

# 超高效液相色谱法测定功能饮料中的维生素 B12 的含量

LC-115

**摘要：**本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 测定功能饮料中的维生素 B12 的方法。前处理采用 C18 固相萃取法，样品处理时间短。使用二元高压梯度系统利用 C18 色谱柱在 5 min 内实现快速分析。实验结果表明：线性范围 0.5 mg/L~100 mg/L，相关系数大于 0.9998；维生素 B12 标样的仪器检出限为 0.06 mg/L，仪器定量限为 0.2 mg/L；0.5 mg/L、5 mg/L 和 50 mg/L 三个浓度标样 6 次连续进样的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.09~0.16% 和 0.08~0.60% 之间；0.5 mg/L 功能饮料样品加标回收率为 77.6%。

**关键词：**B12 UHPLC 功能饮料 固相萃取法

维生素 B12 (英文名 vitamin B12, B12; CAS: 68-19-9) 又称钴胺素, 是一种由含钴的卟啉类化合物组成的 B 族维生素, 又被称为造血维生素, 具有肌肤再生的优越效果, 细胞再生与造血都少不了它, 是促进人体新陈代谢的重要成分。自然界中的维生素 B12 都是微生物合成的, 高等动植物不能制造维生素 B12。维生素 B12 的主要生理功能是参与制造骨髓红细胞, 防止恶性贫血; 防止大脑神经受到破坏。人体维生素 B12 需要量极少, 只要饮食正常, 就不会缺乏。维生素 B12 是人体内每天需要量最少的一种, 过量的维生素 B12 会产生毒副作用, 可出现哮喘、荨麻疹、湿疹、面部浮肿、寒颤等过敏反应, 也可能相发神经兴奋、心前区痛和心悸。维生素 B12 摄入过多还可导致叶酸的缺乏。

功能饮料是指通过调整饮料中营养素(营养成分为各种维生素组成)的成分和含量比例, 在一定程度上调节人体功能的饮料, 现在消费者也称为维生素饮料, 具有提神抗疲劳之作用。

本文参考《GB/T 5009 217-2008 保健食品中维生素 B12 的测定》, 使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A, C18 色谱柱和固相萃取法建立了一种分析功能饮料中维生素 B12 的含量快速检测方法, 供相关检测人员参考。

## 实验条件

### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 二元高压梯度系统。具体配置为 LC-30AD 输液泵, DGU-20A5R 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, SPD-20A 紫外检测器, CBM-20A 系统控制器, LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

#### 液相色谱条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS III 2.0 mm i.d. × 150 mm., 2.2 μm

流动相: A - 0.2% 磷酸水; B - 甲醇

流速: 0.4 mL/min

进样体积: 10 μL

柱温: 40°C

检测波长: 361 nm

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 15%, 时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time (min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	15
1.50	Pumps	Pump B Conc.	95
2.00	Pumps	Pump B Conc.	95
2.01	Pumps	Pump B Conc.	15
5.00	Controller	Stop	

### 1.3 样品制备

标准溶液配制: 用 5% 乙腈水溶液配制 500 mg/L B12 标准储备液。用水将标准储备液稀释成 0.5 mg/L、1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、50 mg/L、100 mg/L 不同浓度的校准曲线工作液。

样品前处理方法: 取 150 mL 功能饮料溶液, 超声脱气 10 min 后, 加入 100 mL 水, 超声 15 min 定容于 250 mL 容量瓶中。C18 固相萃取柱活化后, 将上述处理过的试样加到固相萃取柱上。上样后, 用 5 mL 5% 乙腈溶液作为洗脱溶剂将干扰物质洗脱出来, 最后用 25% 乙腈溶液将维生素 B12 洗脱, 收集洗脱液 0.5 mL, 过 0.45 μm 滤膜后, 上机测试。

