

# 固相萃取 - 高效液相色谱法测定保健食品中维生素 B<sub>12</sub> 的研究

鲁杰 杨大进 王竹天

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021)

**摘要:**为监管保健食品中维生素的含量,建立了保健食品中维生素 B<sub>12</sub>的化学分析法,采用固相萃取(SPE)进行试样富集、净化,高效液相色谱(HPLC)进行分离检测。方法的最小检出量为 0.3 ng,最低检出浓度 0.2 mg/kg,线性范围在 0.334 ~ 167 μg/mL 之间,平均回收率为 72.1% ~ 131.7%。该方法具有简便、快速、可靠、容易推广等优点。

**关键词:**维生素 B<sub>12</sub>; 色谱法; 高压液相; 营养保健品

## Determination of vitamin B<sub>12</sub> in health foods by SPE - HPLC

Lu Jie Ya Dajin Wang Zhutian

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021)

**Abstract:** Determination of vitamin B<sub>12</sub> in health foods by SPE - HPLC was developed for inspecting the vitamin B<sub>12</sub> content in health foods. The detection limit of the assay is 0.3 ng. The linear range of the method is 0.334 μg/mL ~ 167 μg/mL. The detection concentration limit is 0.2 mg/kg. The average recovery is 72.1% ~ 131.7%. It will provide a reliable analysis method for detecting the concentration of vitamin B<sub>12</sub> in health foods. The method has following advantages: simple, fast, easy to extend and reliable.

**Key Words:** Vitamin B<sub>12</sub>; Chromatography, High Pressure Liquid; Dietary Supplements

人体需要的维生素 B<sub>12</sub> 的量很少,推荐的日补充量为 2.4 μg,怀孕和哺乳的妇女日需要量为 2.6 μg,婴儿为 0.4 μg。使用过量可能引起过敏反应,甚至过敏性休克。摄取不足则可能引起恶性贫血,骨髓变性,舌炎,神经系症状,四肢僵硬,易受刺激,困倦,精神不振等。人类的维生素 B<sub>12</sub> 来源于动物性食物如肝、肾、肉类、鱼、贝类动物、禽蛋和乳类等食物,植物类食物中不含维生素 B<sub>12</sub>。为补充人体所需要的维生素 B<sub>12</sub>,目前许多保健食品添加维生素 B<sub>12</sub>。为了规范保健食品中维生素 B<sub>12</sub> 的使用量,需要建立灵敏度高,特异性强,简便易行的检测维生素 B<sub>12</sub> 的分析方法。

目前维生素 B<sub>12</sub> 的测定方法主要采用微生物分析法和化学分析方法,两者相比,微生物分析法步骤繁琐,培养时间长,重复性差;化学分析法则具有分析时间短、分析步骤少、快速等优点。维生素 B<sub>12</sub> 分析所采用的化学分析方法主要有导数分光光度法<sup>[1,2]</sup>、高效毛细管电泳法(HPCE)<sup>[3,4]</sup>、化学发光分析法<sup>[5]</sup>、间接测定法<sup>[6,7]</sup>、高效液相色谱法<sup>[8,9]</sup>。其中

导数分光光度法和高效毛细管电泳法(HPCE)方法检出限过高;化学发光分析法则由于仪器购置费用昂贵,不适用于普通实验室使用;间接测定法是通过测定钴来折算出维生素 B<sub>12</sub> 的含量,这种方法可能会由于基质中含有钴而使测定结果偏高。文献中虽也见用高效液相色谱法测定维生素 B<sub>12</sub>,但基质多为单一成分药品,多成分、基质相对复杂的保健食品中维生素 B<sub>12</sub> 的测定未见报道。本实验主要针对保健食品样品,采用固相萃取作为前处理手段,结合高效液相色谱法达到检测片剂、胶囊、维生素泡腾片等保健食品样品中维生素 B<sub>12</sub> 的目的。本方法具有简便、快速、灵敏、结果可靠等优点。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

高效液相色谱仪 Waters 510,带紫外检测器,美国 Waters 公司生产;超声波清洗仪 美国 Branson 公司生产;离心机 1 000 ~ 4 000 r/min,北京医用离心机厂生产;固相萃取柱 Oasis HLB 3cc,美国 Waters 公司生产。

