

# 高效液相色谱法测定保健食品中维生素 B<sub>12</sub> 的含量 Determination of Vitamin B<sub>12</sub> in Health Care Food by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography

莫建光, 周琳, 陈秋虹, 卢安根

MO Jian-guang, ZHOU Lin, CHEN Qiu-hong, LU An-gen

(广西分析测试研究中心, 广西南宁 530022)

(Guangxi Research Center for Analysis and Test, Nanning, Guangxi, 530022, China)

**摘要:**采用高效液相色谱法测定保健食品中维生素 B<sub>12</sub> 含量, 色谱柱用 Agilent ZORBAX SB-Aq (4.6mm × 250mm, 5μm), 流动相为甲醇-0.2% 磷酸水溶液(38 : 62), 流速 1.0ml/min, 检测波长 361nm。结果是维生素 B<sub>12</sub> 线性范围为 0.816~4.08μg,  $r = 0.9997$ ; 平均回收率为 97.2%,  $RSD$  为 1.39% ( $n = 6$ ), 最小检出限为 0.85μg/g。高效液相色谱法灵敏度高, 操作简便, 重现性好, 结果准确, 可以用于保健食品中维生素 B<sub>12</sub> 的质量控制。

**关键词:** 高效液相色谱法 维生素 B<sub>12</sub> 含量测定 保健食品

中图分类号: O657.72; TQ466.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2006)S0-0408-03

**Abstract:** A method for determination of Vitamin B<sub>12</sub> in health care food by HPLC was created. The method contained a Agilent ZORBAX SB-Aq (4.6 × 25mm, 5μm) column, with methanol-0.2% Phosphoric Acid (38 : 62) as mobile phase, rate 1.0ml/min, detection wavelength at 361nm. Linearity range: 0.816~4.08μg,  $r = 0.9997$ , the average recovery of Vitamin B<sub>12</sub> was 97.2%, the  $RSD$  of results was 1.39% ( $n = 6$ ), minimal detection value 0.85μg/g. The method is sensitive, simple, precise and accurate. This study provides a test method for the quality control of health care food.

**Key words:** HPLC, vitamin B<sub>12</sub>, determination, health care food

维生素 B<sub>12</sub> 又称钴胺素, 是一种含有钴的咕啉类有机化合物, 组成为 C<sub>63</sub>H<sub>88</sub>CoN<sub>14</sub>P。维生素 B<sub>12</sub> 是人体组织代谢过程中必需的维生素, 是人和其它哺乳动物维持生长和促进红细胞生长的重要因子<sup>[1]</sup>。维生素 B<sub>12</sub> 具有广泛的生理作用, 参与体内甲基转换及叶酸代谢, 促进神经髓鞘中脂蛋白的形成, 保持中枢神经和外周髓鞘神经纤维的功能完整, 人体需要的维生素 B<sub>12</sub> 的量很少, 推荐的日补助量为 2.4μg, 怀孕和哺乳的妇女日需量为 2.6μg, 婴儿为 0.4μg, 使用过量维生素 B<sub>12</sub> 可能引起过敏反应, 甚至过敏休

克<sup>[2]</sup>。摄入维生素 B<sub>12</sub> 不足则可能引起恶性贫血, 骨髓变性, 舌炎, 神经系统症状, 四肢僵硬, 易受刺激, 困倦, 精神不振等。临床上将维生素 B<sub>12</sub> 用于治疗恶性贫血和恢复造血功能, 也用于神经系统疾病如多发性神经炎, 末梢神经麻痹等<sup>[3]</sup>。

目前维生素 B<sub>12</sub> 的测定方法主要采用微生物分析法, 导数分光光度法, 高效毛细管电泳法, 化学发光析法, 高效液相色谱法。用高效液相色谱法测定维生素 B<sub>12</sub> 的文献报道不多, 本实验主要针对多成分、复杂基质的糖衣片剂的保健食品中维生素 B<sub>12</sub> 的测定。本方法具有简便、快速、灵敏结果可靠等优点。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪, 2487 紫外检测器; 威玛通用色谱工作站。

