

HPLC-PDA 法同时测定功能性饮料中 9 种水溶性维生素

王荣艳 贾丽 钱春燕

(北京市理化分析测试中心 北京 100089)

摘 要 本文研究了用高效液相色谱 (HPLC) —二极管阵列检测器 (PDA) 扫描结合同时测定 9 种水溶性维生素 VB₁、VB₂、VB₆、VB₁₂、叶酸、烟酸、烟酰胺、泛酸钙和 VC 的方法, 扫描波长是 190nm~600nm, 提取波长分别是 210nm 和 262nm。结果说明测定相关系数 R^2 为 0.9997~1.000。平均回收率为 81.4%~108%, RSD 为 0.41~5.46。可应用于市售功能性饮料中水溶性维生素含量的测定。

关键词 水溶性维生素; 高效液相色谱 (HPLC) 法; 功能性饮料; 二极管阵列检测器 (PDA)

中图分类号 O657.7

HPLC-PDA Determination 9 Water-soluble Vitamins in Functional Drinks

Wang Rongyan, Jia Li, Qian Chunyan

(Beijing Center for Physical & Chemical Analysis, Beijing 100089)

Abstract A method is studied for determination vitamin C, vitamin B₁, vitamin B₂, vitamin B₆, vitamin B₁₂, nicotinic acid, nicotinamide, folic acid, calcium pantothenate of water-soluble vitamins by high performance liquid chromatography (HPLC)-photodiode array detector (PDA). The scanning wavelength was 190 nm~600 nm, and the wavelength of extraction was 210 nm and 262 nm. The calibration curve was linear ($R^2=0.9997\sim1.000$). The average recovery was 81.4%~108%, and RSD was 0.41~5.46. The method may be applied to test water-soluble vitamins in functional drinks.

Key words Water-soluble vitamins; High performance liquid chromatography (HPLC); Functional drinks; Photodiode array detector (PDA);

维生素是维持人体正常物质代谢和某些特殊生理功能不可缺少的低分子有机化合物。根据其物理性质可分为两大类, 即脂溶性维生素和水溶性维生素。水溶性维生素包括 B 族维生素 (VB₁、VB₂、VB₆、VB₁₂、PP 等)、VC、叶酸、泛酸和生物素等。水溶性维生素相对不稳定, 在食物和饮料的加工和储存中会遭到破坏。由于水溶性维生素的功能以及它们的相对不稳定性, 因此定性和定量分析检测 B 族维生素就成了一个非常重要且具有挑战性的任务^[1]。

按照人体生理指标, 各种维生素必须达到一定的摄入量才能保证机体维持正常的生理机能。但是, 一些维生素的过多摄入可能产生一定的毒性作用, 反而危害机体正常的生理机能。故有一套测定功能性饮料中维生素含量的完整、快速、简便、灵敏的试验方法极为重要^[2,3]。

对于食品中水溶性维生素的分析检测有一些报道, 如分光光度法, 荧光法、电化学法、生物分析法等, 这些方法都不能达到快速、简便的目的, 而且干扰物质较多给定量带来一定的困难。本文中介绍了采用 HPLC 法同时测定 VB₁、VB₂、VB₆、VB₁₂、叶酸、烟

酸、烟酰胺、泛酸钙等 8 中水溶性维生素以及 VC, 用二极管阵列检测器 (PDA) 检测, 并对市售功能性饮料进行检测, 结果基本与标签标注一致^[4]。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 2695 型高效液相色谱 (配 2998 型二极管阵列检测器), 维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₆、维生素 B₁₂、叶酸、烟酸、烟酰胺、泛酸钙和维生素 C 对照品 (sigma 公司); 甲醇 (色谱纯), 磷酸二氢钾, 均为分析纯, 所用水为 Millipore 纯水。

1.2 对照品溶液的配制

分别准确称取 VB₁、VB₂、VB₆、VB₁₂、叶酸、烟酸、烟酰胺、泛酸钙和 VC 对照品各 10.0 mg, 用超纯水定容于 10.0 mL 棕色容量瓶中, 配成浓度为 1.0 mg/mL 的储备液, 于 4 ℃ 保存。

