

# 高效液相色谱法测定乳粉中维生素 B<sub>6</sub> 的含量

王惠玉, 张佳佳

(海能未来技术集团股份有限公司, 山东 济南 250104)

**摘要:** 本文使用悟空 K2025 高效液相色谱仪测定乳粉中维生素 B<sub>6</sub> 的含量。色谱条件: C<sub>18</sub> 4.6×250mm, 5μm, 流速为 1.0mL/min, 柱温为 35°C, 进样量为 10μL, 检测器为荧光检测器, 激发波长为 293nm, 发射波长为 395nm。实验结果: 重复性测试中, 将维生素 B<sub>6</sub> 标准溶液连续进样 7 针, 维生素 B<sub>6</sub> 各组分的保留时间的 RSD 范围为 0.026%~0.081%, 峰面积的 RSD 范围为 0.136%~0.328%; 维生素 B<sub>6</sub> 各组分的仪器检出限均小于 4.819ng/mL, 仪器定量限均小于 16.064ng/mL; 维生素 B<sub>6</sub> 各组分在测定浓度范围内均具有良好的线性关系 ( $R^2 \geq 0.9995$ )。因此, Wooking K2025 高效液相色谱仪满足《GB 5009.154-2016 食品安全国家标准 食品中维生素 B<sub>6</sub> 的测定 (第一法)》中乳粉中维生素 B<sub>6</sub> 含量测定的需求。

**关键词:** 乳粉; 维生素 B<sub>6</sub>

维生素 B<sub>6</sub> (Vitamin B<sub>6</sub>) 又称吡哆素, 其包括吡哆醇、吡哆醛及吡哆胺, 在体内以磷酸酯的形式存在, 是一种水溶性维生素, 遇光或碱易破坏, 不耐高温。维生素 B<sub>6</sub> 为人体内某些辅酶的组成成分, 参与多种代谢反应, 尤其是和氨基酸代谢有密切关系。

乳粉中维生素 B<sub>6</sub> 作为营养强化剂, 其添加量应遵循《GB 14880-2012 食品安全国家标准 食品营养强化剂使用标准》中的要求。对于婴幼儿配方乳粉中维生素 B<sub>6</sub> 的添加还应遵守其对应的产品标准《GB 10765-2010 食品安全国家标准 婴儿配方食品》及《GB 10767-2010 食品安全国家标准 较大婴儿和幼儿配方食品》。

## 1 试剂与材料

水: 符合 GB/T6682 的一级水;

甲醇: 色谱纯;

辛烷磺酸钠: 优级纯;

盐酸: 分析纯;

氢氧化钠: 分析纯;

冰乙酸: 色谱纯;

三乙胺: 色谱纯;

盐酸溶液（1mol/L）：准确量取 41.67mL 盐酸（3.4）于 500mL 容量瓶中，用水稀释并定容至刻度，混匀备用；

盐酸溶液（0.1mol/L）：吸取 8.3mL 盐酸（3.4），用水稀释并定容至 1000mL；

氢氧化钠溶液（1mol/L）：准确称取 20g 氢氧化钠（3.5）于 500mL 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀备用；

辛烷磺酸钠溶液：称取辛烷磺酸钠 2g，量取三乙胺 2.7mL 于 1000mL 容量瓶中，加水溶解并定容至刻度，用冰乙酸（3.6）调 pH=3.0，混匀备用；

盐酸吡哆醇：CAS 号：58-56-0，纯度为 99.0%；

盐酸吡哆醛：CAS 号：65-22-5，纯度为 99.5%；

双盐酸吡哆胺：CAS 号：524-36-7，纯度为 99.3%；

维生素 B<sub>6</sub> 混合标准储备液：准确称取一定量的盐酸吡哆醇标准品（3.12）、盐酸吡哆醛标准品（3.13）及双盐酸吡哆胺标准品（3.14）于 10mL 容量瓶中，用盐酸溶液（3.9）超声溶解并定容至刻度，配制成吡哆醇的浓度为 1172.66 $\mu$ g/mL、吡哆醛的浓度为 851.38 $\mu$ g/mL 以及吡哆胺的浓度为 794.44 $\mu$ g/mL 的混合标准储备液，于 4 $^{\circ}$ C 避光保存；