作者简介:鲁杰 女 硕士

## 1.2 试剂

乙腈 液相色谱专用;甲醇 保证试剂;乙醇 分析纯;四丁基氯化胺 分析纯;三氯甲烷 分析纯;维生素 B<sub>12</sub> 标准品 Sigma 公司产品。

维生素 B<sub>12</sub> 标准储备液 用精密天平准确称取(精确至 0.1 mg)维生素 B<sub>12</sub> 标准品 10 mg,5%乙腈溶解,完全转移至 10 mL 棕色容量瓶中,准确定容至刻度,混匀,得到维生素 B<sub>12</sub> 的标准储备液。贮存至 2 ~ 4 条件下。

维生素 B<sub>12</sub> 标准中间液 吸取 1 mL 储备液至 25 mL 棕色容量瓶中,用 5%乙腈稀释得到维生素 B<sub>12</sub> 的标准中间液。贮存至 2 ~ 4 条件下。

维生素 B<sub>12</sub> 标准使用液 分别吸取一定量的标准中间液于 10 mL 棕色容量瓶中,用 5%乙腈稀释得到标准溶液。

## 1.3 方法

试样处理 将 20 个片剂、胶囊试样粉碎或混匀。称取试样 2 g 于 50 mL 离心管中,加入 10 ~ 15 mL 蒸馏水,混匀后置于超声波清洗仪中(超声波清洗仪中的水面应与离心管的液面平齐),超声提取 10 min 后置于离心机中以 4 000 r/min 离心 5 min。用吸管吸取上清液置于另一个 50 mL 空离心管中。对残渣按上述步骤(每次加入约 10 mL 蒸馏水)重复提取 2 次,合并提取液于 50 mL 离心管中。

向提取液中加入四丁基氯化胺 1 mL,三氯甲烷 20 mL,使用涡旋混匀器充分混匀,于离心机中以 1 000 r/min 离心 3 min。将水层转入蒸发皿中,置水浴锅上加热蒸发至干。残渣用乙醇溶解,转移至离心管中,超声溶解,离心,吸取上清液于蒸发皿中。再重复提取 2 次,合并提取液于蒸发皿中。乙醇蒸干,试样用 1 mL 5%乙腈溶液定量转移到试管中,待上固相萃取柱。用 3 mL 甲醇活化固相萃取柱(Oasis HLB 3cc),3 mL 双蒸水平衡固相萃取柱,速度为每秒 1 滴。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从固相萃取柱上淋洗下来,最后用 25%乙腈溶液将维生素 B<sub>12</sub> 洗脱下来,收集洗脱液 0.5 mL。

### 色谱分析

色谱柱 Shim-Pack C<sub>18</sub> 反相分离柱,预柱 Guard-pak C<sub>18</sub>;流动相 0.05 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 乙腈 = 87 + 13;流速 1 mL/min;检测波长 361 nm;柱温室温。

量取 20 μL 标准溶液和试样溶液注入高效液相色谱仪中,以保留时间定性,以试样峰面积与标准品比较定量。

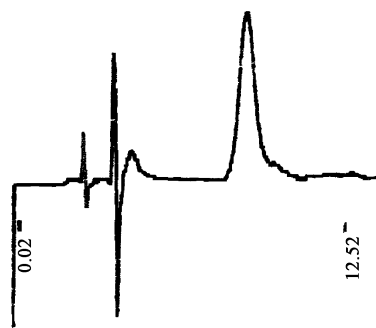


图 1 维生素 B<sub>12</sub> 的标准色谱图

## 2 结果与讨论

### 2.1 前处理条件的选择

2.1.1 提取溶剂的选择 根据维生素 B<sub>12</sub> 可溶于水和乙醇,不溶于丙酮、氯仿和乙醚的物理性质,采用水、乙醇等溶剂对试样进行超声提取。此外根据文献报导,提取时可采用 2% NaHCO<sub>3</sub> 水溶液作为提取溶剂,故本实验也选试了 2% NaHCO<sub>3</sub> 水溶液作为提取溶剂。实验结果显示:对样品成分复杂的保健食品试样进行检测,水和乙醇的提取效果差异不明显。用 2% NaHCO<sub>3</sub> 水溶液提取时提取物呈黑色,而且对维生素 B<sub>12</sub> 的色谱峰有明显干扰。故实验初步确定提取试样的溶剂为水和乙醇。但由于在以后的杂质去除研究过程中选用了二氯甲烷或三氯甲烷作为液-液萃取溶剂,而乙醇与这两者微溶,因此,本实验最终选用水作为维生素 B<sub>12</sub> 的提取溶剂。

