超高效液相色谱法测定保健食品中的多种水溶性维生素

蒲明清，戴舒春，张连龙，周华生，成恒嵩
（无锡健特药业有限公司，江苏无锡 214091）

摘要：本文应用超高效液相色谱法，Acquity UPLC HSS T_3 (2.1×100 mm×1.8 μm)柱，0.1%三氟乙酸-乙腈流动相，梯度洗脱，紫外和荧光串联检测器，可同时测定保健食品中 6 种水溶性维生素，其中包括 Vc、B_3、B_1、B_6、B_{11}、B_2 等，该法线性范围宽、呈直线回归、相关性好、检测限低、分析速度快，其测定结果与国标法相吻合。

关键词：超高效液相色谱；保健食品；水溶性维生素

文章篇号：1673-9078(2012)7-886-889

Determination of Water-soluble Vitamins in Health Foods by UPLC

PU Ming-qing, DAI Shu-chun, ZHANG Lian-long, ZHOU Hua-sheng, CHENG Heng-song
(Wuxi Giant Pharmaceutical Co., Ltd., Wuxi 214091, China)

Abstract: Water-soluble vitamins were determiend by Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) equipping ultraviolet detector and fluorescence detector in series. Samples were separated by a Acquity UPLC HSS T_3 (2.1×100 mm×1.8 μm) column using 0.1% trifluoroacetic acid-acetonitrile as mobile phase in gradient elution mode. Six water-soluble vitamin components in health foods were simultaneously determined, including ascorbic acid (Vc), nicotinamide (B_3), thiamine (B_1), pyridoxine (B_6), folic acid (B_{11}), riboflavin (B_2), etc. This method was enabled to achieve wide linear range, well correlation, low detection limit and fast analysis. The results were in accordance with those wtih GB methods.

Key words: UPLC; health foods; water-soluble vitamins

维生素是维持人体生命活动必须的有机化合物，根据溶解度可将其分为脂溶性和水溶性两大类，后者主要有维生素 C(抗坏血酸)、B_1(硫胺素)、B_2(核黄素)、B_3(烟酰胺、烟酸)、B_5(泛酸)、B_6(吡哆醇、吡哆胺、吡哆醛)、B_7(生物素)、B_{11}(叶酸)、B_{12}(钴胺素)，此外还包括 L-肉碱、胆碱和牛磺酸等。由于水溶性维生素之间结构和化学性质相差很大，分离测定相对比较困难，目前大多采用高效液相色谱法[1]测定。而每种条件仅能分离测定部分成份，超高效液相色谱是在普通高效液相色谱基础上发展起来的新一代高效液相色谱仪，它对于分离和测定有机物质有更多的优越性，用其尝试测定保健食品中多种水溶性维生素，获得较好的效果，为水溶性维生素测定开辟一条新的途径。

1 材料与方法

收稿日期：2012-04-11

作者简介：蒲明清（1985-），男，助理工程师，主要从事药品、保健食品质量分析与研究

通讯作者：周华生（1977-），男，主管药师，主要从事药品、保健食品研制及质量分析

1.1 材料

1.1.1 供试保健食品

黄金搭档中老年和女士型多种维生素片，批号分别为 20111025、20110902，本公司生产；养生堂成人复合维生素片及成长快乐复合维生素咀嚼片，批号分别为 20110714、20110806，海南养生堂药业有限公司；善存多维元素片，批号 20110727，惠氏制药有限公司，市场收集。

1.1.2 仪器设备

Acquity UPLC 超高效液相色谱仪，UV、FLR 检测器，Waters 公司；Kq2200DE 型数控超声清洗器，昆山市超声仪器有限公司；AE240 分析天平，Mettler 公司。

1.1.3 标准品

维生素 B_1、B_2、B_3、B_6、B_{11}、Vc，Sigma 公司

1.1.4 试剂

乙腈(色谱纯)，三氟乙酸、盐酸(分析纯)，水(超纯水)。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配置

先配制含 Vc 1500 μg/mL、B_3 100 μg/mL、B_1 100 μg/mL、B_6 10 μg/mL、B_{11} 20 μg/mL、B_2 20 μg/mL 标准混合贮备液，其中 B_2 用 20 mL 0.01 mol/L 盐酸溶解，B_{11} 先加 20 mL 水，再加 5 mL 0.012 mol/L 氨水溶解，其它维生素均用水溶解，混合后用水定容，保存棕色瓶中，置冰箱中可存放一周，再用水稀释为标准混合使用液，使用时于测定当日配制。

