

固相萃取-高效液相色谱法测定饼干中的 维生素 B₁₂

孙璐璐¹, 朱 帅^{2*}, 陈彦会¹, 凌程江¹, 于兰莉¹

(1. 杭州海润泰合检测技术有限公司, 杭州 310004; 2. 浙江方圆检测集团股份有限公司, 杭州 310004)

摘 要: **目的** 建立固相萃取-高效液相色谱法测定饼干中维生素 B₁₂ 的分析方法。**方法** 样品中的维生素 B₁₂ 用 0.1 mol/L 乙酸钠溶液(pH=4.5)提取, 二乙烯苯和 N-乙烯基吡咯烷酮共聚物(N-vinylpyrrolidone copolymer) HLB 固相萃取柱净化, 10%的乙腈水溶液定容后用高效液相色谱仪测定。**结果** 维生素 B₁₂ 含量在 0.5~10 mg/L 线性关系良好, 线性相关系数 $r=0.9999$, 检出限为 0.1 mg/kg。在精密度实验中, 相对标准偏差为 0.74%~3.75%, 在 0.3、0.8、1.7 mg/kg 的添加水平下, 加标回收率为 93.9%~99.4%。**结论** 该方法准确、高效, 适合饼干中维生素 B₁₂ 的测定。

关键词: 固相萃取; 高效液相色谱法; 维生素 B₁₂; 饼干

Determination of vitamin B₁₂ in biscuit by solid phase extraction-high performance liquid chromatography

SUN Lu-Lu¹, ZHU Shuai^{2*}, CHEN Yan-Hui¹, LING Cheng-Jiang¹, YU Lan-Li¹

(1. Hangzhou Harrens-TH Inspection Testing & Technology Co., Ltd., Hangzhou 310004, China;
2. Zhejiang Fangyuan Test Group Co., Ltd., Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of vitamin B₁₂ in biscuit by solid phase extraction-high performance liquid chromatography. **Methods** Vitamin B₁₂ in the sample was extracted with 0.1 mol/L sodium acetate solution (pH=4.5), purified by divinylbenzene and N-vinylpyrrolidone copolymer HLB solid phase extraction column, and determined by high performance liquid chromatography with a 10% aqueous solution of acetonitrile. **Results** Vitamin B₁₂ has a good linear relationship at 0.5–10 mg/L, the linear correlation coefficient r was 0.9999, and the limit of detection was 0.1 mg/kg. In the precision experiment, the relative standard deviations were 0.74%–3.75%. The standard recoveries were 93.9%–99.4%, with the spiked concentrations of 0.3, 0.8 and 1.7 mg/kg. **Conclusion** This method is accurate and efficient, which is suitable for the determination of vitamin B₁₂ in biscuit.

KEY WORDS: solid phase extraction; high performance liquid chromatography; vitamin B₁₂; biscuit

1 引 言

维生素 B₁₂ 又称钴胺素或氰钴素, 是一种由含钴的卟啉类化合物组成的 B 族维生素。最初发现服用全肝可控制

恶性贫血症状, 经 20 年研究, 到 1948 年才从肝脏中分离出一种具有控制恶性贫血效果的红色晶体物质, 定名为维生素 B₁₂^[1,2]。1963 年确定其结构式。1973 年完成人工合成。维生素 B₁₂ 是 B 族维生素中迄今为止发现最晚的一种。维

*通讯作者: 朱帅, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 1040600611@qq.com

*Corresponding author: ZHU Shuai, Assistant Engineer, Zhejiang Fangyuan Test Group Co., Ltd., Hangzhou 310004, China. E-mail: 1040600611@qq.com

生素 B₁₂ 是一种含有 3 价钴的多环系化合物, 4 个还原的吡咯环连在一起变成为 1 个咕啉大环(与卟啉相似), 是维生素 B₁₂ 分子的核心。所以含这种环的化合物都被称为类咕啉。维生素 B₁₂ 为浅红色的针状结晶, 易溶于水和乙醇, 在 pH 值 4.5~5.0 弱酸条件下最稳定, 强酸(pH<2)或碱性溶液中分解, 遇热可有一定程度破坏, 但短时间的高温消毒损失小, 遇强光或紫外线易被破坏。普通烹调过程损失量约 30%。维生素 B₁₂ 对于机体生长是一种不可缺少的微量营养物质, 大多数动物的植物性饲料中不含维生素 B₁₂, 动物一方面靠胃肠中的微生物合成, 一方面靠外界添加。为满足动物维生素的需要必须补充维生素添加剂。

