

高效液相色谱法测定强化食品中维生素 B₆ 的含量

刘桂果, 王浩淼, 李佳慧, 李嘉禹, 夏 然*

(国家副食品质量监督检验中心, 北京 10070)

摘要: 目的 建立了一种高效液相色谱法检测强化食品(婴幼儿配方食品、婴幼儿谷类辅助食品和功能饮料)中维生素 B₆ 方法。**方法** 利用 Eclipse Plus C₁₈(5 μm, 4.6 mm×250 mm)色谱柱, 流速 1 mL/min, 流动相: 甲醇-(0.2 g/L 辛烷磺酸钠, 体积分数为 0.25%的三乙胺溶液, 利用乙酸调节 pH=3.2±0.1)(V:V=21:79), 进样量 10 μL, 柱温 30 °C实现了对吡哆醛、吡哆醇和吡哆胺 3 种组分的分离; 在激发波长 293 nm, 发射波长 395 nm 的条件下实现了对这 3 种组分的检测。**结果** 吡哆醛、吡哆醇和吡哆胺在 0.1~1.0 μg/mL 范围内均表现出良好的线性关系, 3 种组分的相关系数均大于 0.999, 检出限为 0.01~0.02 mg/100 g, 定量限为 0.03~0.05 mg/100 g, 均满足现行国标要求。3 种维生素 B₆ 在添加水平为 0.05、0.20 和 0.60 mg/100 g 时的加标回收率为 89.6%~107.1%, 相对标准偏差(n=6)为 1.3%~7.0%。**结论** 该方法操作简便, 准确度和精密度高, 能够用于对多种常见强化食品中 3 种维生素 B₆ 的检测

关键词: 高效液相色谱法; 维生素 B₆; 吡哆醛; 吡哆醇; 吡哆胺; 强化食品

Determination of vitamin B₆ in fortified food by high performance liquid chromatography

LIU Gui-Guo, WANG Hao-Miao, LI Jia-Hui, LI Jia-Yu, XIA Ran*

(State Non-Staple Food Quality Supervision and Test Center, Beijing 100070, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of vitamin B₆ in fortified food by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The effective separation of pyridoxal, pyridoxine and pyridoxamine was achieved with Agilent Eclipse Plus C₁₈ column(5 μm, 4.6 mm×250 mm) by using methanol-0.2 g/L sodium salt and 0.25% trimethylamine (pH=3.2±0.1 adjusting with acetic acid)(V:V=21:79) as the mobile phase. Injection volume is 10 μL and column temperature is 30 °C. Under the conditions of 293 nm excitation wavelength and 395 nm emission wavelength, the detection of these three components is realized. **Results** In this method, pyridoxal, pyridoxine and pyridoxamine exhibited excellent linearity over the range of 0.1–1.0 μg/mL, with correlation coefficients of the 3 components all above 0.999. The limits of detection of all the 3 components ranged from 0.01 to 0.02 mg/100 g and the limits of quantitation of them were from 0.03 to 0.05 mg/100 g which met the requirements of the national standard. The average recoveries for three pigments from 3 kinds of common fortified food were in the range of 89.6%–107.1% with relative standard deviations (n=6) of 1.3%–7.0%. **Conclusion** The method is convenient, accurate and suitable for determination of 3 kinds of Vitamin B₆ in common fortified food.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; vitamin B₆; pyridoxal; pyridoxine; pyridoxamine; fortified food

*通讯作者: 夏然, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: xiaran@cofco.com

*Corresponding author: XIA Ran, Senior Engineer, State Non-Staple Food Quality Supervision and Test Center, Beijing 100070, China. E-mail: xiaran@cofco.com