1.2.2 样品处理

称取磨碎的混合维生素片粉末约 0.50 g，精确至 0.0001 g，置 50 mL 棕色容量瓶，加入适量 0.01 mol/L 盐酸溶液，60 ℃恒温超声萃取 20 min，冷却后定容，然后用 0.22 μm 滤膜过滤。

1.2.3 液相色谱条件

色谱柱 Acquity UPLC HSS T_3 2.1×100 mm，1.8 μm，检测器紫外和荧光串联，UV280 nm、FLR (Ex：460 nm，Em：522 nm)，柱温 30 ℃，进样体积 2 μL，流动相 A（0.1%三氟乙酸水溶液）、B（乙腈），梯度洗脱见表 1。

表 1 流动相梯度表

Table 1 The gradient mobile phase program

时间/min	流速/(mL/min)	A/%	B/%	曲线
初始	0.3	100	0	初始
1.5	0.3	97	3	6
2.0	0.3	85	15	6
3.5	0.3	80	20	6
4	0.3	0	100	6
6	0.3	0	100	1
10	0.3	100	0	1

2 结果与分析

2.1 标准品和样品色谱图

2.1.1 标准品色谱图

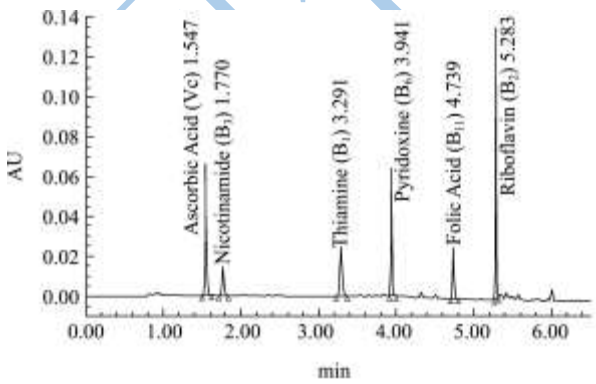


图 1 标准品色谱图

Fig.1 UPLC chromtogram of the standards

将标准混合贮备液稀释为最适浓度，Vc 300 μg/mL、B_3 20 μg/mL、B_1 20 μg/mL、B_6 2 μg/mL、B_{11} 4 μg/mL、B_2 4 μg/mL，按设定的色谱条件进样测定，6 种水溶性维生素出峰的保留时间分别为 1.547 min、1.770 min、3.291 min、3.941 min、4.739 min、5.283 min，见图 1，均达到基线分离，说明能进行定性定量分析。

若将标准混合贮备液配制成不同浓度梯度进行测定，其线性范围宽、浓度与峰面积呈直线回归、相关性好、检出限低，结果见表 2，由此说明能进行定量分析。

表 2 线性回归方程、相关系数、线性范围、检出限

Table 2 Linear regression equations, correlation coefficients, linearity ranges and detection limits

名称	回归方程	相关系数 R	线性范围 /(μg/L)	检出限 /(μg/L)
Vc	$Y=3.09\times10^2X-1.21\times10^3$	0.9999	100~10000	10
B_3	$Y=6.38\times10^2X-3.49\times10^2$	0.9997	2.5~50	0.2
B_1	$Y=4.16\times10^3X-2.70\times10^3$	0.9998	0.5~50	0.3
B_6	$Y=1.38\times10^4X-9.76\times10^2$	0.9998	1.0~10	0.1
B_{11}	$Y=1.05\times10^4X-4.76\times10^2$	0.9999	1.0~10	0.04
B_2	$Y=1.68\times10^4X-2.07\times10^3$	0.9999	1.0~10	0.05