维生素 B<sub>6</sub> 混合标准工作液：将维生素 B<sub>6</sub> 混合标准储备液（3.15）用水稀释并定容配制成为混合标准工作液，其中吡哆醛系列浓度依次为 0.043 $\mu$ g/mL、0.213 $\mu$ g/mL、0.426 $\mu$ g/mL、0.851 $\mu$ g/mL 和 2.128 $\mu$ g/mL；吡哆醇系列浓度依次为 0.235 $\mu$ g/mL、1.173 $\mu$ g/mL、2.345 $\mu$ g/mL、4.691 $\mu$ g/mL 和 11.727 $\mu$ g/mL；吡哆胺系列浓度依次为 0.040 $\mu$ g/mL、0.199 $\mu$ g/mL、0.397 $\mu$ g/mL、0.794 $\mu$ g/mL 和 1.986 $\mu$ g/mL；

微孔滤膜：0.22 $\mu$ m，水相。

## 2 仪器与设备

高效液相色谱仪：K2025 P2 二元高压输液泵、K2025 AS 自动进样器、K2025 CO 柱温箱、RF-20A 荧光检测器、K2025ATD 模数转换器、Wookinglab 色谱工作站；

分析天平：精确到 0.0001g；

涡旋振荡器；

pH 计；

超声波清洗机；

烧杯：250mL；

塑料离心管：10mL、50mL，带盖；

容量瓶：10mL、50mL、500mL、1000mL 等，棕色带刻度。

### 3 测定步骤

#### 3.1 样品前处理

称取5g（精确至0.0001g）乳粉样品于50mL容量瓶中，加水25mL，涡旋混匀，先用盐酸溶液（3.8）调节pH至1.7，静置，再用氢氧化钠溶液（3.10）调节pH至4.6，最后用水定容至50mL，混匀后过滤，取续滤液待液相色谱测定。

#### 3.2 色谱条件

a) 色谱柱：C<sub>18</sub>，4.6×250mm，5μm 或者相当的色谱柱；

b) 流动相：流动相 A 为甲醇，流动相 B 为辛烷磺酸钠溶液（3.11），按下表进行梯度洗脱：

时间 /(min)	流速/(mL/min)	A/(%)	B/(%)
0.0	1.000	10.0	90.0
3.0	1.000	10.0	90.0
10.0	1.000	35.0	65.0
22.0	1.000	35.0	65.0
23.0	1.000	10.0	90.0
30.0	1.000	10.0	90.0

c) 柱温：35℃；

d) 进样量：10μL；

e) 检测器及波长：荧光检测器，激发波长为 293nm，发射波长为 395nm。

### 4 结果

#### 4.1 重复性测试

按照上述色谱条件(5.2)进行采集，维生素 B<sub>6</sub> 混合标准溶液(吡哆醛浓度为 0.426μg/mL，吡哆醇浓度为 2.345μg/mL，吡哆胺浓度为 0.397μg/mL) 的色谱图如图 1 所示，积分结果如表 1 所示。

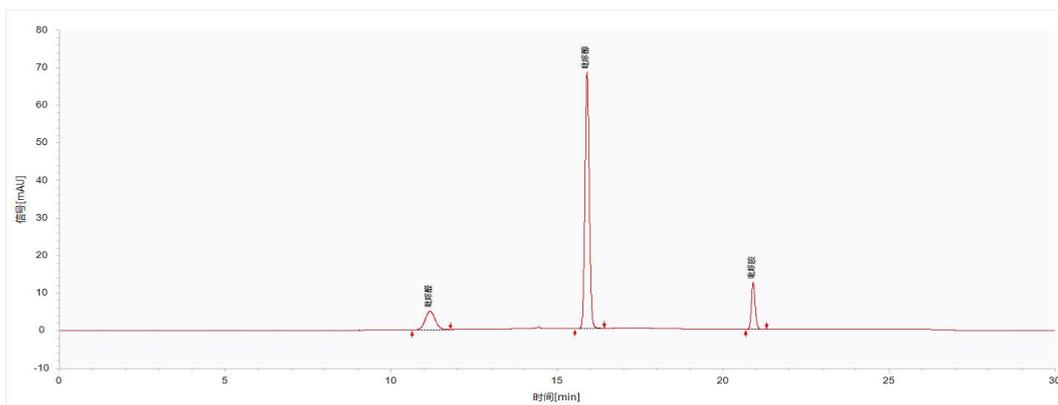


图1 维生素 B<sub>6</sub> 标准溶液的色谱图

表1 维生素 B<sub>6</sub> 标准溶液色谱图积分结果

目标物	保留时间 (min)	峰面积 (mAU.s)	峰高 (mAU)	理论塔板 数	分离度	对称/拖尾因子
吡哆醛	11.187	102.393	4.959	6758	-	1.06
吡哆醇	15.915	617.887	68.193	71697	12.09	1.07
吡哆胺	20.920	97.286	12.448	168237	22.67	1.12

