

谭婉清, 王术玲, 关日晴. HPLC 法测定保健食品 B 族维生素片中 9 种维生素 B 的含量 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(13): 303-310. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110019

TAN Wanqing, WANG Shuling, GUAN Riqing. Determination of Nine Kinds of Vitamin B Components in Healthy Food Vitamin B Tablets by HPLC[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(13): 303-310. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110019

· 分析检测 ·

HPLC 法测定保健食品 B 族维生素片中 9 种维生素 B 的含量

谭婉清^{1,2}, 王术玲^{1,*}, 关日晴²

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东广州 510006;

2. 广东省药品检验所, 广东广州 510663)

摘要:目的: 建立高效液相色谱-二极管阵列检测 (HPLC-DAD) 法测定 B 族维生素片中 9 种维生素 B 成分的含量。方法: 样品中的叶酸经 0.3% 氨溶液超声提取, 样品中的生物素、维生素 B₁₂ 和泛酸经水超声提取, 样品中的维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₆、烟酸和烟酰胺经 0.1% 盐酸超声提取, 经 C₁₈ 柱分离, 以甲醇-0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液为流动相进行梯度洗脱, 泛酸和生物素在 205 nm 波长处进行检测, 维生素 B₁、维生素 B₂、烟酸和烟酰胺在 256 nm 波长处进行检测, 维生素 B₆ 和叶酸在 287 nm 波长处进行检测, 维生素 B₁₂ 在 361 nm 波长处进行检测。结果: 9 种成分能实现较好地分离, 在各自线性范围内线性关系良好, 决定系数 R² 均大于 0.999, 平均回收率为 91.8%~106.9%, RSD 为 0.2%~4.8%, 方法的检出限在 0.05~4.7 mg/kg 之间。结论: 该方法操作快速简便、精密度和重复性好, 能快速完成保健食品 B 族维生素片中 9 种维生素 B 成分的测定, 并降低成本。

关键词: HPLC-DAD, B 族维生素片, 维生素 B₁, 维生素 B₂, 维生素 B₆, 维生素 B₁₂, 烟酸, 烟酰胺, 叶酸, 泛酸, 生物素

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)13-0303-08

本文网刊:

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110019



Determination of Nine Kinds of Vitamin B Components in Healthy Food Vitamin B Tablets by HPLC

TAN Wanqing^{1,2}, WANG Shuling^{1,*}, GUAN Riqing²

(1. College of Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Guangdong Drug Inspection Institute, Guangzhou 510663, China)

Abstract: Objective: To establish a method for the determination of nine vitamin B components in vitamin B tablets by high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD). Method: Folic acid was ultrasonically extracted with 0.3% ammonia solution, biotin, vitamin B₁₂ and pantothenate acid were ultrasonically extracted with water, the vitamins B₁, B₂, B₆, niacin and nicotinamide were ultrasonically extracted by 0.1% hydrochloric acid, separated by C₁₈ column with methanol-0.1 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution as the mobile phase for gradient elution. Pantothenate acid and biotin were detected at the wavelength of 205 nm, vitamins B₁, B₂, niacin and nicotinamide were detected at the wavelength of 256 nm, vitamins B₆ and folic acid were detected at the wavelength of 287 nm, vitamins B₁₂ was detected at the wavelength of 361 nm. Results: The results showed that the nine components could be separated well, and the linear relationship was good in their linear range. The average recoveries were 91.8%~106.9%, RSD were 0.2%~4.8%, and the detection limit of the method were 0.05~4.7 mg/kg. Conclusion: This method is rapid, simple, accurate and repeatable. It can quickly complete the determination of nine vitamin B components in health food vitamin B tablets and reduce the cost.

收稿日期: 2021-11-03

作者简介: 谭婉清 (1985-), 女, 本科, 中药执业药师, 研究方向: 色谱分析, E-mail: 452831302@qq.com。

* 通信作者: 王术玲 (1977-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中药分析, E-mail: jingelwang@gzucm.edu.cn。

Key words: HPLC-DAD; vitamin B tablets; vitamins B₁; vitamins B₂; vitamins B₆; vitamin B₁₂; niacin; nicotinamide; folic acid; pantothenate acid; biotin

水溶性维生素是人体维持正常生理功能所必需的一类微量有机物质,适量摄取对人的生长、代谢、发育都具有积极的促进作用^[1-4],而过量摄入却会造成严重危害,如过量摄入维生素 B₆ 会对神经产生较大的不良影响,导致一些神经毒素的产生,并大幅度影响人们的肢体感官;维生素 B₁ 的大量使用会对人体的诸多新陈代谢环节产生很大的影响,最终导致人体产生头晕、恶心、心律失常、眼花等现象;维生素 B₁₂ 的过量使用也会导致人体另一种营养素叶酸的缺乏,同时导致心脏病患者病情的进一步加重^[5]。由此可见,需要科学、合理地控制维生素的摄入量。

随着食品工业的发展和人们对保健食品需求程度的日渐提高,市场上出现了各类添加维生素 B 的保健食品,虽然已引起了质量监督部门极大的重视,但目前我国针对此类商品功效成分检测的相关标准^[6-8]并未完善,在实际应用中只能参考食品标准或药典^[9-16]。其中,GB/T 5009.197-2003 在流动相中加入对柱效及泵损害较大的离子对试剂;GB 5009.84-2016 用到气味较大的正丁醇,前处理需要繁琐的衍生化,并且测定时受衍生产物在 4 h 内稳定的限制;食品标准中测定烟酸、烟酰胺、叶酸、泛酸和生物素的仲裁法为微生物法,该方法普遍存在操作繁琐、测定时间长、测定误差大、测定结果重复性差等不足。这些方法并不适用于基质相对简单的保健食品,会降低待测组分的回收率。近年来,液相色谱-质谱联用检出限低,准确度高,备受科研人员的青睐^[17-20],但是质谱仪器价格较贵、日常维护费用也很高,很难在基层普及,另外,对于常量的维生素而言,容易污染仪器,造成仪器残留。文献报道^[21-24],用普通高效液相色谱法测定维生素 B 的并不少,但覆盖维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₆、烟酸、烟酰胺、泛酸、叶酸、生物素和维生素 B₁₂ 这 9 种常见成分进行含量测定的研究尚未见报道。

