

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2025.80464

无氰化物降解—亲水保留液相色谱—荧光检测法 测定婴幼儿配方奶粉中维生素 B₁₂

李 樑¹ 邓文娟² 黄伟乾¹ 吴俊发¹ 覃天福¹

(1. 广州检验检测认证集团有限公司, 广东 广州 511447; 2. 广州质量监督检测研究院, 广东 广州 511447)

摘要: [目的] 建立一种基于间接检测维生素 B₁₂ 降解产物 α-核唑(维生素 B₁₂ 的核苷组分)测定总维生素 B₁₂ 含量的检验方法, 用于测定婴幼儿配方奶粉中维生素 B₁₂ 总量。[方法] 试样经蛋白质变性与糖类去除后, 进行酸水解与酶解去磷酸化, 释放 α-核唑, 通过硼酸亲和柱净化, 最终采用亲水保留液相色谱—荧光检测法(HILIC-FLD)进行定量分析。[结果] α-核唑在 1.00~10.0 μg/L 范围内线性关系良好, 相关系数 R² 为 0.999 1, 加标回收率为 72.5%~78.3%, 相对标准偏差(RSD)为 4.56%~7.28%, 方法检出限(LOD)为 0.4 μg/100 g, 定量限(LOQ)为 1.2 μg/100 g。Bland-Altman 分析结果表明, 该方法和国标法的测定结果之间无明显差异且一致性较好。[结论] 该方法灵敏度高, 重现性好, 无需氰化物进行前处理即可准确测定婴幼儿配方奶粉中维生素 B₁₂ 总含量。

关键词: 液相色谱—荧光检测法; 婴幼儿配方奶粉; 维生素 B₁₂; α-核唑

Determination of vitamin B₁₂ in infant formula milk powder by cyanide-free degradation coupled with hydrophilic interaction liquid chromatography with fluorescence detection

LI Liang¹ DENG Wenjuan² HUANG Weiqian¹ WU Junfa¹ QIN Tianfu¹(1. Guangzhou Inspection and Testing Certification Group Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 511447, China;
2. Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou, Guangdong 511447, China)

Abstract: [Objective] To establish a method for determining the total vitamin B₁₂ content in infant formula milk powder based on the indirect detection of α-ribazole, a degradation product and nucleoside component of vitamin B₁₂. [Methods] After protein denaturation and sugar removal, the sample underwent acid hydrolysis and enzymatic dephosphorylation to release α-ribazole, which was then purified using a boronate affinity column. Quantitative analysis was performed using hydrophilic interaction liquid chromatography with fluorescence detection (HILIC-FLD). [Results] Alpha-ribazole showed good linearity in the range of 1.00~10.0 μg/L, with a correlation coefficient (R²) of 0.999 1. The spiked recovery ranged from 72.5% to 78.3%, with relative standard deviations (RSDs) between 4.56% and 7.28%. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.4 μg/100 g and 1.2 μg/100 g, respectively. Bland-Altman analysis showed no significant difference between this method and the national standard method, and the consistency was good. [Conclusion] This method is highly sensitive and reproducible, and it can accurately determine the total vitamin B₁₂ content in infant formula milk powder without the need for cyanide pretreatment.

Keywords: HILIC-FLD; infant formula milk powder; vitamin B₁₂; α-ribazole

基金项目: 广州检验检测认证集团有限公司自研科技项目(编号: 2019KJ01GZ)

通信作者: 李樑(1993—), 男, 广州检验检测认证集团有限公司中级工程师, 学士。E-mail: 451073307@qq.com

收稿日期: 2025-05-21 改回日期: 2025-07-01

引用格式: 李樑, 邓文娟, 黄伟乾, 等. 无氰化物降解—亲水保留液相色谱—荧光检测法测定婴幼儿配方奶粉中维生素 B₁₂[J]. 食品与机械, 2025, 41(7): 39-45.

Citation: LI Liang, DENG Wenjuan, HUANG Weiqian, et al. Determination of vitamin B₁₂ in infant formula milk powder by cyanide-free degradation coupled with hydrophilic interaction liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Food & Machinery, 2025, 41(7): 39-45.

维生素 B₁₂(钴胺素)是人体细胞代谢的关键辅酶,参与多种代谢过程。缺乏维生素 B₁₂可导致巨幼红细胞性贫血、神经系统退行性病变等疾病^[1]。目前婴幼儿配方奶粉中维生素 B₁₂的检测主要采用微生物法^[2]、酶联免疫法^[3]、液相色谱法^[4-6]及液相色谱-质谱联用法^[7-8]。维生素 B₁₂在生物体内以 4 种具有代谢活性的形式存在,包括羟钴胺素、甲钴胺素、5-脱氧腺苷钴胺素及氰钴胺素。GB 5009.285—2022《食品安全国家标准 食品中维生素 B₁₂的测定》第一法(液相色谱法)与第二法(液相色谱-质谱联用法)的前处理均使用氰化钾或氰化钠将钴胺素异构体转化为氰钴胺素。该转化策略虽可防止样品制备过程中维生素 B₁₂的降解,并将多形态检测简化为单一目标物的定量分析,但氰化物属剧毒物质,其半数致死剂量(LD₅₀)仅为 5~30 mg/kg,操作人员暴露后可能出现急性中毒症状(头晕、呼吸困难、抽搐等),严重时可致死亡;慢性暴露则可能导致神经系统损伤、心血管疾病及肝功能异常^[9]。此外,事故性泄漏如 2000 年罗马尼亚巴亚马雷尾矿库 100 t 氰化物泄漏已造成区域性生态灾难^[10]。氰化物的获取和使用受到严格限制,严重制约了该方法的推广应用。因此,开发一种无需氰化物的前处理技术具有重要现实意义。

