

pH 对高效液相色谱法测定保健食品中维生素 B₁₂ 含量结果的影响

许倩倩¹, 成雪², 贾迪¹, 李思蕾¹, 郭义赛¹, 安慧心², 李克静², 李淑娟^{2*}

(1. 中国检验检疫科学研究院综合检测中心, 北京 100176; 2. 中检科(北京)测试技术有限公司, 北京 100083)

摘要: **目的** 研究不同 pH 条件对高效液相色谱法检测保健食品中维生素 B₁₂ 检测结果差异性的影响。**方法** 选取原料中添加较高含量碳酸钙且样品溶液 pH>7.0 的复合维生素片, 调节样品溶液 pH 为 4.0~4.5、5.0~5.5、6.0~6.5, 采用高效液相色谱法测定样品中维生素 B₁₂ 的含量并记录; 检测并记录用 pH 分别为 4.02、5.01、6.05 的水稀释得到的标准中间液维生素 B₁₂ 的检测结果; 记录并分析 pH 为 4.0~4.5、5.0~5.5、6.0~6.5 的样品和碳酸钙溶液 60 min 内 pH 的变化。**结果** 不同 pH 样品溶液维生素 B₁₂ 测得的结果值有显著性差异, 调节 pH 为 4.20~4.50 时测得的结果值与样品实际结果值相符; 维生素 B₁₂ 标准中间液在不同 pH 下测得的检测结果相同。样品和碳酸钙溶液的 pH 在 60 min 内随着时间的变化发生改变, 调节溶液 pH>5.0 时, 溶液的酸碱性较不稳定, 在 10~20 min 内溶液会由酸性变为碱性; 调节溶液 pH<5.0 时, 溶液在 60 min 内较稳定始终为酸性, 碳酸钙溶液的酸碱性 with 样品溶液有相同的变化趋势。**结论** 在保健食品维生素 B₁₂ 的检测中需要关注样品中原辅料的种类和配比对样品溶液检测过程中酸碱性的影响, 对原料中含较高含量碳酸钙且样品溶液 pH>7.0 的样品, 在检测维生素 B₁₂ 时需用柠檬酸调节溶液 pH 为 4.2~5.0。

关键词: pH; 维生素 B₁₂; 保健食品; 高效液相色谱法; 碳酸钙

Effect of pH on the determination results of vitamin B₁₂ in health food by high performance liquid chromatography

XU Qian-Qian¹, CHENG Xue², JIA Di¹, LI Si-Lei¹, GUO Yi-Sai¹, AN Hui-Xin², LI Ke-Jing², LI Shu-Juan^{2*}

(1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine Comprehensive Test Center, Beijing 100176, China;
2. CAIQTEST (Beijing) Co., Ltd., Beijing 100083, China)

ABSTRACT: Objective To study the effect of different pH conditions on the difference of detection results of vitamin B₁₂ in health food by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The compound vitamin tablets with high content of calcium carbonate and pH>7.0 were selected and adjusted to pH4.0~4.5, 5.0~5.5 and 6.0~6.5. The content of vitamin B₁₂ in the sample was determined and recorded by HPLC. The detection results of vitamin B₁₂ in the standard intermediate solution diluted with water with pH of 4.02, 5.01 and 6.05 were detected and recorded; the pH changes of samples with pH of 4.0~4.5, 5.0~5.5, 6.0~6.5 and calcium carbonate solution within 60 min were recorded and analyzed. **Results** There were significant differences in the results of vitamin B₁₂ in different pH samples. When the pH was adjusted from 4.20 to 4.50, the measured results were consistent with the actual values of samples; the detection results of vitamin B₁₂ standard intermediate solution at different pH were the same. The pH of the sample and calcium carbonate solution changed with time within 60 min. When the pH of the

*通讯作者: 李淑娟, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: lishujuan@caiqtest.com