本研究旨在建立一种简便、快速、准确的高效液相色谱-二极管阵列(HPLC-DAD)检测方法,适用于保健食品 B 族维生素片中 9 种维生素 B 成分的含量测定,以期提高检测分析效率,并降低检测成本。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

10 批 B 族维生素片 9 批来自 2018~2019 年保健食品监督抽检样品,1 批来自 2017 年保健食品委托检验样品;9 种维生素标准品:维生素 B₁(纯度为 97.9%)、维生素 B₂(纯度为 98.2%)、维生素 B₆(纯度为 98.2%)、烟酸(纯度为 99.8%)、叶酸(纯度为 89.3%)、泛酸钙(纯度为 96.8%)、生物素(纯度为 99.5%)、维生素 B₁₂(纯度为 90.5%) 中国食品药品检定研究院;烟酰胺 纯度为 99.5%,Dr.

Ehrenstorfer GmbH;甲醇 色谱纯,霍尼韦尔国际公司;水 超纯水;其他试剂为分析纯 广州化学试剂厂。

Agilent 1260 高效液相色谱仪-二极管阵列检测器 美国安捷伦公司;CPA224S 万分之一电子天平 德国赛多利斯集团;XS205DU 十万分之一电子天平 梅特勒-托利多集团;KQ-500DE 数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;Milli Q Advantage with A10 超纯水发生器 默克密理博公司;LD5-2B 离心机 北京京立离心机有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液的配制

1.2.1.1 标准储备液 酸性储备液:精密称取维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₆、烟酸和烟酰胺各 20 mg 于 100 mL 容量瓶中,加适量 0.1% 盐酸,60 ℃ 超声(功率 500 W,频率 40 kHz)溶解,约 10 min,放置至室温,用 0.1% 盐酸定容至刻度,摇匀,即得各成分浓度为 200 μg/mL 的酸性混合储备液。

碱性储备液:精密称取 20 mg 叶酸于 100 mL 容量瓶中,用 0.3% 氨溶液溶解并定容至刻度,摇匀,即得浓度为 200 μg/mL 的碱性储备液。

中性储备液:精密称取维生素 B₁₂ 10 mg 于 50 mL 容量瓶中,用水溶解并定容至刻度,摇匀,即得 200 μg/mL 的维生素 B₁₂ 对照液。精密称取泛酸 20 mg 和生物素 10 mg 于 100 mL 容量瓶中,精密移取上述 200 μg/mL 的维生素 B₁₂ 对照液 20 mL 至此 100 mL 容量瓶中,再加适量水,超声溶解并定容至刻度,摇匀,即得泛酸浓度为 200 μg/mL、生物素浓度为 100 μg/mL、维生素 B₁₂ 浓度为 40 μg/mL 的中性混合储备液。

1.2.1.2 标准工作溶液 维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₆、烟酸和烟酰胺的标准工作溶液:精密吸取上述酸性混合储备液 0.1、0.5、0.5、1.0、2.5、5.0 mL 分别至 20、20、10、10、10、10 mL 的容量瓶中,用 0.1% 盐酸稀释至刻度,即得维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₆、烟酸和烟酰胺的混合标准工作溶液,经 0.45 μm 的水相微孔滤膜过滤,备用。

叶酸的标准工作溶液:精密吸取上述碱性储备液 0.1、0.5、0.5、1.0、2.5、5.0 mL 分别至 20、20、10、10、10、10 mL 的容量瓶中,用 0.3% 氨溶液稀释至刻度,即得叶酸的标准工作溶液,经 0.45 μm 的水相微孔滤膜过滤,备用。

维生素 B₁₂、泛酸和生物素的标准工作溶液:精密吸取上述中性混合储备液 0.1、0.5、0.5、1.0、2.5、5.0 mL 分别至 20、20、10、10、10、10 mL 的容量瓶中,用水稀释至刻度,即得维生素 B₁₂、泛酸和生物素的混合标准工作溶液,经 0.45 μm 的水相微孔滤膜过

滤,备用。

1.2.1.3 标准曲线绘制 将标准工作溶液进样分析,分别以 9 种维生素 B 的浓度为横坐标,峰面积响应值为纵坐标,绘制系列标准曲线,进行线性回归,得到 9 种维生素 B 的标准曲线线性回归方程。

1.2.2 样品的前处理

1.2.2.1 维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₆、烟酸、烟酰胺 称取混合均匀样品 0.1 g 至于 50 mL 离心管中,准确加入 0.1% 盐酸 10 mL(个别样品超曲线范围进行适当稀释),摇匀,60 ℃ 超声(功率 500 W,频率 40 kHz)处理 15 min,中途振摇一次,冷却至室温,摇匀,静置或离心(4000 r/min 离心 10 min),上清液经 0.45 μm 的水相微孔滤膜过滤,即得。

1.2.2.2 叶酸 称取混合均匀样品 0.5 g 至于 50 mL 离心管中,准确加入 0.3% 氨水 10 mL,摇匀,60 ℃ 超声(功率 500 W,频率 40 kHz)处理 15 min,中途振摇一次,冷却至室温,摇匀,静置或离心(4000 r/min 离心 10 min),上清液经 0.45 μm 的水相微孔滤膜过滤,即得。