在类咕啉化合物的下轴配体核苷酸结构中,3 种取代基 α -核啶-3'-磷酸盐、 α -核啶和 5,6-二甲基苯并咪唑均呈现较强荧光特性,为维生素 B₁₂测定提供了可行性。 α -核啶-磷酸盐可通过酸水解或碱水解从维生素 B₁₂中释放^[11-12],但在该过程中磷酸基团可能发生迁移,生成核糖 C-2'位或 C-5'位的异构体(分别为 α -核啶-3'-磷酸盐和 α -核啶-5'-磷酸盐)^[6]。由于这两种异构体的色谱保留时间不同会导致定量偏差,因此不适合作为荧光探针。5,6-二甲基苯并咪唑不存在磷酸基迁移问题,但其释放需要苛刻的反应条件^[13],同样不适合作为荧光探针。相比之下, α -核啶存在于所有维生素 B₁₂形式中^[6],且可通过碱性磷酸酶催化 α -核啶-磷酸盐去磷酸化获得^[4,14-15],因此适合作为维生素 B₁₂测定的荧光探针^[6]。研究拟开发并验证以 α -核啶作为维生素 B₁₂荧光探针的检测方法,以期通过测定其含量间接定量分析维生素 B₁₂,从而避免氰化物转化钴胺素异构体的前处理步骤,为维生素 B₁₂的相关分析方法开发提供依据。

1 材料与方 法

1.1 仪器与设备

超高效液相色谱仪:U3000 型,美国赛默飞世尔科技公司;

纯水系统:Aquaplore 2S 型,重庆艾科浦颐洋企业发展有限公司;

高速冷冻离心机:3-30KS 型,西格玛奥德里奇(上海)

贸易有限公司;

涡旋振荡器:MS3 型,艾卡(广州)仪器设备有限公司;

水浴恒温振荡器:LW20 型,北京莱伯泰科仪器有限公司;

pH 计:FiveEasy Plus 型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;

固相萃取装置:WAT200609 型,沃特世科技上海有限公司;

氮吹浓缩仪:TurboVap LV 型,拜泰齐贸易(上海)有限公司;

亲水作用色谱柱 HILIC Column:4.6 mm×150 mm, 2.6 μ m,美国赛默飞世尔科技公司。

1.2 材料与试剂

婴儿配方奶粉:市售;

碱性磷酸酶:活性 $\geq 5\ 000$ U/mg,德国默克公司;

硼酸亲和凝胶:型号 20244,美国赛默飞世尔科技公司;

氯化镁、乙酸钠、甲酸、氨水、盐酸:优级纯,广州化学试剂厂;

甲醇、乙腈、乙酸、甲酸铵:色谱纯,德国默克公司;

氰钴胺(维生素 B₁₂)标准品:纯度 $\geq 98\%$,德国 Sigma-Aldrich 公司;

α -核啶标准品:纯度 $\geq 95\%$,四川省维克奇生物科技有限公司;

5,6-二甲基苯并咪唑标准品:纯度 $\geq 99\%$,上海麦克林生化科技股份有限公司;

C₁₈固相萃取柱:3 mL,德国默克公司。

1.3 溶液配制

甲酸铵溶液(0.1 mol/L, pH 3.5):准确称取 6.3 g 甲酸铵溶于 900 mL 超纯水中,滴加甲酸调节 pH 至 3.5,用超纯水定容至 1 L。

醋酸钠溶液(0.1 mol/L, pH 4.0):准确称取 13.6 g 醋酸钠溶于 950 mL 超纯水中,加入冰醋酸调节 pH 至 4,用超纯水定容至 1 L。

酶解缓冲液(0.3 mol/L 乙酸铵, 2 mmol/L 氯化镁, pH 8.8):准确称取 23.2 g 乙酸铵和 0.2 g 氯化镁溶于 900 mL 超纯水中,用氨水调节 pH 至 8.8,用超纯水定容至 1 L。

碱性磷酸酶储备溶液(500 U/mL):准确称取 0.02 g 碱性磷酸酶溶解于酶解缓冲液中,随后定容至 200 mL。

乙酸铵缓冲液(0.3 mol/L, pH 8.8):准确称取 11.6 g 乙酸铵溶于 450 mL 超纯水中,用氨水调节 pH 至 8.8,用超纯水定容至 500 mL。

甲酸水溶液-乙腈(1.0 mol/L, $V_{\text{甲酸水溶液}}:V_{\text{乙腈}}=70:30$):将 700 mL 超纯水与 300 mL 乙腈混合,取 900 mL,加入 46.03 g 甲酸,用混合后的乙腈水溶液定容至 1 L。