目前, 用于测定维生素 B₁₂ 含量的方法主要为微生物法^[3,4]、紫外吸光光度法^[5]、液相色谱串联质谱法^[6]、高效液相色谱法^[7-15]。其中, 微生物法操作较繁琐, 费时费力且不够精确; 紫外吸光光度法由于受基质影响较大, 测量结果不够准确; 液相色谱串联质谱法灵敏度高, 但是所使用仪器价值较大, 普及比较困难; 高效液相色谱法虽操作简单、分析准确, 但对于饼干、乳粉等基质复杂、维生素 B₁₂ 含量较低的样品定量比较困难。有报道曾对饮料中的维生素 B₁₂ 进行过研究^[16], 使用乙腈去除大分子成分后利用 MCX 小柱进行浓缩净化。

本研究对高效液相色谱法进行改进, 采用固相萃取柱对样品进行浓缩与净化, 优化色谱条件对维生素 B₁₂ 含量进行测定, 可快速、精确地测定饼干中维生素 B₁₂ 的含量。

2 材料与方法

2.1 材料、仪器与试剂

2.1.1 仪 器

LC-20AT 配二极管阵列检测器(日本岛津公司); ULUPURE- SD-40 L 超纯水机(四川优普公司); DV 215 CD 电子天平(奥豪斯仪器公司); SPE-12 管固相萃取仪(美国 supelco 公司); SHZ-D(III)两表两抽头循环水多用真空泵(巩义市予华仪器公司); MTN-5800A-24 氮吹浓缩装置(奥特赛恩斯公司)。

2.1.2 试 剂

乙酸钠(分析纯, 温州市化学用料厂); 乙酸(分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司); 三氟乙酸(色谱纯, 美国麦克林公司); 甲醇、乙腈(色谱纯, 德国默克公司); 维生素 B₁₂ 标准物质(纯度 96.6%, 德国 Dr.公司)。

净化柱: ANPEL HLB 固相萃取柱(500 mg, 6 mL, 上海安谱公司); Agela C₁₈ 固相萃取柱(500 mg, 6 mL, 天津博纳艾杰尔公司)。

空白饼干样品和幼儿磨牙饼干(营养强化饼干): 购于杭州某超市。

实验用水为一级水。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液配制

维生素 B₁₂ 见光易分解, 配制时均使用棕色容量瓶。

维生素 B₁₂ 标准储备液 1000 mg/L: 准确称取适量的维生素 B₁₂ 标准品, 用 5%的乙醇溶解并定容至 10 mL, 配制成 1000 mg/L 的储备液, 于 4 °C 避光保存。

维生素 B₁₂ 标准中间液 100 mg/L: 准确吸取 1.0 mL 1000 mg/L 的标准储备液于 10 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度。

维生素 B₁₂ 系列标准工作液: 分别准确吸取 0、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 mL 的标准中间液(100 mg/L)于 6 支 10 mL 的容量瓶中, 用水定容至刻度, 得到浓度分别为 0、0.5、1、2、5、10 mg/L 的系列标准工作液。

2.2.2 样品制备

准确称取样品 5.0000 g(准确至 0.0001 g)于 50 mL 离心管中, 加入 25 mL 0.1 mol/L 的乙酸钠溶液(pH=4.5), 于 40 °C 水浴中超声 30 min, 4000 r/min 离心 5 min, 转移上清液于另一离心管中, 残渣再次加入 25 mL 0.1 mol/L 的乙酸钠溶液(pH=4.5)重复提取一次, 合并 2 次提取液, 待用。将样品提取液完全加入到二乙烯苯和 N-乙烯基吡咯烷酮共聚物(N-vinylpyrrolidone copolymer) HLB 固相萃取小柱(HLB 固相萃取小柱预先用 5 mL 甲醇加 5 mL 水活化), 待提取液完全流出后, 加 5 mL 5%甲醇水溶液淋洗固相萃取柱, 弃去流出液, 再用 5 mL 甲醇洗脱小柱, 收集洗脱液, 于 50 °C 氮气吹干。最后用 1 mL 10%乙腈水溶液溶解, 过 0.22 μm 水相滤膜至样品瓶, 待上机检测。

2.2.3 色谱条件

色谱柱为岛津 Inertsil ODS-3 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 A 为 0.025%三氟乙酸溶液, B 为乙腈, 2 者的梯度洗脱条件如表 1 所示; 流速为 1.0 mL/min; 进样体积为 20 μL; 柱温为 40 °C; 检测波长为 361 nm。