维生素 B<sub>12</sub> 对照品(美国 Sigma 公司生产) 甲醇是色谱纯, 天津四友生物医学技术有限公司生产; 无水乙醇是分析纯, 天津四友生物医学技术有限公司生产; 重蒸水是一级。

### 1.2 色谱条件

色谱柱用 Agilent ZORBAX SB-Rq (4.6mm × 250mm, 5μm); 流动相: 甲醇-0.2% 磷酸水溶液(38 : 62); 检测波长 361nm; 柱温为室温; 流速 1.0ml/min; 进样量 10μl。理论塔板数按维生素 B<sub>12</sub> 峰计算为不低于 5000。与其前后峰分离度分别为 2.63、7.39, 均大于 1.5。说明在此色谱条件下, 样品能很好地分离。

### 1.3 对照品溶液制备

精密称取维生素 B<sub>12</sub> 对照品适量, 置容量瓶中, 加 25% 甲醇使溶解, 制成 400μg/ml 的溶液。

### 1.4 供试品溶液制备

取维生素类保健干燥食品 20 丸, 研细。过 40 目筛, 混合均匀。称取均匀样品 1.0g 精确至 0.0001g 置于 50ml 容量瓶中, 加入 25% 甲醇溶液 40ml, 超声提取 15min, 取出, 用 25% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 吸取上清液过 0.5μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。

分别精密吸取以上对照品溶液和供试品溶液各 10μl, 注入色谱仪, 按 2.1 项下色谱条件测定的结果是供试品中维生素 B<sub>12</sub> 色谱峰与其他组分分离度良好, 与对照品维生素 B<sub>12</sub> 的保留时间(10.2min) 一致。色谱图见图 1 和图 2。

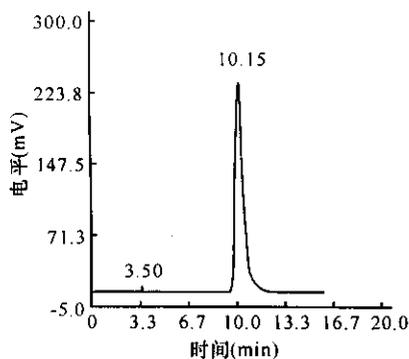


图 1 对照品的色谱图

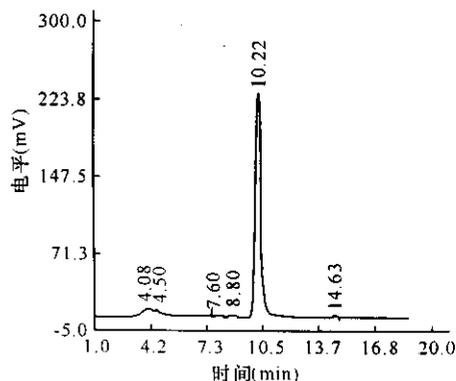


图 2 供试品的色谱图

### 1.5 线性关系考察

精密称取维生素 B<sub>12</sub> 对照品 10.0mg, 置于 25ml 容量瓶中, 加 25% 甲醇溶解并稀释至刻度, 精密量取 2ml, 5ml, 6ml, 8ml, 10ml 置入 10ml 容量瓶中, 加入 25% 甲醇稀释至刻度, 摇匀。精密吸取上述两种溶液各 10μl, 分别注入色谱仪, 测定其峰面积, 以进样量(μg) 为横坐标, 峰面积为纵坐标进行回归, 得回归方程:  $A = 519002 + 20013X$ ,  $r = 0.9997$ , 维生素 B<sub>12</sub> 在 0.816~4.08μg 范围与峰面积呈良好的线性关系。

### 1.6 精密度考察

精密吸取对照品溶液(200μg/ml) 10μl, 重复进样 6 次, 测定维生素 B<sub>12</sub> 峰面积。结果其平均峰面积为 4642464, RSD 为 0.92%。

