

高效液相色谱法测定特殊医学用途全营养 配方食品中烟酰胺

梁嘉敏, 高芝炆*, 陈绮梦, 黄进丽, 曹春梅

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法检测特殊医学用途全营养配方食品中烟酰胺含量的分析方法。**方法** 样品加水溶解后经 0.1 mol/L 盐酸溶液和 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液除杂后, 定容至 100 mL。经过 Kinetex XB-C₁₈ 柱, 流动相为癸烷磺酸钠溶液:乙腈:磷酸=850:150:1(V:V:V), 经等度洗脱 30 min, 波长为 261 nm 处检测。**结果** 与 GB 5009.89-2016 第二法相比, 本方法目标峰与杂峰的分度由 0.73 变为 4.01, 在 0.001~0.020 mg/mL 浓度范围内呈现良好的线性关系, $r^2=1.0000$, 平均回收率为 104.50%, 相对标准偏差为 4.0%。**结论** 该方法操作简便, 精密度和回收率高, 重复性好, 能实现目标峰与杂质峰完全分离, 结果符合要求。

关键词: 烟酰胺; 特殊医学用途配方食品; 分离; 高效液相色谱法

Determination of nicotinamide in nutritive formula food for special medical purposes by high performance liquid chromatography

LIANG Jia-Min, GAO Zhi-Yang*, CHEN Qi-Meng, HUANG Jin-Li, Cao Chun-Mie

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of nicotinamide in nutritive formula food for special medical purposes by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** After the sample was dissolved in water, using 0.1 mol/L hydrochloric acid solution and 0.1 mol/L sodium hydroxide solution to remove impurities, and the volume was fixed to 100 mL. After using Kinetex XB-C₁₈ column, the mobile phase of sodium decane sulfonate solution: acetonitrile: phosphoric acid =850:150:1 (V:V:V) was eluted isometric for 30 min at a wavelength of 261 nm. **Results** Compared with the second method of GB 5009.89-2016, the separation degree of target peak and hybrid peak of this method changed from 0.73 to 4.01, showing a good linear relationship in the concentration range of 0.001–0.020 mg/mL, $r^2=1.0000$, the average recovery was 104.50%, and the relative standard deviation was 4.0%. **Conclusion** This method is simple, has high precision and recovery, good repeatability, and can achieve the target peak and impurity peak separation. The results meet the requirements.

KEY WORDS: nicotinamide; formula food for special medical; separation; high performance liquid chromatography

1 引言

特殊医学用途配方食品(food for special medical

purposes)简称特医食品,属于特殊膳食用食品,是为满足进食受限、消化呼吸阻碍、代谢紊乱或特定疾病状态人群对营养素或膳食的特殊需求,专门加工配制而成的配方食

*通讯作者: 高芝炆, 主要研究方向为营养与食品安全。E-mail: 1046621420@qq.com

*Corresponding author: GAO Zhi-Yang, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 1046621420@qq.com

品^[1]。不仅为病人提供了基本的膳食营养需求, 更为加快病人恢复健康提供能量支持^[2]。但是此类食品不是药品, 不可代替药物起预防或治疗作用^[3]。必须有医生或临床营养师的指导, 单独使用或与其余产品配合使用^[4]。特医食品的产品类型分为全营养配方食品、特定全营养配方食品以及非全营养配方食品, 其产品形态主要以粉剂和液体为主, 其中全营养配方食品是指可以作为单一营养来源满足目标人群营养需求的特殊食品^[1], 对其营养价值研究具有重要意义。

烟酰胺(nicotinamide)又名尼克酰胺, 是烟酸的酰胺化合物, 易溶于水或乙醇, 在甘油中溶解, 是五大水溶性 B 族维生素之一, 是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(辅酶 I)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(辅酶 II)的重要组成部分, 与人体内的脂质代谢、组织呼吸、糖原分解等代谢活动起着密切关联的作用^[5]。除此之外, 烟酰胺还可以促进血管舒化、预防糙皮病、扩张血管、维持细胞呼吸与代谢, 并且在维持人体营养均衡的过程中, 起着不可或缺的作用^[6-8]。烟酰胺广泛应用于医药、食品、饲料添加剂、护肤品等领域。因此, 对烟酰胺的含量测定显得极其重要^[9]。

