

ICS 67.040  
C 53



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.217—2008

---

## 保健食品中维生素 B<sub>12</sub> 的测定

Determination of vitamin B<sub>12</sub> in health foods

2008-12-03 发布

2009-03-01 实施

中华人民共和国卫生部  
中国国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心营养与食品安全所。

本标准主要起草人：杨大进、鲁杰。

## 保健食品中维生素 B<sub>12</sub> 的测定

### 1 范围

本标准规定了保健食品中维生素 B<sub>12</sub> 的测定方法。

本标准适用于片剂、胶囊、粉剂、功能性饮料类型保健食品中维生素 B<sub>12</sub> 的测定。

本方法使用固相萃取法处理样品时,取样量为 2.0 g,方法的检出限为 1.0 μg/g。当应用免疫亲和法处理样品时,片剂、胶囊、粉剂取样量为 2.0 g,方法的检出限为 0.05 μg/g;功能性饮料取样量为 20 mL,方法的检出限为 3.0 μg/L。

### 2 原理

采用固相萃取法或免疫亲和色谱法对试样提取液中的维生素 B<sub>12</sub> 进行富集并去除部分杂质,高效液相色谱分析。

### 3 试剂

除非另有规定,本标准中所用试剂均为分析纯。实验用水均为实验室一级用水,电导率(25 ℃)为 0.01 mS/m。

- 3.1 乙腈(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N):色谱纯。
- 3.2 甲醇(CH<sub>4</sub>O):优级纯。
- 3.3 乙醇(C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O)。
- 3.4 四丁基氯化铵(C<sub>16</sub>H<sub>36</sub>NCl)。
- 3.5 5%四丁基氯化铵(C<sub>16</sub>H<sub>36</sub>NCl)溶液:称取 5.0g 四丁基氯化铵,加水溶解并稀释至 100 mL。
- 3.6 三氯甲烷(CHCl<sub>3</sub>)。
- 3.7 三氟乙酸(C<sub>2</sub>F<sub>3</sub>O<sub>2</sub>H)。
- 3.8 柠檬酸(C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>)。
- 3.9 磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)。
- 3.10 氢氧化钠(NaOH)。
- 3.11 磷酸缓冲液(pH6.5):取磷酸二氢钾 0.68 g,加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 15.2 mL,再用水稀释至 100 mL。
- 3.12 维生素 B<sub>12</sub> 标准品:纯度≥99%。
- 3.13 5%乙腈:量取 50 mL 乙腈,用水稀释定容至 1 000 mL。
- 3.14 25%乙腈:量取 250 mL 乙腈,用水稀释定容至 1 000 mL。
- 3.15 维生素 B<sub>12</sub> 标准储备液:称取维生素 B<sub>12</sub> 标准品 10 mg(精确至 0.1 mg),用 5%乙醇溶解,并定容至 10 mL 棕色容量瓶中,混匀,得到维生素 B<sub>12</sub> 的标准储备液。冷藏保存。
- 3.16 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,用水稀释得到维生素 B<sub>12</sub> 的标准中间液。冷藏保存。
- 3.17 维生素 B<sub>12</sub> 标准系列:分别吸取 0.05 mL、0.10 mL、0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL、5.00 mL 的标准中间液于 10 mL 棕色容量瓶中,用水稀释得到维生素 B<sub>12</sub> 标准溶液系列。

### 4 仪器和设备

- 4.1 高效液相色谱仪,附紫外检测器。

4.2 超声波清洗器。

4.3 离心机:4 000 r/min。

4.4 固相萃取柱:*N*-乙基吡咯烷酮和二乙烯基苯亲水亲脂平衡型固相萃取柱(60 mg,3 mL)。

4.5 免疫亲和净化柱:维生素 B<sub>12</sub>免疫亲和净化柱(EASI-EXTRACT® VITAMINE B<sub>12</sub>)<sup>1)</sup>。

## 5 分析步骤

### 5.1 固相萃取法(前处理方法一)操作步骤

#### 5.1.1 试样处理

将 20 粒片剂、胶囊试样粉碎或混匀;粉剂试样取 5 包~10 包充分混匀。

#### 5.1.2 提取

称取试样 4 g~10 g(相当于含维生素 B<sub>12</sub> 4 μg 左右,精确至 0.001 g)于 50 mL 离心管中,加 10 mL~15 mL 水,混匀,将其置于超声波清洗器中,超声提取约 10 min 后以 4 000 r/min 离心 5 min。用吸管吸取上清液置于另一个 50 mL 离心管中。对残渣按上述步骤每次加入约 10 mL 水,重复提取两次,合并提取液于 50 mL 离心管中。

#### 5.1.3 净化

向提取液中加入 5%四丁基氯化铵溶液 1 mL、三氯甲烷约 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。再重复提取两次,合并提取液于蒸发皿中。蒸干乙醇,试样用 5 mL 5%乙腈溶液定量转移到试管中,待上固相萃取柱。