### 1.7 稳定性试验

取供试品溶液(批号: 4<sup>#</sup>) 分别于 0, 7h, 8h, 12h, 16h 进样 1 次, 依法测定峰面积, 结果维生素 B<sub>12</sub> 平均峰面积为 4442471, RSD 为 0.99%。说明供试品溶液在 16h 内稳定。

### 1.8 重复性试验

取同批号样品(批号: 4<sup>#</sup>) 6 份, 精密称定, 按 2.3 项下的方法制备供试品溶液, 依法测定的结果是平均含量为 5.04mg/g, RSD 为 1.824%。说明本方法重现性良好。

### 1.9 加样回收率试验

精密称取已测知维生素 B<sub>12</sub> 含量的样品约 0.899g(批号: 4<sup>#</sup> 维生素 B<sub>12</sub> 含量为 5.04mg/g) 6 份, 各加入维生素 B<sub>12</sub> 对照品溶液(4.8mg/ml) 1ml, 分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 精密吸取 10μl 进样测定, 计算回收率。结果平均回收率为 97.2%, RSD 为 1.39% ( $n = 6$ ), 详见表 1。

## 2 样品测定

取 10 批样品, 按 2.3 供试品溶液的制备方法制

表1 维生素 B<sub>12</sub>加样回收率试验结果

称样量 (g)	样品中维生素 B <sub>12</sub> 含量 (mg)	维生素 B <sub>12</sub> 加入量 (mg)	维生素 B <sub>12</sub> 测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.8991	4.532	4.800	4.700	97.92	97.2	1.39
0.8420	4.244	4.800	4.713	98.19		
0.8761	4.416	4.800	4.584	95.50		
0.8816	4.4433	4.800	4.767	99.31		
0.8872	4.471	4.800	4.573	95.27		
0.8559	4.314	4.800	4.650	96.88		