*Corresponding author: LI Shu-Juan, Engineer, CAIQTEST (Beijing) Co., Ltd, Beijing 100083, China. E-mail: lishujuan@caiqtest.com

solution was adjusted to be more than 5.0, the pH of the solution was unstable, and the solution changed from acidic to alkaline within 10–20 min; when the pH of the adjusted solution was less than 5.0, the solution was stable and always acidic within 60 min, and the pH of calcium carbonate solution had the same change trend as the sample solution. **Conclusion** In the detection of vitamin B₁₂ in health foods, it is necessary to pay attention to the influence of the type and ratio of raw materials and excipients on the acidity and alkalinity of the sample solution. For the samples with high content of calcium carbonate and pH>7.0, citric acid should be used to adjust the pH of the solution to 4.2–5.0.

KEY WORDS: pH; vitamin B₁₂; health food; high performance liquid chromatography; calcium carbonate

1 引言

维生素 B₁₂ 参与体内多种代谢活动, 是维持机体健康一种不可或缺的营养素^[1–5]。人体不能合成自身所需的维生素 B₁₂, 需要通过食物或添加维生素 B₁₂ 的营养补充剂中获取。维生素 B₁₂ 在生产提纯过程中需加入氰化钠, 使天然形式的维生素 B₁₂ 转化为性质更为稳定的氰钴胺素。氰钴胺素通常作为食品添加剂^[6–8], 添加到保健食品复合维生素片中, 达到补充维生素 B₁₂ 的目的。维生素 B₁₂ 易溶于水 and 乙醇, 在强酸(pH<2)和碱性溶液中易分解, 而在 pH 为 4.5–5.0 弱酸性条件下最稳定^[9], 维生素 B₁₂ 结构如图 1 所示。维生素 B₁₂ 具有独特的分子空间结构, 溶液的酸碱性对维生素 B₁₂ 的稳定性有重要的影响。冯亚青等^[10–13]研究表明, 维生素 B₁₂ 分子中独立碱与中心钴离子相连的 Co-N 键稳定性较弱, 在一定的酸性条件中断裂。维生素 B₁₂ 的中心结构咕啉环有丙酸侧链, 碱性溶液中丙酸易与溶液中的 OH⁻ 发生反应, 破坏分子中氨基醇与吡咯环上丙酸相连的共价键结构, 碱性和强酸性的环境都将导致维生素 B₁₂ 的分子结构发生变化。

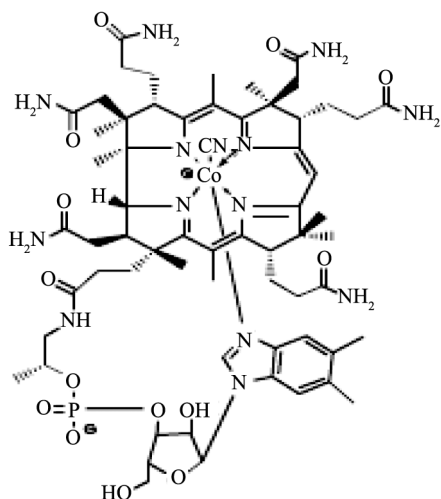


图 1 维生素 B₁₂ 结构式

Fig.1 Structural formula of vitamin B₁₂

针对不同年龄段、不同人群所需营养物质的特点, 保健食品复合维生素片中添加原辅料的种类和配比差异较大^[14], 孕妇和老年人服用的复合维生素片原料中通常添加较高含量的碳酸钙, 碳酸钙将对样品溶液的酸碱性产生较大的影响, 进而对维生素 B₁₂ 的检测结果产生不同的影响。目前对于此类原料中添加较高含量(>30%)碳酸钙样品, 由于其本身所含原料的特殊性影响维生素 B₁₂ 检测结果的研究较少。本研究将参照 GB/T 5009.217-2008 《保健食品中维生素 B₁₂ 的测定》^[15] 方法, 选取原料中包含较高含量碳酸钙且样品溶液 pH>7.0 的复合维生素片为样品, 研究不同 pH 条件下维生素 B₁₂ 高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 检测结果的差异性并探究其原因, 为今后此类产品维生素 B₁₂ 的检测分析提供思路。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