2.1.2 样品色谱图

按测定方法制备样品，选择适当浓度进行分离测定，其样品色谱图见图 2，样品色谱图与标准品色谱图保留时间基本一致，可达到基线分离，故用外标法可精确定量测定。

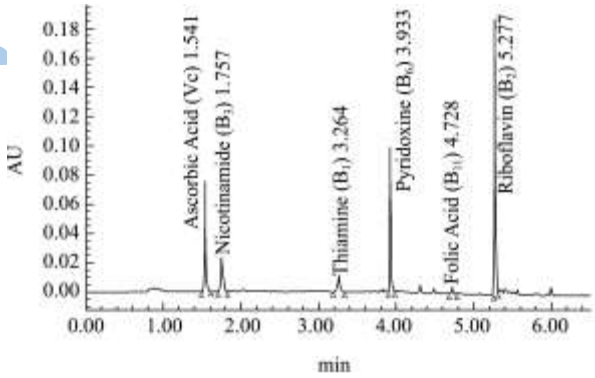


图 2 样品色谱图

Fig.2 UPLC chromatogram of the sample

2.2 精密度测定

表 3 各种维生素精密度试验结果（n=6）

Table 3 Results of the precision test for vitamin detection

名称	1	2	3	4	5	6	RSD/%
Vc	94816	95002	94513	94905	94772	94519	0.19
B_3	12310	12369	12405	12420	12333	12428	0.36
B_1	84000	84315	84259	84106	84297	84357	0.15
B_6	29379	28996	29109	29073	29588	29456	0.74
B_{11}	42356	42516	42604	42027	42128	42556	0.52
B_2	73884	73554	73449	73618	73439	73519	0.20

选定标准混合品最适浓度，重复测定 6 次，其各组份的峰面积重复性好，RSD 为 0.15~0.74%，见表 3。

2.3 回收率测定

表 4 各种维生素的回收试验结果 %

Table 4 Result of the recovery test for various vitamin

名称	低		中		高		平均值	RSD/%
	1	2	3	4	5	6		
Vc	100.4	96.8	98.2	99.8	98.9	99.6	99.0	1.20
B_3	99.6	98.1	102.2	97.8	101.5	99.1	99.7	1.64
B_1	96.5	99.7	95.4	100.4	99.2	101.0	98.7	2.07
B_6	99.3	101.8	100.3	98.2	99.5	100.3	99.9	1.11
B_{11}	98.2	99.6	101.7	103.2	101.2	96.4	100.0	2.27
B_2	96.6	100.4	102.7	97.5	96.0	101.2	99.1	2.52

在线性范围内，采用加标回收的方法进行验证。以黄金搭档中老年型多种维生素为例，先制备 3 中不同浓度的本底，再分别加入 3 种不同浓度的标样，即低、中、高重复两次，共 6 个样本，按测定方法处理样品和测定，计算回收率，结果见表 4，其 Vc、B_3、B_1、B_6、B_{11}、B_2 的平均回收率及 RSD 分别为 99.0%(1.20%)、99.7% (1.64%)、98.7%(2.07%)、99.9%(1.11%)、100.0%(2.27%)、99.1%(2.52%)，由此可见回收率好，精确度高。

2.4 不同保健食品水溶性维生素测定

试验收集市场上畅销的 5 种含多种维生素和矿物质的保健食品，应用本方法和国标法(GB)分别进行测定，结果见表 5，两种方法测定结果误差较小，相对误差(Fractional error,FE)均在允许范围内，因此，可用于这类保健食品水溶性维生素的快速测定。

表 5 5 种保健食品水溶性维生素测定结果

Table 5 The determination of water-soluble vitamin contents in five healthy foods

名称	Vc/(mg/g)			B_3/(mg/g)			B_1/(mg/g)			B_6/(mg/g)			B_{11}/(mg/g)			B_2/(mg/g)		
	UPLC	GB	FE/%	UPLC	GB	FE/%	UPLC	GB	FE/%	UPLC	GB	FE/%	UPLC	GB	FE/%	UPLC	GB	FE/%
样品 1	42.61	38.24	10.11	13.20	14.12	6.73	1.11	1.20	5.81	1.75	1.65	5.88	0.37	0.39	5.26	1.33	1.40	5.12
样品 2	36.79	38.24	3.52	7.29	6.99	3.92	1.04	0.97	6.97	0.66	0.61	7.87	0.16	0.14	13.23	0.97	0.89	8.61
样品 3	3.78	3.51	7.41	-	-	-	0.12	0.13	8.00	0.10	0.09	10.52	0.12	0.13	8.10	0.13	0.12	8.00
样品 4	61.24	64.21	4.73	-	-	-	0.71	0.68	4.32	0.68	0.64	6.06	0.11	0.12	8.69	0.73	0.69	5.63
样品 5	35.25	37.40	5.16	-	-	-	0.68	0.71	4.28	0.70	0.76	8.22	0.14	0.13	7.41	0.70	0.78	10.81

