

紫外串联荧光检测法测定奶昔中 维生素 B₆ 和烟酰胺

邱清莲, 黄成安, 梁嘉敏, 秦菁, 魏鲜娥*

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519000)

摘要: **目的** 建立紫外串联荧光检测法同时快速检测奶昔中维生素 B₆ 和烟酰胺的分析方法。**方法** 参照 GB 5009.154-2016《食品中维生素 B₆ 的测定》和 GB 5009.89-2016《食品中烟酸和烟酰胺的测定》, 采用带有紫外检测器和荧光检测器的高效液相色谱仪快速检测奶昔中维生素 B₆ 和烟酰胺。**结果** 该方法的准确度偏差 < 15%, 线性相关系数 > 0.99, 重复性和稳定性均符合标准要求, 平均回收率在 95%~105%之间, 均符合标准 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范食品理化检测》中的要求, 且目标峰分离效果更好, 效率提升 49.5%。**结论** 该方法的检测效率和分离效果较好, 符合标准要求。

关键词: 维生素 B₆; 烟酰胺; 串联法; 紫外检测法; 荧光检测法

Determination of vitamin B₆ and nicotinamide in milk shake by ultraviolet tandem fluorescence method

QIU Qing-Lian, HUANG Cheng-An, LIANG Jia-Min, QIN Jing, WEI Xian-E*

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for rapid and simultaneous determination of vitamin B₆ and nicotinamide in milk shake by ultraviolet tandem fluorescence method. **Methods** According to GB 5009.154-2016 *Determination of vitamin B₆ in foods* and GB 5009.89-2016 *Determination of niacin and nicotinamide in foods*, vitamin B₆ and nicotinamide in milk shake was determined by high performance liquid chromatography with UV detector and fluorescence detector. **Results** The accuracy deviation of this method was less than 15%, and the linear correlation coefficient was more than 0.99. The repeatability and stability were in line with the standard requirements, and the average recovery rate was between 95%-105%, which met the requirements of the standard GB/T 27404-2008 *Laboratory quality control standard for food physical and chemical testing*. The separation of target peaks was better, and the efficiency was increased by 49.5%. **Conclusion** The established method has better efficiency and separation effect, which can meet the standard requirements.

KEY WORDS: vitamin B₆; nicotinamide; tandem method; ultraviolet detection; fluorescence detection

1 引言

维生素 B₆(vitamin B₆)又称吡哆素, 其包括吡哆醇、吡哆醛及吡哆胺, 是一种水溶性维生素, 遇光或碱易被破坏,

不耐高温。维生素 B₆ 为人体内某些辅酶的组成成分, 参与多种代谢反应, 尤其与氨基酸代谢关系密切, 缺乏维生素 B₆, 一般会引起食欲不振、食物利用率低、失重、呕吐、下痢等。严重时会出现粉刺、贫血、关节炎、小孩痉挛、

*通讯作者: 魏鲜娥, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 176019964@qq.com

*Corresponding author: WEI Xian-E, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519000, China. E-mail: 176019964@qq.com

忧郁、头痛、脱发、易发炎、学习障碍、衰弱等症状^[1-3]。

烟酰胺(nicotinamide)又称尼克酰胺,是烟酸的酰胺化合物。在水或乙醇中易溶,在甘油中溶解。体内缺乏烟酰胺时会引起糙皮病,因此烟酰胺可预防糙皮病。烟酰胺在蛋白质和糖的新陈代谢中起作用,可改善人类和动物的营养。在化妆品中可作为营养性添加剂。此外还用于医药及食品、饲料添加剂^[4-6]。