1 引言

维生素 B₆(vitamin B₆)又称吡哆素,其包括吡哆醛、吡哆醇和吡哆胺 3 种化学物。维生素 B₆可以通过食物摄入和肠道细菌合成 2 条途径获得^[1]。它是评价某些食品营养价值的重要指标,常被用来强化食品,特别是婴儿食品^[2]。虽然维生素 B₆的食物来源很广,但一般质量不是很高,容易造成如婴幼儿、高劳动强度人群等特殊人体的摄入不足,影响人体机能的运行^[3]。所以,人们通常在食品中加入维生素 B₆来弥补摄入的不足。《食品安全国家标准食品营养强化剂使用卫生标准》也已将维生素 B₆列为营养强化剂,允许在某些人群食品中加入一定量的维生素 B₆。例如在婴幼儿配方奶粉和谷类辅助食品中,应按照相应标准加入一定量的维生素 B₆来强化补充^[4-7]。另外,按照国家标准,一些功能饮料虽没有最低限量要求,但会有最高限量的要求^[8]。

目前,检测维生素 B₆的方法有多种,国家标准 GB 5009.154-2016《食品安全国家标准食品中维生素 B₆的测定》^[9]采用高效液相色谱法^[10-12]和微生物法^[13],药典中采用分光光度计法^[14],文献报道中除上述几种方法外还有流动注射液滴荧光法^[15]、光黄素荧光法等^[16,17]。其中以高效液相色谱法和微生物法最为常见有效,虽然微生物法具有较高精度,检出限更低,但对专业化程度要求也高,操作也繁琐,一般用于目标物含量较低、非强化食品中维生素 B₆的检测。综上,高效液相色谱法(配荧光检测器)是目前使用最广泛、操作较简单、精度较高的一种检测食品中维生素 B₆含量的方法。目前,大多数研究报道只对其中一种维生素 B₆(大多为吡哆醇)作分离和检测,如果用于 3 种维生素 B₆同时分离就比较困难。为解决上述问题,本研究在国家标准 GB 5009.154-2016^[9]及相关文献^[10-12]研究的基础上建立了一种能够同时分离吡哆醛、吡哆醇和吡哆胺 3 种维生素 B₆的高效液相色谱方法,并用于常见强化食品(婴幼儿配方食品、婴幼儿谷类辅助食品和功能饮料)中 3 种维生素 B₆的检测,为评判该类食品中维生素 B₆的添加量是否合规提供了可靠的技术手段。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪(附荧光检测器,美国安捷伦科技有限公司); ME204 电子天平、XS105DU 电子天平(上海梅特勒-托利多有限公司); PB-21 pH 计(北京赛多利斯仪器系统有限公司); KQ-500DB 超声波振荡器(昆山市超声仪器有限公司); U-3900 紫外分光光度计(北京日立集团); 尼龙滤膜(孔径为 0.20 μm,美国颇尔公司)。

吡哆醛盐酸盐标品(纯度 99.7%)、吡哆醇盐酸盐标品

(纯度 99.6%)、吡哆胺二盐酸-水合物(纯度 99.9%,上海安谱实验科技股份有限公司); 1-辛烷磺酸钠盐(纯度 99.5%,北京百灵威科技有限公司); 三乙胺(色谱纯,上海迪马科技有限公司); 盐酸、乙酸(分析纯,北京化工厂); 甲醇[色谱纯,赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; 实验用水: Milli-Q 超纯水机制得。

婴幼儿配方奶粉、婴幼儿谷类辅助食品和功能饮料: 超市购买。

2.2 实验方法

2.2.1 标准混合溶液的配制

分别称取一定质量的吡哆醛盐酸盐、吡哆醇盐酸盐和吡哆胺二盐酸-水合物标准品,用 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解后定容,配置成浓度均为 1.0 mg/mL 的吡哆醛、吡哆醇和吡哆胺标准储备液。分别准确吸取一定量吡哆醛、吡哆醇、吡哆胺的标准储备液,用 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释并定容,配置浓度均为 20 μg/mL 的混合标准中间液。分别准确吸取上述混合标准中间液用水逐级稀释,配成浓度为 0.10、0.20、0.40、0.60、1.00 μg/mL 的混合标准工作溶液。标准中间液和工作液需现用现配,标准储备液在使用前需要进行浓度校正。