1.3 色谱条件

色 谱 柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈, 5 μm

4.6 × 250 mm;扫描波长:190 ~ 600 nm;
柱温:25℃;进样量. 20 μL;流动相条件:见表1。

表 1 流动相相关条件			
时间	流量 (mL/min)	甲醇	mol/L 磷酸氢钾-1%乙腈溶液
0	0.6	0	100
4	0.6	0	100
10	1.0	0	100
11	1.0	8	92
20	1.0	8	92
20.1	1.0	28	72
36	1.0	28	72
37	0.6	0	100
40	0.6	0	100

1.4 样品前处理

取一定量样品超声脱气 10 min,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, HPLC 测定。

2 结果与讨论

2.1 线性关系考察

准确移取 1.0 mL 各维生素储备液于 10.0 mL

容量瓶中,加水定容制成混合对照品溶液。
为获得各种维生素尽可能宽的检测线性范围,分别取不同体积的混合对照品溶液,用水稀释为系列浓度,进样量 20 μL,每个浓度连续进样 6 次,以峰面积对浓度绘制标准曲线,其线性方程和相关系数见表 2。由于维生素 C 的提取波长不能和其他 8 种相同,故此实验需要对同一个样品的 PDA 扫描图谱进行两种波长的提取。混合对照品溶液图谱见图 1 和图 2。

表 2 混合标准对照品溶液的线性关系特性表		
组分名称	标准曲线方程	相关系数R ²
烟 酸	y = 69450x - 98854	0.9998
维生素B ₁	y = 19968x - 6667.5	0.9999
维生素B ₆	y = 70282x - 29561	0.9999
烟 酰 胺	y = 77779x - 63587	0.9997
泛 酸 钙	y = 6997x - 6980	1.000
叶 酸	y = 64387x - 2408.1	1.000
维生素B ₁₂	y = 58886x - 29138	0.9999
维生素B ₂	y = 40079x - 32196	1.000
维生素C	y = 92607x - 36128	0.9995