由表1中数据可知,吡哆醛与吡哆醇的分离度为12.09,吡哆醇与吡哆胺的分离度为22.67,具有较好的分离度。三种物质的拖尾因子范围为1.06~1.12,均有良好的峰型。

将维生素 B<sub>6</sub> 标准溶液连续进样 7 针, 叠加的色谱图如图 2 所示, 结果见表 2。

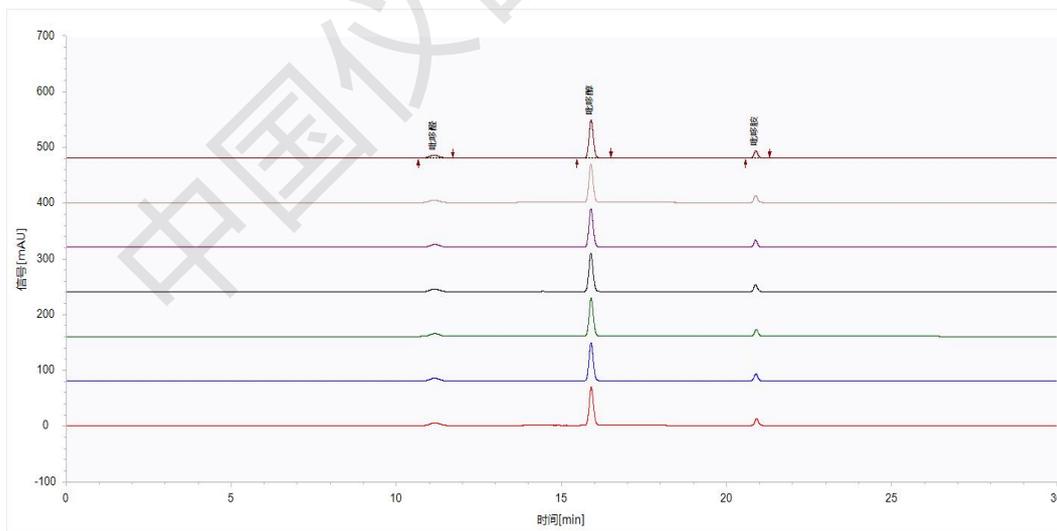


图2 维生素 B<sub>6</sub> 溶液连续进样 7 针叠加的色谱图

表 2 维生素 B6 溶液连续进样 7 针重复性数据统计

目标物		1	2	3	4	5	6	7	平均值	RSD%
吡哆醛	保留时间	11.187	11.173	11.173	11.168	11.180	11.162	11.163	11.172	0.081
	峰面积	102.393	102.624	102.272	102.193	102.411	102.390	102.484	102.395	0.136
吡哆醇	保留时间	15.915	15.908	15.912	15.903	15.907	15.905	15.910	15.909	0.026
	峰面积	617.887	620.260	618.631	618.940	619.105	620.355	619.127	619.186	0.141
吡哆胺	保留时间	20.920	20.900	20.908	20.888	20.888	20.893	20.895	20.899	0.056
	峰面积	97.286	97.216	97.314	98.037	97.824	97.816	97.624	97.588	0.328

由表 2 中数据可知，维生素 B<sub>6</sub> 各组分保留时间的 RSD 范围为 0.026%~0.081%，峰面积的 RSD 范围为 0.136%~0.328%，均具有良好的定性定量重复性。

