

食品中维生素 B₆ 的测定 液相色谱法

1. 检测方法

依据国家标准：食品安全国家标准 食品中维生素 B₆ 的测定（GB 5009.154-2016）。

2. 方法提要

试样经提取等前处理后，经 C₁₈ 色谱柱分离，高效液相色谱-荧光检测器检测，外标法定量维生素 B₆（吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺）的含量。

3. 试剂和材料

- 3.1. 辛烷磺酸钠 (C₈H₁₇NaO₃S)
- 3.2. 冰乙酸 (C₂H₄O₂)
- 3.3. 三乙胺 (C₆H₁₅N)：色谱纯
- 3.4. 甲醇 (CH₄O)：色谱纯
- 3.5. 盐酸 (HCl)
- 3.6. 氢氧化钠 (NaOH)
- 3.7. 淀粉酶：酶活力 ≥ 1.5U/mg
- 3.8. 盐酸吡哆醇 (C₈H₁₂ClNO₃，CAS 号：58-56-0)：纯度 ≥ 98%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质
- 3.9. 盐酸吡哆醛 (C₈H₁₀ClNO₃，CAS 号：65-22-5)：纯度 ≥ 99%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质
- 3.10. 双盐酸吡哆胺 (C₈H₁₄Cl₂N₂O₃，CAS 号：524-36-7)：纯度 ≥ 99%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质

4. 仪器和装置

- 4.1. 高效液相色谱仪：福立 LC5090 高效液相色谱仪，配备 LC5090 在线脱气机、LC5090 二元高压输液泵、LC5090 自动进样器、LC5090 柱温箱、LC5090 荧光检测器。
- 4.2. 色谱柱：Sunniest C18 色谱柱，4.60 mm × 150 mm，粒径为 5.0 μm。
- 4.3. 天平：精度为 0.0001g。
- 4.4. 一次性注射器。
- 4.5. 针头过滤器：0.45 μm 水滤膜。

- 4.6. 抽滤瓶。
- 4.7. 真空泵。
- 4.8. 微孔滤膜 0.45 μm 。

5. 实验

5.1. 试剂配制

5.1.1. 盐酸溶液液(5.0 mol/L)

量取 45 mL 盐酸，用水稀释并定容至 100 mL。

5.1.2. 盐酸溶液液(0.1 mol/L)

吸取 9 mL 盐酸，用水稀释并定容至 1000 mL。

5.1.3. 氢氧化钠溶液(5.0 mol/L)

称取 20 g 氢氧化钠，加 50 mL 水溶解，冷却后，用水定容至 100 mL。

5.1.4. 氢氧化钠溶液(0.1 mol/L)

称取 0.4 g 氢氧化钠，加 50 mL 水溶解，冷却后，用水定容至 100 mL。

5.2. 标准系列配置

5.2.1. 吡哆醇标准储备液(1 mg/mL):

准确称取 12.16 mg 盐酸吡哆醇标准品，用 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解后定容到 10 mL，在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存，有效期 1 个月。

5.2.2. 吡哆醛标准储备液(1mg/mL):

准确称取 12.18 mg 盐酸吡哆醛标准品，用 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解后定容到 10 mL，在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存，有效期 1 个月。

5.2.3. 吡哆胺标准储备液(1mg/mL):

准确称取 14.34 mg 双盐酸吡哆胺标准品，用 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解后定容到 10 mL，在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存，有效期 1 个月。

5.2.4. 维生素 B₆混合标准中间液(20 μg /mL):

分别准确吸取吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺的标准储备液各 0.20 mL，用 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释并定容至 10mL。临用前配制。

5.2.5. 维生素 B₆混合标准系列工作液：

分别准确吸取维生素 B₆混合标准中间液 0.05 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.5 mL、1.0 mL，至 100mL 容量瓶中，用水定容。该标准系列浓度分别为 0.10 μg/mL、0.20 μg/mL、0.40 μg/mL、0.60 μg/mL、1.00 μg/mL、2.00 μg/mL。临用前配制。

5.3. 样品制备

5.3.1. 样品的制备

称取混合均匀的维生素功能饮料试样约 4 g (精确至 0.01 g) 于 10 mL 容量瓶中，静置 5 min~10 min。用 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释，定容至 10 mL。