1.4 标准曲线制备

分别准确称取 α -核啞和5,6-二甲基苯并咪啞标准品于10 mL棕色具塞容量瓶中,用甲酸铵溶液(0.1 mol/L, pH 3.5)溶解并定容,折算后质量浓度为1 000 mg/L。使用上述甲酸铵溶液稀释得到标准中间液并逐级稀释,分别得到 α -核啞和5,6-二甲基苯并咪啞标准系列工作溶液,其质量浓度分别为0,1.00,2.00,5.00,7.50,10.0 μ g/L。

1.5 前处理方法及原理

α -核啞是维生素B₁₂经酸水解与酶解后的特征产物。由于试样中存在内源性 α -核啞干扰,试验分为内源性 α -核啞分析组(未经酸水解处理)和总 α -核啞分析组(经酸水解处理),分别测定其 α -核啞含量。样品中源自维生素B₁₂的 α -核啞含量可通过总 α -核啞分析组含量扣除内源性 α -核啞分析组含量计算得出。

1.5.1 样品复原及蛋白质变性处理 精确称取样品8.000 0 g于高脚烧杯中,放入磁力搅拌子,向烧杯中加入50 g 35 $^{\circ}$ C的超纯水。将烧杯置于磁力搅拌器上,调节转子转速至形成旋涡且保持平稳旋转后,持续搅拌至样品完全溶解,恢复至常温后,精确称取复原婴幼儿配方奶液2.000 0 g置于10 mL离心管中。加入5 mL醋酸钠溶液(0.1 mol/L, pH 4.0),涡旋振荡混匀后,于90 $^{\circ}$ C水浴加热30 min。转移至冰水浴中冷却后,10 000 r/min离心10 min。吸取上清液,沉淀物用5 mL醋酸钠溶液再次提取。将上清液与提取液合并,经0.45 μ m水相微孔滤膜过滤,备用。

1.5.2 固相萃取去除糖类 依次用5 mL甲醇和5 mL醋酸钠溶液(0.1 mol/L, pH 4.0)活化与平衡C₁₈固相萃取柱。将1.5.1所得的滤液加入固相萃取柱中,待柱中液体流干后,再真空抽干。分别用5 mL甲醇洗脱2次,每次停留1 min,收集全部洗脱液后,置于50 $^{\circ}$ C水浴中氮气浓缩至近干,获得干燥提取物。

1.5.3 维生素B₁₂的酸水解及产物验证 总 α -核啞分析组:向1.5.2的提取物中加入1 mL盐酸溶液(1.5 mol/L),涡旋振荡1 min,100 $^{\circ}$ C水浴加热40 min。冰水浴冷却30 min后,加入1 mL氢氧化钠溶液(1.5 mol/L)中和盐酸,备用。

内源性 α -核啞分析组:不进行酸水解处理。为保持两组溶液体系的体积和pH一致,向提取物中加入预先中和的1 mL盐酸(1.5 mol/L)与1 mL氢氧化钠(1.5 mol/L),涡旋振荡1 min,备用。

1.5.4 产物的去磷酸化处理 向1.5.3的总 α -核啞分析组样品与内源性 α -核啞分析组样品中,分别加入2 mL酶解缓冲液(0.3 mol/L乙酸铵,2 mmol/L氯化镁,pH 8.8)及50 μ L碱性磷酸酶储备溶液,涡旋振荡30 s。将混合溶液置于37 $^{\circ}$ C下酶解14 h,去磷酸化释放 α -核啞。

1.5.5 硼酸亲和柱净化 取0.5 mL硼酸亲和凝胶填于固相萃取空柱管中,作为硼酸亲和柱,于4 $^{\circ}$ C储存。依次用

3 mL甲醇、3 mL超纯水进行活化,随后加入3 mL乙酸铵缓冲液(0.3 mol/L, pH 8.8)后,封盖振荡30 s,静置15 min(期间每5 min振荡30 s),排出缓冲液,重复上述平衡操作2次。

分别将总 α -核啞分析组与内源性 α -核啞分析组样品加入至平衡后的硼酸亲和柱中。先用3 mL乙酸铵缓冲液(0.3 mol/L, pH 8.8)淋洗,再用5 mL 1.0 mol/L甲酸水溶液—乙腈($V_{\text{甲酸水溶液}}:V_{\text{乙腈}}=70:30$)洗脱 α -核啞。洗脱液经60 $^{\circ}$ C氮吹浓缩至近干后,用乙腈复溶并定容至1 mL,过0.22 μ m有机相微孔滤膜,待液相色谱分析。

1.6 液相色谱条件

检测器为荧光检测器;激发波长251 nm;发射波长303 nm;亲水作用色谱柱(HILIC Column, 4.6 mm \times 150 mm, 2.6 μ m);柱温30 $^{\circ}$ C;进样量10 μ L;流速1.0 mL/min;流动相A为乙腈,B为甲酸铵溶液(0.1 mol/L, pH 3.5);采用等度洗脱方式, $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{甲酸铵溶液}}=95:5$ 。