表2 样品含量测定结果

样品编号	试样成分	维生素 B <sub>12</sub> 平均含量 (mg/g, n=3)
1 <sup>#</sup>	Vc, V <sub>E</sub> , V <sub>B<sub>1</sub></sub> , V <sub>B<sub>2</sub></sub> , V <sub>B<sub>6</sub></sub> , V <sub>D<sub>3</sub></sub> , V <sub>B<sub>12</sub></sub> , 烟酸, 叶酸, β-叶红素, 氧化锌, 富血铁, 辅料 <sup>1</sup> 。	0.63
2 <sup>#</sup>	Vc, V <sub>E</sub> , V <sub>B<sub>1</sub></sub> , V <sub>B<sub>2</sub></sub> , V <sub>B<sub>6</sub></sub> , V <sub>D<sub>3</sub></sub> , V <sub>B<sub>12</sub></sub> , 烟酰胺, 叶酸, VA 醋酸盐, 葡萄糖酸锌, 辅料。	8.78
3 <sup>#</sup>	V <sub>B<sub>1</sub></sub> , V <sub>B<sub>2</sub></sub> , V <sub>B<sub>12</sub></sub> , 烟酰胺, 叶酸, V <sub>A</sub> , V <sub>D</sub> , 泛酸钙, 胆碱枸橼酸盐, 肌醇, 葡萄糖酸锌, 葡萄糖酸亚铁, 葡萄糖酸铜, 葡萄糖酸锰, 对氨基苯甲酸, 辅料。	0.99
4 <sup>#</sup>	Vc, V <sub>E</sub> , V <sub>B<sub>1</sub></sub> , V <sub>B<sub>2</sub></sub> , V <sub>B<sub>6</sub></sub> , V <sub>D<sub>3</sub></sub> , V <sub>B<sub>12</sub></sub> , 烟酸, 叶酸, V <sub>A</sub> , 醋酸盐, 肌醇, 对氨基苯甲酸, 胆碱酸性酒石酸盐, 氯化钾, 碳酸钙, 富血铁, 硫酸锌, 硒酸钠, 辅料。	5.04
5 <sup>#</sup>	Vc, V <sub>E</sub> , V <sub>B<sub>1</sub></sub> , V <sub>B<sub>6</sub></sub> , V <sub>D<sub>3</sub></sub> , V <sub>B<sub>12</sub></sub> , 烟酸, 叶酸, 肌醇, L-赖氨酸, L-胱氨酸, 氨基乙酸, 胆碱酸性酒石酸盐, 辅料。	3.28
6 <sup>#</sup>	Vc, V <sub>B<sub>1</sub></sub> , V <sub>B<sub>2</sub></sub> , V <sub>B<sub>6</sub></sub> , V <sub>D<sub>3</sub></sub> , V <sub>B<sub>12</sub></sub> , 烟酰胺, D 泛酸钙, 胆碱枸橼酸盐, 肌醇, V <sub>A</sub> , 醋酸盐, 辅料。	0.05
7 <sup>#</sup>	Vc, V <sub>E</sub> , V <sub>B<sub>1</sub></sub> , V <sub>B<sub>2</sub></sub> , V <sub>B<sub>6</sub></sub> , V <sub>D<sub>3</sub></sub> , V <sub>B<sub>12</sub></sub> , 烟酸, 叶酸, V <sub>A</sub> , 醋酸盐, 肌醇, 一氧化镁, 富血铁, 胆碱酸性酒石酸盐, 硬脂酸镁, 硫酸锌, 碳酸钙, 辅料。	4.39
8 <sup>#</sup>	Vc, V <sub>E</sub> , V <sub>B<sub>1</sub></sub> , V <sub>B<sub>2</sub></sub> , V <sub>B<sub>6</sub></sub> , V <sub>D<sub>3</sub></sub> , V <sub>B<sub>12</sub></sub> , 烟酰胺, V <sub>A</sub> , 醋酸盐 硫酸锌, 对氨基苯甲酸, 富血铁, 辅料。	3.94
9 <sup>#</sup>	V <sub>B<sub>1</sub></sub> , V <sub>D<sub>3</sub></sub> , V <sub>B<sub>12</sub></sub> , 辅料。	5.27
10 <sup>#</sup>	V <sub>B<sub>1</sub></sub> , V <sub>B<sub>2</sub></sub> , V <sub>B<sub>6</sub></sub> , V <sub>B<sub>12</sub></sub> , 烟酰胺, 辅料。	21.1

备样品溶液,分别精密吸取 10 $\mu$ l 进样测定的结果见表 2。

表 2 结果显示,10 批样品均分离出维生素 B<sub>12</sub>, 其平均含量为 0.05~21.1mg/g,而且维生素 B<sub>12</sub> 与其他组分的分离度良好。

### 3 结论

本实验建立了 Rp-HPLC 快速测定维生素 B<sub>12</sub> 的方法,从进样到分离出峰仅需 10min。该方法所用的试剂简易,前处理操作简单迅速,分离不需要梯度洗脱,准确度和精密度较好,方法的线性范围宽,检出限也较低,用于保健食品分析的结果令人满意。

参考文献:

- [1] 刘敏. HPLC 法测定功能性饮料中多种 B 族维生素的含量[J]. 饮料工业, 2006, 9(1): 39-41.
- [2] 高美哲, 黎海芪. 重庆地区学龄前儿童血清维生素 B<sub>12</sub> 营养状况调查[J]. 中华儿科杂志, 2006, 44(1): 7-10.
- [3] 王铭维, 孙秀巧, 王彦永, 等. 维生素 B<sub>12</sub> 缺乏引起中枢及周围神经变性 15 例临床分析[J]. 河北医药, 2006, 28(1): 34-34.
- [4] 王莉, 周光明, 黄成, 等. 离子对反相高效液相色谱法测定维生素 B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C 和叶酸[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2006(6).