#### 4.2 仪器灵敏度测试

灵敏度测试的谱图如图 3 所示，计算结果见表 3。

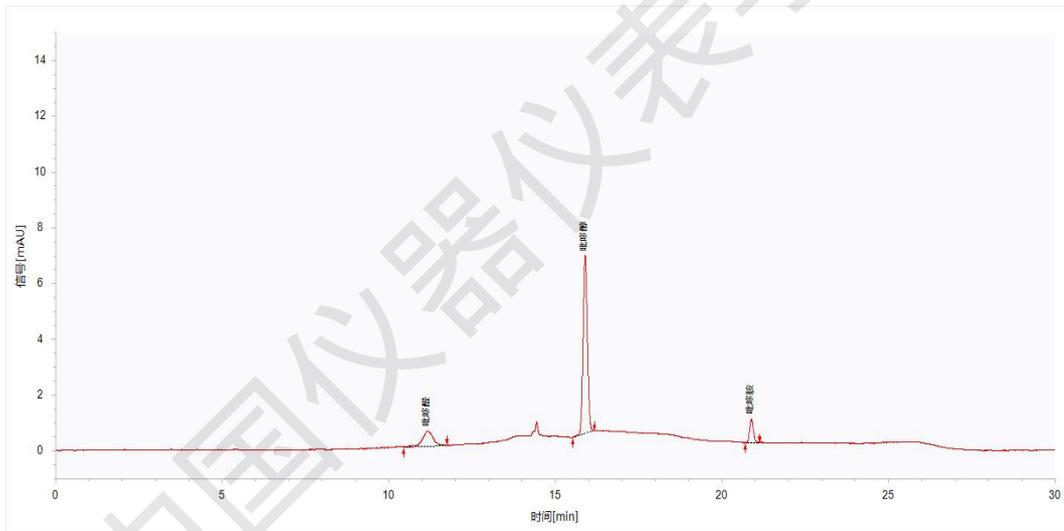


图 3 仪器灵敏度的色谱图

表 3 仪器灵敏度测试数据

目标物	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	峰高 (mAU)	噪声 (mAU)	S/N	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
吡哆醛	0.043	0.530	0.020	26.5	4.819	16.064
吡哆醇	0.235	6.380	0.020	319.0	2.206	7.352
吡哆胺	0.040	0.834	0.020	41.7	2.858	9.526

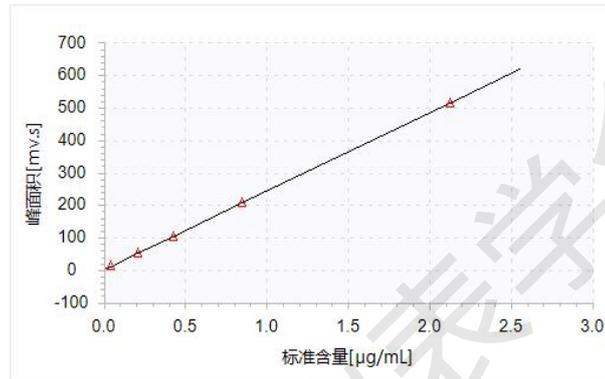
由表 3 中数据可知，吡哆醛的仪器检出限为 4.819ng/mL，仪器定量限为 16.064ng/mL；吡哆醇的仪器检出限为 2.206ng/mL，仪器定量限为 7.352 ng/mL；吡哆胺的仪器检出限为

2.858ng/mL，仪器定量限为 9.526 ng/mL。。

### 4.3 含量测定

#### 4.3.1 校准曲线

将配制好的维生素 B<sub>6</sub> 混合标准工作液（3.16）在 HPLC 上进行测定，以浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制校准曲线，线性方程及确定系数见图 4~图 6，叠加色谱图见图 7。维生素 B<sub>6</sub> 各组分混合标准工作液在测定浓度范围内，曲线的确定系数  $R^2 \geq 0.9995$ ，线性关系均良好。