1.7 结果计算

由标准曲线算出 α -核啞的浓度,再按式(1)计算粉末样品中维生素B₁₂的含量。

$$X = \left[\left(\frac{c_{\text{总}} \times v_{\text{总}}}{m_{\text{总}}} \right) - \left(\frac{c_{\text{内}} \times v_{\text{内}}}{m_{\text{内}}} \right) \right] \times \frac{M_{\text{B}_{12}}}{M_{\text{a-R}} \times 10}, \quad (1)$$

$$m_{\text{总}} \text{ 或 } m_{\text{内}} = \frac{m_{\text{乳粉}}}{m_{\text{乳粉}} + m_{\text{水}}} \times m_{\text{复原乳}}, \quad (2)$$

式中:

X——试样中维生素B₁₂含量, μ g/100 g;

$c_{\text{总}}$ 、 $c_{\text{内}}$ ——总 α -核啞分析组和内源性 α -核啞分析组由标准曲线得到的 α -核啞质量浓度,ng/mL;

$v_{\text{总}}$ 、 $v_{\text{内}}$ ——总 α -核啞分析组与内源性 α -核啞分析组经硼酸亲和柱净化后洗脱液最终定容体积,mL;

$m_{\text{总}}$ 、 $m_{\text{内}}$ ——总 α -核啞分析组与内源性 α -核啞分析组对应的婴幼儿配方奶粉折算质量,g;

$M_{\text{B}_{12}}$ 、 $M_{\text{a-R}}$ ——维生素B₁₂和 α -核啞的相对分子质量;

10——换算系数;

$m_{\text{乳粉}}$ ——称量的婴幼儿配方奶粉质量,g;

$m_{\text{水}}$ ——用于复原的超纯水质量,g;

$m_{\text{复原乳}}$ ——精确称量的复原婴幼儿配方奶液质量,g。

1.8 回收率试验设计

选择含量相对较低的阳性样品进行加标回收试验,先对其重复测定,求出本底值的平均值,按照平均值的0.5倍、1.0倍、2.0倍进行标准添加,并于日内重复测定6组平行样品,以回收率和相对标准偏差评价方法的可行性和重复性。

1.9 不同方法间测定结果的对比分析

随机选取市售的20个婴幼儿配方奶粉,分别使用优化后的方法与GB 5009.285—2022第一法(液相色谱法)

进行测定。通过 Bland-Altman 分析对 2 种方法的测定结果差异进行一致性评价。

1.10 数据处理及绘图

所有测定数据及谱图数据由液相系统软件采集,记录于 Excel 2010 表格中拟合和计算,图片均由 Origin 8.5 软件进行绘制。

2 结果与分析

2.1 色谱条件优化

从 α -核唑的化学结构来分析,N 原子中所含有的孤对电子具有较强的亲核性,在酸性条件下容易与 H^+ 结合,另外,结构中含有的 3 个羟基也会与水或者其他极性溶剂形成氢键,导致其在反相色谱系统中,保留能力较弱,因此基于 α -核唑在酸性流动相中容易质子化形成正电荷的特性,采用亲水作用色谱通过静电与氢键作用实现分离相对合适。为了保证目标物的峰型,在流动相中加入了甲酸铵。甲酸铵的加入可以增强流动相中的离子强度,在改善峰型的同时增加了色谱柱中的保留时间,对杂质的分离也有一定的帮助。具体的 α -核唑标准品及样品色谱图如图 1 所示。

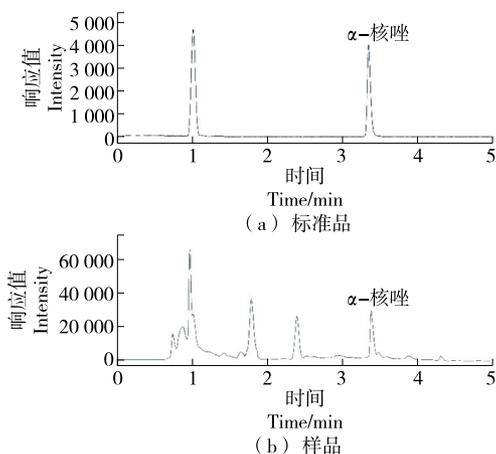


图 1 婴幼儿配方奶粉样品与 α -核唑标准品的色谱图

Figure 1 Chromatogram of infant formula milk sample and α -ribazole standard

2.2 蛋白质变性条件优化

由于维生素 B_{12} 在婴幼儿配方奶粉中常与蛋白质形成复合物,因此需通过使蛋白质变性的方式,将结合态的维生素 B_{12} 转化为游离态。前期试验发现,在 pH 达到等电点的情况下,采用高温加热的方式可使蛋白质充分变性,因此试验在加入 5 mL 0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 4.0), 90 °C 水浴 (其余步骤按照 1.5.2~1.5.5 中的方法进行操作,后续的优化只控制单因素水平变化) 的条件下进行,以维生素 B_{12} 呈阳性的婴幼儿配方奶粉为试验对象,分别考察 10, 20, 30, 40, 50, 60 min 的加热时间对蛋白质变性效果