表 1 流动相梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution conditions of mobile phases

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	100	0
3.50	100	0
8.00	75	25
10.00	75	25
10.50	40	60
13.00	40	60
13.50	100	0
16.00	100	0

2.2.4 结果计算

样品中维生素 B₁₂ 的结果计算:

$$X=\frac{C \cdot V}{m}$$

式中: *X*——试样中维生素 B₁₂ 的含量, mg/kg;
C——试样溶液中维生素 B₁₂ 的质量浓度, mg/L;
V——定容体积, mL;
m——试样称样量, g。

3 结果与分析

3.1 提取液的选择

维生素 B₁₂ 易溶于水、甲醇和乙腈, 在 pH 值 4.5~5.0 弱酸条件下最稳定^[6], 本研究分别采用水、pH=4.5 的 0.1 mol/L 的乙酸钠溶液、10%的乙腈水作为提取液, 结果见表 2。结果表明 pH=4.5 的 0.1 mol/L 的乙酸钠溶液作为提取液时回收率高, 重复性好。

3.2 固相萃取柱的选择

食品中维生素 B₁₂ 含量一般较低, 且基质干扰较大, 本研究采用固相萃取的方法对饼干样品进行处理。C₁₈ 和 HLB 作为实验室 2 种常用的固相萃取柱, 本研究分别选用 ANPEL HLB 固相萃取小柱和 Agela C₁₈ 固相萃取小柱对饼干中的维生素 B₁₂ 进行富集和净化, 图 1 和图 2 分别为 ANPEL HLB 固相萃取小柱和 Agela C₁₈ 固相萃取小柱净化后上机测试的色谱图, 结果表明 Agela C₁₈ 固相萃取小柱在本方法条件下净化后的基质干扰杂峰较多, 用 ANPEL HLB 固相萃取小柱对提取液净化和浓缩之后, 可以很好地

避免复杂基质的干扰, 大大降低了方法的检出限。

表 2 不同提取液的实验结果
Table 2 Test results of different extracts

提取液	测定值 /(mg/L)	计算值 /(mg/kg)	加标量 /(mg/kg)	回收率 /%	相对标准偏差 /%
水	2.876	0.575	0.8	71.9	6.20
	3.042	0.608		76.0	
	3.439	0.688		86.0	
	3.187	0.637		79.7	
	3.005	0.601		75.1	
	3.161	0.632		79.0	
	3.653	0.731		91.3	
	3.800	0.760		95.0	
乙酸钠 溶液	3.885	0.777	0.8	97.1	2.50
	3.769	0.754		94.2	
	3.792	0.758		94.8	
	3.640	0.728		91.0	
	3.405	0.681		85.1	
	3.284	0.657		82.1	
	3.766	0.753		94.2	
	3.205	0.641		80.1	
10%的 乙腈水	3.543	0.709	0.8	88.6	6.65
	3.178	0.636		79.5	

