

团体标准

T/ NAIA×××-××××

功能性饮料中维生素 B12 的测定 液相色谱-质谱/质谱法

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

宁夏化学分析测试协会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定编写。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏菲杰特检测有限公司、宁夏化学分析测试协会。

本文件主要起草人：张海星、李亚辉、朱斐全、张金霞、张小飞。

功能性饮料中维生素 B₁₂ 的测定

液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了功能性饮料中维生素 B₁₂ 的测定方法

本标准适用于功能性饮料食品中维生素 B₁₂ 的测定

本方法功能性饮料取样量为 50g 时，方法检出限为 3.0ug/kg。

2 原理

采用 VB₁₂ 免疫亲和和液相色谱-质谱法对试样提取液中维生素 B₁₂ 进行富集并去除部分杂质超高效液相色谱-质谱/质谱法分析。

3 试剂

除另有规定外，均要求试剂为分析纯试剂。实验室用水均为一级水，电导率 25 摄氏度时为 0.01ms/m。

3.1 甲醇（色谱纯）

3.2 乙酸铵（色谱纯）

3.3 氢氧化钠

3.4 一水合柠檬酸

3.5 磷酸二氢钾

3.6 乙醇

3.7 磷酸缓冲液（PH6.5）：称取 0.68g 磷酸二氢钾，加 0.1mol/l 氢氧化钠 15.2ml，再用水稀释至 100ml。

3.8 维生素 B₁₂ 标准品：纯度 ≥99%。

3.9 维生素 B₁₂ 标准储备液：称取维生素 B₁₂ 标准品 10mg（精确至 0.1mg），用 5%乙醇溶解，并定容至 10ml 棕色容量瓶中，摇匀，冷藏保存。

3.10 维生素 B₁₂ 标准中间液：精密移取 0.1ml 维生素 B₁₂ 标准储备液于 100ml 容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀既得 1ug/ml 的标准中间液。

3.11 维生素 B₁₂ 标准系列：分别精密移取一定量的维生素 B₁₂ 标准中间液于 10ml 容量瓶中，用水定容至刻度，配成 0.5、1.0、10.0、20.0、50.0、200.0ng/ml 的标准系列溶液。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱-质谱/质谱仪

4.2 超声波清洗机

4.3 离心机：16000r/min

4.4 免疫亲和净化柱：维生素 B₁₂ 免疫亲和柱。

5 分析步骤

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

5.2 果粒或果汁型功能性饮料：用 1mol/L 氢氧化钠调 pH 至 7.0，置离心机中以转速 4000r/min 离心 10min,过滤，滤液待用。

5.3 称取试样 50g 样品于 250mL 容量瓶中，加入 100mL 水，振摇混匀，将其置于超声波清洗器中，超声提取约 15min 后用水定容。（如样品溶液的 pH 在 7.0 以上，用柠檬酸调节 pH 在 5.0（±1）之间；如样品溶液的 pH 在 4.5 以下，则应用磷酸盐缓冲液代替水作为提取液并重复上面步骤。

5.4 富集、净化

维生素 B₁₂ 免疫亲和净化柱先用 10mL 水淋洗小柱中未键合的化合物，吸取 20mL (5.3) 提取液上样到净化柱上，再用 3mL 甲醇洗脱维生素 B₁₂ 至蒸发皿中，整个过程速度约为 1 滴/s。于 60°C~70°C 水浴中蒸干溶剂，用 1ml(2+98)(甲醇+10mmol/L 乙酸铵)溶液溶解，溶液过 0.45m 水系滤膜，待高效液相色谱-质谱/质谱仪用。

5.3 液相色谱参考分析条件

5.3.1 色谱柱：C18 (5mm×150mm×2.7um) 反向色谱柱

5.3.2 流动相：梯度洗脱

T/min	A (甲醇) %	B (10mmol/L 乙酸铵) %
0	2	98
2	2	98
6	40	60
6.2	100	0
7.0	2	98
15	2	98

5.3.3 流速：300ul/min.

5.3.4 柱温 35°C。

5.3.5 进样量 10ul。

5.4 质谱条件仪条件

5.4.1 离子源：ESI 离子源

5.4.2 气流量：11L/min

5.4.3 压力 35Pa

5.4.3 扫描模式：正离子扫描

5.4.4 反应模式：MRM

6 结果计算

按式 (1) 计算试样中维生素 B₁₂ 的含量。

$$X = \frac{V_1 \times V_3}{V_2 \times m} \times C \quad (1)$$

X-试样中维生素 B12 的含量，单位为 ug/Kg;

V1-提取液体积 (ml)

V2-分取体积 (ml)

V3-最终定容体积 (ml)

M-样品称样量 (g)

C-曲线查得维生素 B12 的含量 (ng/ml)

计算结果保留两位有效数字。

7 精密度

重复性条件下测得两次独立的结果，其相对偏差不得超过 10%;

8 色谱图见方法验证报告