

Assay of vitamins by HPLC-UVD

多种水溶性维生素HPLC测定方法

背景介绍：因成品食品国标方法都是单个检测，前处理繁琐，有些需要衍生，结果不太稳定，多种维生素同时检测没有专用国标检测方法，为此创建新方法

A.1 一般规定

本标准所用试剂和水在未注明其他要求时，均指分析纯试剂和GB/T6682规定的三级水。试验中所用标准溶液、杂质测定用标准溶液、制剂和制品在未注明其他要求时，均按GB/T 601、GB/T 602和GB/T 603的规定制备。试验中所用溶液在未注明用何种溶剂配制时，均指水溶液。

A.2 鉴别试验

在多种维生素含量测定试验中，试样溶液色谱图的主峰保留时间应和标准溶液色谱图(见图B.1)的主峰保留时间相一致。

A.3 多种维生素含量的测定

A.3.1 试剂和材料

A.3.1.1 水：符合GB/T6682规定的一级水。

A.3.1.2 乙腈：色谱纯。

A.3.1.3 多种维生素标准品，纯度 $\geq 99.0\%$ 。

A.3.1.4 峰辉专用离子对试液

A.3.1.5 磷酸色谱纯，纯度85-90%。

A.3.1.6 乙醇，分析纯

A.3.1.7 草酸，分析纯

A.3.1.8 氨水，分析纯

A.3.2 仪器和设备

A.3.2.1 旋转震摇器

A.3.2.2 水浴震荡器

A.3.2.3 超声清洗机

A.3.2.4 高速离心机

A.3.2.5 高效液相色谱仪，配备可变波长紫外检测器UVD、恒柱温及真空脱气系统。

A.3.2.6 色谱柱：以峰辉 AQ 系列色谱柱。

A.3.3 水溶性维生素参考色谱条件

A.3.3.1 流动相：乙腈离子对溶液梯度洗脱(B：峰辉专用离子对试液；C：乙腈)

Assay of vitamins by HPLC-UVD

通用 | 脱气 | 事件 | 流量 | 温度 | 溶剂 | 通道

压力限制

上限 (psi) (L) 下限 (psi) (L)

设定的流量

加速到 10.0 毫升/分的时间 (A): 分 (5.00 毫升/分/分)

泵模式 (E)

| 时间 | 流量 | %A | %B | %C | %D | 曲线 |
|----|-------|-----|------|------|-----|----|
| 1 | 1.00 | 0.0 | 90.0 | 10.0 | 0.0 | |
| 2 | 20.00 | 0.0 | 80.0 | 20.0 | 0.0 | 6 |
| 3 | 21.00 | 0.0 | 10.0 | 90.0 | 0.0 | 6 |
| 4 | 25.00 | 0.0 | 10.0 | 90.0 | 0.0 | 6 |
| 5 | 26.00 | 0.0 | 90.0 | 10.0 | 0.0 | 1 |
| 6 | 35.00 | 0.0 | 90.0 | 10.0 | 0.0 | 6 |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

A. 3. 3. 2 流速:1.0mL/min。

A. 3. 3. 3 柱温:35℃。

A. 3. 3. 4 进样量:10 μL。

A. 3. 3. 5 紫外检测器2489 (Waters) : 初始波长261nm, 转换波长见前处理

A. 3. 4 分析步骤

A. 3. 4. 1标准溶液的制备

称取多种水溶性维生素标准品25mg (精确至0.0001g)溶于50mL容量瓶中,加75%乙醇水溶解并定容作为储备液。再依次用水稀释成0.5, 1, 5, 20, 50ug/ml的标准应用液,根据样品浓度可适当调整最低和最高浓度。

A. 3. 4. 2 试样溶液的制备

取片剂10片,碾碎成细粉,准确称量细粉若干 (精确至0.0001g),检测项目与取样量按下列方式进行前处理:

VB₁/B₂/B₆/烟酸/烟酰胺/维生素C 检测

准确称取0.2500-0.5000g样品置于50mL容量瓶中,加20%乙醇水25mL和1%草酸溶液5ml,旋涡震摇25秒,50℃超声10min,静置放冷0.5h,用水定容,摇匀,6000转离心5min,过滤,上机,进样不超过3ul,否则吡哆醇峰型不好。波长转换如下

Assay of vitamins by HPLC-UV

2489 UV/Vis 检测器

波长模式 单 双

通道 A | 模拟输出 1 | 事件

切换事件: 开关 1 (通道 A) 初始开关状态: 开 阈值: 1.0000 AU
 开关 2 (通道 B) 初始开关状态: 开 阈值: 1.0000 AU

脉冲宽度: 1.0 秒
 方波区间: 0.2 秒 (50% 占空比)

运行事件: 启用

| | 时间 (分) | 事件 | 参数 | 通道 |
|---|--------|----|-----|------|
| 1 | 8.00 | 波长 | 288 | 通道 A |
| 2 | 11.50 | 波长 | 444 | 通道 A |
| 3 | 14.80 | 波长 | 293 | 通道 A |
| 4 | 17.80 | 波长 | 246 | 通道 A |
| 5 | | | | |