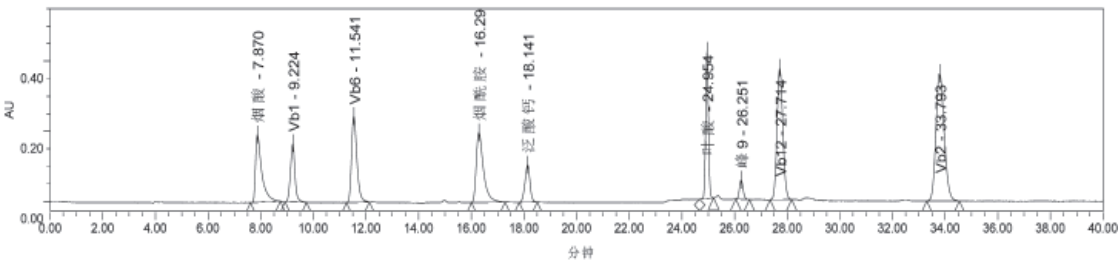


图 1 提取波长为 210 nm 时标准对照品的色谱图

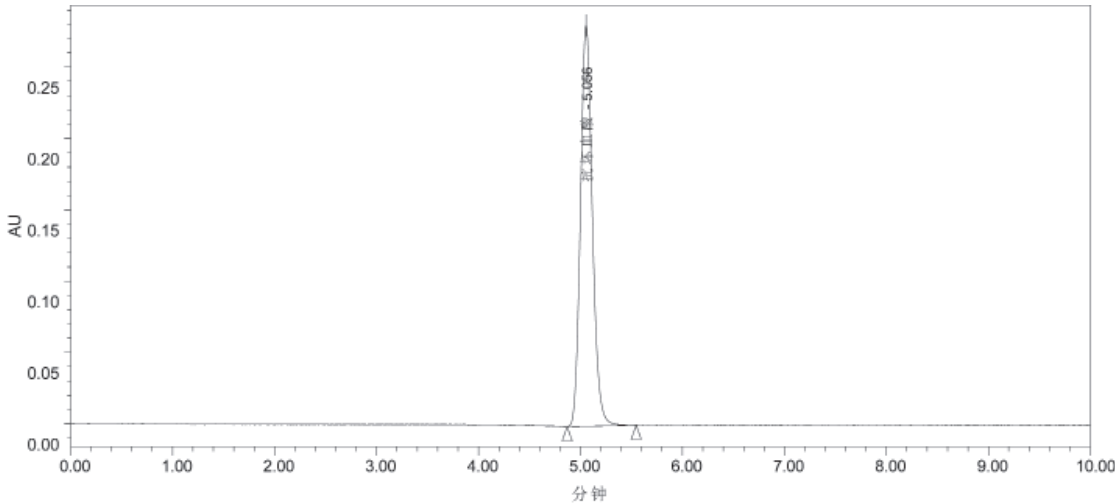


图 2 提取波长为 262 nm 时标准对照品的色谱图

2.2 回收率和精密度试验

取一个空白样品进行标准添加实验,每个添加

量做 6 个平行实验,实验结果见表 3,空白样品及其加标图谱见图 3 和图 4。

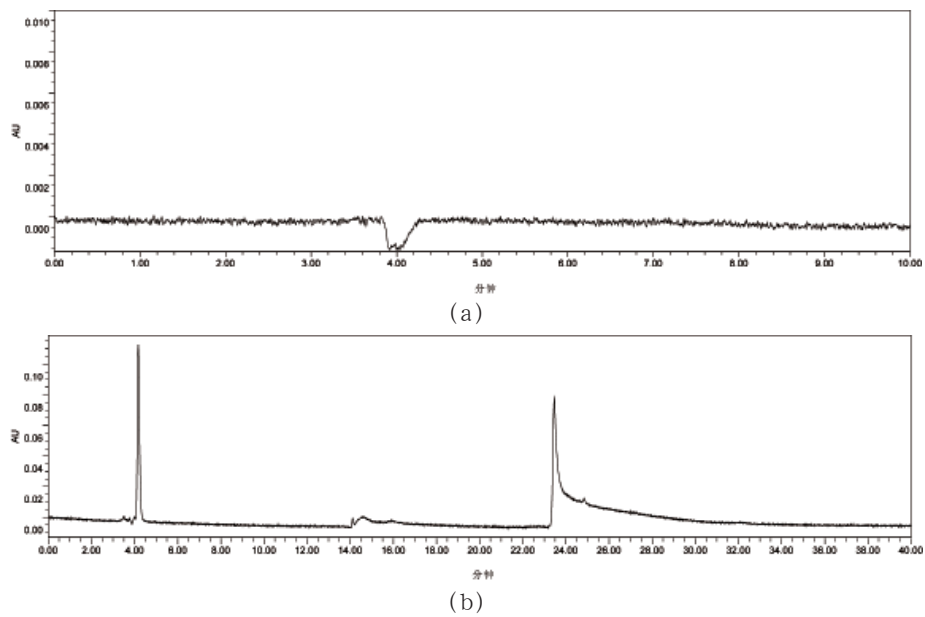


图 3 a: 提取波长为 262 nm 时空白样品色谱图; b: 提取波长为 210 nm 空白样品色谱图

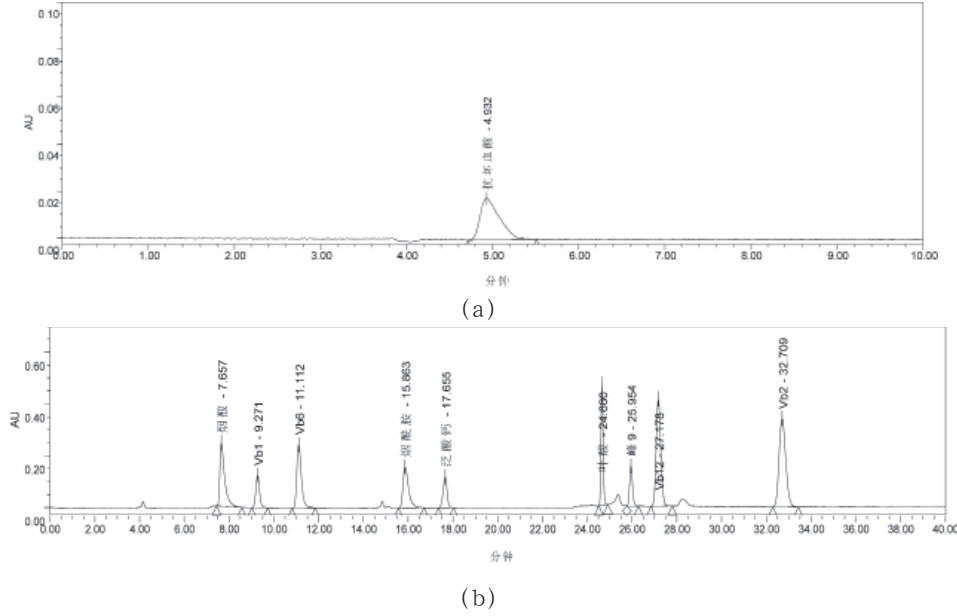


图 4 a: 提取波长为 262 nm 时加标样品色谱图; b: 提取波长为 210 nm 加标样品色谱图

表 3 空白样品标准对照品添加实验结果 (n=6)

组分名称	添加量的序号	添加量 (mg/L)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (RSD) %
烟 酸	1	2	97.0	3.21
	2	5	98.4	1.45
	3	50	107	1.13
维生素B ₁	1	2	83.3	1.58
	2	5	89.6	0.65
	3	50	101	1.22
维生素B ₆	1	2	98.5	2.31
	2	5	97.6	2.11
	3	50	101	1.54
烟 酰 胺	1	2	81.4	3.72
	2	5	93.3	0.41
	3	50	95.0	1.10

泛 酸 钙	1	2	97.8	2.23
	2	5	106	2.63
	3	50	108	1.84
叶 酸	1	2	97.2	3.34
	2	5	103	0.79
	3	50	98.9	1.92