---

方程式  $y=242.00496*x-0.04038$

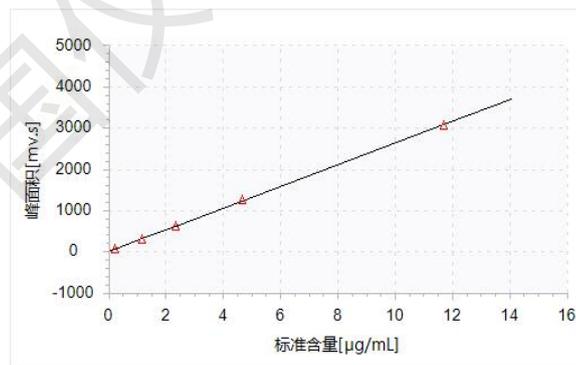
---

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R<sup>2</sup>) 0.9999

---

图 4 吡哆醛混合标准溶液的校准曲线



---

方程式  $y=261.77118*x-2.93454$

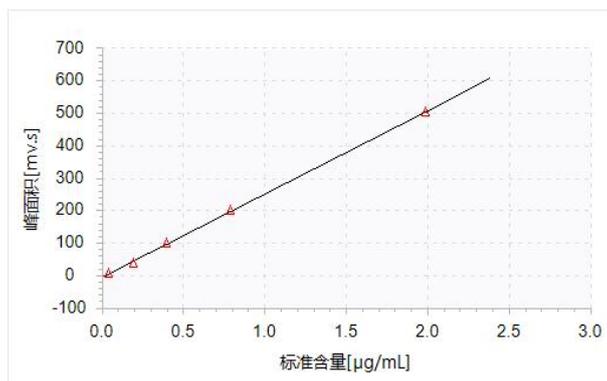
---

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R<sup>2</sup>) 0.9999

---

图 5 吡哆醇混合标准溶液的校准曲线



方程式	$y=261.77118*x-2.93454$
相关系数(R)	0.9999
确定系数(R <sup>2</sup> )	0.9999

图 6 吡哆胺混合标准溶液的校准曲线

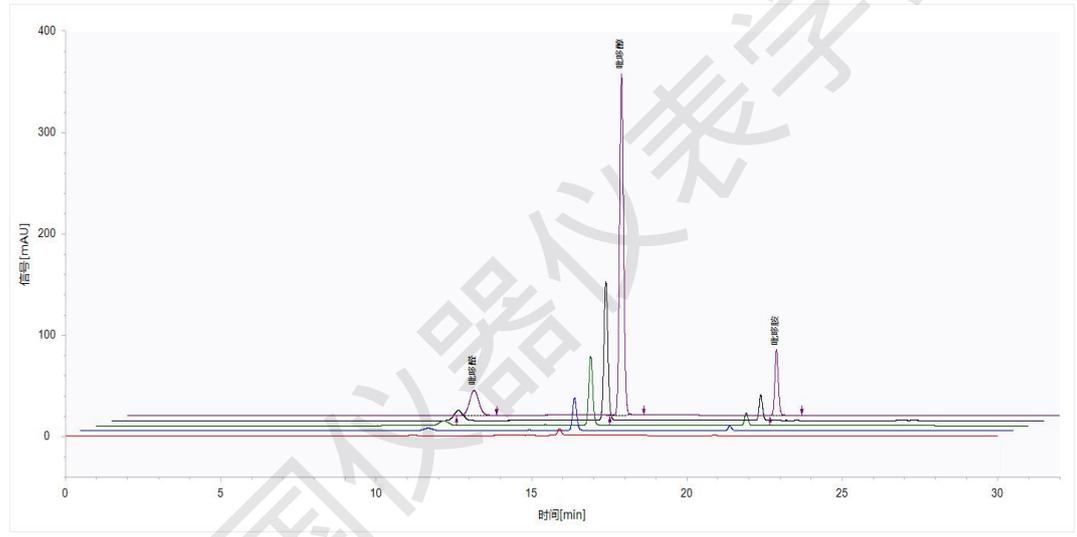


图 7 维生素 B6 混合标准工作液浓度系列曲线叠加色谱图

### 4.3.2 样品含量测定

以市售乳粉为样品，按照 5.1 的流程对样品进行处理，并计算样品中维生素 B<sub>6</sub> 各组分的含量。按照公式（1）、公式（2）进行计算，样品的色谱图如图 8 所示。

$$\omega = \frac{C \times V \times f \times 100}{m \times 1000} \quad \text{----公式（1）}$$

式中：

- ω----为样品中维生素 B<sub>6</sub> 各组分的含量，单位为毫克每百克（mg/100g）；
- C----为通过校准曲线计算的样品中维生素 B<sub>6</sub> 各组分的浓度，单位为微克每毫升（µg/mL）；
- V----为样品的定容体积，单位为毫升（mL）；

$m$ ---为样品质量，单位为克（g）；

$f$ ---为稀释倍数；

1000、100---为单位换算系数。

试样中维生素 B<sub>6</sub>的含量按式（2）计算：

$$X=X_{\text{醇}}+X_{\text{醛}}\times 1.012+X_{\text{胺}}\times 1.006 \quad \text{---公式（2）}$$

