性。尽管有研究者开发了固相萃取的样品前处理方法配合液相色谱分析以提升样品前处理效率, 但检测成本的提升制约了食品检验的大范围覆盖<sup>[27]</sup>。因此, 为简化样品前处理过程、提高样品前处理效率、确保检测结果准确可靠, 满足现行婴幼儿配方奶粉及米粉中烟酸和烟酰胺的批量检测要求, 本研究采用高效液相色谱法, 通过对影响提取效率的主要因素进行研究, 建立一种适用于配方

米粉和乳粉中烟酸、烟酰胺的检测方法, 进一步完善国家标准关于配方米粉和乳粉中烟酸、烟酰胺的检测方法。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

LC-20AD 液相色谱仪(配有四元低压泵 LC-20AD, 自动进样器 SIL-20A, 柱温箱 CTO-20A, 二极管阵列检测器 SPD-M20A, 日本岛津公司); DS-5510DTH 超声提取仪(40 KHZ, 上海珂准仪器有限公司); DK-S24 电热恒温水浴锅(上海森信实验仪器有限公司); Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司); Sartorius PB-10 酸度计(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司)。

乙腈、甲醇(均为色谱纯, 美国天地公司); 磷酸、乙醇、丙酮(均为分析纯, 杭州华东医药公司); 淀粉酶(杭州华东医药公司); 婴幼儿配方米粉、配方奶粉购于市场(杭州世纪联华超市); 标准品: 烟酸、烟酰胺(上海安谱公司)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 样品前处理

称取 1.5~2 g(精确到 0.0001g)样品于 50 mL 容量瓶中, 米粉样品需加入 2 g/100 mL 的淀粉酶 5.0 mL, 60 °C 水浴酶解 1 h 待用。奶粉样品无需酶解。加入提取液(10%甲醇+0.1%磷酸水溶液)25 mL, 超声提取 10 min, 提取液定容, 摇匀, 12000 r/min 离心 5 min, 0.22 μm 有机膜过滤后, HPLC 分析。

#### 2.2.2 色谱条件

色谱柱 GL Wondasil™ C<sub>18</sub>(250mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 35 °C, 流动相为十二烷基硫酸钠磷酸缓冲液: 乙腈(74:26, V:V), 流速 1.0 mL/min, 检测波长: 261 nm, 进样量: 20 μL。

## 3 结果与讨论

### 3.1 样品称样量的影响

本方法流动相采用十二烷基硫酸钠磷酸缓冲液与乙腈等度洗脱的方式, 在分析中发现样品中烟酰胺的峰形易受到称样量的影响。依照 2.2.1 中的处理提取稀释样品, 样品定容量都是 50 mL 时, 取样量增至 3 g, 形成劈叉峰, 甚至成为 2 个色谱峰, 且保留时间与标样相比偏离 20%左右, 当待测样品中烟酰胺含量较高

时, 其结构式中 $-NH_2$  在色谱柱中拖展, 形成分叉峰; 取样量 1.5~2 g, 检测时可产生对称的色谱峰, 保留时间偏离 2%以内, 有利于提高定量的准确性。

### 3.2 提取试剂的影响

烟酸和烟酰胺均为水溶性维生素, 在提取液中加入一定比例的有机溶剂, 有利于样品中蛋白质的沉淀。本实验选择了乙腈、乙醇、甲醇及丙酮进行了提取效率的比较, 均采用体积比 10%、磷酸含量 0.1% 的水溶液作为提取液, 按照 2.2.1 进行处理, 并与现有国家标准 GB 5413.15-2010 进行了比较。结果如图 1 所示, 不同提取溶剂对奶粉中烟酰胺的含量测定结果无显著差别, 并与标准提取方法结果吻合。但对米粉测定时发现, 添加不同有机溶剂时测得的含量均高于标准方法, 且甲醇的提取效果最佳。一方面本方法称量小有利于烟酰胺充分提取, 另外该方法可能更利于米粉中天然烟酰胺的提取。

选择甲醇比例为 0~60%, 考察不同甲醇比例对样品中烟酸及烟酰胺提取效率的影响。结果发现, 提取液中不加甲醇时, 奶粉及米粉中烟酸及烟酰胺的提取率 85%以上, 但蛋白质沉淀效果差, 离心后仍为