柠檬酸、碳酸钙、三氟乙酸(分析纯, 国药集团); 甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司)。

PL303 电子天平(精度 0.001 g)、XS105DU 电子天平(精度 0.01 mg)、FE28 梅特勒 FiveEasy Plus pH 计[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; KQ218 型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司); 日立 CF16RXII 高速冷冻离心机(日本 HitachiKoki 公司); 维生素 B₁₂ 免疫亲和柱(天津博纳艾杰尔有限公司); 安捷伦 1200 高效液相色谱仪附带紫外检测器(美国安捷伦科技有限公司)。

原料中添加有较高含量碳酸钙且样品溶液 pH>7 样品: 复合维生素片 1(维生素 B₁₂ 含量为 1.1~1.2 μg/片)、复合维生素片 2(维生素 B₁₂ 含量为 3.3~3.5 μg/片)、复合维生素片 3(维生素 B₁₂ 含量为 2.7~2.9 μg/片)。

2.2 实验方法

2.2.1 维生素 B₁₂ 标准系列配制

准确称取 10.12 mg (精确至 0.01 mg) 维生素 B₁₂ 标准品, 用 5% 乙醇溶解定容至 10 mL 棕色容量瓶内混匀得标准储备液; 取 1.00 mL 标准储备液于 100 mL 棕色容量瓶内

水稀释定容得标准中间液, 分别取 0.10、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 mL 标准中间液于 10 mL 棕色容量瓶内, 水稀释定容得维生素 B₁₂ 标准溶液系列。

2.2.2 不同 pH 样品溶液制备及 HPLC 检测

分别准确称取 2 g (精确至 0.001 g) 样品 1、2、3 各 3 份, 用 25 mL 二次水溶解, 用 10% 柠檬酸溶液调节其 pH 值分别在 4.0~4.5、5.0~5.5、6.0~6.5 之间, 超声提取 15 min, 定容至 50 mL 后以 10000 r/min 离心 3 min, 取 20 mL 样品溶液使用免疫亲和柱富集, 甲醇洗脱, 氮吹浓缩至干, 0.04% 三氟乙酸溶液复溶, 过滤膜, 按照 GB/T 5009.217-2008 保健食品中维生素 B₁₂ 测定方法中免疫亲和法的 HPLC 仪器条件进行检测。

2.2.3 不同 pH 标准中间液配制及 HPLC 检测

量取 3 份 25 mL 二次水, 用 10% 柠檬酸溶液调节其 pH 值分别为 4.02、5.01、6.05, 取 0.10 mL 标准储备液分别用 pH 为 4.02、5.01、6.05 的二次水稀释定容至 10 mL 得标准中间液, 随后和上述样品溶液进行相同条件下 HPLC 检测。

2.2.4 不同 pH 样品和碳酸钙溶液 pH 变化记录

另称取 2 g (精确至 0.001 g) 样品 1、2、3 各 3 份样品, 用 10% 柠檬酸溶液调节其 pH 值分别为 4.0~4.5、5.0~5.5、6.0~6.5 之间, 随后每隔 10 min 对样品溶液 pH 进行检测并记录。

称取 3 份 1.35 g 碳酸钙试剂, 用 25 mL 二次水溶解, 用 10% 柠檬酸溶液调节其 pH 值分别为 4.02、5.01、6.05, 随后每隔 10 min 对碳酸钙溶液 pH 进行检测并记录。

3 结果与分析

3.1 不同 pH 样品和标准中间液维生素 B₁₂ HPLC 检测结果及分析

样品 1、2、3 在不同 pH 条件下测得的维生素 B₁₂ 含量结果如表 1 所示。可以看出每个样品在 3 个不同 pH 条件下 HPLC 测得的样品中维生素 B₁₂ 的含量结果均有显著性差异 ($P < 0.05$), 样品溶液 pH 调为 4.20~4.50 之间测得的结果与样品实际结果值相符。