2.2.2 样品的处理

婴幼儿配方食品、婴幼儿谷类辅助食品和功能饮料按照国家标准 GB 5009.154-2016《食品安全国家标准 食品中维生素 B₆的测定》^[9]中的处理方法来处理,最终提取液用 0.2 μm 水系滤膜过滤后进高效液相色谱仪检测。

2.2.3 液相色谱条件

色谱柱: Eclipse Plus C₁₈ (5 μm, 4.6 mm×250 mm, 美国安捷伦科技有限公司); 流动相: V(甲醇)(A): V(0.2 g/L 辛烷磺酸钠, 体积分数为 0.25%的三乙胺溶液, 利用乙酸调节 pH=3.2±0.1)(B)=21:79, 流速 1 mL/min, 进样量 10 μL, 柱温 30 °C; 检测波长: 激发波长 293 nm, 发射波长 395 nm。

3 结果与分析

3.1 流动相的选择

实验证明,在利用 Eclipse Plus C₁₈(5 μm, 4.6 mm×250 mm)的色谱柱进行分析时,若采用国标 GB 5009.154-2016 中流动相条件无法将吡哆醇和吡哆胺两者分开。利用王浩等^[17]的方法,流动相比例为 V(甲醇): V(0.2 g/L 辛烷磺酸钠, 体积分数为 0.25%的三乙胺溶液, 利用乙酸调节 pH=3.2±0.1)=35:65, 可以完全将 3 者完全分开,但在对某些婴幼儿强化食品进行加标实验时,发现吡哆胺附近有杂峰干扰,影响其积分和计算,如图 1。实验最终发现,将上述离子对缓冲盐溶液的比例调整到 79%,可将 3 者很好地分开并排除杂峰干扰,如图 2 和 3。

3.2 方法的线性范围、检出限和定量限

对 2.2.1 中不同浓度的混合标准工作溶液在 2.2.3 实验条件下进行测试, 以目标物的质量浓度为横坐标, 以对应的峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 得到线性方程, 结果表明, 吡哆醛、吡哆醇和吡哆胺在 0.1~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内峰面积和质量浓度均呈现良好的线性关系, 相关系数均大于 0.999。将标准工作溶液逐级稀释后, 以信噪比(S/N)为 3 时的标准液浓度为仪器检出限, 以 S/N 为 10 时的标准液浓度为仪器定量限, 当取样量为 5.00 g, 定容体积位 50 mL 时, 方法检出限为: 吡哆醇 0.01 mg/100 g, 吡哆醛 0.01 mg/100 g, 吡哆胺 0.02 mg/100 g; 方法定量限为: 吡哆醇 0.03 mg/100 g, 吡哆醛 0.03 mg/100 g, 吡哆胺 0.05 mg/100 g。能够满足国家标准 GB 5009.154-2016 中方法检出限和定量限的要求。3 种组分标准曲线方程、相关系数、线性范围、检出限和定量限如表 1 所示。

3.3 回收率及精密度

以 3 种市售产品(婴儿配方奶粉、婴儿营养米粉和功能饮料)为基质, 测定了吡哆醛、吡哆醇和吡哆胺加标水平为 0.05、0.20 和 0.60 mg/100 g 的回收率, 每一水平 6 个平行样, 扣除基质中原有的质量浓度, 计算平均回收率及相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), 结果见表 2。3 种组分在不同基质中、不同加标浓度下的加标回收率范围为 89.6~107.1%, RSD 为 1.3~7.0%, 证明该方法准确度、精密度较高。

3.4 实际样品检测

利用上述方法对市场上常见的 6 种强化食品中的维生素 B₆ 进行检测, 检测结果如表 3。将实际检测结果和产品营养成分表的标注值比较, 结果表明实际检出含量均大于或基本等于标注值, 并且含量符合 GB 10767-2010《食品安全国家标准较大婴儿和幼儿配方食品》^[6]等相关产品标准的要求。