维生素B ₁₂	1	2	93.4	2.15
	2	5	99.1	1.98
	3	50	101	1.11
维生素B ₂	1	2	84.5	5.46
	2	5	86.9	1.15
	3	50	95.4	2.49
维生素C	1	0.5	88.6	1.19
	2	1	97.8	0.79
	3	5	100	0.51

2.3 样品测定

取饮料原液,按 1.4 中样品处理方法进行处理,然后进行 HPLC 测定,外标法定量,以回归曲线求出样品含量,结果见表 4。

表 4 样品测定结果 (mg/mL)

样品	烟酸	VB ₁	VB ₆	烟酰胺	泛酸钙	叶酸	VB ₁₂	VB ₂	VC
1	标注值	—	—	—	—	—	—	—	含有
	实测值	—	—	—	—	—	—	—	0.30
2	标注值	—	—	0.40	4.10	—	—	0.0012	—
	实测值	—	—	0.50	4.19	—	—	—	—
3	标注值	—	5	5	20	—	—	—	5
	实测值	—	4.83	5.05	19.2	—	—	—	—
4	标注值	—	—	0.1~0.2	含有	—	—	—	含有
	实测值	—	—	0.21	3.13	—	—	—	1.44
5	标注值	—	—	—	—	—	—	—	含有
	实测值	—	—	—	—	—	—	—	4.55
6	标注值	—	—	—	—	—	—	—	含有
	实测值	—	—	—	—	—	—	—	7.19
7	标注值	—	—	0.01~0.12	1~4	—	—	—	—
	实测值	—	—	0.12	3.52	—	—	—	—
8	标注值	—	—	0.04~0.12	0.33~1	—	—	—	25~50
	实测值	—	—	0.12	0.78	—	—	—	43.15
9	标注值	—	—	0.1	1	—	—	—	25
	实测值	—	—	0.13	0.83	—	—	—	18.3
10	标注值	—	—	—	—	—	—	—	22.5
	实测值	—	—	—	—	—	—	—	27.5

