

光黄素荧光法测定保健食品中的维生素 B₂ 的方法研究

王永芳¹ 韩宏伟¹ 赵 馨¹ 杨大进¹ 李 敏²

(1. 卫生部食品卫生监督检验所, 北京 100021; 2. 辽宁省食品卫生监督检验所, 辽宁 沈阳 110005)

食品中天然存在的维生素 B₂ 一般呈结合形式, 与磷酸和蛋白等结合成复合化合物。此种结合型维生素 B₂ 对光比较稳定。国标法测定维生素 B₂ 即是针对食品中天然存在的维生素 B₂ 而制定的,^[1] 由于食品成分比较复杂, 试样处理繁琐费时。而保健食品中的维生素 B₂ 大多以游离形式存在, 且试样成分相对简单, 如采用国标法测定既耗时又费试剂。游离维生素 B₂ 对光极为敏感, 光照下即分解产生光黄素。^[2] 本文参考日本卫生试验法食品中维生素 B₂ 的测定方法,^[3] 利用维生素 B₂ 分解为光黄素这一反应, 以光黄素荧光法定量测定保健食品中的维生素 B₂ 含量, 方法简便、快速, 且准确度及精密度都能满足分析要求。

1 材料和方法

1.1 试验原理 试样经提取后, 游离维生素 B₂ 在碱性条件下被光分解为光黄素, 加高锰酸钾除去有机质后, 用三氯甲烷提取生成的光黄素, 在激发光波长 450nm、发射光波长 510nm 下测定其荧光强度, 在一定范围内荧光强度与维生素 B₂ 的浓度成正比, 与标准比较定量。

1.2 仪器与试剂 荧光分光光度计, 岛津 RF-5301, 岛津公司生产; 氢氧化钠溶液(8 g/100 mL); 高锰酸钾溶液(4 g/100 mL); 冰醋酸; 过氧化氢; 三氯甲烷; 以上试剂均为分析纯或优级纯。

维生素 B₂ 标准溶液 准确称取 0.050 g 维生素 B₂ 标准品, 加入 0.1% 的磷酸 300 mL, 边加温边超声溶解, 冷却后用 0.1% 磷酸定容至 500 mL。此液每毫升含维生素 B₂ 100 μg。装入棕色瓶于冰箱保存。用时用水稀释成 4 μg/mL 的溶液。

1.3 方法 试样处理: 称取适量研细的试样(维生素 B₂ < 40 μg)于 10 mL 离心管中, 加入 10 mL 去离子水, 充分摇匀后置于超声波内超声 15 min, 然后离心 10 min(3 000 r/min)。取上清液待测。

试样测定 取上清液 2 mL 于 25 mL 比色管中, 加 2 mL 氢氧化钠溶液, 摇匀, 于灯光(100 W 白炽灯泡, 距离 25 cm)下照射 30 min 后, 加 0.5 mL 的冰醋酸, 摇匀。此为试样 T 管; 同时另取上清液 2 mL 于另一 25 mL 的比色管中, 先加 0.5 mL 的冰醋酸, 混匀, 再加 2 mL 的氢氧化钠溶液, 混匀于暗处放置 30 min, 此为试样空白 T' 管。

分别往 T、T' 管中加入高锰酸钾溶液 0.1 mL, 摇匀, 放置片刻后, 加过氧化氢 3 滴, 摇动使之褪色, 然后加 10 mL 的三氯甲烷, 剧烈振摇 1 min, 静置分层后, 取三氯甲烷层, 于激发光波长 450 nm 处发射光波长 510 nm 处测其荧光强度。

标准溶液的测定 取 2 mL 维生素 B₂ 标准溶液(做与试样含量相近的一点, 并做平行双样)于 25 mL 的比色管内, 同时做标准 T 和空白 T' 管, 以下操作同试样测定。

1.4 计算
$$X = \frac{T - T'}{T_B - T_B'} \times S \times \frac{V}{m}$$
 X: 试样中维生素 B₂ 含量, μg/g; T, T': 试样管及试样空白管的荧光强度; T_B - T_B': 标准及标准空白管的荧光强度; S: 标准溶液加入量, μg; V: 试样定容体积, mL; m: 试样取样量, g。