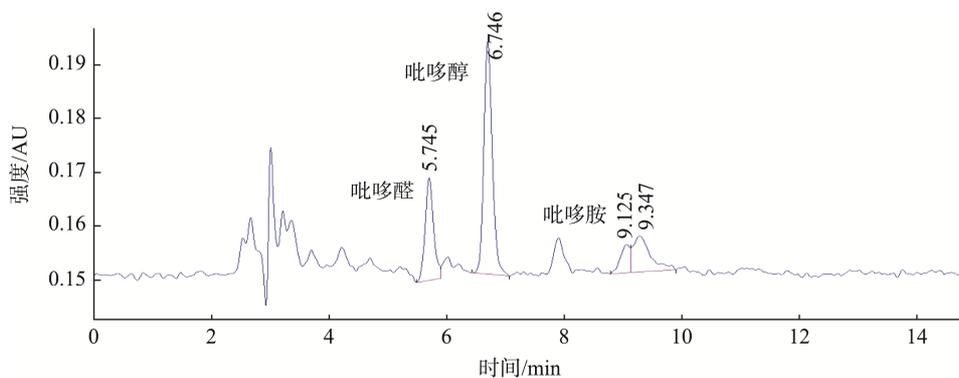


图 1 流动相优化前的样品加标色谱图

Fig.1 Chromatogram of spiked sample before mobile phase modified

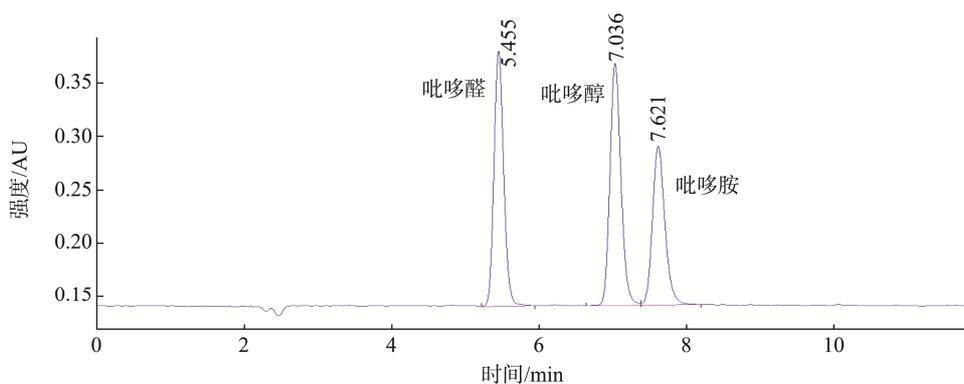


图 2 流动相优化后的标准色谱图

Fig.2 Chromatogram of standard solution after mobile phase modified

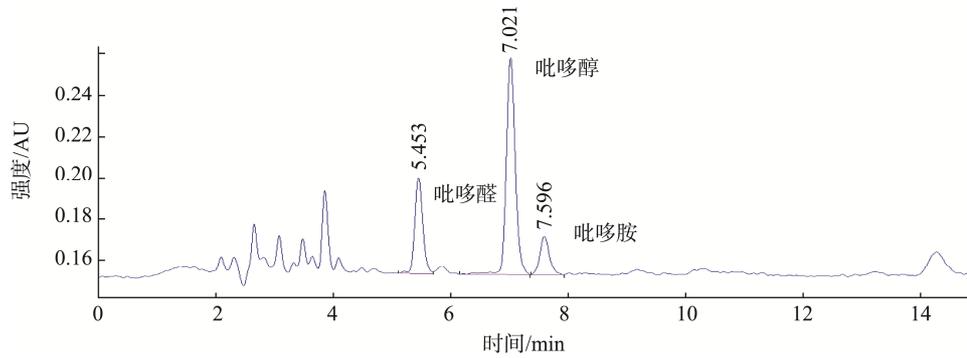


图3 流动相优化后的样品色谱图

Fig.3 Chromatogram of sample after mobile phase modified

表1 3种组分的标准曲线方程、相关系数、线性范围和检出限、定量限

Table 1 The linear regression equation, correlation coefficient, detection limit and quantitation limit of 3 vitamins B₆