现行检测烟酰胺的方法有微生物法、紫外分光光度法以及高效液相色谱法^[10], 虽然微生物法结果准确度高, 但是操作步骤繁琐, 费时费力^[11]; 紫外分光光度法特异性较差, 容易产生误差^[12]; 高效液相色谱法具有灵敏度高、选择性好、高效快速等特点, 被广泛应用于分析检测领域中^[13]。

在运用 GB 5009.89-2016《食品安全国家标准 食品中烟酸与烟酰胺的测定》^[14]第二法检测全营养配方食品过程中发现, 目标峰极易与杂质峰相连, 难达到最小分离度, 给实验者带来一定的难题。本研究将 GB 5009.89-2016《食品安全国家标准 食品中烟酸与烟酰胺的测定》第二法色谱条件中的流动相更换为癸烷磺酸钠溶液:乙腈:磷酸=850:150:1(V:V:V), 其他色谱条件不变。本研究在国家标准方法的基础上, 为实现样品中的烟酰胺目标峰延后出峰, 对流动相的种类进行优化, 使得目标峰与杂质峰有更好的分离, 同时对检测结果的线性、准确度、回收率、稳定性的偏差进行一一验证, 给同行实验者在检测过程中提供一定的参考价值。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

仪器: Agilent1200 高效液相色谱仪(配 VWD 检测器, 美国安捷伦公司); XP 205 电子天平[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司]; pH 计(上海雷磁仪器公司)。

材料: 特殊医学用途全营养配方食品(固体粉末, 汤臣倍健股份有限公司)。

试剂与对照品: 乙腈(色谱纯, 德国 CNW 公司); 纯化水; 烟酰胺(纯度 99.9%, 美国 SUPELCO 公司); 磷酸、氢氧化钠、盐酸(分析纯, 广州化学试剂厂); 癸烷磺酸钠(纯度: 98.0%, 天津市光复精细化工研究所)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的制备

称取烟酰胺标准品 20 mg 至 100 mL 容量瓶, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液适量超声溶解后定容。制成浓度为 0.20 mg/mL 的储备液, 并按照参照 GB 5009.89-2016 附录 B 的方法进行标准品校准, 作为烟酰胺母液, 并于 4 °C 条件下保存。分别精密移取烟酰胺母液 0.5、2、5、8、10 mL 至 100 mL 容量瓶中用一级水定容至刻度, 作为标准工作液, 临用配制。

2.2.2 样品前处理

称取样品 4 g 左右(精确到 0.01 g), 置于 100 mL 小烧杯中, 加入适量水, 置 45 °C 超声(功率 500 W, 频率 50 kHz)用玻璃棒搅拌至溶解完全(约 20 min), 冷却至室温, 用 0.1 mol/L 盐酸和 6 mol/L 盐酸调 pH 至 1.7, 静置 2 min 后, 用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 4.5 左右, 有白色絮状物出现, 转移至 100 mL 容量瓶, 用水反复冲洗小烧杯, 合并洗液至容量瓶后加水定容至刻度。摇匀, 离心, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.2.3 色谱条件

色谱柱: Kinetex XB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)或具有同等性能的色谱柱, 流速: 1.0 mL/min, 柱温: 25 °C, 波长: 261 nm, 流动相: 癸烷磺酸钠溶液(称 1.22 g 癸烷磺酸钠到 850 mL 水溶解完全):乙腈:磷酸=850:150:1(V:V:V)。

2.2.4 试样中烟酰胺的含量

试样中烟酰胺含量计算公式为:

$$\text{试样中烟酰胺的含量 } X = \frac{C \times V \times 100}{m}$$

式中:

X——试样中烟酰胺的含量, mg/100 g;

C——试样待测液中烟酰胺的浓度, mg/mL;

V——试样溶液的体积, mL;

m——试样的质量, g。

3 结果与分析

3.1 色谱条件的优化

在 GB 5009.89-2016《食品安全国家标准 食品中烟酸与烟酰胺的测定》第二法中, 流动相的配制为庚烷磺酸钠溶液:甲醇:异丙醇=910:70:20(V:V:V), 再用高氯酸调节 pH 为 2.1。在该色谱条件中, 高氯酸为易制爆试剂, 存放条件特殊, 领取过程繁琐, 且流动相的 pH 较小, 容易对色谱柱造成损耗。在该色谱条件下检测全营养配方食品中烟酰胺时, 发现目标峰极易与杂质峰相连, 如图 1 所示, 容易造成检验结果不准确, 给实验者带来一定的困扰。

