

CCD - 二极管阵列分光光度法同时测定食品中的 维生素 B₁ 和维生素 B₂

刘红河¹ 黎源倩²

(1. 深圳市疾病预防控制中心, 广东 深圳 518020; 2. 四川大学华西公共卫生学院, 四川 成都 610041)

摘要:为建立一种同时测定食品中维生素 B₁ 和维生素 B₂ 的简单快速的方法,在氢氧化钠和碳酸氢钠混合溶液缓冲介质中,对氨基苯磺酸重氮盐与维生素 B₁ 发生偶氮反应,维生素 B₂ 不发生反应,采用电感耦合二极管阵列检测装置进行检测,用偏最小二乘法解析重叠光谱,从而实现了食品中维生素 B₁、维生素 B₂ 的同时测定。方法的线性范围维生素 B₁ 和维生素 B₂ 分别为 0~0.050 mg/mL 和 0~0.10 mg/mL;检出限分别为 0.007 2 mg/mL 和 0.008 5 mg/mL。平均加标回收率维生素 B₁ 为 87.3%~105.4%,维生素 B₂ 为 90.0%~104.9%;相对标准偏差维生素 B₁ 为 3.6%~9.1%,维生素 B₂ 为 4.7~8.0%。该方法简单、快速、测定干扰小,结果与国家标准测定方法的差异无显著性。

关键词:硫胺素;核黄素;分光光度法

Simultaneous spectrophotometric determination of vitamin B₁ and vitamin B₂ in food by charge-coupled device-diode array detection

Liu Honghe, et al.

(Shenzhen Municipal Center for Disease Prevention and Control, Guangdong Shenzhen 518020, China)

Abstract: Objectives: To search for a simple, rapid method for simultaneous determination of vitamin B₁ and vitamin B₂ in foods. Methods: CCD diode array detection-spectrophotometric setup was established for simultaneous determination of vitamin B₁ and vitamin B₂ with azo-reaction between diazosalts of sulfanilic acid and vitamin B₁ in solution of NaOH and NaHCO₃. Results: The linear range of vitamin B₁ and vitamin B₂ was 0~0.050 mg/mL and 0~0.10 mg/mL, respectively. The detection limit was 0.007 2 mg/mL for vitamin B₁ and 0.008 5 mg/mL for vitamin B₂. The recovery of spiked samples was from 87.3% to 105.4%, and the relative standard deviation was less than 9.1%. Conclusions: The method was proved to be more simple, more rapid and less interfered by metal ions. The results obtained checked very well with that by standard method.

Key Words: Thiamine; Riboflavin; Spectrophotometry

目前食品中维生素 B₁、维生素 B₂ 测定方法主要有分光光度法、荧光光度法、电化学法、薄层色谱法和高效液相色谱法等。^[1] 维生素 B₁ 和维生素 B₂ 同时测定主要采用高效液相色谱法和毛细管电泳法,^[2]但仪器设备昂贵,难于普及;分光光度法是目前应用最广泛的分析方法之一,但维生素 B₁、维生素 B₂ 之间吸收峰重叠严重。食品中维生素 B₁、维生素 B₂ 的含量很低且共存物质干扰严重,本文采用层析柱对样品中维生素 B₁、维生素 B₂ 进行富集并

消除其他共存干扰物质,采用对氨基苯磺酸重氮盐显色,采用电荷偶合器件(Charge coupled device, CCD)二极管阵列检测装置代替传统分光光度计中的波长选择装置及光电倍增管,用偏最小二乘法(PLS)解析重叠光谱对食品中维生素 B₁、维生素 B₂ 进行同时测定,取得了满意的结果。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 CCD - 二极管阵列分光光度装置(附专用计算机,自行组装,其中 CCD 芯片:TCD142D, TOSHIBA)。pHS - 4C 型酸度计。