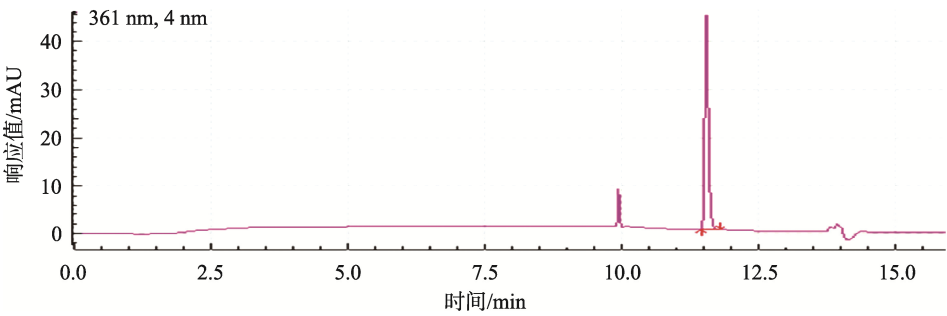


图 1 HLB 固相萃取柱的色谱图

Fig.1 Chromatograms of HLB-solid phase extraction (SPE) column

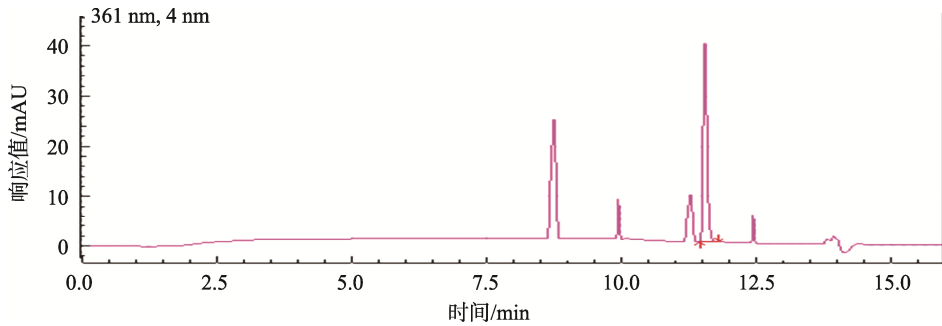


图 2 C₁₈ 固相萃取柱的色谱图

Fig.2 Chromatograms of C₁₈-SPE

3.3 色谱条件的选择

本研究验证了分别以甲醇和水、乙腈和水、磷酸水溶液和乙腈、磷酸氢二铵水溶液和乙腈、三氟乙酸水溶液和乙腈作为流动相上机测试,最终选用以三氟乙酸水溶液和乙腈作为流动相(具体色谱条件如 2.2.3 所示,见图 1),供试样品中色谱峰的分离度、拖尾因子均满足实验需要并且优于上述其他流动相的上机结果。图 3 为维生素 B₁₂ 的 190~800 nm 波长下的吸收光谱图,显示在 361 nm 波长下维生素 B₁₂ 有较大吸收强度。

3.4 标准曲线方程及检出限

对 2.2.1 维生素 B₁₂ 标准工作液进行上机测定,以标准工作液中被测组分峰面积为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线,得到标准曲线方程为 $Y=22451.3X+1208.21$, 相关系数 $r=0.9999$ (见图 4),当维生素 B₁₂ 的添加浓度为 0.1 mg/kg 时,测得的色谱峰信噪比为 3,说明本方法的检出限为 0.1 mg/kg^[17]。

3.5 精密度实验

对空白饼干样品添加 3 个水平的不同含量的维生素 B₁₂ 分别重复测定 6 次,计算其相对标准偏差,结果见表 3。由表 3 可知,3 个水平的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)在 0.74%~3.75%之间,每个水平的精密度均符合 GB/T 27404-2008^[18]的要求,说明方法的精密度良好。

表 3 精密度实验结果(n=6)
Table 3 Results of precision test (n=6)

样品	上机浓度/(mg/L)	含量/(mg/kg)	平均值/(mg/kg)	RSD/%
1	1.340	0.268	0.286	3.75
	1.461	0.292		
	1.471	0.294		
	1.441	0.288		
	1.388	0.278		
	1.472	0.294		
2	3.653	0.731	0.751	2.50
	3.800	0.760		
	3.885	0.777		
	3.769	0.754		
	3.792	0.758		
	3.640	0.728		
3	8.505	1.701	1.690	0.74
	8.355	1.671		
	8.386	1.677		
	8.475	1.695		
	8.493	1.699		
	8.480	1.696		