不同 pH 条件下标准中间液维生素 B₁₂ HPLC 的检测结果显示, 均为 10 μg/mL, 与标准中间液的理论计算值相同。

对以上得到的结果分析, 发现维生素 B₁₂ 在 4.5~7.0 水溶液中性质稳定, 不会发生分解, 不同 pH 样品溶液测得的维生素 B₁₂ 结果不同, 可能是由于不同 pH 样品溶液的酸碱性在检测过程中发生了改变。

3.2 不同 pH 样品和碳酸钙溶液 pH 变化记录结果及分析

对 pH 分别为 4.32、5.01 和 6.05 的样品 1, 每隔 10 min 记录得到的样品溶液 pH 变化, 结果如表 2 所示。

表 1 不同 pH 条件下样品溶液维生素 B₁₂ HPLC 检测结果 ($n=3$)
Table 1 HPLC detection results of vitamin B₁₂ in sample solutions under different pH conditions ($n=3$)

样品	pH	维生素 B ₁₂ 检测结果/(μg/片)	相对标准偏差/%
样品 1	4.32	1.1±0.02 ^a	1.75
	5.01	0.84±0.03 ^b	3.84
	6.05	0.21±0.01 ^c	4.76
样品 2	4.25	3.4±0.03 ^a	0.74
	5.03	2.6±0.08 ^b	3.26
	6.27	0.42±0.02 ^c	3.70
样品 3	4.38	2.8±0.03 ^a	0.89
	5.16	1.5±0.04 ^b	2.39
	5.87	0.33±0.02 ^c	4.58

表 2 样品 1 溶液 pH 值变化记录
Table 2 Record of pH value change of sample 1 solution

时间/min	pH=4.32	pH=5.01	pH=6.05
0	4.32	5.01	6.05
10	4.60	6.94	7.38
20	4.82	7.40	7.68
30	4.98	7.99	7.90
40	5.19	7.91	8.13
50	5.47	8.07	8.96
60	5.69	8.34	9.01

对 pH 分别为 4.25、5.07 和 6.19 的样品 2, 每隔 10 min 记录得到的样品溶液 pH 变化, 结果如表 3 所示。

表 3 样品 2 溶液 pH 值变化记录
Table 3 Record of pH value change of sample 2 solution

时间/min	pH=4.25	pH=5.07	pH=6.19
0	4.25	5.07	6.19
10	4.61	5.93	7.27
20	4.83	6.67	7.64
30	5.22	7.49	8.01
40	5.50	7.82	8.16
50	5.91	8.00	8.32
60	6.29	8.23	8.42

对 pH 分别为 4.38、5.08 和 5.98 的样品 3, 每隔 10 min 记录得到的样品溶液 pH 变化, 结果如表 4 所示。

表 4 样品 3 溶液 pH 值变化记录
Table 4 Record of pH value change of sample 3 solution

时间/min	pH=4.38	pH=5.08	pH=5.98
0	4.38	5.08	5.98
10	4.62	5.72	6.79
20	4.76	6.78	7.56
30	4.86	7.66	7.89
40	4.90	8.05	8.13
50	5.05	8.12	8.21
60	5.42	8.26	8.29

对以上得到的数据结果进行分析, 结果发现随着时间的增加, 样品 1、2、3 溶液的 pH 值均不断升高。60 min 内, pH 为 4.20~4.50 的溶液仍显酸性; pH 为 5.00~5.20、5.80~6.30 的溶液则变为碱性。此时 pH 为 5.00~5.20 的样品溶液在 20 min 左右开始呈碱性, pH 为 5.80~6.30 的样品溶液则在 10 min 左右开始呈碱性。

pH 为 4.02、5.01、6.05 碳酸钙溶液 pH 的变化结果如表 5 所示, 数据结果显示随着时间的增加, 溶液的 pH 不断升高, 60 min 后测得溶液的 pH 分别为 5.38、8.21 和 9.00。pH 为 4.02 的溶液 60 min 内其仍呈弱酸性, pH 为 5.01 的溶液 20 min 后开始呈碱性, pH 为 6.05 的溶液则在 10 min 后开始呈碱性。