1.2.2.3 泛酸、生物素、维生素 B₁₂ 称取混合均匀样品 1 g 至于 50 mL 离心管中,准确加入超纯水 10 mL,摇匀,60 ℃ 超声(功率 500 W,频率 40 kHz)处理 15 min,中途振摇一次,冷却至室温,摇匀,静置或离心(4000 r/min 离心 10 min),上清液经 0.45 μm 的水相微孔滤膜过滤,用于测定生物素与维生素 B₁₂,稀释 10 倍用于测定泛酸。操作过程应避免强光照射。

1.2.3 色谱条件 色谱柱: COSMOSIL C₁₈(5 μm, 4.6 mm×250 mm);流速: 0.5 mL/min;柱温: 25 ℃;进样量: 10 μL;检测波长: 泛酸和生物素: 205 nm,维生素 B₁、维生素 B₂、烟酸和烟酰胺: 256 nm,维生素 B₆ 和叶酸: 287 nm,维生素 B₁₂: 361 nm;检测器: 二极管阵列检测器(DAD);流动相: A 为甲醇, B 为 0.1 mol/L 的磷酸二氢钾,梯度洗脱: 0.00~8.00 min,

A 由 5% 递增至 20%, 8.00~8.01 min, A 由 20% 快速增至 55%, 8.01~16.00 min, A 保持 55%, 16.00~17.00 min, A 由 55% 递减至 5%, 17.00~28.00 min, A 保持 5%。

1.3 数据处理

方法学考察中重复性平行测定 6 份,回收率测定三组 9 份,适用性样品测定 2 份,采用 Microsoft Office Excel 2007 进行数据处理,结果以平均数表示。

2 结果与分析

2.1 溶剂的选择

保健食品 B 族维生素片基质相对简单,其中的 9 种维生素 B 成分均为水溶性维生素,但化学结构并不相关,理化性质和色谱行为差异较大,所以要在同一个溶剂下同时测定 B 族维生素片的 9 种成分比较困难。维生素 B₁₂ 易溶于水和乙醇,在强酸(pH<2)和碱性溶液中易分解,导致其检测结果偏低^[25-26]。维生素 B₁ 在酸性条件下稳定,在中性和碱性中稳定性差^[27]。维生素 B₂、泛酸在碱性条件下不稳定,叶酸和泛酸在酸性条件下不稳定^[28]。维生素 B₆ 在空气与酸性溶液中稳定,但在碱性溶液中易被破坏^[29]。因此,本实验用酸溶液提取测定维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₆、烟酸和烟酰胺;用碱溶液提取叶酸;用水提取泛酸、生物素和维生素 B₁₂,以确保样品中的成分稳定,结果可靠。

本实验比较了盐酸含量为 0.05%、0.1%、0.3% 和 0.5% 对样品提取的影响,经试验,维生素 B₁ 随着盐酸含量增加,出峰时间提前,0.3% 盐酸提取液中维生素 B₁ 开始有干扰(见图 1),维生素 B₂、维生素 B₆ 和烟酰胺用 0.1% 盐酸提取比用 0.05% 盐酸提取效果稍好些,所以选用了 0.1% 盐酸作为维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₆、烟酸和烟酰胺的提取液。参照《中华人民共和国药典》(二部)叶酸“含量测定”项,叶酸用 0.3% 氨溶液作为提取溶剂。

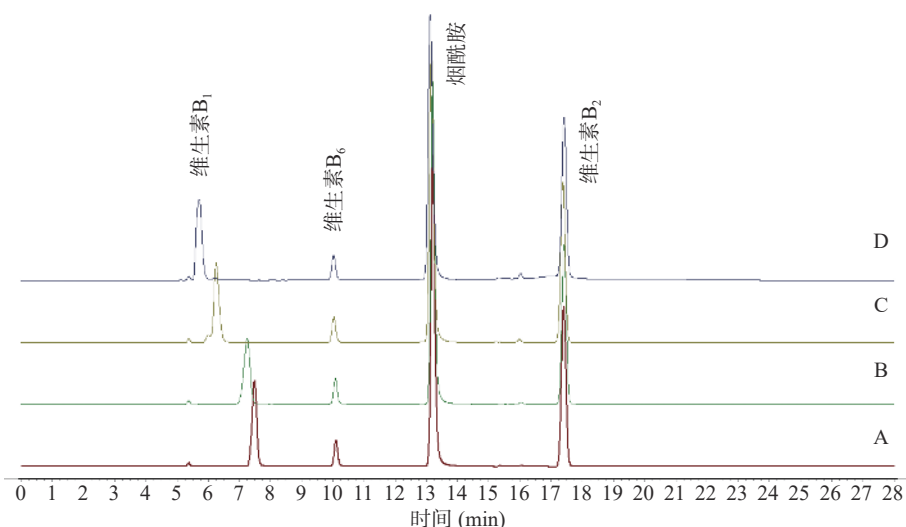


图 1 不同含量盐酸提取样品的液相色谱图

Fig.1 Liquid chromatograms of samples extracted with different contents of hydrochloric acid
注: A: 0.05% 盐酸提取液; B: 0.1% 盐酸提取液; C: 0.3% 盐酸提取液; D: 0.5% 盐酸提取液。

2.2 提取条件的选择

比较了 20、30、40、60 ℃ 各超声(功率 500 W, 频率 40 kHz)处理 15 min 的样品中各成分的响应值, 以 20 ℃ 测得的响应值为基底, 折算出 20、30、40、60 ℃ 的相对峰面积(相对峰面积=不同温度提取的峰面积/20 ℃ 提取的峰面积 $\times$ 100), 绘制柱形图, 总的来说 60 ℃ 条件下提取相对较好。再比较 60 ℃ 超声(功率 500 W, 频率 40 kHz)处理 15、30、45、60 min 的样品中各成分的响应值, 以 15 min 测得的响应值为基底, 折算出 15、30、45、60 min 的相对峰面积(相对峰面积=不同超声时间提取的峰面积/15 min 提取的峰面积 $\times$ 100), 绘制柱形图, 结果显示差异不明显, 所以确定提取条件为 60 ℃ 超声 15 min, 见图 2。