乳浊液。甲醇比例为 10%时, 可实现蛋白质沉淀及烟酰胺的充分提取。甲醇比例大于 40%时, 由于提取液极性太强, 烟酰胺的提取受到抑制, 提取率有所降低。

### 3.3 磷酸比例的影响

本实验采用磷酸酸解蛋白, 选择 0~1%的磷酸比例, 考察了不同磷酸含量对样品中烟酸及烟酰胺提取效率的影响。由于奶粉及米粉样品中的部分烟酰胺被蛋白质包埋, 采用 10%甲醇水溶液烟酰胺的提取率为 90%, 当磷酸比例为 0.1%时奶粉及米粉中的蛋白质可完全酸解释放出包埋的烟酰胺。随着磷酸比例的增加, 蛋白质的沉淀效果没有明显改善。

### 3.4 方法学评价

将烟酸及烟酰胺配制成系列标准混合液, 对方法的线性范围、检出限、精密度和回收率等指标进行评价, 并在奶粉样品中添加 3 组不同浓度水平的烟酸和烟酰胺混合标准工作液, 按实验方法进行样品处理和测定, 考察其回收率, 对加标样重复测定 6 次, 考察方法的精密度, 结果如表 1 所示。图 2~4 分别为标准样品、奶粉样品及米粉样品的色谱图。

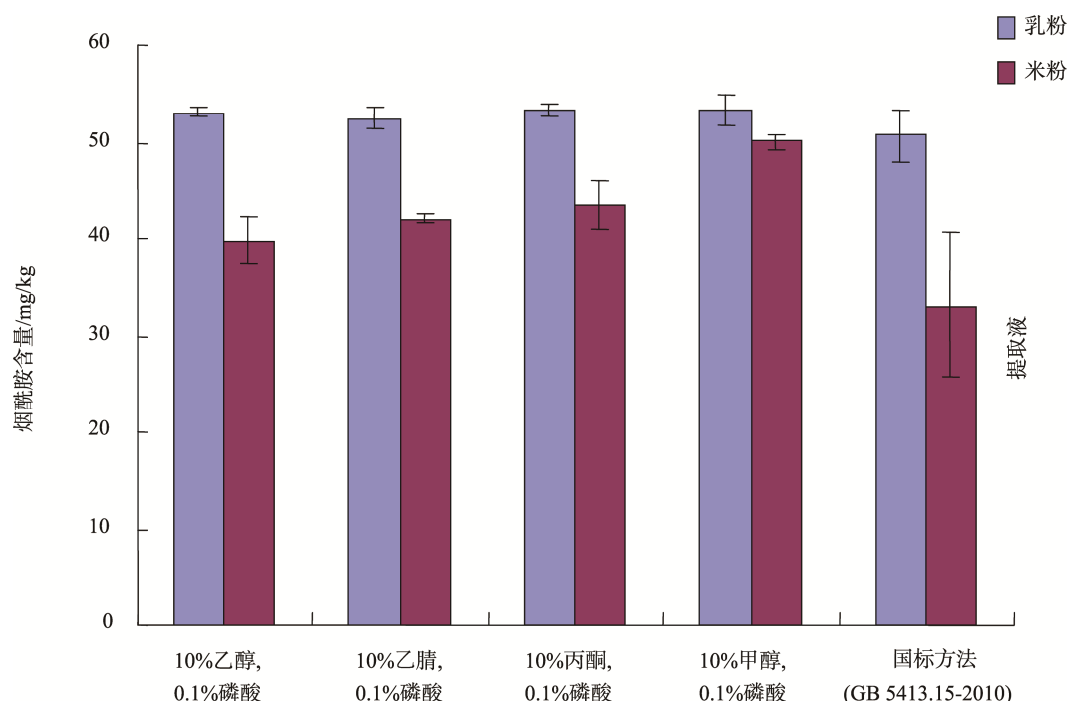


图 1 不同的溶剂对奶粉和米粉提取率对比图( $n=3$ )

Fig. 1 Comparison of different solvents on extraction rate of milk powder and rice powder ( $n=3$ )