缺乏维生素 B₆ 和烟酰胺都会引起一些病症,因此对维生素 B₆ 和烟酰胺的含量测定尤为重要。现检测维生素 B₆ 的方法主要有 GB 5009.154-2016《食品中维生素 B₆ 的测定》^[7]、GB 14753-2010《食品添加剂中维生素 B₆ 的测定》^[8]、GB 7298-2017《饲料添加剂中维生素 B₆ 的测定》^[9]、GB/T 33309-2016《化妆品中维生素 B₆ 的测定》^[10]、SN/T 0549-1996《出口蜂王浆及干粉中维生素 B₆ 的测定》^[11]。现测定烟酰胺的方法有 GB 5009.89-2016《食品中烟酸和烟酰胺的测定》^[12]、GB/T 5009.197-2003《保健食品中盐酸硫胺素、盐酸吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因的测定》^[13]、GB 7301-2017《饲料添加剂中烟酰胺的测定》^[14]、GB/T 29664-2013《化妆品中烟酸、烟酰胺的测定》^[15]、NY/T 2130-2012《饲料中烟酰胺的测定》^[16]、DB37/T 2140-2012《预混合饲料中维生素 B₁、B₂、B₆ 和烟酰胺的同步测定》^[17]。

上述测定维生素 B₆ 和烟酰胺的方法主要是滴定法、高效液相色谱法、荧光检测法和高效液相色谱串联质谱法,其中滴定法主要用于测定原料中的维生素 B₆ 和烟酰胺,而不适用于食品。在现有的方法当中,高效液相色谱法和高效液相色谱串联质谱法都只能单独检测维生素 B₆ 或烟酰胺中的一种成分,检测效率较低。本研究采用紫外串联荧光检测法同时检测维生素 B₆ 和烟酰胺,检测效率高,检测结果的线性、重复性、回收率、稳定性以及准确度偏差均符合标准要求,为快速、同时检测维生素 B₆ 和烟酰胺提供了技术支持。

2 材料与方 法

2.1 实验材料

蛋白纤维营养奶昔(固体饮料,榛子味,批号 20190201A、20190202A、20181101A)(汤臣倍健股份有限公司),其维生素 B₆ 和烟酰胺的理论含量计算见表 1。

2.2 试 剂

盐酸、氢氧化钠、磷酸(分析纯,广州化学试剂厂);乙腈(色谱纯,美国 Sigma 公司);癸烷磺酸钠(色谱纯,天津市光复精细化工研究所)。

2.3 实验仪器

XP 205 电子天平[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司];Agilent1200 高效液相色谱仪(附紫外检测器和荧光

检测器,美国安捷伦科技有限公司);P180H 超声波清洗器(德国 ELMA 公司);TGL-10C 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);PH 计(上海雷磁仪器有限公司)。

表 1 样品中维生素 B₆ 和烟酰胺理论投料量计算表
Table 1 Calculation table of the theoretical dosage of vitamin B₆ and nicotinamide in the sample

蛋白纤维营养奶昔原料名称	投料量/(30 g)	维生素 B ₆ 理论含量/(mg/100 g)
维生素 B ₆ (盐酸吡哆醇)	0.00057	
A	0.075	1.9
烟酰胺	0.006	
B	0.00743	
C	0.141	烟酰胺理论含量(mg/100 g)
D	9.07	
E	20.7	20
总量	30	

2.4 实验方法

2.4.1 维生素 B₆ 和烟酰胺检测方法

1) 标准溶液的配制

准确称取烟酰胺标准品 16.43 mg,置于 100 mL 容量瓶中,用 0.1 mol/L 盐酸溶解,定容至刻度,混匀,参照 GB 5009.89-2016 附录 B 的方法进行标准品校准,作为烟酰胺母液。

准确称取维生素 B₆ 标准品 25.17 mg,置于 50 mL 容量瓶中,用 0.1 mol/L 盐酸溶解,定容至刻度,混匀,用标准品纯度计算浓度,作为维生素 B₆ 母液。

准确吸取烟酰胺母液 10.00 mL 和维生素 B₆ 母液 1.00 mL 于同一 100 mL 容量瓶中,用 0.1 mol/L 盐酸溶解,定容至刻度,作为中间混标液。