表 5 碳酸钙溶液 pH 值变化记录
Table 5 Record of pH value change of calcium carbonate solution

时间/min	pH=4.02	pH=5.01	pH=6.05
0	4.02	5.01	6.05
10	4.50	6.94	7.38
20	4.72	7.40	7.68
30	4.91	7.91	7.90
40	5.09	7.99	8.13
50	5.27	8.07	8.96
60	5.38	8.21	9.00

对以上得到的数据结果进行对比分析可以发现不同 pH 的 3 份样品和碳酸钙溶液在 60 min 内 pH 值的变化趋势基本一致。在制备不同 pH 样品过程中发现, 随着柠檬酸溶液的加入, 溶液中有大量气体产生, 溶液由混浊逐渐变得澄清, 与制备不同 pH 碳酸钙溶液时产生的实验现象相同。上述分析结果表明, 不同 pH 样品溶液维生素 B₁₂ 检测结果的差异是由于样品溶液酸碱性的变化, 导致样品溶液碱性发生变化的物质为碳酸钙。

4 结论与讨论

本研究分析了不同 pH 条件对高效液相色谱法检测保健食品中维生素 B₁₂ 检测结果差异性的影响。结果发现不同 pH 条件下样品溶液维生素 B₁₂ 检测结果有显著性差异, 标准中间液维生素 B₁₂ 检测结果相同。记录相应 pH 条件下样品溶液和碳酸钙溶液 60 min 内 pH 的变化, 发现样品和碳酸钙溶液在 pH>5.0 时, 溶液 30 min 内会变为碱性, pH<5.0 时溶液始终为酸性; 导致溶液酸碱性发生变化的原因是柠檬酸与碳酸钙的反应速率较慢, 在加入一定量柠檬酸后会使得样品溶液在短时间内呈现酸性, 随着时间的增加加入的柠檬酸被完全消耗, 此时样品中仍然存在过量的碳酸钙, 碳酸钙在水中发生水解生成 HCO₃⁻ 使溶液呈碱性, 维生素 B₁₂ 在碱性溶液中易发生分解, 导致其检测结果偏低。

保健食品由于添加原料、辅料的多样性和复杂性导致样品在溶解过程中 pH 变化较大, 在保健食品维生素 B₁₂ 的检测中要重视产品中添加的原辅料种类及其配比, 在维生素 B₁₂ 检测之前了解样品中添加原辅料的种类及其化学性质, 判断其将对样品溶液酸碱性的影响, 避免其在检测过程中引起溶液酸碱性的变化。在实际检测工作中, 对原料中添加较高含量(>30%)碳酸钙且样品溶液 pH>7.0 的片剂类样品进行处理时, 应调节 pH 范围为 4.2~5.0, 以保证维生素 B₁₂ 在 HPLC 检测过程中样品溶液始终处于酸性条件下, 避免由于溶液酸碱性的变化影响检测结果的准确性。

参考文献

- 李晶晶. 浅谈维生素 B₁₂ 的功能与应用[J]. 健康之友, 2019, (12): 120.
Li JJ. Talking about the function and application of vitamin B₁₂ [J]. Healthy Friends, 2019, (12): 120.
- 晁志引. 食品添加剂维生素 B₁₂ 的检测研究进展[J]. 中国食品, 2019, (7): 133.
Chao ZY. Research progress in the detection of food additive vitamin B₁₂ [J]. China Foods, 2019, (7): 133.
- 王冀芳. 叶酸和维生素 B₁₂ 联合治疗对血管性痴呆伴 H 型高血压患者血浆 Hcy 及炎症因子水平和血管壁内皮功能的影响效果分析[J]. 当代医学, 2018, 24(31): 79-81.
Wang JF. The effect of combined treatment of folic acid and vitamin B₁₂ on plasma Hcy and inflammatory factor levels and vascular endothelial function in patients with vascular dementia with H-type hypertension [J]. Contemp Med, 2018, 24(31): 79-81.
- 李敏, 陈超阳, 陈哲晖, 等. 钴胺素代谢及其不同形式的临床应用[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2020, 35(9): 716-720.
Li M, Chen CY, Chen ZH, et al. Cobalamin metabolism and its different forms of clinical application [J]. Chin J Pract Pediatr, 2020, 35(9): 716-720.
- 任茜, 孙建琴. 微量营养素补充剂对老年人认知功能影响的研究进展[J]. 中华老年医学杂志, 2019, 38(12): 1435-1440.