表 1 烟酸和烟酰胺的线性范围, 线性方程, 相关系数, 回收率, 定量限( $n=6$ )  
Table 1 The linear range, linear equation, correlation coefficient, recovery rate, and limit of quantitation of nicotinic acid and nicotinamide. ( $n=6$ )

	线性范围(mg/L)	线性方程	相关系数 $r^2$	定量限(mg/kg)
	0.20~30	$Y=31240.8X+9770.9$	0.9995	0.40
烟酸	样品本底(mg/100 g)	加标浓度(mg/100 g)	回收率/%	RSD/%
		3.00	107.10	2.6
	ND	9.00	110.33	3.7
		15.00	101.25	4.4
	线性范围(mg/L)	线性方程	相关系数 $r^2$	定量限(mg/kg)
	0.20~30	$Y=31441.1X+7264.5$	0.9998	0.40
烟酰胺	样品本底(mg/100 g)	加标浓度(mg/100 g)	回收率/%	RSD/%
		5.00	104.52	3.6
	5.20	15.00	99.07	4.2
		25.00	103.22	4.0

备注: ND 表示未检出

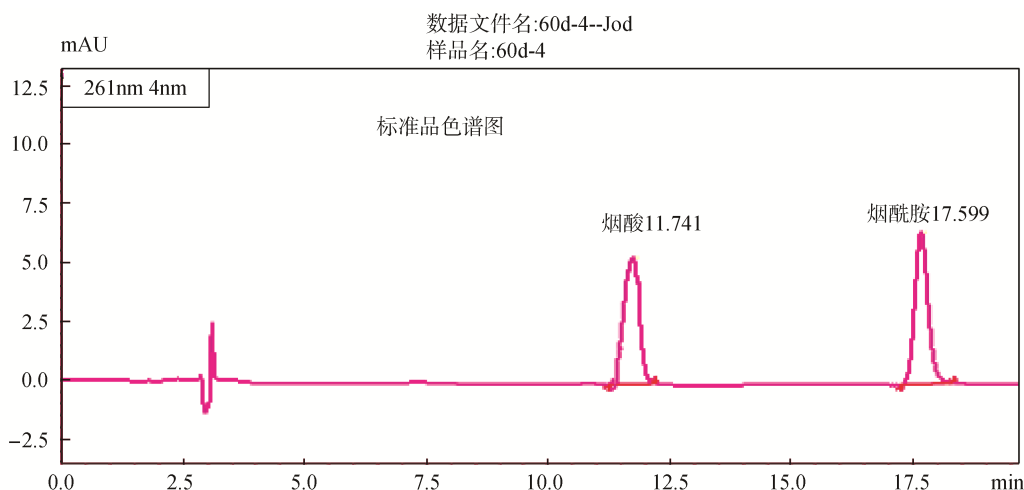


图 2 标准品的色谱图

Fig.2 Chromatogram of standard samples

### 3.5 实际样品的检测

分别采用本方法与标准方法对 6 批米粉样品和 6 批奶粉样品进行检测, 并与标签标识进行比较。如表 2 所示。采用本方法提取奶粉中的烟酸和烟酰胺时, 奶粉样品中的烟酸或烟酰胺含量相对于标签标识偏差 1.3%~60.6%之间; 采用标准方法提取时, 奶粉样品中的烟酸或烟酰胺含量相对于标签标识偏差在 0%~53.6%之间。采用本方法检测米粉样品时, 米粉

样品中的烟酸或烟酰胺含量相对于标签标识偏差 25.8%~62.7%之间; 采用标准方法提取时, 米粉样品中的烟酸或烟酰胺含量相对于标签标识偏差在 -14.3%~30.7%之间。由于大米中本身就含有一定量的烟酸和烟酰胺<sup>[10,11]</sup>, 标签标识所示含量仅是人为添加的烟酸或烟酰胺含量, 没考虑大米本身含有量, 故用自提方法测定的米粉中的烟酸或烟酰胺含量明显高于标准方法是合理的, 更接近真实值。