2) 样品处理步骤

称取试样约 4 g 于 100 mL 烧杯,加入约 40 mL 45~50 °C 的水,搅拌均匀,置于超声波振荡器中振荡约 10 min 以上充分溶解,静置冷却至室温。用 5.0 mol/L 盐酸溶液和 0.1 mol/L 盐酸溶液调节试样溶液的 pH 至(1.7±0.1),放置约 2 min 后,再用 5.0 mol/L 氢氧化钠溶液和 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调节试样溶液的 pH 至(4.5±0.1),置于 50 °C 水浴超声波振荡器中振荡 10 min 以上充分提取,冷却至室温后转至 100 mL 容量瓶中,定容,摇匀。试样转移至 50 mL 离心管,8000 r/min 离心 5 min。滤液再经 0.45 μm 微孔滤膜加压过滤,即为试样测定液。

3) 参考液相色谱条件

色谱柱: C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)或具有同等性能的色谱柱;柱温: 30 °C;紫外检测器: 检测波长为 261 nm;

荧光检测器: 激发波长 293 nm, 发射波长 395 nm; 流动相: 癸烷磺酸钠 1.22 g 加水 850 mL, 加磷酸 1 mL, 加乙腈 15 mL; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μ L。

4) 试样维生素 B₆ 和烟酰胺含量计算

$$X = \frac{C \times V \times 100}{m}$$

式中:

X ——试样中维生素 B₆ 或烟酰胺的含量, mg/100 g;

C ——试样待测液中维生素 B₆ 或烟酰胺的浓度, mg/mL;

V ——试样溶液的体积, mL;

m ——试样的质量, g。

2.4.2 线性范围确认

分别吸取 5.034 μ g/mL 维生素 B₆ 和 16.41 μ g/mL 烟酰胺标准液制成 5 个对照浓液, 对照溶液浓度见表 2。

表 2 对照溶液维生素 B₆ 和烟酰胺浓度($n=5$)
Table 2 Concentration of control solution of vitamin B₆ and nicotinamide($n=5$)

对照溶液	维生素 B ₆ 浓度 (μ g/mL)	烟酰胺浓度 (μ g/mL)
1	0.2517	0.8205
2	0.5034	1.641
3	1.2585	4.1025
4	2.013	6.564
5	3.7755	12.307

对照溶液经 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤, 进样量为 20 μ L, 以浓度 C (μ g/mL) 为横坐标, 峰面积 A 为纵坐标, 绘制标准工作曲线。

2.4.3 重复性测定

以批号为 20190202A 的蛋白纤维营养奶昔为例, 称取相同质量的样品, 共 6 份, 按 2.4.1 的方法处理样品, 测定样品中维生素 B₆ 和烟酰胺的含量, 计算其相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

2.4.4 稳定性测定

以 2.517 μ g/mL 维生素 B₆ 和 8.205 μ g/mL 烟酰胺标准品为例, 进样量为 20 μ L; 考察 0、1、2、4、8、12 h 溶液维生素 B₆ 和烟酰胺的峰面积变化, 计算其相对标准偏差 RSD。

2.4.5 回收率测定

加标样品的处理: 以批号为 20190202A 的蛋白纤维营养奶昔为例, 精密称取约 4 g 样品 9 份, 置于 100 mL 烧杯中, 分成 3 组, 每组 3 份, 分别加入 0.0925 mg/mL 维生素 B₆ 和 0.9292 mg/mL 烟酰胺标准品溶液 0.8、1.0、1.2 mL, 按 2.4.1 的方法处理样品, 测定样品中维生素 B₆ 和烟酰胺的加标量。

测得对照品投入量=加标样品测得量-样品测得量

回收率(%)=测得对照品投入量/投入量 \times 100。

3 结果与分析

3.1 新方法的测定结果与产品理论含量进行比对

取蛋白纤维营养奶昔(批号 20190201A、20190202A、20181101A)为样品, 称样量为 4 g, 按照 2.4.1 的方法进行处理样品, 测定其维生素 B₆ 和烟酰胺的含量, 测定结果如表 3。