本研究将流动相更换为癸烷磺酸钠溶液:乙腈:磷酸=850:150:1(V:V:V)之后,在2.2.1条件下处理样品并检测,标准品色谱图与样品色谱图如图2、3所示。由图1和图3比对可知,样品中烟酰胺的保留时间分别由8.156 min延后至9.823 min,分离度由0.73变为4.01,且无杂质峰干扰。

3.2 方法的线性关系

在实验条件下,对混合标准工作溶液进行测定,线性方程为 $Y=22223.79194X-0.645230$,烟酰胺在0.001~0.020 mg/mL范围内有良好的线性关系, $r^2=1.0000$ 。符合

GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范》的要求(相关系数 $r^2 \geq 0.99$)^[15]。

3.3 精密度实验

6份样品中烟酰胺的平均含量分别为6.54 mg/100 g,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为3.8%,其 $RSD \leq 5.3\%$,表明该方法重复性良好。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 $1 \text{ mg}/100 \text{ g} < X \leq 10 \text{ mg}/100 \text{ g}$ 时,检测结果的 $RSD \leq 5.3\%$)。

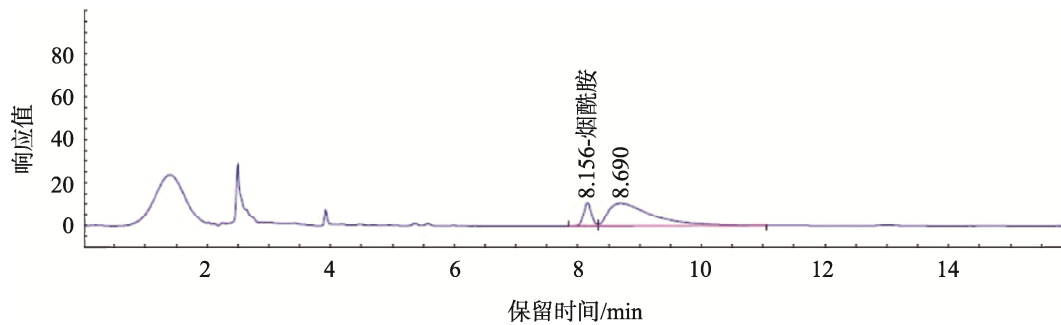


图1 样品峰与杂质峰色谱图

Fig.1 Chromatogram of sample peak and impurity peak

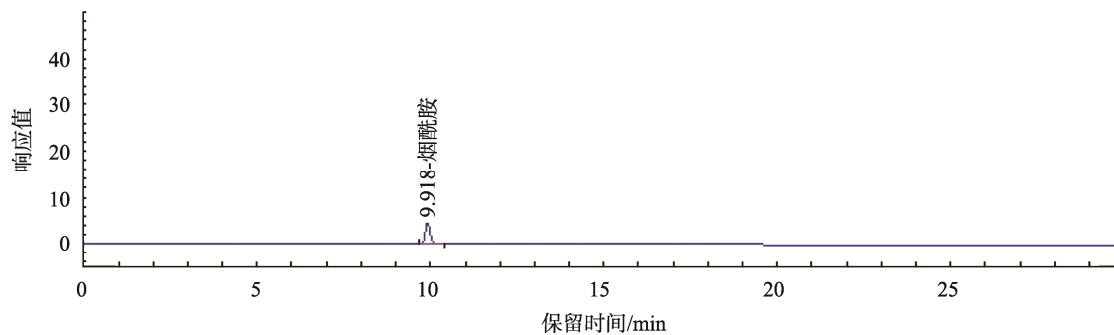


图2 烟酰胺对照的色谱图

Fig.2 Chromatogram of nicotinamide control

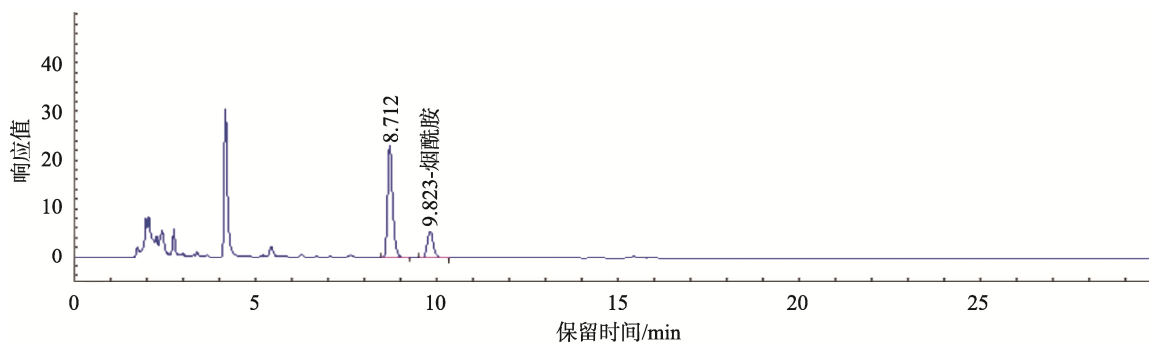


图3 样品的色谱图

Fig.3 Chromatogram of the sample

3.4 稳定性确认

将样品分别在室温下放置 0、1、2、4、8、12 h 时, 计算其 RSD 为 2.7%, 结果如表 1, 表明样品溶液在室温下 12 h 内的稳定性良好。

表 1 稳定性实验($n=6$)
Table 1 Stability test ($n=6$)

时间/h	0	1	2	4	8	12	平均值	RSD/%
峰面积/mAU	67.1	67.3	67.0	71.1	65.9	66.6	67.5	2.7

3.5 回收率实验

称取 9 份样品至 100 mL 烧杯中, 分成 3 组, 每组 3

份, 分别加入 0.020 mg/mL 标准品溶液 0.8、1.0、1.2 mL, 按照 2.2.1 的方法处理样品。如表 2 所示, 当加标量为 80%、100%和 120%时, 样品中烟酰胺的平均回收率为 104.5%, RSD 为 4.0%, 符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范》的要求(当含量满足 $0.1 \text{ mg}/100 \text{ g} < X \leq 10 \text{ mg}/100 \text{ g}$ 时, 回收率为 90%~110%), 表明该研究方法对烟酰胺的含量测定满足要求。

3.6 方法检测结果与理论含量结果比对