2.3 流动相的选择

高效液相色谱法测定维生素 B 的标准及文献中很多用到了离子对试剂, 离子对试剂平衡时间长, 而且对柱子寿命影响比较大, 所以本研究不考虑离子对试剂。参考标准, 遴选出流动相中可以添加乙酸钠和磷酸二氢钾, 本实验对乙腈-水、甲醇-水、甲醇-乙酸钠(0.05 mol/L)、甲醇-磷酸二氢钾(0.01 mol/L)、甲醇-磷酸二氢钾(0.05 mol/L)和甲醇-磷酸二氢钾(0.1 mol/L)不同流动相进行了考察。结果显示甲醇-乙酸钠(0.05 mol/L)体系中在 205 nm 波长下基线波

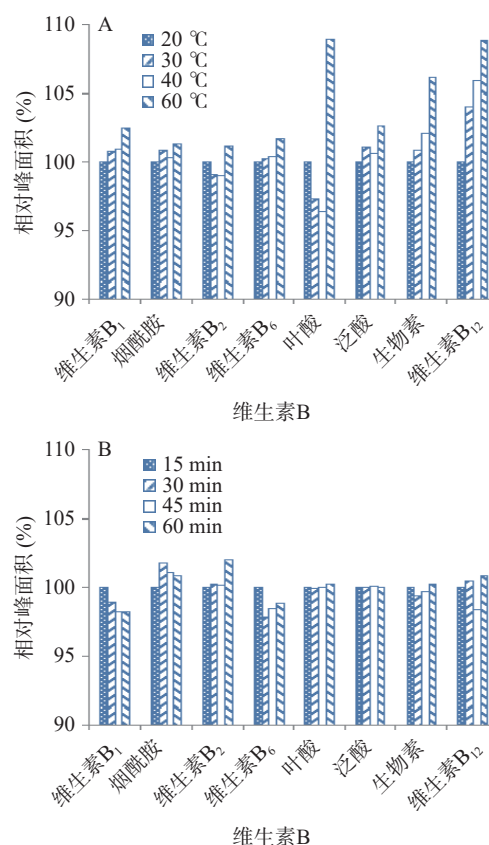


图2 不同温度(A)和不同超声时间(B)的提取效果比较

Fig.2 Comparison of extraction effects at different temperatures (A) and ultrasonic time (B)

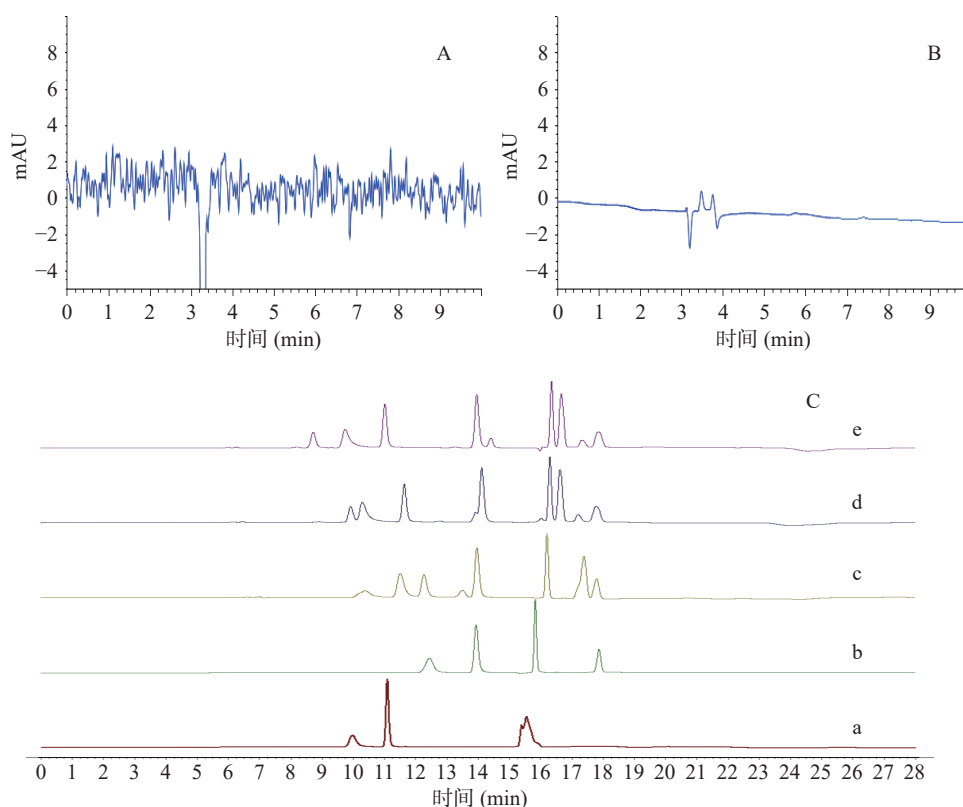


图3 不同流动相体系下 20 µg/mL 混合标准品溶液的液相色谱图

Fig.3 Liquid chromatograms of 20 µg/mL mixed standard solution under different mobile phase systems

注: A: 甲醇-乙酸钠(0.05 mol/L)基线图; B: 甲醇-磷酸二氢钾(0.05 mol/L)基线图; C: 不同流动相下维生素 B 的色谱图(a~e 分别为乙腈-水、甲醇-水、甲醇-磷酸二氢钾(0.01 mol/L)、甲醇-磷酸二氢钾(0.05 mol/L)和甲醇-磷酸二氢钾(0.1 mol/L))。

动大,不利于泛酸和生物素的测定,乙腈-水和甲醇-水体系中有些成分难以被洗脱,甲醇-0.1 mol/L 磷酸二氢钾体系的分离效果最好,为本实验的最终流动相,见图 3。