#### 5.1.4 固相萃取

固相萃取柱先用 3 mL 甲醇进行活化,再用 3 mL 水对固相萃取柱进行平衡,速度为 1 滴/s。将上述处理过的适量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。

### 5.2 免疫亲和法(前处理方法二)操作步骤

#### 5.2.1 试样处理

碳酸型功能性饮料:取 150 mL 样液于超声波中脱气 10 min,待用。

果粒或果汁型功能性饮料:用 1 mol/L 氢氧化钠调 pH 至 7.0,置离心机中以转速 4 000 r/min 离心 10 min,过滤,滤液待用。

片剂、胶囊、粉剂:取 20 粒片剂、胶囊试样粉碎或混匀。粉剂试样取 5 包~10 包充分混匀。

称取试样 10 g~50 g(相当于维生素 B<sub>12</sub> 的量为 25 μg~2 500 μg,精确至 0.001 g)于 250 mL 容量瓶中,加入 100 mL 水,振摇混匀,将其置于超声波清洗器中,超声提取约 15 min 后用水定容,稀释样品溶液的浓度到样品中维生素 B<sub>12</sub> 的含量为 25 μg/mL。如样品溶液的 pH 在 7.0 以上,用柠檬酸调节 pH 在 4.5~7.0 之间;如样品溶液的 pH 在 4.5 以下,则应用磷酸缓冲液代替水作为提取液并重复上面步骤。

#### 5.2.2 富集、净化

维生素 B<sub>12</sub> 免疫亲和净化柱先用 10 mL 水淋洗小柱中未键合的化合物,吸取 20 mL(5.2.1)提取液上样到净化柱上,再用 3 mL 甲醇洗脱维生素 B<sub>12</sub> 至蒸发皿中,整个过程速度约为 1 滴/s。于 60 ℃~70 ℃水浴中蒸干溶剂,用 1 mL 0.025%的三氟乙酸溶液溶解,溶液过 0.45 μm 水系滤膜,待高效液相色谱用。

### 5.3 液相色谱参考分析条件

#### 5.3.1 色谱柱:C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm,5 μm)反相色谱柱。

1) 给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效的产品。

5.3.2 流动相:采用梯度洗脱方式,见表1。

表1 流动相梯度洗脱表

<i>t</i> /min	A:0.025%三氟乙酸(pH=2.6)	B:乙腈
0~3.5	100	0
3.5~11	75	25
11~19	65	35
19~20	90	10
20~30	100	0

5.3.3 流速:1 mL/min。

5.3.4 检测波长:361 nm。

5.3.5 柱温:室温。

#### 5.4 测定

吸取 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,用标准曲线法进行测定。

#### 6 结果计算

按式(1)计算试样中维生素 B<sub>12</sub> 的含量。

$$X = \frac{A \times f}{m} \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

*X*——试样中维生素 B<sub>12</sub> 的含量,单位为微克每克或微克每毫升(μg/g 或 μg/mL);

*A*——从标准曲线上查得的含量,单位为微克(μg);

*f*——试样稀释倍数;

*m*——试样的取样量,单位为克或毫升(g 或 mL)。

计算结果保留两位有效数字。

#### 7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。

#### 8 色谱图

维生素 B<sub>12</sub> 标准色谱图见图 1。

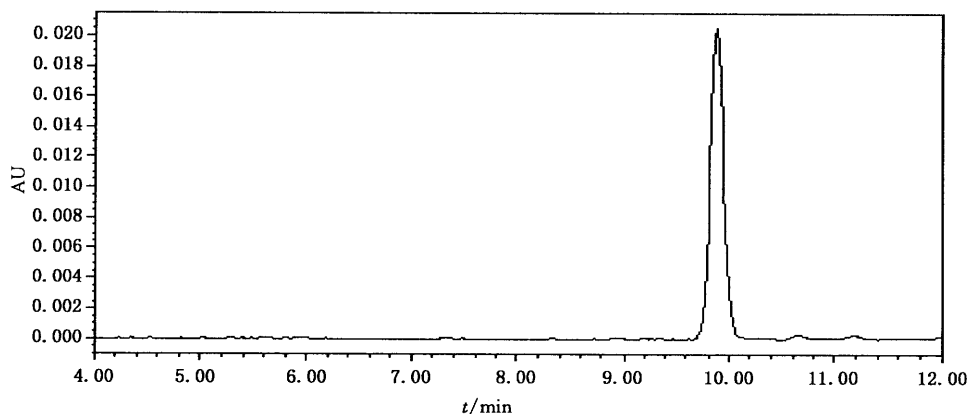


图1 维生素 B<sub>12</sub> 标准色谱图