5.3.2. 加标样品的制备

称取混合均匀的维生素功能饮料试样约 4 g (精确至 0.01 g) 于 10 mL 容量瓶中，静置 5 min~10 min。加入 1.5 mL 维生素 B₆混合标准中间液 (5.2.4)，用 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释，定容至 10 mL。

5.4. 仪器条件

(a) 色谱柱：Sunniest C18，柱长 150 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μm；

(b) 流动相：A：B=20：80；

A：甲醇

B：辛烷磺酸钠 2.0 g、三乙胺 2.5 mL，用水溶解并定容到 1000 mL 后，用冰乙酸调 pH 至 3.0±0.1，过 0.45 μm 微孔滤膜过滤

(c) 流速：1.0 mL/min；

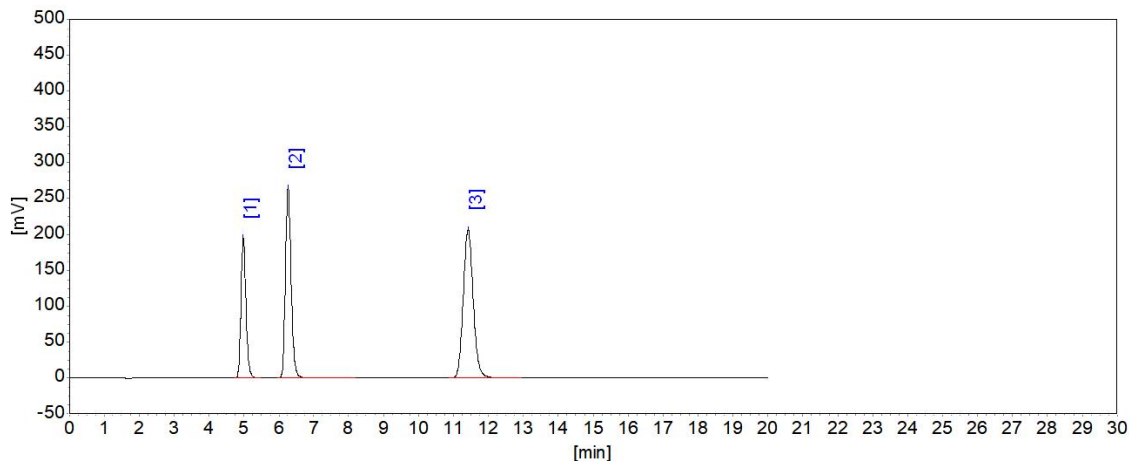
(d) 检测器：激发波长 293 nm，发射波长 395 nm；

(e) 柱温：30 °C；

(f) 进样量：10 μL。

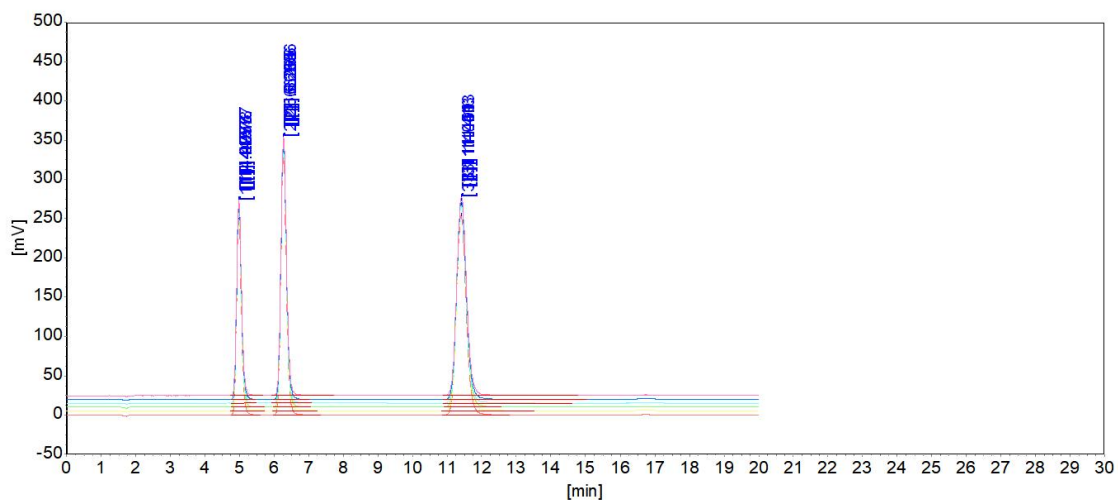
5.5. 分析结果

5.5.1. 维生素 B₆ 标准溶液典型谱图及结果 (0.40 μg/mL)