2.4 流速与柱温的选择

固定柱温为 28 ℃,比较了 0.5、0.8、1.0 mL/min 的出峰情况,实验结果显示,0.5 mL/min 的条件下,叶酸和维生素 B₁₂ 的分离效果最好,其他成分之间的分离度都大于 2,所以选用 0.5 mL/min。分离度见表 1。

表 1 不同流速和柱温的分离度

Table 1 Resolution of different flow rates and column temperatures

成分	不同流速分离度(mL/min)			不同柱温分离度(℃)			
	0.5	0.8	1.0	20	25	30	35
维生素B ₁	/	/	/	/	/	/	/
烟酸	3.60	3.46	3.28	4.60	4.11	3.63	3.20
维生素B ₆	4.27	4.47	4.41	4.87	4.47	4.04	3.74
烟酰胺	13.42	12.64	11.99	14.05	13.85	13.46	13.10
泛酸	2.78	3.16	3.31	1.95	2.53	3.06	3.54
维生素B ₁₂	10.41	23.12	29.86	7.13	9.30	11.21	13.47
叶酸	2.03	1.61	1.43	2.60	2.30	2.01	1.69
生物素	3.45	2.80	2.40	3.17	3.35	3.52	3.61
维生素B ₂	2.40	2.76	3.05	2.30	2.37	2.43	2.54

注: 分离度为相邻峰之间的分离度。

在 0.5 mL/min 的条件下,比较了柱温分别为 20、25、30、35 ℃ 的出峰情况,实验结果显示,温度越低,叶酸和 B₁₂ 的分离度越大,20、25、30、35 ℃ 温度下叶酸和 B₁₂ 的分离度分别为 2.60、2.30、2.01、1.69,但泛酸和烟酰胺 20 ℃ 时的分离度为 1.95<2,所以选用 25 ℃。分离度见表 1。

2.5 波长的选择

混合标准溶液经 C₁₈ 柱分离后,由二极管阵列检测器于 190~550 nm 波长范围内扫描,获得各化合物的吸收光谱图,维生素 B₁ 的光谱在 242 nm 处有强吸收峰,维生素 B₂ 的光谱在 266 nm 处有强吸收峰,烟酸、烟酰胺的光谱在 260 nm 处有强吸收峰,维生素 B₆ 的光谱在 290 nm 处有强吸收峰,叶酸的光谱在 284 nm 处有强吸收峰,维生素 B₁₂ 的光谱在 361 nm 处有强吸收峰,泛酸和生物素没有明显的强吸收峰,参考 GB/T 22246-2008^[7] 在 200 nm 处测定泛酸,GB/T 17778-2005^[30] 在 210 nm 处测定生物素,为兼顾多种组分的同时检测,并综合考虑灵敏度等因素,泛酸和生物素的检测波长为 205 nm,维生素 B₁、维生素 B₂、烟酸、烟酰胺的检测波长为 256 nm,维生素 B₆ 和叶酸的检测波长为 287 nm,维生素 B₁₂ 的检测波长为 361 nm,标品的检测结果见图 4。

2.6 方法学考察

2.6.1 方法的线性及方法检出限浓度 在试验条件下,对标准工作溶液进行测定。结果表明 9 种维生

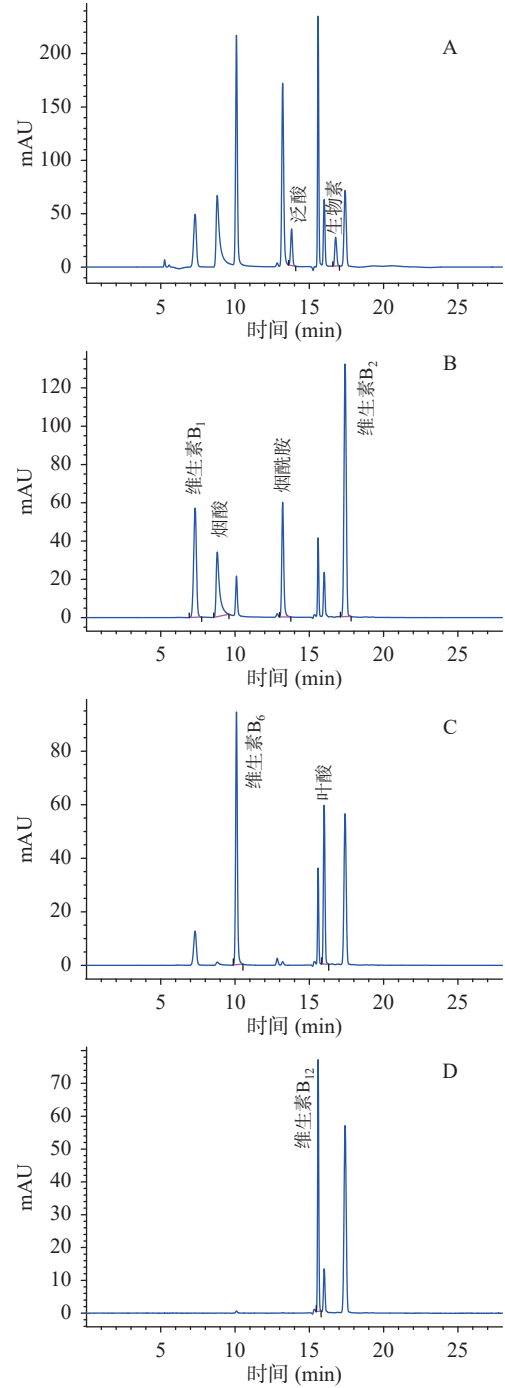


图 4 20 µg/mL 混合标准品溶液的液相色谱图
Fig.4 Liquid chromatograms of 20 µg/mL mixed standard solution