叶酸/泛酸 检测

准确称取1.0000g样品，精密加1%氨水10.00ml，旋转混匀，50摄氏度超声10min，6000转离心5min，放冷，过滤，上机，进样25ul。流动相B改为:0.1%磷酸水溶液，其它不变；波长转换如下

2489 UV/Vis 检测器

波长模式 单 双

通道 A | 模拟输出 1 | 事件

切换事件: 开关 1 (通道 A) 初始开关状态: 开 阈值: 1.0000 AU
 开关 2 (通道 B) 初始开关状态: 开 阈值: 1.0000 AU

脉冲宽度: 1.0 秒
 方波区间: 0.2 秒 (50% 占空比)

运行事件: 启用

| | 时间 (分) | 事件 | 参数 | 通道 |
|---|--------|----|-----|------|
| 1 | 4.00 | 波长 | 210 | 通道 A |
| 2 | 8.00 | 波长 | 280 | 通道 A |
| 3 | | | | |
| 4 | | | | |
| 5 | | | | |

VB₁₂ 检测

准确称取1.0000g样品，精密加超纯水10.00ml，旋转混匀，50摄氏度超声10min，6000转离心5min，放冷，过滤，上机，进样25ul。流动相B改为:超纯水，其它不变；波长转换如下

Assay of vitamins by HPLC-UV



A. 3. 4. 3 测定

在A. 3. 3参考色谱条件下, 将标准溶液注入色谱仪中进行测定, 得到组分的相对保留时间(参见表A. 1)。将制备好的试样溶液进样, 根据标准品的保留时间定性试样中待测组分的色谱峰, 由标准溶液的峰面积和浓度做标准曲线, 根据样品的峰面积通过标准曲线计算待测组分的含量。系统适用性为重复注入标准溶液5次, 所得响应面积的相对误差应小于2. 0%。

A. 3. 4. 4 结果计算

试样中待测组分(多种维生素)的含量w1 (mg/100g), 按式(A. 1)

计算:

$$w1 = C_{\text{样}} \times V / W \times 100 \dots\dots\dots (A. 1)$$

式中:

C_样——试样溶液中某组分的浓度, 单位为毫克每毫升(mg/mL);

V ——样品稀释倍数(mL);

W ——试样重量, 单位为克(g)。

试验结果以平行测定结果的算术平均值为准。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的相对标准偏差不大于5%。

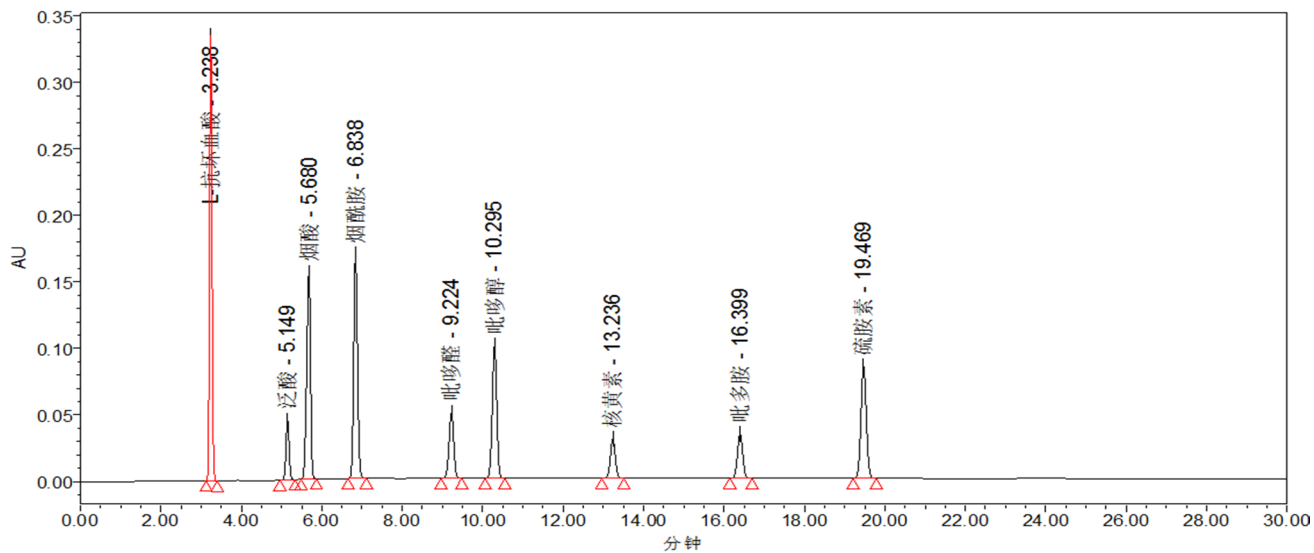
Assay of vitamins by HPLC-UVD

附录

相关液相色谱图:

1. 多种维生素标准品的参考液相色谱图见图B. 1。

图B. 1



2. 添加多种维生素的片剂和预混料参考液相色谱图见图 B. 2。

图 B. 2