- Ren Q, Sun JQ. Research progress on the effects of micronutrient supplements on the cognitive function of the elderly [J]. *Chin J Geriatr*, 2019, 38(12): 1435–1440.
- [6] 何嘉明. 食品中维生素 B₁₂ 的检测方法分析[J]. *现代食品*, 2019, (5): 169–171.
- He JM. Analysis of detection methods of vitamin B₁₂ in foods [J]. *Mod Food*, 2019, (5): 169–171.
- [7] 付炎, 李力更, 王于方, 等. 天然药物化学史话: 维生素 B₁₂ [J]. *中草药*, 2015, 46(9): 1259–1264.
- Fu Y, Li LG, Wang YF, *et al.* History of natural medicine chemistry: Vitamin B₁₂ [J]. *Chin Herb Med*, 2015, 46(9): 1259–1264.
- [8] 权爽, 李菊, 臧恒昌. 甲钴胺的环境友好生产工艺过程研究[J]. *分析仪器*, 2018, (4): 195–202.
- Quan S, Li J, Zang HC. Study on the environmentally friendly production process of methylcobalamin [J]. *Anal Instrum*, 2018, (4): 195–202.
- [9] 徐琼, 王志伟, 刘洋, 等. 维生素 B₁₂ 生物合成及检测技术研究进展[J]. *食品工业*, 2019, 40(2): 278–283.
- Xu Q, Wang ZW, Liu Y, *et al.* Research progress of vitamin B₁₂ biosynthesis and detection technology [J]. *Food Ind*, 2019, 40(2): 278–283.
- [10] 周爱儒. 生物化学第 6 版[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- Zhou AR. *Biochemistry 6th Ed* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2011.
- [11] 冯亚青, 张晓东, 张卫红. 维生素 B₁₂ 模型分子侧链钴-氮键稳定性研究[J]. *高等学校化学学报*, 1998, 19(4): 550–554.
- Feng YQ, Zhang XD, Zhang WH. Study on the stability of side chain cobalt-nitrogen bond of vitamin B₁₂ model [J]. *Chem J Chin Univ*, 1998, 19(4): 550–554.
- [12] 冯亚青, 张卫红. 咪唑钴啉酯的合成及钴-氮键稳定性的研究[J]. *有机化学*, 1999, 19(5): 523–527.
- Feng YQ, Zhang WH. Synthesis of imidazocobalinate and study on the stability of cobalt-nitrogen bond [J]. *Chin Organ Chem*, 1999, 19(5): 523–527.
- [13] 冯亚青, 董宁, 张卫红. 双分子络合维生素 B₁₂ 模型化合物的合成[J]. *高等学校化学学报*, 1998, 19(S1): 258–259.
- Feng YQ, Dong N, Zhang WH. Synthesis of bimolecular complex vitamin B₁₂ model compound [J]. *Chem J Chin Univ*, 1998, 19(S1): 258–259.
- [14] 朱永洙. 维生素 B₁₂ 的药理作用及临床应用研究进展[J]. *中国保健营养*, 2017, 27(18): 457–458.
- Zhu YZ. Research progress on pharmacological effects and clinical application of vitamin B₁₂ [J]. *China Health Nutr*, 2017, 27(18): 457–458.
- [15] GB/T 5009.217-2008 保健食品维生素 B₁₂ 检测方法[S].
- GB/T 5009.217-2008 Determination of vitamin B₁₂ in health food [S].

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



许倩倩, 硕士, 工程师, 主要研究方向为保健食品功效成分检测。

E-mail: xuqianqian@caiqtest.com



李淑娟, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: lishujuan@caiqtest.com