的影响,以测得值为评判依据。由图 2 可知,加热时间对蛋白质的变性效果有一定的影响,随着时间的增加,维生素 B_{12} 的测定值升高,但当加热时间为 30 min 时,维生素 B_{12} 测定值基本达到最高,随着时间的增加,也没有下降的趋势,表明维生素 B_{12} 基本转化为游离态,且在加热条件下性质仍然稳定。最终选择 30 min 为最优蛋白质变性加热时间。

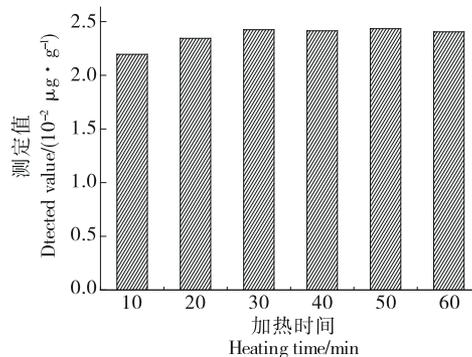


图 2 加热时间对维生素 B_{12} 测定值的影响

Figure 2 Effect of heating time on the detected value of vitamin B_{12} ($n=6$)

2.3 去除糖类物质的固相萃取柱选择

婴幼儿配方奶粉中的主要还原糖为乳糖,由于试验采用的是水相提取,乳糖会被大量提取至溶液中,因此提取后若未能有效去除糖类物质,那么在酸水解阶段的高温有可能会引发糖类焦糖化反应或产生美拉德反应,产生黄棕色色素,导致溶液褐变^[16]。由于目标分析物与褐变产物结构相似,均含有羟基或胺基等同类基团,因此会竞争结合硼酸亲和柱的活性位点,另外,显色杂质可通过氢键作用力使色谱峰形畸变,甚至可能产生荧光干扰,降低检测灵敏度。试验基于糖类强亲水性与维生素 B_{12} 的疏水性差异,使用 C_{18} 固相萃取柱通过反相色谱机制实现选择性分离。由于糖类因强亲水性而难以被 C_{18} 固相萃取柱填料保留,而维生素 B_{12} 分子中的苯并咪唑环及咕啉环结构赋予其疏水特性,因而能被 C_{18} 固定相吸附。通过试验发现,使用 C_{18} 固相萃取柱并不影响维生素 B_{12} 的测定值,而分别用 5 mL 甲醇洗脱 2 次,基本可保证维生素 B_{12} 被完全洗脱。此外,有研究^[17-18]表明, C_{18} 固相萃取柱对 4 种形式的维生素 B_{12} 均具有良好的保留效率。因此,选择 C_{18} 固相萃取柱,使用甲醇作为洗脱液回收吸附的维生素 B_{12} 。

2.4 酸水解条件优化

为保证维生素 B_{12} 完全水解释放 α -核唑-磷酸盐,需要对酸水解的条件进行优化。试验以维生素 B_{12} 呈阳性的婴幼儿配方奶粉为对象,在水解时间为 40 min 的条件下,分别考察盐酸浓度 (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mol/L) 对维生素 B_{12} 测定值的影响。如图 3 所示,盐酸浓度对维生素 B_{12}

测定值的影响相对其他因素更加明显,随着盐酸浓度的增加,维生素B₁₂测定值升高,但当浓度超过1.5 mol/L时,测定值开始出现下降的趋势,可能是由于盐酸浓度的增加,促进了体系中美拉德反应的发生或者是目标物发生了进一步的水解反应,因此选择最佳盐酸浓度为1.5 mol/L,并在此条件下进一步优化酸水解时间。如图4所示,当水解时间为40 min时,维生素B₁₂测定值基本达到最大值,随着时间的增加,测定值也趋于稳定,表明此时目标物已充分水解。最终选择1.5 mol/L盐酸,100 °C水解40 min为酸水解条件。

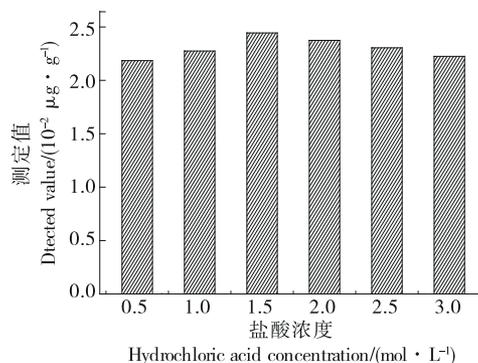


图3 盐酸浓度对维生素B₁₂测定值的影响

Figure 3 Effect of hydrochloric acid concentration on the detected value of vitamin B₁₂ (n=6)

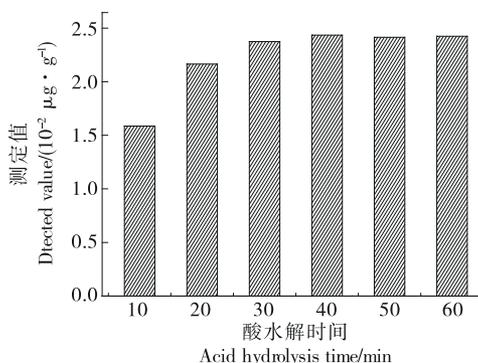


图4 酸水解时间对维生素B₁₂检测值的影响

Figure 4 Effect of acid hydrolysis time on the detected value of vitamin B₁₂ (n=6)

