

方法开发报告 2014-APP-RLC-055

在线固相萃取液相色谱法检测奶粉中的 VB12 (LC-UV)

表1 仪器参数设置

检测项目	VB12		
样品基体	奶粉		
仪器型号	Thermo Ultimate 3000: 泵: DGP-3600SD 自动进样器: WPS-3000TSL 柱温箱: TCC-3200SD 检测器: VWD-3100 色谱软件: Chromeleon Chromatography Data System 7.2		
分析柱	SPE 柱: IonPac NG1, 4*35mm (P/N:039567, S/N: 021692) 分析柱: Acclaim PolarAdvantage II, 150*4.6mm, 5μm (P/N:063197, S/N: 001339)		
流动相	流动相 A: CH3CN; 流动相 B: 水(0.025%TFA) SPE 柱流动相梯度条件		
	Time (min)	Flow rate (mL/min)	A (%)
	0	1	5
	10	1	5
	10.5	0.5	30
	19	0.5	30
	22.5	1	30
	23	1	95
	29	1	95
	30	1	5
	39	1	5
	分析柱流动相梯度条件		
	Time (min)	Flow rate (mL/min)	A (%)
	0	1	100
2	1	100	
2.5	1	5	
10	1	5	
30	1	25	
35	1	100	
B (%)			95

	39	1	100	0
柱 温	30 °C			
	Time (min)	Valve		
	0	1-2		
	10	1-10		
	22.5	1-2		
UV 检测波长	361 nm			
进样量	1000 μL			
仪器连接图				

1. 引言

人体需要的VB₁₂量很少，使用过量可能引起过敏反应，甚至过敏性休克，但是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VB₁₂ 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VB₁₂。为补充人体所需要的维生素B12，目前许多保健食品添加VB₁₂。为了规范保健食品中VB₁₂的使用量,需要建立灵敏度高，特异性强，简便易行的检测VB₁₂的分析方法。

目前维生素B12 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，但是又存在检测限过高或者仪器购置过于昂贵等问题。文献中虽也见用高效液相色谱法测定维生素B12，但基质多为单一成分药品，多成分、基质相对复杂的食品中维生素B12 的测定未见报道。

本实验主要针对乳制食品样品，采用固相萃取作为前处理手段，结合阀切换技术运用在线固相萃取高效液相色谱法达到检测固体奶粉中维生素B₁₂的目的。本方法具有简便、快速、灵敏、结果可靠等优点。

2. 样品制备

1) 前处理柱预处理

将 Dionex OnGuard II RP Cartridges(1 cc, Package of 48)串联起来，使用 5mL 甲醇低流速（液体成滴流下）冲洗，然后用 2mL 空气排空甲醇，再使用 10mL 超纯水低流速冲洗后待用。

1) 标准溶液的制备

VB₁₂ 标准储备液：精密称取 VB₁₂ 对照品适量使用超纯水溶解制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液。

VB₁₂ 标准曲线：将 VB₁₂ 标准储备液，用超纯水稀释，配制成 1, 5, 10, 50μg/L 的系列标准溶液。

2) 样品前处理

选取市售的奶粉 1 和 2，称取试样 9g（精确至 0.001g）于 100mL 棕色容量瓶中，加入 75mL 超纯水，涡旋 30 秒后，精确量取 12.5mL 奶粉溶液放置于 50mL 离心管中，加入 15mL 0.1M 的醋酸铵（PH=4.5），涡旋 30 秒，4℃ 下 10000r/h 离心 15 分钟，取上清液，0.22μm 滤膜过滤后，以低流速上样到预处理好的前处理柱上，弃除流出液体，然后使用 5mL 超纯水冲洗柱子后，使用 2mL 空气排空液体，弃除流出液体，然后使用 5mL 30% 乙腈冲洗柱子，收集流出液于 10mL 容量瓶中，使用 2mL 空气排空液体并合并于之前收集的流出液里，定容至 10mL 摇匀，装瓶制成加 VB₁₂ 标 10ppb 的样品待测液，避光保存。前处理柱使用 10mL 乙腈冲洗后，使用 10mL 超纯水平衡准备下一次上样处理样品。

2、样品分析谱图

1) 标准品色谱图