### 2.1.2 液-液萃取条件的选择

萃取溶剂的选择 液-液萃取的目的主要是去除脂溶性干扰物质,诸如脂溶性维生素、油脂等,这些干扰物质在富集过程中会占据固相萃取柱的穴点,降低固相萃取柱的柱效,不利于维生素 B<sub>12</sub> 的有效富集。维生素 B<sub>12</sub> 属于水溶性维生素,去除脂溶性物质可选用非极性的溶剂或中等极性的溶剂如:石油醚、乙醚、二氯甲烷、三氯甲烷等溶剂。本实验最终选用比重较水大的二氯甲烷、三氯甲烷作为萃取溶剂,目的是使得在分离去除脂溶性物质的同时,还可以将水提取物中某些不溶性的物质进一步去除,使之沉降于二氯甲烷层或三氯甲烷层,实验中肉眼即可观察到三氯甲烷层或二氯甲烷层由无色变为有色。试样最终确定用水提取试样中的维生素 B<sub>12</sub>,二氯甲烷或三氯甲烷作为萃取溶剂。

表面活性剂的使用 加入表面活性剂的目的是为了进一步去除或部分去除杂质,如色素等,减少杂质对固相萃取柱的萃取效率的影响和在高效液相色谱分离过程中对维生素 B<sub>12</sub> 的色谱干扰。实验现象表明,加入表面活性剂四丁基氯化胺可以明显起到

净化试样的效果。为了解这一步实验对维生素 B<sub>12</sub> 的分析可能造成的影响,进行了如下实验。在浓度为 3.42 μg/mL 的维生素 B<sub>12</sub> 标准液 1 mL 中,加入 20 mL 水,1 mL 表面活性剂四丁基氯化铵,20 mL 三氯甲烷进行萃取,经高效液相色谱进行检测,实际测得值为 3.39 μg/mL,标准的回收率为 99.12%。结果表明维生素 B<sub>12</sub> 未被萃取至有机层。理论判断认为维生素 B<sub>12</sub> 虽也在分子结构中含有五个羟基,但由于它的分子结构较大(分子量为 1 355.38),整个分子可能不易被表面活性剂的阳离子部分结合,故仍留于水层。

四丁基氯化铵属于液相色谱分析中常用的阳离子表面活性剂,色谱分析无干扰,同时可以使试样中的色素和一些其它杂质被进一步萃取至氯仿层。故选用四丁基氯化铵作为表面活性剂。

2.1.3 固相萃取法条件的选择 因维生素 B<sub>12</sub> 的含量很低,必须富集到足够的浓度,才能达到仪器检测的灵敏度。为了进一步净化,本实验采用固相萃取作为进一步提纯富集的步骤。

固相萃取柱的选择 根据固相萃取柱的基本特点,分别考察目前应用较广的 Waters 公司生产的 Sep-Pak 3cc C<sub>18</sub>、Oasis HLB 3cc、Oasis HLB 1cc、Oasis HLB Plus、Oasis MCX 3cc 柱,通过比较各个柱子的载样量、溶剂流失对柱效的影响、标准回收率、洗脱溶剂的体积等方面,最终本实验选用萃取性能最佳的 Oasis HLB 3cc 柱作为实验用固相萃取柱。

SPE 洗脱液的选择及其调配比例 根据 Oasis 固相萃取小柱的性质,主要选用极性较强的甲醇和乙腈作为洗脱溶剂,分别使用 0%、5%、10%、25%、40%、60%、80%、100% 甲醇水溶液和 0%、5%、10%、25%、40%、60%、80%、100% 乙腈水溶液进行洗脱。实验结果表明(见表 1 和图 2 洗脱曲线图),试样上固相萃取柱后,用 25% 的乙腈溶液洗脱效果最佳,回收率最高。

表 1 不同溶剂的比较 (n=3, 试样浓度为 3.42 μg/mL, 标准峰面积积分为 39 434) %

甲醇溶剂	峰面积	回收率	乙腈溶剂	峰面积	回收率
0	0	0.0	0	0	0.0
5	0	0.0	5	0	0.0
10	12291	31.1	10	27665	70.2
20	31662	80.3	20	37989	96.3
25	32209	81.7	25	39473	100.1
40	31703	80.4	40	11876	30.1
60	31194	79.1	60	0	0.0
75	13685	34.7	80	0	0.0
100	0	0.0	100	0	0.0