对氨基苯磺酸重氮盐 按文献[3]配制。

作者简介:刘红河 男 主管技师

NaHCO₃ + NaOH(1 + 0.5) 溶液:称取 3.2 g NaOH,4.2 g NaHCO₃,重蒸水溶解后稀释至 100 mL。1 g/L EDTA - 2Na:称取 0.1 g EDTA - 2Na,重蒸水溶解并稀释至 100 mL。洗脱液:乙醇 + 冰乙酸 + 200 g/L KCl 溶液(5 + 2 + 9)。

维生素 B₁ 标准储备液称取 0.0100 g 维生素 B₁,用少量 0.01 mol/L HCl 溶液溶解后,转移到 10 mL 容量瓶,以 0.01 mol/L HCl 溶液定容至刻度,冰箱避光保存。

维生素 B₁ 标准应用液 取 1.0 mL 标准储备液用重蒸水稀释至 10 mL。

维生素 B₂ 标准溶液 称取 0.0100 g 维生素 B₂,用少量 0.01 mol/L 乙酸溶液溶解后,转移到 100 mL 容量瓶,以 0.01 mol/L 乙酸溶液定容至刻度,混

匀,冰箱中避光保存。

硅镁吸附剂(北京化学试剂厂),用前先用洗脱液浸泡过夜,再用重蒸水反复洗涤备用。

1.2 方法

1.2.1 标准校正集吸光度矩阵的建立 按正交设计分别吸取适量维生素 B₁ 及维生素 B₂ 标准溶液于 16 支 10 mL 比色管中(见表 1),配成混合标准溶液,依次加入对氨基苯磺酸重氮盐 0.5 mL,EDTA - 2Na 溶液 1.0 mL,再加入 1.0 mL NaHCO₃ + NaOH 混合碱溶液,用水稀释至刻度,摇匀。用 1 cm 比色皿,以试剂空白为参比,测定其在 400 ~ 570 nm 范围的吸收光谱。然后用 C 语言编制的程序每隔 5 道(0.75 nm)读取光谱图上 190 nm 波长处的吸光度值,得到标准校正集的吸光度矩阵。

表 1 标准校正集浓度配比

管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
维生素 B ₁	0.01	0.03	0.02	0.04	0.01	0.03	0.02	0.04	0.01	0.03	0.02	0.04	0.01	0.03	0.02	0.04
维生素 B ₂	0.02	0.04	0.04	0.02	0.03	0.01	0.01	0.03	0.01	0.03	0.03	0.01	0.04	0.02	0.02	0.04

1.2.2 校正曲线制做 取 6 支 10 mL 比色管,分别加入维生素 B₁ 标准应用液 0.0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL 及维生素 B₂ 标准应用液 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,加入 4 mL 洗脱液,加入 1 mL 10 mol/L NaOH 溶液摇匀,以中和洗脱液中乙酸。按标准校正集测定步骤测定吸光度,分别以维生素 B₁ 和维生素 B₂ 浓度与相应的吸光度绘制校正曲线。

1.2.3 试样分析 称取一定量的试样(含维生素 B₁ 或维生素 B₂ 约 5 ~ 60 μg) 转移入 100 mL 容量瓶中,加入 15 mL 0.1 mol/L HCl 溶液,混匀,超声振荡 30 min,然后置于沸水浴中 30 min,取出放冷至室温,定容至刻度,混匀,离心取一定量上清液于烧杯中,滴加 5% KMnO₄ 溶液至溶液变红,再滴加 H₂O₂ 使红色褪去,振摇使气体尽量逸去,用中速滤纸过滤,收集滤液。

用少许脱脂棉铺于盐基交换管的交换柱底部,用湿法装柱法将适量经过处理的硅镁吸附剂装于盐基交换管,勿使管内产生气泡。将上面收集的滤液过柱,并用重蒸水洗涤数次,弃去洗液。然后用 4 mL 洗脱液分 4 次将试样中维生素 B₁ 及维生素 B₂ 洗脱并收集于一带盖 10 mL 比色管中,再用少量水洗吸附柱,收集洗出之液体,加入 1 mL 10 mol/L NaOH 溶液,摇匀。按标准校正集测定步骤建立试样的吸光度矩阵,然后采用 Metlab 语言编制的 PLS 程序由计算机计算出试样中待测元素含量。