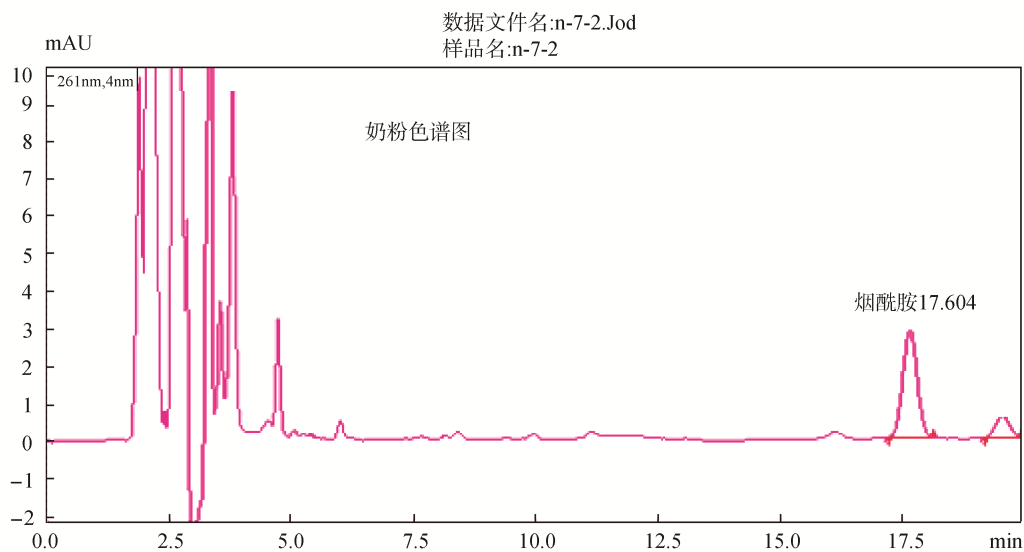


图 3 奶粉样品的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of milk powder samples

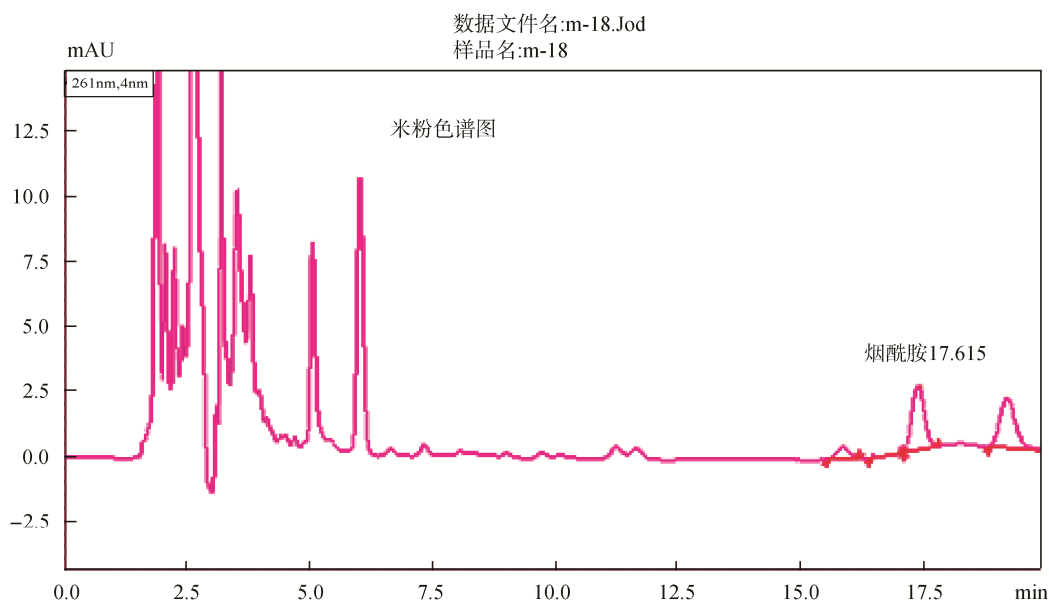


图 4 米粉样品的色谱图

Fig. 4 Chromatogram of rice flour samples

表 2 实际样品检测结果( $n=6$ )Table 2 Detection results of real samples ( $n=6$ )