从表 3 中数据中可以看出, 样品中维生素 B₆ 和烟酰胺的测定结果与样品中维生素 B₆ 和烟酰胺的理论计算结果的标准偏差均 < 15%, 符合 GB/T 27404-2008 《实验室质量控制规范 食品理化检测》的要求^[18](当含量满足 1 mg/100 g < $X \leq 100$ mg/100 g 时, 检测结果的准确度偏差 < 15%)。

3.2 紫外串联荧光检测法方法学验证

3.2.1 线性范围确认

维生素 B₆ 和烟酰胺的线性范围如表 4 和表 5。其相关系数分别为 0.99997 和 0.99999, 即采用该方法测定维生素 B₆ 和烟酰胺的含量, 维生素 B₆ 在 0.25~3.77 μ g/mL 浓度范围之间呈现良好的线性, 烟酰胺在浓度为 0.82~8.20 μ g/mL 之间呈现良好的线性, 符合 GB/T27404-2008 《实验室质量控制规范》的要求(GB/T 27404-2008 要求相关系数 $r^2 \geq 0.99$)。

表 3 新方法的测定结果与产品理论含量进行比对($n=6$)
Table 3 Comparison of the measured results of the new method with the theoretical content of the product ($n=6$)

项目名称	批号	样品测定含量 (mg/100 g)	理论含量 (mg/100 g)	准确度偏差/%	准确度偏差标准/%	结论
烟酰胺	20190201A	21.8	20	9.0	< 15	符合规定
	20190202A	19.6		2.0		符合规定
	20181101A	20.2		1.0		符合规定
维生素 B ₆	20190201A	1.8	1.9	5.3	< 15	符合规定
	20190202A	1.8		5.3		符合规定
	20181101A	1.9		0		符合规定

表4 维生素B₆线性范围确认数据(n=5)Table 4 Confirmation data of linear range of vitamin B₆ (n=5)

标准序号	维生素B ₆ 浓度/(μg/mL)	维生素B ₆ 峰面积(A)
STD1	0.2517	9.008
STD2	0.5034	18.699
STD3	1.2585	44.703
STD4	2.0136	72.040
STD5	3.7755	133.496
线性方程	A=35334.8C+0.3735	
相关系数(r ²)	0.99997	

表5 烟酰胺线性范围确认数据(n=5)

Table 5 Confirmation data of linear range of nicotinamide(n=5)

标准序号	烟酰胺浓度/(μg/mL)	烟酰胺峰面积(A)
STD1	0.8205	39.066
STD2	1.641	75.490
STD3	4.1025	190.752
STD4	6.564	303.696
STD5	8.205	571.480
线性方程	A=46395.6C+0.6494	
相关系数(r ²)	0.99999	

表6 重复性实验结果(n=6)

Table 6 Results of repeatability experiment (n=6)

	序号	称样量/g	浓度/(mg/mL)	含量/(mg/100 g)	平均含量/(mg/100 g)	RSD/%	标准要求/%
烟酰胺	1	4.0364	0.00782421	19.38	19.4	0.7	3.8
	2	4.0653	0.00781504	19.22			
	3	4.1065	0.00789767	19.23			
	4	4.0653	0.00786963	19.35			
	5	4.0211	0.00783965	19.49			
	6	4.0165	0.00785548	19.55			
维生素B ₆	1	4.0364	0.00073553	1.82	1.8	2.5	5.3
	2	4.0653	0.000746256	1.83			
	3	4.1065	0.00073008	1.77			
	4	4.0653	0.00072635	1.78			
	5	4.0211	0.000748024	1.86			
	6	4.0165	0.000760887	1.89			

表7 稳定性实验(n=6)