1. 吡哆醛 2. 吡哆醇 3. 吡哆胺

5.5.2. 维生素 B₆ 标准溶液六针重复性谱图及结果 (0.60 μg/mL)



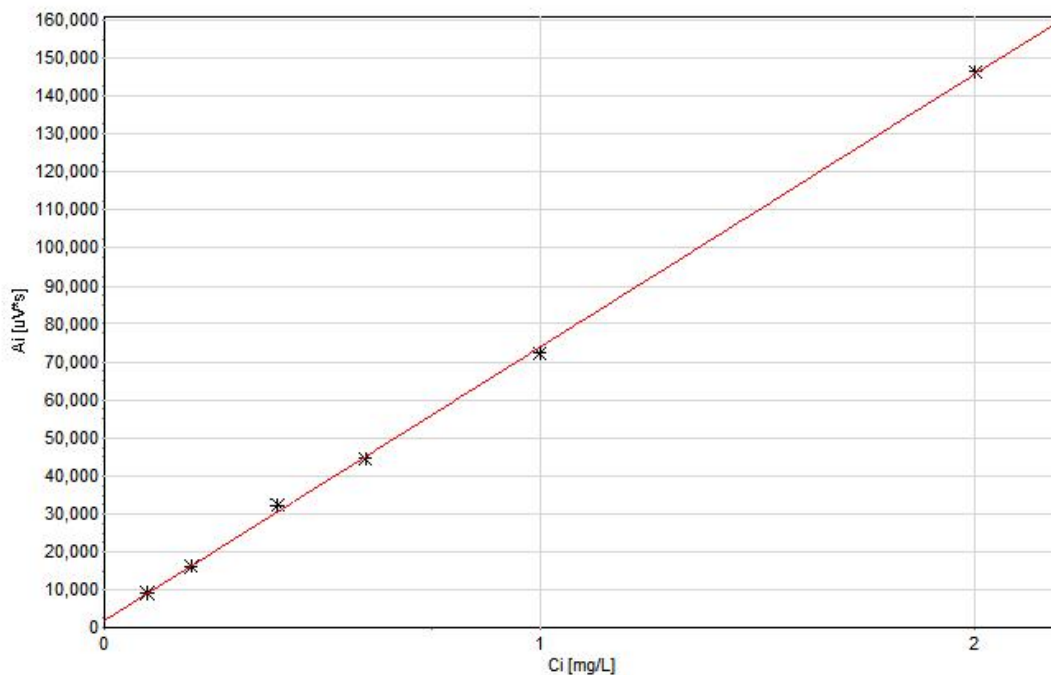
峰序	组分名	保留时间平均值/min	保留时间 RSD/%	面积平均值/uAU*s	面积 RSD/%	峰高平均值/uAU	峰高 RSD/%	谱图数
1	吡哆醛	4.976	0.025	41519	1.368	251187	1.460	6
2	吡哆醇	6.265	0.021	63183	1.299	332030	1.440	6
3	吡哆胺	11.410	0.026	85087	1.152	255171	1.467	6

5.5.3. 标准曲线

标准曲线的绘制：分别进样浓度为 0.10 $\mu\text{g/mL}$ 、0.20 $\mu\text{g/mL}$ 、0.40 $\mu\text{g/mL}$ 、0.60 $\mu\text{g/mL}$ 、1.00 $\mu\text{g/mL}$ 、2.00 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列溶液各 10 μL ，进行 HPLC 分析。然后以峰面积为纵坐标，以目标物的含量为横坐标，绘制标准曲线。