注: A~D 分别为 205、256、287、361 nm 的色谱图。

素 B 均在各自线性范围内有良好的线性关系,决定系数 R² 均大于 0.999。取维生素 B 的标准品,以信噪比(S/N)3~5 配制检出限溶液,按本方法最大取样量 1 g,最小稀释倍数 10,计算检出限(LOD)。见表 2。

2.6.2 重复性 烟酰胺是烟酸的酰胺化合物,通常不会同时添加在同一样品中,所以通过样品 1 和样品 2 来完成 9 种成分的重复性试验。在相同的仪器条件下,按照 1.2.2 实验步骤,分别测得样品 1 中维生素 B₁、烟酰胺、维生素 B₂、维生素 B₆、叶酸、泛酸、生物素及维生素 B₁₂ 的含量,按照 1.2.2.1 实验步骤,

表 2 9 种维生素 B 的线性回归方程、线性关系和 LOD
Table 2 Linear regression equation, correlation coefficient and LOD of 9 kinds of vitamin B

成分	线性方程	决定系数(R^2)	检出限 (mg/kg)
维生素B ₁	$y=37.0699x-4.8520$	1.0000	0.4
烟酸	$y=28.2656x-10.7949$	0.9999	0.6
烟酰胺	$y=25.9636x+0.4596$	1.0000	0.2
维生素B ₂	$y=60.9041x+10.1378$	1.0000	0.05
维生素B ₆	$y=36.3405x+1.7111$	1.0000	0.1
叶酸	$y=77.6801x-3.5187$	1.0000	0.1
泛酸	$y=16.9963x-1.6844$	1.0000	1.9
生物素	$y=12.1273x+2.3880$	1.0000	4.7
维生素B ₁₂	$y=23.5442x-0.1077$	1.0000	0.2

分别测得样品 2 中烟酸的含量, 结果表明重复性良好, 其 RSD 见表 3。

表 3 9 种维生素 B 的重复性和稳定性(n=6)
Table 3 Repeatability and stability of 9 kinds of vitamin B (n=6)

成分	含量 (mg/g)	重复性 RSD(%)	稳定性时间 RSD(%)	稳定性峰面积 RSD(%)
维生素B ₁	3.7	0.7	0.3	0.5
烟酸	16.8	0.8	0.2	0.8
烟酰胺	18.4	1.0	0.1	0.4
维生素B ₂	4.1	0.5	0.1	0.8
维生素B ₆	3.9	0.6	0.6	0.5
叶酸	0.42	0.7	0.1	0.2
泛酸	8.5	1.0	0.2	0.2
生物素	0.053	1.0	0.1	0.5
维生素B ₁₂	0.0053	5.2	0.1	0.3

2.6.3 稳定性考察 在相同的仪器条件下, 对同一混合标准工作溶液(20 $\mu\text{g/mL}$)进行 0、1、2、4、8、16、24、36、48 h 进样测定, 可以看出 9 种维生素 B 保留时间稳定, 峰面积的相对标准偏差(RSD) $\leq 0.8\%$ (n=9), 结果表明, 维生素 B 族 9 种成分 48 h 内的稳定性良好, 其 RSD 见表 3。

2.6.4 方法回收率 通过样品 1 和样品 2 来完成

9 种成分的回收试验。精密称取 9 份同批次样品 1, 按样品各成分含量约 80%、100%、120% 高中低三个水平加入各标准溶液, 每个水平各 3 份样品, 按照 1.2.2 实验步骤, 分别测得样品 1 中三个水平的维生素 B₁、烟酰胺、维生素 B₂、维生素 B₆、叶酸、泛酸、生物素及维生素 B₁₂ 的浓度并计算回收率, 精密称取 9 份同批次样品 2, 按样品烟酸含量约 80%、100%、120% 低中高三个水平加入烟酸标准溶液, 每个水平各 3 份样品, 按照 1.2.2.1 实验步骤, 测得样品 2 中三个水平的烟酸浓度并计算回收率。结果显示平均回收率为 91.8%~106.9%, RSD 为 0.2%~4.8%, 可以满足维生素 B 族 9 种成分的检测要求, 各回收率及 RSD 见表 4。

2.6.5 适用性 为考察方法的普遍适用性, 采用本试验方法, 对收集的 9 个品种 10 批次 B 族维生素片样品进行检测, 并与检验标准规定的方法测定结果进行比较, 2 号和 3 号样品的检验标准并没有对维生素 B₆、叶酸、泛酸及维生素 B₁₂ 作要求, 其它结果与本方法结果的相对偏差在允许范围内, 表明本方法适用于 B 族维生素片中 9 种维生素 B 的含量测定, 见表 5。

3 结论

在本研究建立的 HPLC 色谱条件下, 9 种维生素 B 成分能得到较好的分离。线性、精密度、稳定性、重复性和回收率等试验结果表明, 本方法灵敏、快速、准确, 适用于保健食品 B 族维生素片中 9 种维生素 B 的含量测定。与目前的国家标准和文献报道的方法相比, 在保证准确性好、灵敏度高的同时, 尽可能省去了复杂的前处理, 降低了检测成本, 提高了检测效率。从实际样品的测定实验发现, 个别产品(本实验中的 2、3 号样品)标签有添加维生素 B₆、叶酸、泛酸及维生素 B₁₂ 这几种成分, 但企业标准中并没有作相应的要求, 检验机构一般按标准检验, 从而造成监管漏洞, 该方法可快速测定 B 族维生素片中 9 种维生素 B 成分的含量, 尤其适用于大批量的监督抽检, 可为该类保健品质量标准的制定提供定量依据, 为监督 B 族维生素类保健食品市场提供保障。