淋洗液的选择及其调配比例 根据 Oasis HLB

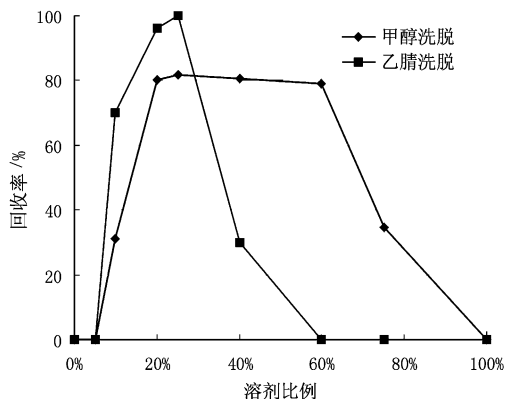


图 2 洗脱曲线图

固相萃取柱的一般使用方法选用水作为淋洗液,但在实验中发现 5% 的乙腈溶液不能洗下维生素 B<sub>12</sub>, 且又由于它本身的极性较水稍弱,可淋洗下吸附能力较维生素 B<sub>12</sub> 弱的干扰物,节省淋洗溶液的体积,节省分析时间。故选用 5% 的乙腈作为固相萃取过程中的淋洗液。

洗脱体积 洗脱体积应以淋洗完全为前提,体积最少为最佳。实验中分别用 25% 乙腈淋洗,依次收集 0.5 mL 洗脱液,共 4 次(试样浓度为 167.2 μg/mL,直接进样标准的峰面积(见图 3)为 1977913。)洗脱效果见表 2。

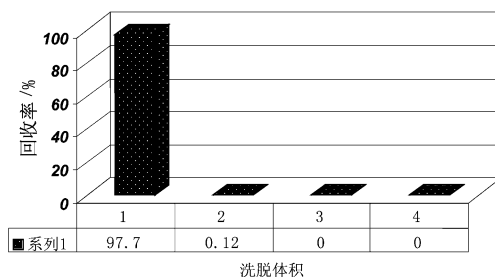


图 3 洗脱体积比较图

表 2 不同洗脱体积的比较

洗脱次数	峰面积积分	回收率 %
1	1933265	97.70
2	2406	0.12
3	0	0.00
4	0	0.00

测定结果见表 2,表明仅 0.5 mL 25% 乙腈的洗脱液即可将维生素 B<sub>12</sub> 基本洗脱完全。

## 2.2 高效液相色谱条件的选择

流动相的选择 根据相关文献资料,流动相主要采用甲醇与水的不同比例混合和乙腈与水的不同比例混合。经过筛选,本实验的流动相主要选择了 0.05 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 乙腈 (83 + 17)、<sup>101</sup> 水 + 甲醇 (70 + 30)、<sup>91</sup> 水 + 乙腈 (87 + 13)。<sup>[11]</sup> 上述流动相对维生素 B<sub>12</sub> 标准溶液的分析效果很好。经过试验调整 0.05 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和乙腈二者之间的比例,本实验

的流动相最终确定为 0.05 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 乙腈 (87 + 13), 使得  $\text{B}_{12}$  的出峰时间变为 8 min 左右, 分离效果也最佳。对于该实验所使用的 Shim - Pak  $\text{C}_{18}$  色谱柱和保健食品特有的复杂基质来说, 使用 0.05 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 乙腈 (83 + 17) 作为流动相, 出峰大约在 3 min 左右, 太快。但采用水 + 乙腈 (87 + 13), 试样分离效果相对差些。(分离色谱图图 4 ~ 图 8)

**波长的选择** 维生素  $\text{B}_{12}$  在 278、361、550 nm 波长处均有吸收, 361 nm 波长处的吸光度与 278 nm 波长处的吸光度的比值为 1.70 ~ 1.88。361 nm 波长处的吸光度与 550 nm 波长处的吸光度的比值为 3.15 ~ 3.45。<sup>[10]</sup> 因 550 nm 处为可见吸收, 很多物质在此都有吸收, 对于分析基质复杂的保健食品中的微量维生素  $\text{B}_{12}$  将会有严重的干扰。278 nm 波长处的吸光度值仅约为 361 nm 波长处的吸光度的 55%, 不如 361 nm 处吸收信号强。故本实验选用有最大吸收的, 干扰较少的, 波长为 361 nm 处的光波作为检测用波长。