目标物名称	保留时间/min	标准曲线方程	相关系数 <i>r</i>	检出限/(mg/100 g)	定量限/(mg/100 g)
吡哆醛	5.457	$Y=3.8927X+0.01512$	0.99988	0.01	0.03
吡哆醇	7.037	$Y=3.9009X+0.02092$	0.99998	0.01	0.03
吡哆胺	7.624	$Y=3.2678X-0.05481$	0.99902	0.02	0.05

表2 不同基质3种组分的加标回收率及相对标准偏差(*n*=6)Table 1 The recovery frequency and relation standard deviation of 3 vitamin B₆ of different samples (*n*=6)

样品名称	添加水平/(mg/100 g)	平均回收率/%			相对标准偏差 RSD/%		
		吡哆醛	吡哆醇	吡哆胺	吡哆醛	吡哆醇	吡哆胺
婴儿配方奶粉	0.05	99.2±5.8	100.1±6.7	98.5±7.9	5.6	6.5	7.0
	0.20	98.9±3.6	96.9±2.8	96.2±4.5	3.5	2.7	4.3
	0.60	97.2±2.1	98.2±1.9	97.9±3.1	1.7	1.3	2.0
婴儿营养米粉	0.05	97.2±7.6	94.1±7.2	95.6±6.8	6.1	5.5	6.0
	0.20	95.9±6.3	99.7±5.0	94.3±4.4	3.3	2.4	3.3
	0.60	101.0±2.9	97.9±2.7	99.9±2.7	1.8	1.5	2.1
功能饮料	0.05	100.1±6.8	99.3±6.7	100.3±6.8	5.5	5.2	6.4
	0.20	98.9±3.6	100.9±3.8	99.4±4.5	2.5	2.7	3.3
	0.60	100.2±2.1	99.8±2.9	98.9±2.1	1.4	1.5	1.7

表3 6种常见强化食品中各维生素B₆的检测结果Table 3 The content of vitamin B₆ of 6 kinds of samples

常见强化食品	检测结果/(mg/100 g 或 mg/100 mL)				营养成分表标注值 (/mg/100 g 或 mg/100 mL)
	吡哆醛	吡哆醇	吡哆胺	维生素 B ₆ 总量 [#]	
某品牌幼儿配方奶粉	0.102	0.717	ND [*]	0.821	0.400
某品牌幼童配方奶粉	0.100	0.704	ND	0.804	0.524
某品牌婴儿营养米粉 1#	ND	0.781	ND	0.781	0.400
某品牌婴儿营养米粉 2#	ND	0.812	ND	0.812	0.400
某品牌功能饮料 1#	ND	4.010	ND	4.010	4.000
某品牌功能饮料 2#	ND	0.110	ND	0.110	0.100

注: *: "ND"表示实际未检出; #: 维生素 B₆ 总量 $X=X(\text{吡哆醇})+X(\text{吡哆醛})\times 1.012+X(\text{吡哆胺})\times 1.006$

4 结论与讨论

本方法在国家标准 GB 5009.154-2016 中要求的流动相基础上, 结合前人研究成果, 在现有的实验室条件下对流动相条件加以改进, 实现了在 Eclipse Plus C₁₈ 柱上对 3 种吡哆素的有效分离, 并利用荧光检测器实现对 3 种组分含量的检测。3 种组分在一定含量范围内的线性关系良好, 相关系数均大于 0.999, 检出限、定量限均不低于国家标准要求。说明本方法操作简单、快速高效, 可适用于常见强化食品(婴幼儿配方食品、婴幼儿谷类辅助食品和功能性饮料)中 3 种维生素 B₆ 的检测。为测定强化食品中 3 种维生素 B₆ 提供了科学参考。