Table 7 Stability test (n=6)

稳定性(峰面积)	0 h	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	平均值	RSD/%
烟酰胺(mAU)	381.705	381.268	380.948	381.820	384.780	382.073	382.099	0.4
维生素B ₆ (mAU)	91.116	89.197	89.461	89.227	88.816	89.7	89.5862	0.9

3.2.2 重复性测定

6份样品中维生素B₆和烟酰胺的平均含量分别为1.8 mg/100 g和19.4 mg/100 g, RSD分别为2.5%和0.7%,其RSD分别小于5.3%和3.8%,表明该方法重复性良好(见表6)。符合GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范》的要求(GB/T 27404-2008要求当含量满足1 mg/100 g < X ≤ 10 mg/100 g时,检测结果的RSD ≤ 5.3%;当含量满足10 mg/100 g < X ≤ 100 mg/100 g时,检测结果的RSD ≤ 3.8%)。

3.2.3 稳定性实验

将维生素B₆和烟酰胺标准品分别在室温下放置0、1、2、4、8、12 h时, RSD分别为0.9%和0.4%(见表7),表明维生素B₆和烟酰胺标准品溶液在室温下12 h内的稳定性良好。

3.2.4 回收率测定

当加标为80%、100%和120%时,样品中维生素B₆和烟酰胺的平均回收率分别为98.8%和100.8%,相对标准偏差(RSD)分别为4.8%和3.1%(见表8),符合GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范》的要求(当含量满足0.1 mg/100 g < X ≤ 10 mg/100 g时,回收率为90%~110%;当含量满足10 mg/100 g < X时,回收率为95%~105%)。

表 8 加标回收率实验结果(n=3)
Table 8 Spiked recovery rate experiment results (n=3)

项目名称	加标量	称样量 M/g	测定浓度 C/(mg/mL)	测得标准品加入量/mg	理论标准品加入量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
烟酰胺	80%加标	4.1483	0.015557	0.74261	0.74336	99.89	100.8	3.1
		4.0108	0.015215	0.73541	0.74336	98.93		
		4.1062	0.015236	0.71874	0.74336	96.68		
		4.3529	0.018115	0.95835	0.9292	103.13		
	100%加标	4.1246	0.017215	0.91311	0.9292	98.26		
		4.1063	0.017285	0.92367	0.9292	99.40		
		4.1032	0.019379	1.13363	1.11504	101.66		
		4.0092	0.019775	1.19165	1.11504	106.87		
	120%加标	4.2265	0.01968	1.13950	1.11504	102.20		
		4.1483	0.001445	0.06980	0.074	94.33		
		4.0108	0.001463	0.07410	0.074	100.14		
		4.1062	0.001513	0.07737	0.074	104.56		
维生素 B ₆	100%加标	4.3529	0.001667	0.08831	0.0925	95.47	98.8	4.8
		4.1246	0.001685	0.09421	0.0925	101.85		
		4.1063	0.00171	0.09707	0.0925	104.95		
	120%加标	4.1032	0.001838	0.10989	0.111	99.00		
		4.0092	0.001732	0.10108	0.111	91.06		
		4.2265	0.001842	0.10817	0.111	97.45		

4 结 论

采用 GB 5009.89-2016 检测烟酰胺, GB 5009.154-2016 检测维生素 B₆ 时, 检测一批样品所用的时间为 930 min, 用紫外串联荧光检测法测定一批维生素 B₆ 和烟酰胺, 所用的时间是 460 min, 效率提升 49.5%。由准确度、线性、重复性、稳定性、回收率可知, 紫外串联荧光检测法可以同时快速检测蛋白纤维奶昔中的维生素 B₆ 和烟酰胺。