**2.3 重复性** 取 2 g 试样, 按实验所描述的试样测定法进行含量测定, 平行 6 份, 结果见表 3。

结果表明该方法对于测定试样中的维生素  $\text{B}_{12}$  重复性良好。

表 5 部分保健食品试样的测定结果

试样名称	试样形态	试样成分	样品本底值 $\mu\text{g/g}$	称样量 g	添加标准量 $\mu\text{g}$	实验测定总量 $\mu\text{g}$	标准回收率
样品 1	片剂	VA, VC, VD, VE, VB <sub>1</sub> , VB <sub>2</sub> , 烟酰胺, VB <sub>6</sub> , VB <sub>12</sub> , 叶酸, 泛酸, 钙, 铁, 钾, 镁, 锌, 硒, 碘, 辅酶 Q <sub>10</sub> , 葡萄糖子提取物, RNA, 等。	1	2.046	0.85	2.658	72.1
			1	2.013	1.71	3.381	80.6
			1	2.342	3.42	4.907	75.2
样品 2	胶囊	VA, VB <sub>1</sub> , VB <sub>2</sub> , VB <sub>6</sub> , VB <sub>12</sub> , VC, VD <sub>2</sub> , VE, 烟酰胺, 生物素, 叶酸, 泛酸, VK <sub>1</sub> , 锌, 铁, 硒, 铜, 镁, 铬, 钼, 锰等。	4.2	0.426	0.85	2.659	102.3
			4.2	0.487	1.71	3.942	110.9
			4.2	0.445	3.42	5.569	108.2
样品 3	胶囊	VB <sub>6</sub> , VB <sub>12</sub> , 叶酸, 铜, 铁, 锌等。	10.4	0.462	0.85	5.488	80.4
			10.4	0.509	1.71	6.598	76.3
			10.4	0.468	3.42	8.034	92.6
样品 4	胶囊	VA, VB <sub>1</sub> , VB <sub>2</sub> , VB <sub>6</sub> , VB <sub>12</sub> , VC, VD <sub>2</sub> , VE, 烟酰胺, 叶酸, 泛酸, 锌, 铁, 硒等。	2.5	0.466	0.85	2.238	131.7
			2.5	0.861	1.71	4.209	125.3
			2.5	0.779	3.42	5.919	118.4
样品 5	片剂	VC, 烟酰胺, VE, VB <sub>6</sub> , VB <sub>12</sub> , VB <sub>2</sub> , VB <sub>1</sub> , 葡聚糖等。	0.2	11.580	0.85	2.999	80.4
			0.2	12.672	1.71	3.856	77.3
			0.2	12.112	3.42	4.957	74.1

部分样品色谱分离图见图 4—图 8。



图 4 样品 1 色谱分离图

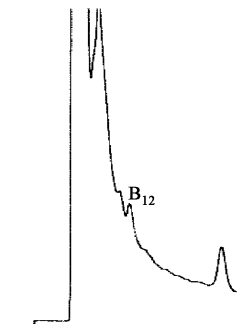


图 5 样品 2 色谱分离图

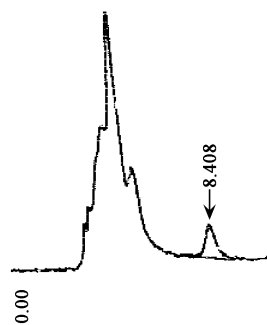


图 6 样品 3 色谱分离图

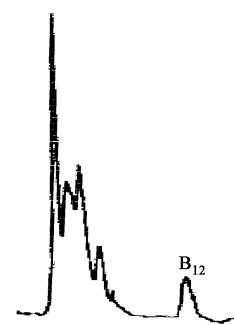


图 7 样品 4 色谱分离图

表 3 重复性考察结果

实验次数	称样量 g	峰面积积分 $\mu\text{v}$	维生素 $\text{B}_{12}$ 的质量 $\mu\text{g}$	维生素 $\text{B}_{12}$ 的含量 $\mu\text{g/g}$	RSD %
1	2.272	19074	1.84	0.81	14.8
2	2.309	25111	2.27	0.98	
3	2.266	26304	2.53	1.12	
4	2.325	21205	2.05	0.88	
5	2.284	23276	2.11	0.92	
6	2.301	29572	2.85	1.24	

**2.4 处理后试样的稳定性** 称取 2.127 g 试样, 照上述测定方法制备供试样溶液, 吸取该溶液 10  $\mu\text{L}$ , 每隔一定时间测定 1 次, (进完样后, 将试样放入冰箱中保存), 结果见表 4。

表 4 稳定性考察结果

测定时间 h	峰面积积分 $\mu\text{v}$	RSD %
1	24662	4.12 %
3	26537	
240	23486	
1 个月	24994	
3 个月	25783	