2.5 酸水解产物验证

酸水解过程使维生素B₁₂降解成α-核啉-磷酸盐,但过度水解可能引发α-核啉-磷酸盐的进一步降解,生成5,6-二甲基苯并咪唑,导致目标物α-核啉的生成量降低,进而影响维生素B₁₂的检测准确性。按优化的水解条件对氰钴胺标准溶液进行处理(上机质量浓度为5.0 μg/L),将处理后的氰钴胺标准品与5,6-二甲基苯并咪唑标准品同时进行亲水作用色谱-荧光检测分析。结果表明,5,6-二甲

基苯并咪唑标准品出峰处,未见氰钴胺水解产物出峰,表明氰钴胺水解产物不含5,6-二甲基苯并咪唑,证明该水解条件不会对检测结果造成干扰。

2.6 去磷酸化条件优化

维生素B₁₂在水解后,α-核啉会以α-核啉-磷酸盐的形式释放到体系中,为了避免磷酸基团的迁移而进一步生成异构体,因此需要通过酶解去除磷酸基团。为确保α-核啉-磷酸盐尽可能转化为α-核啉,试验对不同的酶解时间进行了优化,以维生素B₁₂的测定值为评判依据。由图5可知,当酶解时间低于14 h时,α-核啉-磷酸盐未完全去磷酸化,导致检测值偏低,当酶解时间超过14 h时,维生素B₁₂测定值基本达到最大值,随着时间的增加变化不再明显,表明酶解反应基本达到平衡状态。因此,选择14 h作为最佳酶解时间。

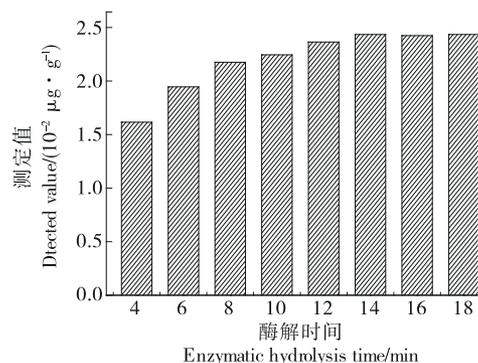


图5 酶解时间对维生素B₁₂检测值的影响

Figure 5 Effect of enzymatic hydrolysis time on the detected value of vitamin B₁₂ (n=6)

2.7 硼酸亲和柱净化条件优化

由于α-核啉中含有较多的羟基和胺基,硼酸亲和柱中的硼酸基团可与其发生络合,从而进行吸附,但因为两者之间的吸附作用力较强,若要α-核啉尽可能被洗脱,需要使用合适的洗脱液。试验初期考察了不同浓度(0.5, 1.0, 1.5 mol/L)甲酸水溶液对α-核啉回收率的影响。结果发现,甲酸浓度为1.0 mol/L时α-核啉回收率最高,达86.1%,但考虑到α-核啉具有一定的疏水性,加入有机溶剂可使洗脱液的整体极性降低,因此进一步考察了含不同体积分数乙腈(10%, 20%, 30%, 40%)的洗脱液对α-核啉回收率影响。如图6所示,当乙腈体积分数为30%时,α-核啉回收率最高,可能是此时洗脱液整体极性与α-核啉的最接近,但溶液的极性降低,也有可能将更多的脂溶性杂质洗脱下来,从而影响回收率。综合考虑,以1.0 mol/L甲酸水溶液-乙腈(V_{甲酸水溶液}:V_{乙腈}=70:30)作为洗脱液。

2.8 线性方程

按照1.4的方法配制α-核啉的标准系列工作溶液,于优化后的仪器方法下进行测定。以响应值为纵坐标,标

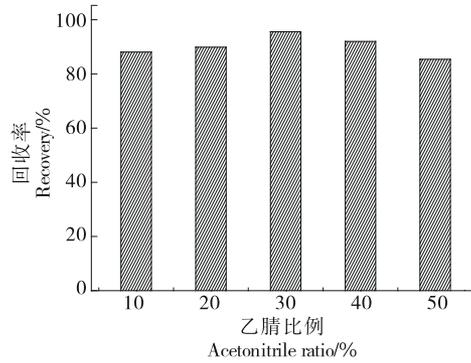


图 6 不同乙腈比例的洗脱液对 α -核唑回收率的影响
Figure 6 Effect of eluents with different acetonitrile ratios on the recoveries of α -ribazole ($n=6$)

准溶液质量浓度为横坐标,通过一次线性回归拟合,绘制标准曲线,结果表明, α -核唑在 1.00~10.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内呈良好线性,回归方程为 $Y=5\ 740.86X-857.36$,相关系数 R^2 为 0.999 1。通过对样品进行逐级稀释,结合仪器信噪比的 3 倍和 10 倍,计算得到方法的检出限和定量限分别为 0.7, 2.0 $\mu\text{g}/100\ \text{g}$ 。说明方法灵敏度高,能对婴幼儿配方奶粉中的维生素 B_{12} 进行准确定量。