样品	烟酸和烟酰胺含量 mg/100 g			
	标签标识	本方法	标准方法	
米粉	1	3.00±0.12	4.78±0.14	2.57±0.09
	2	3.00±0.09	3.88±0.22	2.59±0.14
	3	4.00±0.11	4.88±0.09	4.39±0.10
	4	3.00±0.08	3.89±0.11	3.33±0.11
	5	4.00±0.05	5.03±0.12	4.14±0.20
	6	3.00±0.10	4.88±0.11	3.92±0.15

续表 2

样品	烟酸和烟酰胺含量 mg/100 g			
	标签标识	本方法	标准方法	
奶粉	1	4.00±0.10	5.20±0.13	5.11±0.10
	2	3.60±0.15	3.85±0.08	3.77±0.14
	3	3.30±0.11	5.30±0.11	5.07±0.22
	4	3.60±0.17	4.48±0.22	4.33±0.22
	5	3.80±0.09	4.43±0.30	4.40±0.09
	6	4.69±0.09	4.81±0.08	4.75±0.14

备注: 米粉 1~6, 奶粉 4、6 标签标注均为烟酸, 表 2 测得值均为烟酰胺含量, 烟酸均未检出

## 4 结 论

通过自提方法检测米粉及奶粉中的烟酸、烟酰胺, 对样品称样量, 流动相, 提取试剂、比例, 超声时间等进行了优化, 并与现有的国家标准 GB 5413.15-2010 的检测结果进行比较。本试验建立的测定米粉及奶粉中烟酸、烟酰胺的检测方法具有前处理提取过程更简单, 使用的流动相柱压低, 对色谱柱损害小的优点。该方法经过验证在 0.20~30 mg/L 质量浓度范围内, 线性关系良好, 烟酸、烟酰胺相关系数分别为 0.9995 和 0.9998, 低、中、高 3 个质量浓度的加标回收率在 99.07%~110.33% 之间, RSD 小于 5%, 满足方法学要求, 适用于奶粉和米粉中烟酸、烟酰胺含量的测定。

### 参考文献

- [1] 姜培珍, 蔡美琴, 郭红卫. 营养失衡与健康[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.  
Jiang PZ, Cai MQ, Guo HW. Nutritional imbalance and health [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004.
- [2] Grundy SM, Mok HY, Zech L, *et al.* Influence of nicotinic acid on metabolism of cholesterol and triglycerides in man[J]. *J Lipid Res*, 1981, 22(1): 24-26.
- [3] Moreschi ECP, Matos JR, Almeida-Muradian LB. Thermal analysis of vitamin PP Niacin and Niacinamide [J]. *J Therm Anal Calorim*, 2009, 98(1): 161-164.
- [4] Katrina L, Bogan, Charles B. Nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinamide riboside: a molecular evaluation of NAD<sup>+</sup> precursor vitamins in human nutrition [J]. *Annu Rev Nutr*, 2008, 28: 115-130.
- [5] 玛丽·麦高恩, 乔·麦高恩. 降低胆固醇 50 法[M]. 雷丽萍, 译. 北京: 新华出版社, 2004.  
Mcgowan M, McGowan J. The 50 methods of lowering cholesterol [M]. Lei LP, trans. Beijing: Xinhua Press, 2004.
- [6] Ohashi R, Mu H, Wang X, *et al.* Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis [J]. *J Assoc Physic*, 2005, 98(12): 845-856.
- [7] Ahsehl R, Hoffer A, Stephen JD. Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man [J]. *Archives Biochem*, 1955, 54(2): 558-559.
- [8] Carlson LA. Nicotinic acid: the broad-spectrum lipid drug. A50th anniversary review [J]. *J Int Med*, 2005, 25(8): 194-114.
- [9] Revollo JR, Grimm AA, Imai S. The regulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis by Nampt/PBEW/visfatin in mammals [J]. *Curt Opin Gastroenterol*, 2007, 23(2): 164-170.
- [10] 高言诚. 营养学[M]. 北京: 北京体育大学出版社, 2006.  
Gao YC. Nutrition [M]. Beijing: Beijing Sport University Press, 2006.
- [11] Luo QF, Sun L, Du GH, *et al.* Progress in new drugs targeting reverse cholesterol transport [J]. *J Chin Pharmacol Bull*, 2006, 122(8): 904-907.
- [12] Kenneth M, Zhao ZC. Nicotinamide: necessary nutrient emerges as anovel cytoprotectant for the brain [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2003, 24(5): 228-232.
- [13] GB 10765-2010 食品安全国家标准 婴儿配方食品[S].  
GB 10765-2010 National food safety standard infant formula [S].
- [14] GB 10767-2010 食品安全国家标准 较大婴儿和幼儿配方食品 [S].  
GB 10767-2010 National food safety standard older infants and young children formula [S].
- [15] 霍艳敏, 王艳丽, 王骏, 等. 高效液相色谱法测定婴幼儿乳粉中烟酰胺的不确定度评定[J]. *食品科学*, 2011, 32(16): 330-333.  
Huo YM, Wang YL, Wang J, *et al.* Uncertainty evaluation for nicotinamide determination in infant formula milk powder by high performance liquid chromatography [J]. *Food Sci*, 2011, 32(16): 330-333.
- [16] 郭亚东. 超临界流体色谱同时测定维生素 B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> 和烟酰胺[J].