2 结果与讨论

2.1 二极管阵列分光光度装置 自行研制的 CCD - 二极管阵列分光光度装置由 7 个部分组成。它的结构如图 1 所示。



图 1 CCD - 二极管阵列分光光度检测装置示意图

2.2 试验条件的优化

2.2.1 酸度的影响 分别取维生素 B₁ 及维生素 B₂ 标准应用液 0.2 mL 于若干支 10 mL 比色管中,各加入 0.5 mL 重氮盐,然后加入 0.5 mol/L NaHCO₃ 溶液 1 mL,分别加入 1 mol/L NaOH 溶液 0.0 ~ 1.0 mL,定容至刻度,混匀后采集吸收光谱,测定最大吸收波长处吸光度。NaOH 加入量在 0.3 ~ 0.7 mL 时两种维生素的吸光度最大且稳定,考虑到 pH 过高,试样中金属离子将出现沉淀而产生干扰,本法选用 NaOH 溶液加入量 0.4 mL。考虑加样方便,将 NaOH 和 NaHCO₃ 配成混合碱溶液(含 0.8 mol/L NaOH 及 0.5 mol/L NaHCO₃)。

2.2.2 显色剂用量 分别取维生素 B₁ 及维生素 B₂ 标准应用液 0.2 mL 于若干支 10 mL 比色管中,固定其他试剂用量,改变对氨基苯磺酸重氮盐的加入量,分别采集维生素 B₁ 和维生素 B₂ 的吸收光谱,测定它们的吸光度。对氨基苯磺酸重氮盐的用量在 0.2 ~ 0.6 mL 时维生素 B₁ 的吸光度最大且稳定,而显

色剂的加入量对维生素 B₂ 的吸光度无影响。考虑到同时测定,显色剂用量选取 0.5 mL。

2.2.3 偏最小二乘法(PLS)的计算参数选择 在 NaOH+NaHCO₃ 的碱性条件下,维生素 B₁ 和对氨基苯磺酸重氮盐形成稳定的配合物,其最大吸收波长为 485 nm;维生素 B₂ 则不发生反应,可利用其本身的颜色定量。但其在 485 nm 处有较大吸收。致使两者吸收光谱重叠较严重,用普通分光光度法难于测定,本法采用 PLS 解析两组分的光谱,效果较好。

分别采用 5 组均匀设计、7 组均匀设计、9 组正交设计和 16 组正交设计作为标准校正集对混合标准溶液进行试验,并对吸光度测定点进行了试验,分别取 80、100、150、190 nm 波长处的吸光度形成的吸光度矩阵进行运算,以计算结果和实际加入量的相对误差来衡量其优劣。结果显示,采用 16 组正交设计,在 400~570 nm 范围内等距离选择 190 个波长处的吸光度进行 PLS 运算,其相对误差最小。

2.2.4 洗脱液洗脱效果试验 配制 5 种不同浓度的两组混合标准液,一组直接测定,一组通过硅镁吸附剂柱后采用不同洗脱液洗脱后进行比色测定。比较了丙酮+冰乙酸+水,含 0.1 mol/L HCl 的 250 g/L KCl 溶液,丙醇+冰乙酸+水,无水乙醇+冰乙酸+水及无水乙醇+冰乙酸+200 g/L KCl 的洗脱效果,测定结果表明,采用无水乙醇+冰乙酸+200 g/L KCl(比例为 5+2+9),两组浓度值的相对误差为 -8.3%~7.7%,可以认为吸附洗脱效率达到 90% 以上,故采用该洗脱液洗脱并用标准系列代替通过硅镁吸附剂柱的工作系列作为标准校正集。