称取全营养配方食品(批号: 202001、202002、202003)各 4 g, 在 2.2.1 条件下处理样品并检测, 测得烟酰胺含量结果如表 3 所示。由表 3 数据可看出, 样品中的烟酰胺测得含量与理论投料中的烟酰胺理论标准偏差 $< 15\%$, 符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范》的要求(当含量满足 $0.01 \text{ g}/\text{kg} < X \leq 1 \text{ g}/\text{kg}$ 时, 检测结果的准确度偏差 $< 15\%$), 表明该方法检测烟酰胺结果准确。

表 2 加标回收率实验结果($n=3$)
Table 2 Spiked recovery rate experiment results ($n=3$)

项目名称	加标量	称样量/g	测定浓度/(mg/mL)	理论标准品加入量/mg	测得标准品加入量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
烟酰胺	80%加标	4.5253	0.00395408	0.1011	0.09945	98.371	104.50	4.0
		4.5371	0.00399068	0.1011	0.10234	101.228		
		4.5279	0.00395970	0.1011	0.09985	98.759		
		4.4782	0.00512894	0.2022	0.22002	108.813		
		4.4416	0.00511125	0.2022	0.20964	103.682		
		4.4318	0.00504340	0.2022	0.21450	106.083		
	120%加标	4.6318	0.00630045	0.3033	0.32713	107.855		
		4.6379	0.00629579	0.3033	0.32626	107.570		
		4.6277	0.00630522	0.3033	0.32787	108.101		

表 3 测定结果与产品理论含量数据比对($n=3$)
Table 3 Comparison of measured results with theoretical content data ($n=3$)

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	202001	6.41	6.43	0.4	< 15	符合规定
	202002	6.28		2.7		符合规定
	202003	6.51		1.3		符合规定

4 结论

本研究改进了高效液相色谱法来检测特殊医学用途配方食品中烟酰胺含量, 在波长 261 nm 下, 用流动相为癸烷磺酸钠溶液:乙腈:磷酸=850:150:1(V:V:V), 等度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 实现目标峰与杂质峰有更好的分离, 分离度为 4.01。该方法操作简便、准确度高、重复性好、稳

定性强、回收率高, 可作为检测特殊医学用途配方食品中烟酰胺的分析方法。

参考文献

- [1] 王溢, 汪新洁, 杨波, 等. 特殊医学用途全营养配方食品的稳定性研究[J/OL]. 食品工业科技, 1-14 [2020-07-29]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.TS.20200725.1528.004.html>.