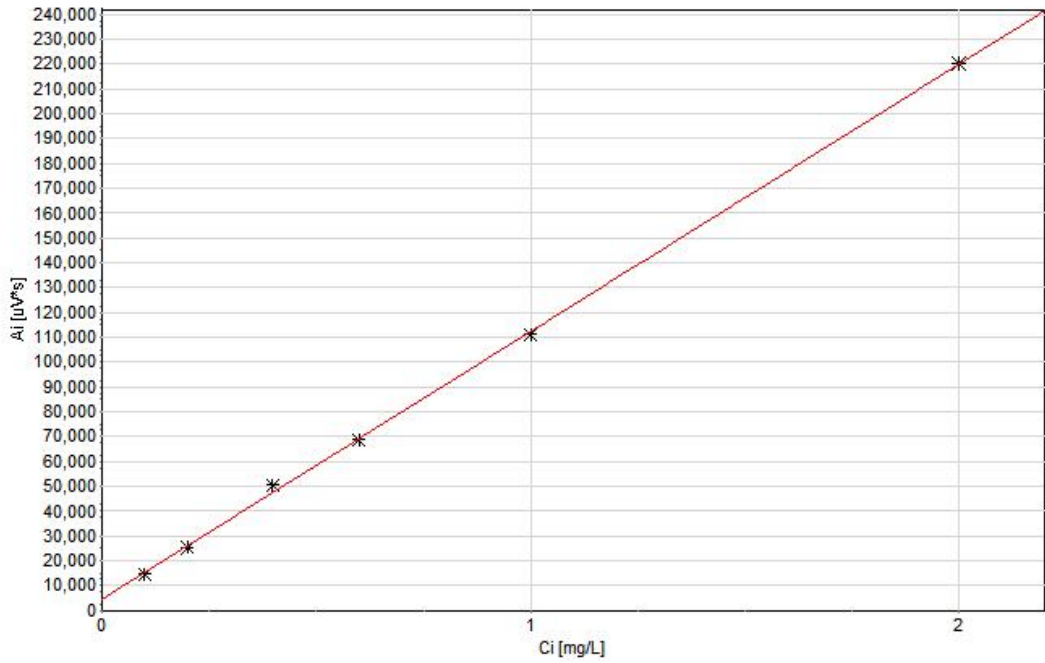
组分[吡哆醛]： 曲线方程： $C_i = -0.0258253 + 1.38919E-005 \cdot A_i$

校正因子： $f_0 = -0.0258253$, $f_1 = 1.38919E-005$ 相关系数： $r^2 = 0.99958$



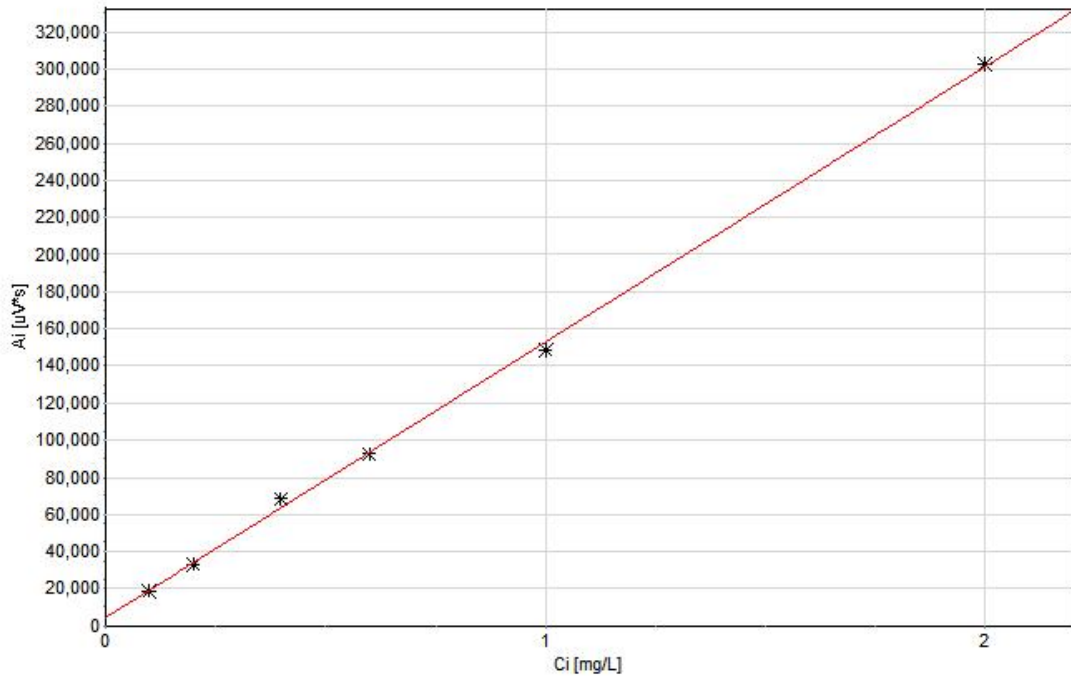
组分[吡哆醇]: 曲线方程: $C_i = -0.0415753 + 9.27705E-006 * A_i$