- 色谱, 2003, 21(6): 603–605.
- Guo YD. Simultaneous determination of riboflavin, nicotinic acid and nicotinamide by supercritical fluid chromatography [J]. Chin J Chromatogr, 2003, 21(6): 603–605.
- [17] Saccaia G, Tanzia E, Mallozzia E, *et al.* Determination of niacin in fresh and dry cured pork products by ion chromatography: experimental design approach for the optimisation of nicotinic acid separation [J]. Food Chem, 2005, 92(2): 373–379.
- [18] Manuela P, Emilia M, Silvia R, *et al.* Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry assay for determination of nicotine and metabolites, caffeine and arecoline in breast milk [J]. Rapid Commun Mass Spectr, 2007, 21(16): 2693–2703.
- [19] Tania S, Agostini HT. Simultaneous determination of nicotinamide, nicotinic acid, riboflavin, thiamin, and pyridoxine in enriched Brazilian foods by HPLC [J]. J High Res Chromatogr, 1997, 20(4): 245–248.
- [20] Lahély S, Bergaentzlé M, Hasselmann C. Fluorimetric determination of niacin in foods by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization [J]. Food Chem, 1999, 65(1): 129–133.
- [21] 樊继鹏, 徐振东, 陈军, 等. 高效液相色谱法同时测定乳粉中烟酸、烟酰胺和维生素 B<sub>6</sub>[J]. 包装与食品机械, 2015, 33(3): 66–69.
- Fan JP, Xu ZD, Chen J, *et al.* HPLC determination of niacin, nicotinamide and itamin B6 in milk power [J]. Pack Food Mach, 2015, 33(3): 66–69.
- [22] Roman L, Erkan FY, Rudolf E, *et al.* Quantitative Investigation of trigonelline, nicotinic acid, and nicotinamide in foods, urine, and plasma by means of LC-MS/MS and stable isotope dilution analysis [J]. Food Chem, 2008, 56 (23): 11114–11121.
- [23] Daniel P, Carmen MD, Adriana F. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography–mass spectrometry [J]. Food Chem, 2008, 110(4): 1030–1035.
- [24] Tadashi M, Isao K, Shuichi S. Rapid determination of nicotinic acid by immobilized lactobacillus arabinosus, 1978, 99(2): 233–239.
- [25] GB 5413.15-2010 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中烟酸和烟酰胺的测定[S].
- GB 5413.15-2010 National food safety standard determination of vitamin niacin and niacinamide in foods for infants and young children, milk and milk products [S].
- [26] Mu GF, Luan F, Liu HT, *et al.* Use of experimental design and artificial neural network optimization of capillary electrophoresis for the determination of nicotinic acid andnicotinamide in food compared with high-performance liquid chromatography [J]. Food Anal Methods. 2013, (6): 191–200.

(责任编辑: 金延秋)

### 作者简介



胡玉霞, 工程师, 主要研究方向为食品安全与营养。

E-mail: hyzxf@163.com



郝云彬, 高级工程师, 主要研究方向为水产品质量安全。

E-mail: yunbinhao@163.com