式中：

$X$ ---试样中维生素 B<sub>6</sub>(以吡哆醇计)的含量,单位为毫克每百克(mg/100g)；

$X_{\text{醇}}$ ---试样中吡哆醇的含量,单位为毫克每百克(mg/100g)；

1.012---吡哆醛的含量换算成吡哆醇的系数；

$X_{\text{醛}}$ ---试样中吡哆醛的含量,单位为毫克每百克(mg/100g)；

1.006---吡哆胺的含量换算成吡哆醇的系数；

$X_{\text{胺}}$ ---试样中吡哆胺的含量,单位为毫克每百克(mg/100g)。

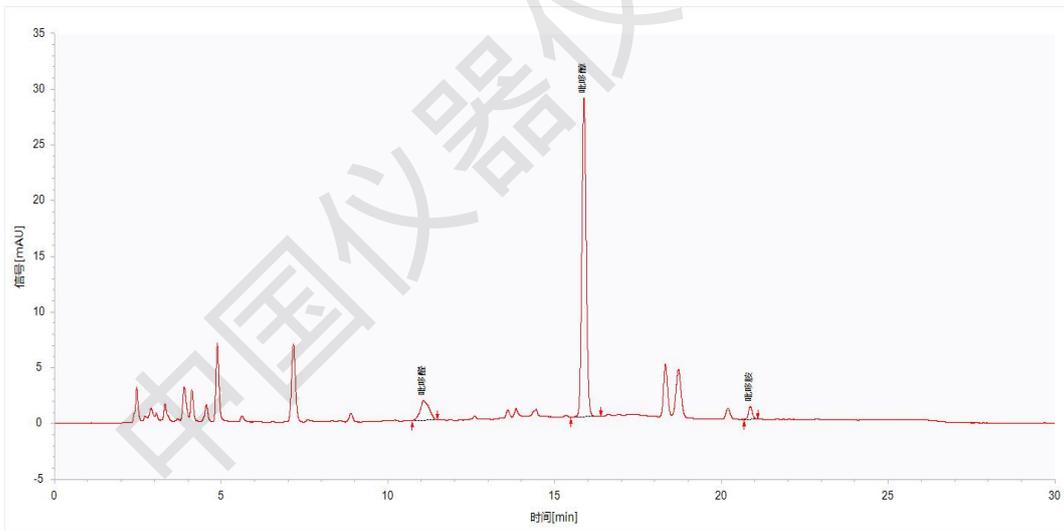


图8 乳粉样品的色谱图

依据公式（1）、公式（2）进行计算，此乳粉样品中维生素 B<sub>6</sub>的含量为 10.9mg/100g。

## 5 结论

通过对维生素 B<sub>6</sub>各组分的峰型、重复性、灵敏度、线性的测试以及对乳粉样品中维生素 B<sub>6</sub>的含量进行测定，实验结果表明：用 Wooking K2025 高效液相色谱仪测定维生素 B<sub>6</sub>，维生素 B<sub>6</sub>各组分峰分离度均大于 1.5，三种物质的拖尾因子范围为 1.06~1.12，具有良好的分离度及峰型；重复性测试中，将维生素 B<sub>6</sub>混合标准溶液连续进样 7 针，维生素 B<sub>6</sub>各组分

的保留时间的 RSD 范围为 0.026%~0.081%，峰面积的 RSD 范围为 0.136%~0.328%，均有良好的定性定量重复性；维生素 B<sub>6</sub> 各组分的仪器检出限均小于 4.819ng/mL，仪器定量限均小于 16.064ng/mL；在测定浓度范围内，维生素 B<sub>6</sub> 各组分均具有良好的线性关系，确定系数 R<sup>2</sup> 均≥0.9995；乳粉样品中维生素 B<sub>6</sub> 的含量为 10.9mg/100g。因此，Wooking K2025 高效液相色谱仪可以满足《GB 5009.154-2016 食品安全国家标准 食品中维生素 B<sub>6</sub> 的测定（第一法）》中维生素 B<sub>6</sub> 含量测定的需求。

附 1:

仪器配置清单

序号	单元
K2025 二元高压梯度系统	
A)	<u>Pump Unit 泵单元</u>
1	62Mpa 二元高压输液泵（内置溶剂托盘）
2	流动相瓶（肖特瓶，1L）
3	脱气机
4	四通道溶剂切换阀
5	自动在线清洗系统
B)	<u>Sample Injector 进样器</u>
1	自动进样器
2	样品瓶（2mL，含瓶盖）
3	脱气组件
4	100μL 定量环
C)	<u>Column Oven 柱温箱</u>
1	色谱柱恒温箱（室温以下 10°C 至 85°C）
2	色谱柱：ChromCore 120 C <sub>18</sub> 4.6×250mm，5μm
D)	<u>Detector 检测器</u>
1	荧光检测器
2	ATD 模数转换器
E)	<u>Workstation 工作站</u>
1	Wookinglab（中文版）

附 2:

悟空 Wooking K2025 高效液相色谱仪 (可靠、精准、友好、合规)