3 讨论

3.1 测定食品中水溶性维生素大多采用反相 C_{18} 柱，甲醇-乙酸水溶液为流动相，在乙酸水溶液中加离子对试剂，通常加入的离子对试剂为己烷[2]或庚烷[3]或辛烷[4]磺酸钠，与维生素形成离子对，可延长维生素各组份相应的保留时间，达到基线分离。但离子对试剂均属于磺酸盐类，很容易造成管道堵塞和管道接口有盐分析出，形成白色盐霜，腐蚀柱体填料，降低柱效，减少柱寿命。特别对超高效系统又长又细的管线造成堵塞，故选用乙腈-三氟乙酸水溶液作为流动相，采用梯度洗脱，提高分离效果，除避去离子对试剂伤害柱体填料结构外，还大大降低分析成本。

3.2 文献记载，所测定各种维生素最大紫外吸收波长各不相同，其中 Vc 190 nm、B_3 260 nm、B_1 198 nm、B_6 195 nm、B_{11} 280 nm、B_2 266 nm，为兼顾各种维生素都有很好的灵敏度，使最后出峰的 B_2 不造成拖尾又达到基线分离，试验采用紫外—荧光串联检测器，前 5 中维生素先用紫外 280 nm 检测，后一种维生素 B_2 用荧光(Ex: 462 nm，Em: 522 nm)检测，取得了很好的效果。

3.3 由于水溶性维生素之间结构化学性质相差很大，同时测定相对比较困难，有的维生素性质不稳定，易破坏，叶酸添加量又极低，再加上辅料复杂，干扰严重，目前国标法测定食品中这几种水溶性维生素采用多种条件分别测定，以婴幼儿食品和乳品对这几种水溶性维生素测定为例，其中 Vc 采用荧光分光光度法[5]，B_3 采用微生物和高效液相色谱法[6]，B_1 和 B_6 分别采用高效液相色谱法[7;8]，B_{11} 采用微生物法[9]，B_2 采用高效荧光法[10]。这些方法特别是微生物法测定手续繁杂，耗时费材，本研究在一种条件下，6 min 可完成所有测定，大大提高工作效率，测定结果与国标法相吻合。

3.4 近年来，随着超高效液相色谱柱亚 2 μm 填料的逐步推广，本研究的填料粒径为 1.8 μm，由于色谱柱孔隙率低，在相同的流速下，本研究为 0.3 mL/min，产生的压力大，本研究为 6000 psi，即为超高压液相色谱法，可使分离时间更短，出峰更多，峰型更窄，对称性更好，定量更精确，能更好的满足保健食品中多种水溶性维生素分析要求。

4 结论

应用超高效液相色谱法，Acquity UPLC HSS T_3 (2.1×100 mm×1.8 μm)柱，0.1%三氟乙酸-乙腈流动相，

梯度洗脱，紫外和荧光串联检测器，可同时测定保健食品中 Vc、B_3、B_1、B_6、B_{11}、B_2 等 6 种水溶性维生素，该法线性范围宽、相关性好、分析速度快、灵敏度高，其测定结果与国标法相吻合，这对测定该类产品中水溶性维生素有一定参考借鉴意义。

参考文献

[1] 张连龙,周华生,成恒嵩.反相离子对色谱测定食品中 B 族维生素的研究进展[J].现代食品科技,2009,25(7):830-833

[2] Manz U. Assay for niacin or niacinamide, pyridoxine hydrochloride, riboflavin,and thiamine [J]. Roche publication index, 1993, 2467: 29-30

[3] Kamman J F, Labuza TP, Warthesen JJ. Thiamine and riboflavin analysis by high performance liquid chromatography [J]. Food Sci., 2000, 65: 1497-1499

[4] Bitsch R, Analysis of B_6 vitamins in foods using a modified high-performance liquid chromatographic method [J]. Chromat., 1999, 20(473): 207-211

[5] 食品安全国家标准.婴幼儿食品和乳品中维生素 C 的测定[S]. GB 5413.18-2010

[6] 食品安全国家标准.食品中烟酰胺的测定[S]. GB 5413.15-2010

[7] 食品安全国家标准.婴幼儿食品和乳品中维生素 B_1 的测定[S]. GB5413.11-2010

[8] 食品安全国家标准.婴幼儿食品和乳品中维生素 B_6 的测定[S]. GB5413.13-2010

[9] 食品安全国家标准.婴幼儿食品和乳品中叶酸盐的测定[S]. GB 5413.16-2010

[10] 食品安全国家标准.婴幼儿食品和乳品中维生素 B_2 的测定[S]. GB 5413.12-2010

现代食品科技