参考文献

- [1] 黄绿苗. 维生素 B₆ 的进展性研究[J]. 医学美容美容(中旬刊), 2014, (7): 607. Huang LM. Progressive study of vitamin B₆ [J]. Med Aesthetics Beauty (Middle), 2014, (7): 607.
- [2] 沈丽平. HPLC 测定维生素 B₆ 片含量测定方法的探讨[J]. 海峡药学, 2016, 28(2): 75-76. Shen LP. Discussion on the determination method of vitamin B₆ tablets by HPLC [J]. Strait Pharm J, 2016, 28(2): 75-76.
- [3] 曹高娃, 崔毅, 张力, 等. 紫外分光光度法测定维生素 B₆[J]. 光谱实验室, 2001, 18(6): 802-803. Cao GW, Cui Y, Zhang L, et al. Determination of vitamin B₆ by ultraviolet spectrophotometry [J]. Spectrosc Lab, 2001, 18(6): 802-803.
- [4] Galluzzi L, Kepp O, Vander-Heiden MG, et al. Metabolic targets for cancer therapy [J]. Nat Rev Drug Discov, 2013, 12(11): 829-846.
- [5] Vora M, Ansari J, Shanti RM, et al. Increased nicotinamide phosphoribosyltransferase in rhabdomyosarcomas and leiomyosarcomas compared to skeletal and smooth muscle tissue [J]. Anticancer Res, 2016, 36(2): 503-507.
- [6] 韩永利, 李秋凤, 李建国. 烟酸对奶牛的营养作用[J]. 饲料博览, 2002, (3): 33-34. Han YL, Li QF, Li JG. Nutrition effect of niacin on dairy cows [J]. Feed Expo, 2002, (3): 33-34.
- [7] GB 5009.154-2016 食品中维生素 B₆ 的测定[S]. GB 5009.154-2016 Determination of vitamin B₆ in food [S].
- [8] GB 14753-2010 食品添加剂中维生素 B₆ 的测定[S]. GB 14753-2010 Determination of vitamin B₆ in food additives [S].
- [9] GB 7298-2017 饲料添加剂中维生素 B₆ 的测定[S]. GB 7298-2017 Determination of vitamin B₆ in feed additives [S].
- [10] GB/T 33309-2016 化妆品中维生素 B₆ 的测定[S]. GB/T 33309-2016 Determination of vitamin B₆ in cosmetics [S].
- [11] SN/T 0549-1996 出口蜂王浆及干粉中维生素 B₆ 的测定[S]. SN/T 0549-1996 Determination of vitamin B₆ in exported royal jelly and dry powder [S].
- [12] GB 5009.89-2016 食品中烟酸和烟酰胺的测定[S]. GB 5009.89-2016 Determination of niacin and nicotinamide in food [S].
- [13] GB/T 5009.197-2003 保健食品中盐酸硫胺素、盐酸吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因的测定[S]. GB/T 5009.197-2003 Determination of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride, niacin, nicotinamide and caffeine in health foods [S].

- [14] GB 7301-2017 饲料添加剂中烟酰胺的测定[S].
GB 7301-2017 Determination of nicotinamide in feed additives [S].
- [15] GB/T 29664-2013 化妆品中烟酸、烟酰胺的测定[S].
GB/T 29664-2013 Determination of niacin and nicotinamide in cosmetics [S].
- [16] NY/T 2130-2012 饲料中烟酰胺的测定[S].
NY/T 2130-2012 Determination of nicotinamide in feed [S].
- [17] DB37/T 2140-2012 预混合饲料中维生素 B₁、B₂、B₆和烟酰胺的同步测定[S].
DB37/T 2140-2012 Simultaneous determination of vitamins B₁, B₂, B₆ and nicotinamide in premixed feed [S].
- [18] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].
GB/T 27404-2008 Criterion on quality control of laboratories-Chemical testing of food [S].

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介



邱清莲, 高级食品检验工, 主要研究方向为保健食品的质量检测。

E-mail: 493278091@qq.com



魏鲜娥, 主要研究方向为保健食品的质量检测。

E-mail: 176019964@qq.com