## 实验部分

### 2.1 标准样品的色谱图

维生素 B12 标准样品的色谱如图 1 所示, 保留时间为 2.133 min, 最大吸收波长 361 nm。

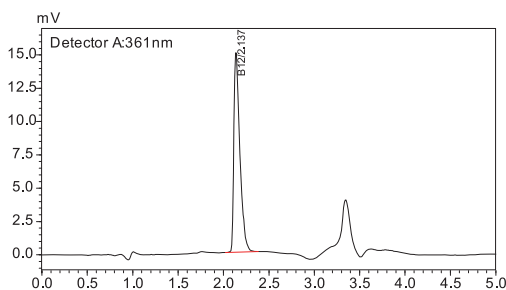


图1 5mg/L维生素B12标准溶液的色

## 实验部分

### 2.2 线性关系

将7个不同浓度的标准工作液，按1.2中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，如图2所示。线性方程为  $Y = (14632.1)X + (-797.9)$ 、线性范围0.5~100 mg/L，相关系数大于0.9998，线性关系良好。

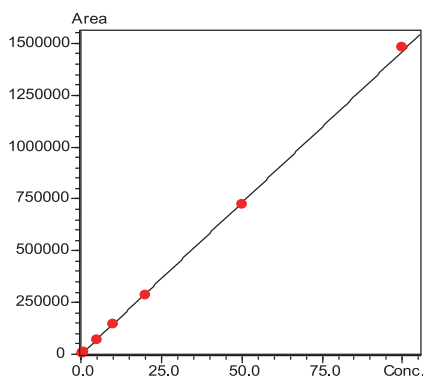


图2 维生素B12的标准工作曲线

### 2.3 检出限和定量限

0.5 mg/L的标样色谱图如下所示，按照ASTM计算信噪比，选取基线为1.2–1.7 min，信噪比为24.17。以3倍信噪比为检测限，计算得到仪器的检出限为0.06 mg/L，定量限为0.2 mg/L。

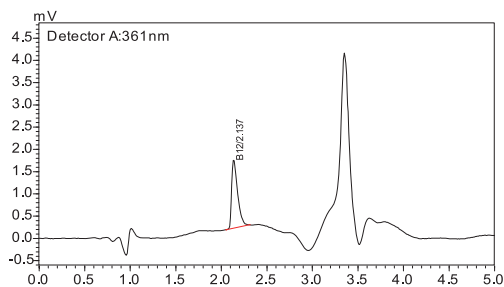


图3 0.5mg/L维生素B12标准溶液的色谱图

### 2.4 精密度实验

取标准工作液中0.5 mg/L、5 mg/L和50 mg/L三个浓度，分别平行进样7次，目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在0.09~0.16%和0.08~0.60%之间，仪器精密度良好。

表4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=7)

浓度 (mg/L)	保留时间 RSD	峰面积 RSD
0.5	0.09%	0.60%
5	0.16%	0.08%
50	0.11%	0.59%

### 2.5 基质加标实验

按照1.3中样品制备方法，在功能饮料样品中添加标样，加标含量为0.5 mg/L。功能饮料样品中检出维生素B12浓度为0.15 mg/L，维生素B12加标回收率为77.6%。功能饮料样品的色谱图如图4所示，0.5 mg/L维生素B12加标样品的色谱图如图5所示。

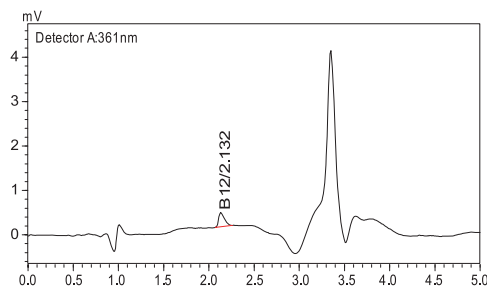


图4 功能性饮料样品维生素B12的色谱图

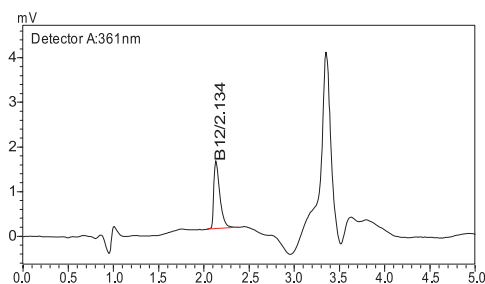


图5 0.5mg/L维生素B12加标样品的色谱图

## 实验部分

本方法参考《GB/T 5009 217-2008 保健食品中维生素B12的测定》，采用岛津超高效液相色谱仪LC-30A，前处理采用C18固相萃取方法富集，测试功能饮料中的维生素B12，在5 min内完成快速分析，灵敏度高。可用于功能饮料中维生素B12含量测定。