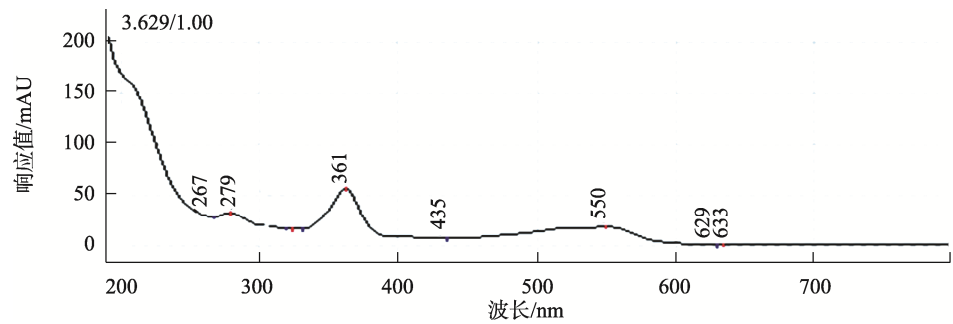


图 3 维生素 B₁₂ 的光谱图
Fig.3 Spectrograph of vitamin B₁₂

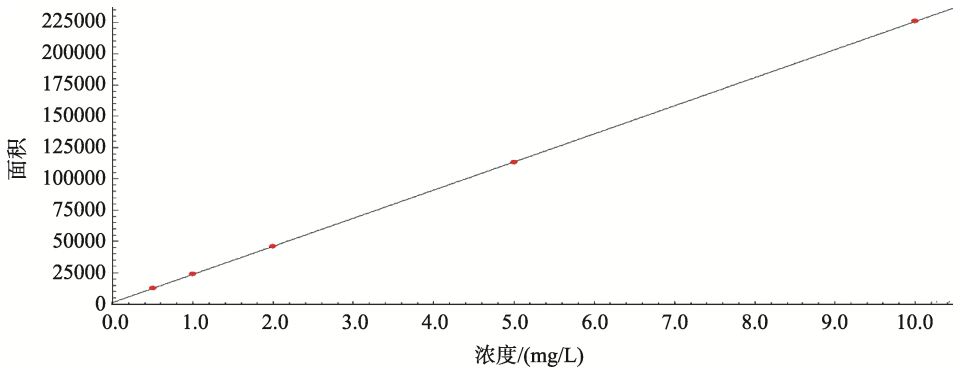


图 4 维生素 B₁₂ 的标准曲线
Fig.4 Standard curves of vitamin B₁₂

3.6 回收率实验

对空白饼干样品添加 3 个水平的不同含量的维生素 B₁₂ 分别重复测定 6 次, 加入空白饼干样品中维生素 B₁₂ 的最高残留量分别为 0.3、0.8、1.7 mg/kg, 测定计算其回收率, 结果如表 4。由表 4 可得, 回收率在 93.9%~99.4%之间, 符合 GB/T 27404-2008^[18]中回收实验的回收率要求。

表 4 回收实验结果(n=6)				
Table 4 Results of recovery rate (n=6)				
样品	测定值/(mg/L)	计算值/(mg/kg)	平均值/(mg/kg)	回收率/%
1	1.340	0.268	0.286	95.3
	1.461	0.292		
	1.471	0.294		
	1.441	0.288		
	1.388	0.278		
	1.472	0.294		
2	3.653	0.731	0.751	93.9
	3.800	0.760		
	3.885	0.777		
	3.769	0.754		
	3.792	0.758		
	3.640	0.728		
3	8.505	1.701	1.690	99.4
	8.355	1.671		
	8.386	1.677		
	8.475	1.695		
	8.493	1.699		
	8.480	1.696		

3.7 准确度实验

对幼儿磨牙饼干样品通过本研究方法进行检测结果和另外 5 家实验室微生物方法的结果进行比对, 结果见表 5, 表中测定结果为各实验室根据所使用方法平行测定 6 次测定值的平均值。结果表明, 本方法测量结果和微生物方法测量结果相对标准偏差符合 GB/T 27404-2008^[18]中准确度要求。

4 结 论

通过固相萃取-高效液相色谱法对食品中的维生素 B₁₂ 进行测定, 与现有方法相比, 该方法具有操作简便、线性范围宽、检出限低、精确度高、稳定性强等优点, 适用于饼干中维生素 B₁₂ 含量的测定。

表 5 准确度实验结果(n=6)			
Table 5 Results of accuracy test (n=6)			
实验室	测定结果/(mg/kg)	平均结果/(mg/kg)	RSD/%
本研究方法	0.214	0.211	4.36
实验室 1	0.221		
实验室 2	0.208		
实验室 3	0.210		
实验室 4	0.218		
实验室 5	0.195		

参考文献

[1] 刘惠, 张颖, 薛稚明, 等. 食品中维生素 B₁₂ 的测定方法研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, (11): 2556–2558.
Liu H, Zhang Y, Xue ZM, et al. Research progress on methods of determination of vitamin B₁₂ in food [J]. China Health Inspect Magaz, 2013, (11): 2556–2558.

[2] 关士海, 王岚. 保健食品 B 族维生素片中维生素 B₁₂ 测定方法的改进[J]. 黑龙江医药, 2013, (1): 13–14.
Guan SH, Wang L. Improvement of determination method for vitamin B₁₂ of vitamin B tablets in health supplementary foods [J]. Heilongjiang Med, 2013, (1): 13–14.

[3] GB 5413.14-2010 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中维生素 B₁₂ 的测定[S].
GB 5413.14-2010 National food safety standard-Determination of vitamin B₁₂ in infant food and dairy [S].

[4] 张丽宏, 王克新, 王森, 等. 微生物法测定乳粉中维生素 B₁₂ 的应用与探讨[J]. 中国乳品工业, 2008, (10): 58–60.
Zhang LH, Wang KX, Wang M, et al. Application and discussion on determination of vitamin B₁₂ in milk powder by microbiological method [J]. Chin Dairy Ind, 2008, (10): 58–60.