2.9 回收率及精密度试验

通过设计方法学试验,以考察方法整体的可行性。先使用优化后的方法对同一婴儿配方奶粉样品进行 10 次平行测定,计算平均值得到维生素 B_{12} 含量为 2.44 $\mu\text{g}/100\ \text{g}$ 。根据此本底值的 0.5 倍、1.0 倍、2.0 倍进行氰钴胺标准溶液的添加,所有添加水平在日内重复测定 6 组平行样品。如表 1 所示,维生素 B_{12} 在不同的添加水平下,平均回收率为 72.5%~78.3%,符合 GB/T 27417—2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》对 $<0.1\ \text{mg/kg}$ 水平下 60%~120% 的方法回收率偏差范围。相对标准偏差为 4.56%~7.28%,说明方法的精密度高,满足测定要求。

表 1 维生素 B_{12} 加标回收率及精密度试验结果

Table 1 Experiment results of vitamin B_{12} for recoveries and precision ($n=6$)

本底值/ ($10^{-2}\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	维生素 B_{12} 添加 量/($10^{-2}\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	维生素 B_{12} 检测 值/($10^{-2}\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	平均回 收率/%	相对标准 偏差/%
2.44	1.20	3.31	72.5	7.28
	2.40	4.26	75.8	5.55
	4.80	6.20	78.3	4.56

2.10 Bland-Altman 分析评估方法间的一致性

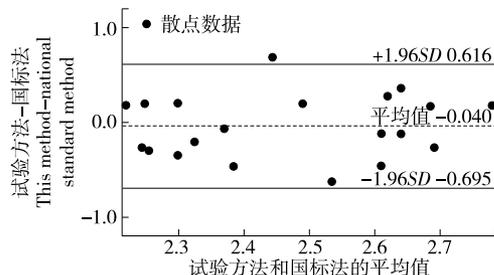
随机选取市售的 20 个样品,分别使用试验方法和国标法进行测定,结果使用 Bland-Altman 分析方法进行一致性检验,计算结果见表 2。通过进一步计算,可得模型的差值

表 2 2 种方法的均值和差值结果

Table 2 Mean and difference results of two methods ($n=6$) $\mu\text{g}/100\ \text{g}$

样品编号	试验方法平均值	国标法平均值	均值	差值
1	2.87	2.69	2.780	0.18
2	2.76	2.48	2.620	0.28
3	2.31	2.13	2.220	0.18
4	2.11	2.38	2.245	0.27
5	2.58	2.70	2.640	0.12
6	2.55	2.83	2.690	0.28
7	2.55	2.67	2.610	0.12
8	2.11	2.40	2.255	0.29
9	2.79	2.10	2.445	0.69
10	2.59	2.39	2.490	0.20
11	2.40	2.20	2.300	0.20
12	2.38	2.84	2.610	0.46
13	2.22	2.43	2.325	0.21
14	2.22	2.85	2.535	0.63
15	2.15	2.62	2.385	0.47
16	2.34	2.40	2.370	0.06
17	2.77	2.60	2.685	0.17
18	2.13	2.47	2.300	0.34
19	2.82	2.46	2.640	0.36
20	2.35	2.15	2.250	0.20

平均值为 $-0.040\ \mu\text{g}/100\ \text{g}$, 差值标准差为 $0.334\ \mu\text{g}/100\ \text{g}$, 一致性界限如图 7 所示, 2 种方法的差值 95% 落在 $-0.695\sim 0.616\ \mu\text{g}/100\ \text{g}$, 由于偏差接近 0, 说明 2 种方法的测定结果整体差异较小, 结果之间无显著系统性偏差, 在实际应用中可接受。Bland-Altman 分析表明, 试验方法与国标法在测定婴幼儿配方奶粉中的维生素 B_{12} 具有较好的一致性, 但一致性界限跨度较大 ($1.31\ \mu\text{g}/100\ \text{g}$), 若法规限值 $\pm 0.5\ \mu\text{g}/100\ \text{g}$ 小于一致性界限跨度时, 需谨慎对待方法互换性, 但总体上来说, 一般样品含量均高于此值, 因此



The average value of this method and the national standard method

中间虚线表示差值的平均值, 上下线条为 95% 一致性界限的上下限 (即 1.96 个标准差上下界限); 散点基本落在 95% 一致性区间 (即 1.96 个标准差范围内), 则说明一致性情况良好

图 7 Bland-Altman 分析方法的一致性结果

Figure 7 Consistency results of Bland-Altman analysis method

在大多数实际应用中,2种方法可以互换使用。

2.11 质控样品测定

对 SRM 1549a 全脂奶粉标准品进行检测,SRM 1549a 全脂奶粉标准品的维生素 B₁₂ 检测值为 3.08 μg/100 g,符合证书标示值范围(3.2±0.2) μg/100 g。说明该方法具有实际测定的应用价值。