校正因子: $f_0 = -0.0415753$, $f_1 = 9.27705E-006$ 相关系数: $r^2 = 0.99965$



组分[吡哆胺]: 曲线方程: $C_i = -0.0285768 + 6.72942E-006 * A_i$

校正因子: $f_0 = -0.0285768$, $f_1 = 6.72942E-006$ 相关系数: $r^2 = 0.99924$

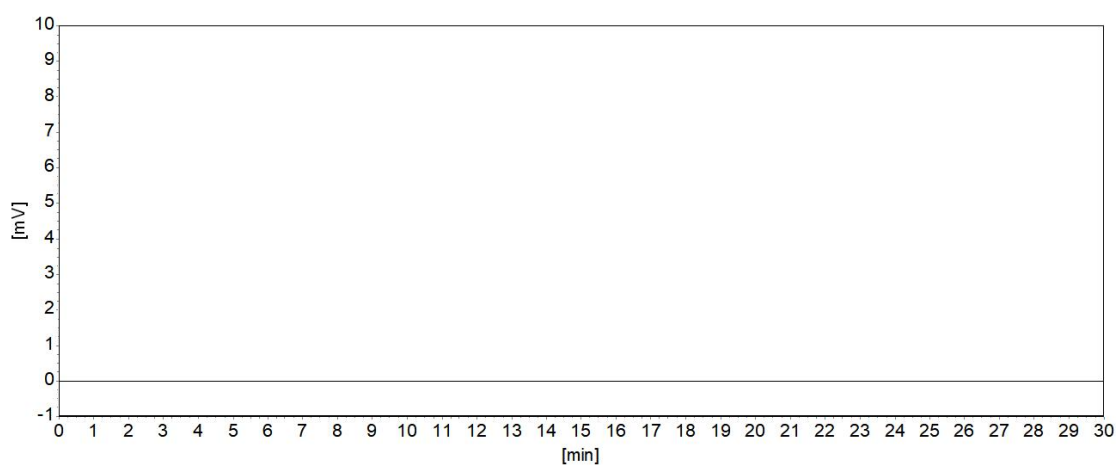


5.5.4. 检出限

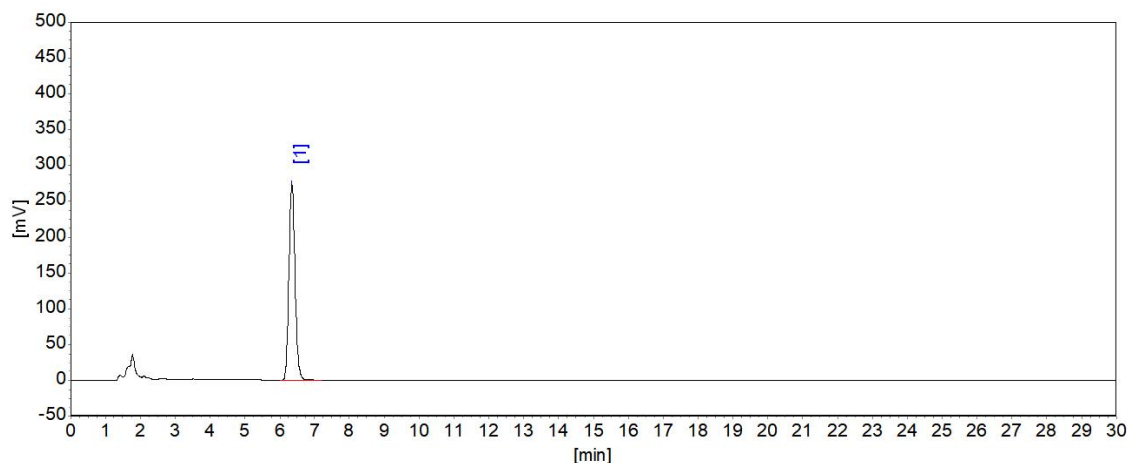
峰序	平行测定	1/ μg/mL	2/ μg/mL	3/ μg/mL	4/ μg/mL	5/ μg/mL	6/ μg/mL	7/ μg/mL	检出限 /mg/kg	定量限 /mg/kg
1	吡哆醇	0.0669	0.0660	0.0664	0.0666	0.0674	0.0676	0.0676	0.0020	0.0063
2	吡哆醛	0.0060	0.0054	0.0059	0.0061	0.0064	0.0064	0.0064	0.0012	0.0037
3	吡哆胺	0.0884	0.0869	0.0866	0.0884	0.0882	0.0876	0.0876	0.0023	0.0072