[5] 李姝. 紫外吸光度法测定维生素 B₁₂[J]. 理化检验-化学分册, 2005, 41(1): 53–54.
Li S. Determination of vitamin B₁₂ by ultraviolet light absorption spectrophotometry [J]. Phys Chem Tests-Chem Fascicles, 2005, 41(1): 53–54.

[6] 马颖清, 王霞, 张小刚, 等. 超高效液相色谱-串联质谱测定营养强化食品中维生素 B₁₂ 的含量[J]. 上海大学学报(自然科学版), 2014, (1): 114–119.
Ma YQ, Wang X, Zhang XG, et al. Determination of vitamin B₁₂ in nutrient-fortified foods by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Shanghai Univ (Nat Sci Ed), 2014, (1): 114–119.

[7] 黄东萍, 张国柱, 周永丽, 等. 反相高效液相色谱法测定维生素 B₁₂ 片的含量[J]. 中国药业, 2010, 19(23): 30–31.
Hang DP, Zhang GZ, Zhou YL, et al. Determination of vitamin B₁₂ tablets by RP-HPLC [J]. Chin Pharm Ind, 2010, 19(23): 30–31.

[8] 吴楠, 姜金斗, 陶大利, 等. 免疫亲和柱净化/高效液相色谱法测定乳粉中维生素 B₁₂ 含量[J]. 分析测试学报, 2013, (3): 389–392.
Wu N, Jiang JD, Tao DL, et al. Determination of vitamin B₁₂ in milk powder by immune affinity column purification/high performance liquid

- chromatography [J]. *J Anal Testing*, 2013, (3): 389–392.
- [9] Xuan Z, Bernward B. Determination of vitamin B₁₂ in fermented soybean products by high-performance liquid chromatography [J]. *J Biotechnol*, 2010, 150(1): 330–330.
- [10] Heudi O, Kilin T, Fontannaz P, *et al.* Determination of vitamin B₁₂ in fermented soybean products by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1101(1–2): 63–68.
- [11] 农云军, 王飞, 窦文渊, 等. 高效液相色谱法测定婴儿奶粉中维生素 B₁₂[J]. *中国酿造*, 2013, (9): 142–144.
- Nong YJ, Wang F, Dou WY, *et al.* Determination of vitamin B₁₂ in infant milk powder by high performance liquid chromatography [J]. *Chin Brew*, 2013, (9): 142–144.
- [12] 顾娅楠, 战虎. 液相色谱法测定固体饮料中维生素 B₁₂ 的含量[J]. *食品研究与开发*, 2018, (16): 145–152.
- Gu YN, Zhan H. Determination of vitamin B₁₂ in solid beverages by liquid chromatography [J]. *Food Res Dev*, 2018, (16): 145–152.
- [13] 周黎, 余以刚, 徐红, 等. 免疫亲和柱-超高效液相色谱法测定维生素饮料中维生素 B₁₂[J]. *中国食物与营养*, 2018, (3): 27–29.
- Zhou L, Yu YG, Xu H, *et al.* Determination of vitamin B₁₂ in vitamin beverages by immunoaffinity column ultra-high performance liquid chromatography [J]. *Chin Food Nutr*, 2018, (3): 27–29.
- [14] Guggisberg D, Risse MC, Hadorn R. Determination of vitamin B₁₂ in meat products by RP-HPLC after enrichment and purification on an immunoaffinity column [J]. *Meat Sci*, 2012, 90(2): 279–283.
- [15] Watanabe F, Takenaka S, Abe K, *et al.* Comparison of a microbiological assay and a fully automated chemiluminescence system for the determination of vitamin B₁₂ in food [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(4): 1433–1436.
- [16] 李红艳, 王瑾, 邵亮亮, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定功能性饮料中微量维生素 B₁₂[J]. *浙江农业科学*, 2012, (3): 384–386.
- Li HY, Wang J, Shao LL, *et al.* Determination of trace vitamin B₁₂ in functional beverages by solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. *J Zhejiang Agric Sci*, 2012, (3): 384–386.
- [17] GB/T 27417-2017 合格评定 化学分析方法确认和验证指南[S].
- GB/T 27417-2017 Conformity assessment-Guidelines for confirmation and verification of chemical analysis methods [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 Laboratory quality control specification-Food physical and chemical examination [S].

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介



孙璐璐, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: Lucysun@harrens.com



朱帅, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 1040600611@qq.com