注:“—”表示未检出。

3 结论

本实验建立了 HPLC-PDA 快速同时分离测定 9 种水溶性维生素 VB₁、VB₂、VB₆、VB₁₂、叶酸、烟酸、烟酰胺、泛酸钙和 VC 的方法,实验证明该方法所用试剂简单易得,操作简便快速。

此方法用于功能性饮料的测定,结果可靠。从样品测定结果来看,功能饮料中所标示添加的维生素均可被检出,且含量的标示量和实测量基本相符。本文所研究的方法为功能性饮料的产品质量控制提供了可靠的实验依据。本方法亦可应用于其他基质的样品中水溶性维生素的含量测定。

参考文献

[1] 高旭,李淑娟 等. 高效液相色谱法同时测定食品中 8 种水溶性维生素. 中国医药指南,2008,6 (19): 6-38.

[2] 杨玲娟,谢天柱,等. 离子对反相高效液相色谱法同时测定功能性饮料中的 B 族维生素. Analysis and Examination,2009, 8(209): 140-142

[3] 刘敏,郑伟涛. HPLC 法测定功能性饮料中多种 B 族维生素的含量. 饮料工业, 2006 (1): 39-41.

[4] 刘娜,陈大舟,杨桦,等. 婴儿配方奶粉中 8 种水溶性维生素的高效液相色谱法同时测定. 分析测试学报,2008,27(4): 408-411

(上接第 97 页)

Co. Pte. Ltd., UK, 2006

[2] 吴树仁,王曙. 地质词典(二) 矿物、岩石、地球化学分册. 地质出版社,1981

[3] 许桂花,姚艳红,李承范. X-射线衍射 K 值法测定硅灰石矿中方解石的含量. 长春师范学院学报(自然科学版),2006,25 (6): 41-43

[4] 金达莱,岳林海,徐铸德. 球形碳酸钙复合物的红外、拉曼光谱分析研究. 无机化学学报,2004,6: 715-720

[5] 刘元芬,李祥,高锦飏等. 石膏炮制前后红外光谱的特征分析与鉴定. 内蒙古中医药,2007,5: 27-29

[6] 刘丽华,张培萍,李宪州. 蒙药饭石膏的红外光谱分析及药用再研讨. 广东微量元素科学,2002,9 (6): 56-58

[7] 孙育斌,恽怀顺,李新怀. 用漫反射差示红外光谱法研究高岭土与赤铁矿的分离机理. 分析仪器,2002,4: 29-31

[8] 古代青铜器锈蚀产物的拉曼和红外光谱分析. 有色金属,2008, 60 (2): 146-152

[9] 彭文世,刘高魁. 矿物红外光谱图集. 北京科学出版社,1982

[10] Arthur M. Halpern, B. R. Ramachandran and Eric D. Glendening. The inversion potential of ammonia: An intrinsic reaction coordinate calculation for student investigation. Journal of Chemical Education, 2007, 84 (6):

1067-1072

[11] K. Balci, A Koch, E. Kleinpeter. A theoretical IR spectroscopic study based on DFT calculations for free mn-15S₂O₃ maleonitrile-dithiacrown ether compound. Journal of Molecular Structure, 2009, 919 (1-3): 128-139

[12] Zhijian Shen, Ralf Keding, Thomas H. che. Modelling IR-spectra of single-phase polycrystalline materials with random orientation-supplementations and refinements for optically uniaxial crystallites. Optik-International Journal for Light and Electron Optics, 2003, 114 (8): 351-359

[13] Clifford A. Bunton and Fernando Casta eda. Infrared spectroscopy and ab initio computation in conformer determination of keto ester and diketo triphenylphosphonium ylides. Journal of Molecular Structure, 2009, 936 (1-3): 132-136

[14] 孙凤久,楼丹花,李莉娟. 方解石晶体振动模式群论分析和红外光谱的 DFT. 东北大学学报(自然科学版),2008,29 (1): 145-148

[15] James B. Foresman, Aeleen Frisch. Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods. Second Edition, Gaussian, Inc. Pittsburgh, PA, USA, 1996

[16] <http://webbook.nist.gov/chemistry>, 2010-2-10