- Wang Y, Wang XJ, Yang B, *et al.* Study on the stability of whole nutritional formula food for special medical use [J/OL]. Food Ind Sci Technol, 1-14 [2020-07-29]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.TS.20200725.1528.004.html>.
- [2] Filomena G, Philipp S, Lisa B, *et al.* ESPEN guidelines on nutritional support for polymorbid internal medicine patients [J]. Clin Nutr, 2018, 37(1).
- [3] 韩军花.《特殊医学用途配方食品通则》(GB 29922-2013)解读[N]. 中国食品报, 2014-09-02 (008).
Han JH. Interpretation of *General rules of formula food for special medical use* (GB 29922-2013) [N]. China Food News, 2014-09-02 (008).
- [4] 杨国峰, 周建新, 汪海峰, 等. 花生壳提取物的制备及其抗氧化与抗菌活性的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2007, (2): 97-101.
Yang GF, Zhou JX, Wang HF, *et al.* Advances in the preparation of peanut shell extract and its antioxidant and antibacterial activities [J]. Food Ferment Ind, 2007, (2): 97-101.
- [5] 李志远, 刘屹, 左文松. 烟酰胺片含量及有关物质测定方法改进[J]. 中国药业, 2019, 28(9): 35-38.
Li ZY, Liu Y, Zuo WS. Improved method for determination of nicotinamide tablets and related substances [J]. China Pharm, 2019, 28(9): 35-38.
- [6] 顾晨荣, 徐琼, 庞贝妮, 等. 微生物法测定婴幼儿乳粉中烟酸含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(5): 1143-1146.
Gu CR, Xu Q, Pang BN, *et al.* Determination of niacin in infant milk powder by microbiological method [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(5): 1143-1146.
- [7] 郝刚, 俞蕴莉, 顾炳仁. UPLC-MS/MS法测定奶粉中烟酸的含量[J]. 中国乳业, 2014, (11): 54-58.
Hao G, Yu YL, Gu BR. Determination of niacin in milk powder by UPLC-MS/MS method [J]. China Dairy, 2014, (11): 54-58.
- [8] 刘志楠, 李海礁, 宋晓东, 等. 牛奶中烟酸本底含量的测定[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(10): 103-106.
Liu ZN, Li HJ, Song XD, *et al.* Determination of the niacin in milk [J]. Food Res Dev, 2012, 33(10): 103-106.
- [9] 邱清莲, 黄成安, 梁嘉敏, 等. 紫外串联荧光检测法测定奶昔中维生素B₆和烟酰胺[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(9): 2795-2800.
Qiu QL, Huang CA, Liang JM, *et al.* Determination of vitamin B₆ and nicotinamide in milkshakes by ultraviolet fluorescence detection [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(9): 2795-2800.
- [10] 陈毓芳, 林海丹, 吴宏中, 等. 高效液相色谱法同时测定保健食品中 11 种功效成分[J]. 食品科学, 2015, 36(8): 244-249.
Chen YF, Lin HD, Wu HZ, *et al.* Simultaneous determination of 11 functional components in health food by high performance liquid chromatography [J]. Food Sci, 2015, 36(8): 244-249.
- [11] 毛希琴. 高效液相色谱法测定化妆品中的烟酸和烟酰胺[J]. 日用化学工业, 2012, 42(6): 469-472.
Mao XQ. Determination of niacin and nicotinamide in cosmetics by high performance liquid chromatography [J]. J Daily Chem Ind, 2012, 42(6): 469-472.
- [12] 王浩, 刘艳琴, 杨红梅, 等. 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, 37(10): 56-58.
Wang H, Liu YQ, Yang HM, *et al.* Simultaneous determination of five water-soluble vitamins in infant formula by HPLC [J]. China Dairy Ind, 2009, 37(10): 56-58.
- [13] 熊赛霞. 高效液相色谱法的特点及应用[J]. 现代食品, 2020, (3): 199-201.
Xiong SX. Characteristics and application of high performance liquid chromatography [J]. Mod Food, 2020, (3): 199-201.
- [14] GB 5009.89-2016 食品安全国家标准 食品中烟酸和烟酰胺的测定[S].
GB 5009.89-2016 National food safety standard-Determination of niacin and nicotinamide in food [S].
- [15] 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 for physical-Chemical testing of food [S].

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



梁嘉敏, 助理研究员, 主要研究方向为营养与食品安全。

E-mail: 1025171799@qq.com



高芝扬, 主要研究方向为营养与食品安全。

E-mail: 1046621420@qq.com