表 4 9 种维生素 B 的回收率
Table 4 Recoveries of 9 kinds of vitamin B

化合物	加标量(低) (mg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)	加标量(中) (mg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)	加标量(高) (mg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)
维生素B ₁	2502.3	101.8	0.8	3753.5	102.0	0.7	5421.7	103.0	0.2
烟酸	10144.7	104.3	0.2	16231.5	104.3	0.6	23332.7	105.9	0.7
烟酰胺	10326.1	99.4	1.1	18588.4	98.2	1.0	25815.3	99.3	0.4
维生素B ₂	2569.8	106.2	0.6	3953.5	106.9	0.4	5732.6	105.4	0.3
维生素B ₆	2237.4	104.7	1.2	3661.1	103.3	0.5	5288.3	104.0	0.3
叶酸	266.2	100.3	0.5	446.0	100.9	0.5	618.7	99.8	0.5
泛酸	4506.9	100.4	0.5	7511.5	100.9	0.9	10516.1	100.0	0.6
生物素	31.7	102.2	4.4	52.8	98.1	4.8	73.9	97.1	4.4
维生素B ₁₂	4.0	91.8	1.2	6.6	94.3	2.2	8.8	93.2	3.2

表 5 10 批样品的维生素 B 含量(mg/g)
Table 5 Contents of vitamin B in 10 samples (mg/g)

序号	维生素B ₁	烟酸	烟酰胺	维生素B ₂	维生素B ₆	叶酸	泛酸	生物素	维生素B ₁₂
1A	3.7	/	18.3	4.1	3.9	0.42	8.5	0.053	0.0053
1B	3.8	/	20.0	4.2	4.0	0.40	8.3	0.058	0.0056
1C(%)	1.3	/	4.4	1.2	1.3	2.4	1.2	4.5	2.8
2A	3.1	16.8	/	3.0	3.6	0.42	10.5	/	0.0050
2B	2.9	17.0	/	3.0	/	/	/	/	/
2C(%)	3.3	0.6	/	0.0	/	/	/	/	/
3A	3.2	16.5	/	2.9	3.6	0.45	11.1	/	0.0056
3B	3.5	16.5	/	3.2	/	/	/	/	/
3C(%)	4.5	0.0	/	4.9	/	/	/	/	/
4A	3.4	/	/	4.3	3.5	0.57	/	/	/
4B	3.7	/	/	4.3	3.4	0.55	/	/	/
4C(%)	4.2	/	/	0.0	1.4	1.8	/	/	/
5A	2.3	/	/	2.2	2.5	0.27	/	/	0.0040
5B	2.5	/	/	2.4	2.3	0.29	/	/	0.0040
5C(%)	4.2	/	/	4.3	4.2	3.6	/	/	0.0
6A	17.6	/	32.2	16.5	10.0	0.46	22.7	/	0.0086
6B	16.9	/	35.5	16.5	9.1	0.42	20.8	/	0.0094
6C(%)	2.0	/	4.9	0.0	4.7	4.5	4.4	/	4.4
7A	15.8	/	57.0	22.5	10.6	0.36	15.8	/	/
7B	17.5	/	53.3	20.7	11.7	0.40	17.2	/	/
7C	5.1	/	3.4	4.2	4.9	5.3	4.2	/	/
8A	3.2	/	/	2.2	1.3	/	/	/	0.0021
8B	3.5	/	/	2.0	1.3	/	/	/	0.0018
8C	4.5	/	/	4.8	0.0	/	/	/	7.7
9A	16.0	/	74.5	24.0	10.1	0.42	25.1	/	0.0099
9B	17.2	/	81.0	26.1	11.1	0.41	22.8	/	0.0100
9C	3.6		4.2	4.2	4.7	1.2	4.8	/	0.5
10A	16.7	/	76.9	27.3	10.3	0.44	24.8	/	/
10B	18.1	/	70.4	24.8	11.2	0.41	22.6	/	/
10C	4.0	/	4.4	4.8	4.2	3.5	4.6	/	/

注: A为本方法测定结果; B为标准测定结果; C为A与B的相对偏差SD(%)。

参考文献

[1] BEITANE I, CIPROVICA I. The study of added prebiotics on B group vitamins concentration during milk fermentation[J]. AC Romanian Biotechnology Letters, 2011, 16(6): 92-96.

[2] ASLAM J, KHAN S H, KHAN S A. Quantification of water soluble vitamins in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar's fruits growing in Dubai, United Arab Emirates, through high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2013, 17(1): 9-16.

[3] KHALIL H, ANG C D, KHALIL V. Vitamin B for treating diabetic peripheral neuropathy-A systematic review[J]. *Diabetes & Metabolic Syndrome*, 2021, 15(5): 102213.

[4] SHI Jing, WANG Luyin, ZHANG Yongshang, et al. Clinical efficacy of vitamin B in the treatment of mouth ulcer: A systematic review and meta-analysis[J]. *Annals of Palliative Medicine*, 2021, 10(6): 6588-6596.

[5] 付玲. 探讨过量营养素的毒性[J]. *现代农业研究*, 2019(2): 42-44. [FU Ling. Explore the toxicity of excess nutrients[J]. *Modern Agriculture Research*, 2019(2): 42-44.]

[6] 中国国家标准化管理委员会. 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]. 2003. [China National Standardization Administration Committee. GB/T 5009.197-2003 Determination of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride, niacin, niacinamide and caffeine in health foods[S]. 2003.]

[7] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 22246-2008 保健食品中泛酸钙的测定[S]. 2008. [China National Standardization Administration Committee. GB/T 22246-2008 Determination of calcium pantothenate in health foods[S]. 2008.]

[8] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.217-2008 保健食品中维生素B₁₂的测定[S]. 2008. [China National Standardization Administration Committee. GB/T 5009.217-2008 Determination of vitamin B₁₂ in health foods[S]. 2008.]

[9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.84-2016 食品安全国家标准 食品中维生素B₁的测定[S]. 2016. [State Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 5009.84-2016 Food safety standards Determination of vitamin B₁ in foods[S]. 2016.]