3 结论

该研究开发并验证了一种无需氰化物前处理的婴儿配方奶粉中维生素 B₁₂ 总量检测方法。通过亲水作用液相色谱—荧光检测法(HILIC-FLD)测定维生素 B₁₂ 特征水解产物 α-核唑,实现了对样品中总维生素 B₁₂ 的定量分析;该方法无需氰化物即可检测 4 种具有代谢活性的钴胺素(羟钴胺素、甲钴胺素、5-脱氧腺苷钴胺素及氰钴胺素)。通过规避传统方法中氰化钾/氰化钠的使用,显著降低了试验毒性,符合绿色分析化学要求;方法学试验结果表明,方法整体的灵敏度高,重复性好,且 Bland-Altman 分析结果显示该方法与国标法一致性较好,可以互换使用。

参考文献

- [1] 孙兴卫. 维生素 B₁₂ 和叶酸治疗巨幼细胞贫血患者的临床疗效[J]. 医学临床研究, 2025, 42(2): 255-257.
SUN X W. Clinical efficacy of vitamin B₁₂ and folic acid in treatment of megaloblastic anemia patients[J]. Journal of Medical Clinical Research, 2025, 42(2): 255-257.
- [2] 苏妙仪, 严家俊, 蔡艳. 微生物法测定乳粉中维生素 B₁₂ 的实验室验证及结果分析[J]. 现代食品, 2022, 28(21): 192-197.
SU M Y, YAN J J, QI Y. Laboratory verification and analysis of vitamin B₁₂ in milk powder by microbiological method[J]. Modern Food, 2022, 28(21): 192-197.
- [3] 李江, 蔡艳, 田秀梅, 等. 酶联免疫法检测婴幼儿配方奶粉中的维生素 B₁₂[J]. 食品工业, 2017, 38(8): 250-252.
LI J, QI Y, TIAN X M, et al. Detection of vitamin B₁₂ in infant formula milk powder by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. The Food Industry, 2017, 38(8): 250-252.
- [4] LI Y N, GILL B D, MANLEY-HARRIS M, et al. A cyanide-free sample preparation methodology prior to determination of vitamin B₁₂ in infant milk formula using hydrophilic interaction liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Talanta, 2025, 282: 126970.
- [5] AOAC International. Cobalamin (vitamin B₁₂ activity) in milk-based infant formula by turbidimetric method: AOAC 986.23 [S]. Rockville: AOAC International, 2023.
- [6] PAKIN C, BERGAENTZLÉ M, AOUDE -WERNER D, et al. α-ribazole, a fluorescent marker for the liquid chromatographic determination of vitamin B₁₂ in foodstuffs[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1 081(2): 182-189.
- [7] 励炯, 林伟杰, 曹青文, 等. 免疫亲和柱净化—超高效液相色谱—串联质谱法测定奶粉中的维生素 B₁₂ 总量[J]. 营养学报, 2020, 42(1): 72-77.
LI J, LIN W J, CAO Q W, et al. Determination of total vitamin B₁₂ in milk powder by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry after purification on an immunoaffinity column[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2020, 42(1): 72-77.
- [8] WANG X X, LI X M, LIU X H, et al. Accurate determination of vitamin B₁₂ in infant formula by liquid chromatography/isotope dilution high-resolution mass spectrometry[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 171: 114170.
- [9] 孙晓琳. 氰化物中毒死亡并发气胸 1 例[J]. 中国法医学杂志, 2025, 40(2): 249-250.
SUN X L. Death from cyanide poisoning complicated by pneumothorax: a case report[J]. Chinese Journal of Forensic Medicine, 2025, 40(2): 249-250.
- [10] 王艳峰. 死亡之水: 罗马尼亚金矿氰化物污染事件[N]. 学习时报, 2022-03-02(A7).
WANG Y F. Death water: cyanide pollution incident in Romanian gold mine[N]. Study Times, 2022-03-02(A7).
- [11] ARMITAGE J B, CANNON J R, JOHNSON A W, et al. Chemistry of the vitamin B₁₂ group. part III. The course of hydrolytic degradations[J]. Journal of the Chemical Society, 1953, 787: 3 849-3 864.
- [12] BUCHANAN J G, JOHNSON A W, MILLS J A, et al. Chemistry of the vitamin B₁₂ group. part I. acid hydrolysis studies. Isolation of a phosphorus-containing degradation product[J]. Journal of the Chemical Society, 1950, 552: 2 845-2 855.
- [13] BONNETT R, RALEIGH J A, REDMAN D G. The hydrolysis of vitamin B₁₂. Studies with model amides[J]. Journal of the American Chemical Society, 1965, 87(7): 1 600-1 607.
- [14] SHARMA U, PAL D, PRASAD R. Alkaline phosphatase: an overview[J]. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2014, 29(13): 269-278.
- [15] COLEMAN J E, GETTINS P. Alkaline phosphatase, solution structure, and mechanism[J]. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 1983, 55: 381-452.
- [16] MATTES T A, ESCALANTE-SEMERENA J C. Facile isolation of α-ribazole from vitamin B₁₂ hydrolysates using boronate affinity chromatography[J]. Journal of Chromatography B, 2018, 1 090: 52-55.
- [17] NURSTEN H. Maillard reaction[M]// Encyclopedia of dairy sciences. Oxford: Elsevier, 2002: 1 657-1 672.
- [18] HEAL K R, CARLSON L T, DEVOL A H, et al. Determination of four forms of vitamin B₁₂ and other B vitamins in seawater by liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2014, 28(22): 2 398-2 404.