结果表明, 试样放入冰箱中避光保存, 在 3 个月内测定, 测定结果未见有差异。说明试样在经过本实验处理后可以稳定存在, 不分解。

**2.5 方法的适用性** 本实验分别对 5 种试样进行了维生素  $\text{B}_{12}$  的测定。测定结果见表 5。

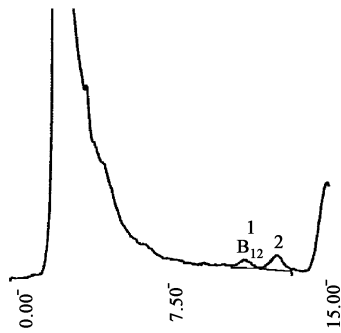


图 8 样品 5 色谱分离图

### 参考文献:

- [ 1 ] Morelli B. Determination of a quaternary mixture of vitamins B<sub>6</sub>, B<sub>1</sub>, and B<sub>12</sub> and Uridine 5'-triphosphate, by derivative spectrophotometry[J]. J pharm Sci, 1995, 81(1): 34—37.
- [ 2 ] Morelli B. Determination synthetic mixtures and commercial injections for drugs[J]. Fresenius 'F Anal chem, 1996, 354(1), :97—102.
- [ 3 ] Herbeth V, Drivas G, Foscaldi R. Forms of vitamin B<sub>12</sub> compounds in fertilized and unfertilized eggs[J]. N Engl J Med, 1982(307): 255.
- [ 4 ] Kondo H, Binter M J. The assay of cyanocobalamin in pharmaceutical preparations by spectrophotometry[J]. J Acclin Invest, 1982, (70): 889.
- [ 5 ] Watanabe F, Takenaka S, Abe K, et al. Comparison of a

microbiological assay and a fully automated chemiluminescent system for the determination of vitamin B<sub>12</sub> in food[J]. J Agric Food chem, 1998, 46: 1433—1436.

- [ 6 ] Qiu Ecao, Yunkun Zhao, Shu Qing Wu, et al. Study on the mechanism and applications of the fluorescence reactions among cobalt ( ), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and two new derivatives of 8-sulfonamidoquinoline[J]. Talanta, 2000(51): 615—623.
- [ 7 ] L Ballesteros. Analytical use of the kinetics of complex formation: Simultaneous determination of iron and cobalt by differential kinetic methods[J]. Analyst, 2001, 108(1285): 443.
- [ 8 ] Surapote wongyain. Determination of vitamin B<sub>12</sub> in multivitamin tablets by multimode high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2000, (870): 217—220.
- [ 9 ] Hua-Bin Li, Feng Chen, Yue Jiang. Determination of vitamin B<sub>12</sub> in multivitamin tablets and fermentation medium by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography A, 2000, (891): 243—247.
- [10] 中国药典(二部) [M]. 北京: 化学工业出版社. 2000, 760.
- [11] Hiroshi Iwase. Ultramicrodetermination of cyanocobalamin in elemental diet by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with visible detection [J]. Journal of Chromatography, 1992, (590): 359—363.

[收稿日期: 2004 - 01 - 22]

中图分类号: R15; O657.72 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 8456(2004)04 - 0324 - 05

[上接第 323 页]

程中应该有目的地选择对霉菌孢子活性有灭活作用的乳酸菌, 减少发酵食品对消费者的潜在危害。

### 参考文献:

- [1] Hassan G, Bulleman L B. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* spp [J]. J Food Prot, 1995, 57: 1249—1256.
- [2] Cotty P J, Bhatnagar D. Variability among toxigenic *Aspergillus flavus* strains in ability to prevent aflatoxin contamination and production of aflatoxin biosynthetic pathway enz-

ymes[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 2248—2251.

- [3] Woloshuk C P, Foutz K R, Brewer J F, et al. Molecular characterization of *afIR*, regulatory locus, for aflatoxin biosynthesis[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 2408—2414.
- [4] 徐进, 冉陆, 杨宝兰, 等. 乳杆菌抑制黄曲霉孢子萌发的研究[J]. 卫生研究, 2002, 31(1): 47—48.
- [5] Dave R I, Shah N P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures[J]. International dairy Journal, 1997a, 7: 31—41.

[收稿日期: 2004 - 03 - 08]

中图分类号: R15; TS201.3 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 8456(2004)04 - 0321 - 04