[10] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.85-2016 食品安全国家标准 食品中维生素B₂的测定[S]. 2016. [State Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 5009.85-2016 Food safety standards Determination of vitamin B₂ in foods[S]. 2016.]

[11] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 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]. 2016. [State Health and Family Planning Commission of the People's

- Republic of China. GB 5009.89-2016 Food safety standards Determination of niacin and niacinamide in foods[S]. 2016.]
- [12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.154-2016 食品安全国家标准 食品中维生素 B₆ 的测定 [S]. 2016. [State Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 5009.154-2016 Food safety standards Determination of vitamin B₆ in foods[S]. 2016.]
- [13] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.211-2014 食品安全国家标准 食品中叶酸的测定 [S]. 2014. [State Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 5009.211-2014 Food safety standards Determination of folic acid in foods[S]. 2014.]
- [14] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.210-2016 食品安全国家标准 食品中泛酸的测定 [S]. 2016. [State Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 5009.210-2016 Food safety standards Determination of pantothenate acid in foods[S]. 2016.]
- [15] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.259-2016 食品安全国家标准 食品中生物素的测定 [S]. 2016. [State Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 5009.259-2016 Food safety standards Determination of biotin in foods[S]. 2016.]
- [16] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典 (二部): 叶酸 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020. [Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China(II): folic acid[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.]
- [17] 宁霄, 金绍明, 刘雅丹, 等. 超高效液相串联质谱法同时保健食品中 10 种水溶性维生素 [J]. 中国药事, 2017, 31(4): 392-402. [NING Xiao, JIN Shaoming, LIU Yadan, et al. Simultaneous detection of 10 kinds of water-soluble vitamins in health food using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2017, 31(4): 392-402.]
- [18] 朱晓玲, 张苗, 王会霞, 等. 功能饮料、保健食品中 11 种水溶性维生素测定的 HPLC-MS/MS 方法研究 [J]. 食品科技, 2017, 42(7): 294-300. [ZHU Xiaoling, ZHANG Miao, WANG Huixia, et al. Determination of 11 kinds of water-soluble vitamins in function beverage and food supplements by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Science and Technology, 2017, 42(7): 294-300.]
- [19] 边丽娜. 液质联用仪同步检测婴幼儿配方食品中 11 种水溶性维生素 [J]. 轻工标准与质量, 2018(5): 47-48. [BIAN Lina. Simultaneous detection of 11 water-soluble vitamins in infant formula food by HPLC-MS[J]. Standard & Quality of Light Industry, 2018(5): 47-48.]
- [20] ZHANG M, LIU H J, HANG X L, et al. A novel LC-MS/MS assay for vitamin B₁, B₂ and B₆ determination in dried blood spots and its application in children[J]. *Journal of Chromatography B*, 2019, 1112: 33-40.
- [21] 胡晓琴, 韩春. HPLC-DAD 法测定复合维生素 B 片中 5 种组分的含量 [J]. *长治学院学报*, 2018, 35(2): 26-29. [HU Xiaoqin, HAN Chun. Determination of five components in compound vitamin B tablets by HPLC-DAD[J]. *Journal of Changzhi University*, 2018, 35(2): 26-29.]
- [22] 周国, 刘倩倩, 王波, 等. 高效液相色谱法同时测定婴幼儿乳粉中 7 种水溶性维生素 [J]. *分析试验室*, 2015, 34(1): 49-52. [ZHOU Wei, LIU Qianqian, WANG Bo, et al. Simultaneous determination of seven water-soluble vitamins in infant milk powder by HPLC[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2015, 34(1): 49-52.]
- [23] 朱艳春, 王倩, 徐金玲. 保健食品中维生素 B₁、B₂、B₆ 和烟酰胺同时测定方法的改进 [J]. *甘肃医药*, 2020, 39(5): 449-452. [ZHU Yanchun, WANG Qian, XU Jinling. Improvement of simultaneous determination of vitamin B₁, B₂, B₆ and nicotinamide in health food[J]. *Gansu Medical Journal*, 2020, 39(5): 449-452.]
- [24] LAVERROUX S, PICARD F, ANDUEZA D, et al. Vitamin B₂ concentration in cow milk: Quantification by a new UHPLC method and prediction by visible and near-infrared spectral analysis[J]. *Food Chemistry*, 2021, 342: 128310.
- [25] 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 Qiong, WANG Zhiwei, LIU Yang, et al. Advances in biosynthesis and detection of vitamin B₁₂[J]. *The Food Industry*, 2019, 40(2): 278-283.]
- [26] 许倩倩, 成雪, 贾迪, 等. 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 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(23): 8793-8797. [XU Qianqian, CHENG Xue, JIA Di, et al. Effect of pH on the determination results of vitamin B₁₂ in health food by high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2020, 11(23): 8793-8797.]
- [27] VOELKER A L, TAYLOR L S, MAUER L J. Effect of pH and concentration on the chemical stability and reaction kinetics of thiamine mononitrate and thiamine chloride hydrochloride in solution[J]. *BMC Chemistry*, 2021, 15(1): 47.
- [28] 宋亚伟, 刘发全, 吴昊, 等. 饲料中维生素检测方法探讨 [J]. *中国畜禽种业*, 2019, 15(9): 60-61. [SONG Yawei, LIU Faquan, WU Hao, et al. Discussion on the detection method of vitamins in feed[J]. *The Chinese Livestock and Poultry Breeding*, 2019, 15(9): 60-61.]
- [29] 蔡美琴. B 族维生素 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2020: 23. [CAI Meiqin. Vitamin B[M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 2020: 23.]
- [30] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 17778-2005 预混合饲料中 d-生物素的测定 [S]. 2005. [China National Standardization Administration Committee. GB/T 17778-2005 Determination of d-biotin in premix[S]. 2005.]