2.3 干扰消除 在本法反应条件下,样品中共存的大多数金属离子都将产生沉淀甚至显色而对测定造成干扰,经加入 0.1 g/L EDTA 溶液 1.0 mL 后,至少 1 000 倍的 Sn²⁺、Ni²⁺、Sb³⁺、Ca²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、F⁻、Co²⁺、Al³⁺、Cd²⁺、Cu²⁺、Ge²⁺、Ba²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺、Pb²⁺、Se()、亚硝酸盐、柠檬酸及酒石酸等不产生干扰;维生素 C 对测定有干扰,在试样处理时已通过高锰酸钾破坏除去。

2.4 方法的线性范围和检出限 在选定的条件下,分别绘制维生素 B₁ 和维生素 B₂ 的校正曲线。维生素 B₁ 的线性回归方程为 $y = 0.79x - 0.0039$,相关系数 $r = 0.9994$,线性范围为 0~0.050 mg/mL;维生素 B₂ 的线性回归方程为 $y = 0.46x + 0.0063$,相关系数 $r = 0.9994$,线性范围 0~0.10 mg/mL (y 表示吸光

度, x 表示待测组分浓度)。

以不加维生素 B₁ 和维生素 B₂ 标准品的试剂空白按试样测定方法连续测定 10 次,以其吸光度的 10 倍标准差所对应的浓度作为方法的检出限,维生素 B₁ 的最低检出限为 7.2 μg/mL,维生素 B₂ 为 8.5 μg/mL。

2.5 方法的准确度和精密度 称取一定量的黄豆、绿豆、大米、面粉和奶粉试样,按测定方法进行加标回收试验,结果见表 2。

分别用本法和国家卫生标准方法(荧光分光光度法)^[4]测定粮食试样中维生素 B₁ 和维生素 B₂ 的含量($n = 4$)。本法测定大米中的维生素 B₁ 和维生素 B₂ 的含量分别为 0.60 mg/100 g 和 0.33 mg/100 g;荧光法测定维生素 B₁ 和维生素 B₂ 含量分别为 0.61 mg/100 g 和 0.31 mg/100 g。本法测得的维生素 B₁ 和维生素 B₂ 的相对标准差分别为 1.6% 和 6.5%。由此可见,本法的测定结果和国家卫生标准方法的结果基本一致。

表 2 加标回收试验($n = 6$)

样品	待测成分	mg/100 g			回收率 %	RSD %
		本底值	加标量	测得值		
黄豆	维生素 B ₁	2.15	3.08	4.84	87.3	7.0
	维生素 B ₂	1.09	3.08	4.15	99.4	5.3
绿豆	维生素 B ₁	3.81	3.50	7.50	105.4	3.6
	维生素 B ₂	2.25	3.50	5.74	99.7	4.7
大米	维生素 B ₁	0.60	0.30	0.88	93.3	4.4
	维生素 B ₂	0.33	0.30	0.60	90.0	6.6
面粉	维生素 B ₁	2.87	3.08	5.81	95.5	7.1
	维生素 B ₂	1.94	3.08	5.17	104.9	8.0
奶粉	维生素 B ₁	0.03	3.08	2.80	89.9	9.1
	维生素 B ₂	1.34	3.08	4.51	102.9	6.9

参考文献:

- [1] 聂洪勇,黄伟坤,唐英章,等主编.维生素及其分析方法[M].上海:上海科学技术文献出版社,1987,121.
- [2] 叶飞云,张君倩,严健,等.水溶性维生素的毛细管电泳测定[J].中国医药工业杂志,2000,9:405.
- [3] 李如亮,主编.生物化学实验[M].武汉:武汉大学出版社,1998,193.
- [4] 杨惠芬,李明元,沈文,主编.食品卫生理化检验手册[M].北京:中国标准出版社,1997:77.

[收稿日期:2002-12-17]

中图分类号:R15;O657.32;Q56

文献标识码:B

文章编号:1004-8456(2003)06-0508-03