参考文献

- [1] 孙庆杰, 陈海华. 食品化学[M]. 长沙: 中南大学出版社, 2016.
Sun QJ, Chen HH. Food Chem [M]. Changsha: Zhong Nan University Press, 2016.
- [2] 饶泽青, 门智明. 高效液相色谱法同时测定强化食品中的维生素 A、D、E[J]. 营养学报, 2017, 3: 215-216.
Rao ZQ, Men ZM. The simultaneous determination of vitamin A, vitamin D and vitamin E in fortified foods by high performance liquid chromatography [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2017, 3: 215-216.
- [3] 李凤林, 张忠, 李凤玉. 食品营养学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
Li FL, Zhang Z, Li FY. Food Nutrition [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2009.
- [4] GB 14880-2012 食品安全国家标准 食品营养强化剂使用卫生标准[S].
GB 14880-2012 National food safety standard-Hygienic standard for the use of nutritional fortification substances in foods [S].
- [5] 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].
- [6] 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].
- [7] GB 10769-2010 食品安全国家标准 婴幼儿谷类辅助食品[S].
GB 10769-2010 National food safety standard-Cereal-based complementary foods for infants and young children [S].
- [8] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2014, National food safety standard-Standard for uses of food additives [S].
- [9] GB 5009.154-2016 食品安全国家标准 食品中维生素 B₆ 的测定 [S].
GB 5009.154-2016 National food safety standard-Determination of vitamin B₆ of food [S].
- [10] 陈彩云, 魏鲜娥, 蔡伟江, 等. 高效液相色谱法同时测定保健食品中泛酸、烟酰胺、维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₆ 的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(5): 1866-1871.
Chen CY, Wei XE, Cai WJ. Simultaneous determination of pantothenic acid, nicotinamide, vitamin B₁, vitamin B₂ and vitamin B₆ in health food by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(5): 1866-1871.
- [11] 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 B₆[J]. 包装与食品机械, 2015, 33(3): 66-69.
Han JP, Xu ZD, Chen J, et al. HPLC determination of niacin, nicotinamide and vitamin B₆ in milk powder [J]. Pack Food Machin, 2015, 33(3): 66-69.
- [12] 李灿明, 柏建国, 刘桂果, 等. 高效液相色谱法同时测定功能饮料中烟酰胺、咖啡因、维生素 B₆、柠檬黄、胭脂红和苯甲酸的含量[J]. 化学分析计量, 2017, 26(2): 79-81.
Li CM, Bai JG, Liu GG, et al. Simultaneous determination of niacinamide, caffeine, vitamin B₆, tartrazine, carmine and benzoic acid in functional beverage by high performance liquid chromatography [J]. Chem Anal Meter, 2017, 26(2): 79-81.
- [13] 陈亚波, 周敏, 杨彤. 微生物法测定维生素饮料中的维生素 B₆[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(12): 5502-5503, 5509.
Chen YB, Zhou M, Yang T. Microbiological method for assay of vitamin B₆ in vitamin drinks [J]. Agricul Sci AnHui, 2013, 41(12): 5502-5503, 5509.
- [14] 张旭, 李援, 胡英. 微生物分析方法测定保健食品中维生素 B₆ 的含量[J]. 中国微生态学杂志, 2005, (6): 477-478.
Zhang X, Li Y, Hu Y. The measurement of vitamin B₆ in health foods by microbiological method [J]. Chin J Microec, 2005, (6): 477-478.
- [15] 林洁刁. 流动注射液滴荧光法用于水溶性维生素的分析研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2005.
Lin JD. Investigation of flow injection liquid drops spectrofluorimetry to assay water-soluble vitamins [D]. Nanchang: Nanchang University, 2005.
- [16] 梅玉琴, 樊文明, 刘天洁. 婴幼儿食品和乳品中维生素 B₆ 测定方法的改进和优化[J]. 预防医学情报杂志, 2014, 30(12): 1019-1021.
Mei YQ, Fan WM, Liu TJ. Improvement and optimization of method to determine vitamin B₆ in infant foods and dairy food[J]. J Prev Med Inf, 2014, 30(12): 1019-1021.
- [17] 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.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



刘桂果, 硕士研究生, 工程师, 主要研究方向为食品安全与质量控制。
E-mail: liuguiguo@cofco.com

夏然, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: xiaran@cofco.com