5.5.5. 样品典型谱图及结果

5.5.5.1. 空白谱图

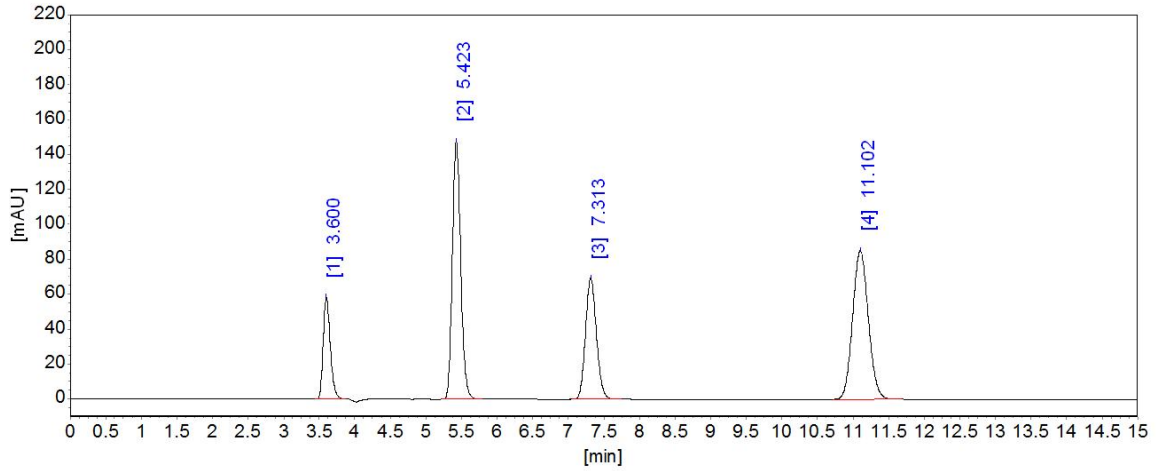


5.5.5.2. 样品典型谱图及 3 次测定结果



组分名	保留时间/min	峰面积/uAU*S	含量/(mg/kg)	平均含量/(mg/kg)
吡哆醇	6.351	55644	1.1858	1.1835
	6.350	55581	1.1843	
	6.353	55416	1.1805	

5.5.6. 样品 1 加标典型谱图及回收率



组分名称	样品中酰胺类物质含量 (mg/kg)	加标浓度 (mg/kg)	测量值 (mg/kg)	加标回收率 (%)	平均加标回收率范围 (%)
吡哆醛	未检出	1.5000	1.4581	97.21	95.20-97.21
			1.4321	95.47	
			1.428	95.20	
吡哆醇	1.1835	1.500	2.7915	107.00	102.44-107.00
			2.7323	103.05	
			2.7231	102.44	
吡哆胺	未检出	1.500	1.5026	100.17	97.41-100.17
			1.4705	98.03	
			1.4612	97.41	

6. 实验结果

方法验证结论: 维生素 B₆ 的精密度、线性相关系数、检出限、回收率结果汇总如下:

方法验证汇总表

化合物	保留时间 (min)	峰面积 RSD (%)	标准曲线线性相关系数	检出限 (mg/m ³)	加标回收率范围 (%)
吡哆醛	4.976	1.368	0.999	0.0020	95.20-97.21
吡哆醇	6.265	1.299	0.999	0.0012	102.44-107.00
吡哆胺	11.410	1.152	0.999	0.0023	97.41-100.17

由以上实验结果可知, 采用福立 LC5090 测定食品中的维生素 B₆, 方法稳定可靠, 目标物线性范围良好, 灵敏度较高, 有很好的重现性, 能够对样品进行准确定量。