2 结果与讨论

2.1 荧光物质的激发和发射光谱 维生素 B₂ 溶于水不溶于有机溶剂, 其水溶液发出强烈荧光, 但加入氢氧化钠后, 荧光即消失。维生素 B₂ 分解产生的光黄素溶于三氯甲烷, 其溶液具有较强的荧光发射, 如图 1 所示。在最佳激发波长 450 nm 处最大发射波长为 510 nm。

2.2 pH 值对荧光强度的影响 由于维生素 B₂ 是在碱性条件下分解为光黄素, 因此氢氧化钠的加入量将直接影响其反应速度。试验取 4 μg 的维生素 B₂ 标准溶液, 分别加入不同量的氢氧化钠溶液, 光照 30 min, 各加入 0.5 mL 的冰醋酸后, 测量反应液 pH 值, 然后继续试验, 最后测定荧光强度。结果见表 1。

加入 5 mL 氢氧化钠溶液时, 氢氧化钠已经过量, 溶液呈现碱性, 已不符合本试验要求。加入冰醋酸是为了将溶液转化为酸性, 因为高锰酸钾氧化有机质的反应必须在酸性条件下进行。当氢氧化钠加入量小于 4.0 mL 时, 加入 0.5 mL 冰醋酸溶液均能转化为酸性。本文选择加入 2.0mL 的氢氧化钠, 其荧光强度已基本达到最大值, 且 pH 值也符合本试验要求。

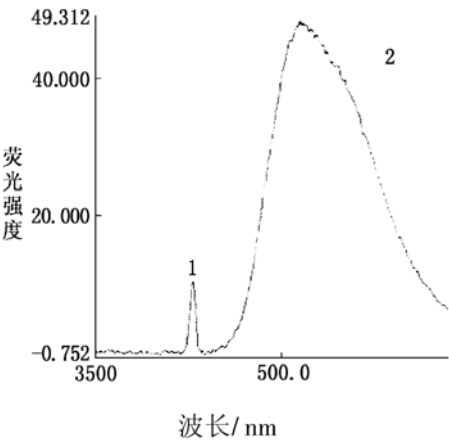


图 1 光黄素的荧光光谱
1 为激发光谱 2 为发射光谱

表 1 pH 值对荧光强度的影响

氢氧化钠加入量 mL	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
pH	3.0	3.5	4.5	5.5	6.0	8.5
荧光强度	13.268	13.749	14.174	14.181	14.201	-

2.3 光照强度及照射时间对荧光强度的影响 由于维生素 B₂ 在光的照射下分解为光黄素, 所以光照强度和光照时间直接影响荧光强度。试验分别取 8 μg 的维生素 B₂ 标准溶液, 于不同强度灯光及日光下在不同照射时间内其荧光强度的变化结果见表 2。

表 2 光照强度及时间与荧光强度的关系

光源	时间 min					
	10	20	30	40	50	60
60W 灯泡	10.258	20.390	26.544	28.542	29.696	31.533
100W 灯泡	22.238	29.792	31.404	31.988	31.977	32.044
日光 20℃	4.969	8.472	14.999	18.728	22.619	28.245

由上表可见, 日光照射反应缓慢, 60 min 内未反应完全。而灯光照射强度越大, 反应速度越快。60 W 灯泡照射约需 50~ 60 min 才能达到最大荧光强度, 而 100 W 灯泡只需 20~ 30 min 即可。由于日光受客观条件影响, 每次测定的光照强度不易统一。本文选择试验条件为 100W 灯光照射 30 min。

2.4 稳定性试验 游离维生素 B₂ 非常不稳定, 遇光即分解。但分解生成的光黄素却非常稳定, 试验表明光黄素的三氯甲烷溶液放置 60 min 内, 荧光强度不变, 这对测定是有利的。

2.5 校正曲线和线性范围 在上述条件下荧光强度与维生素 B₂ 浓度在 0.8~ 8 μg 范围内呈现良好的线性关系, 相关系数 $r = 0.9997$ 。

2.6 方法精密度 对标准溶液 0.8 μg 和 4 μg 进行多次重复测定的结果见表 3。

2.7 方法准确度 对试样进行加标回收试验, 加标量为 0.5~ 4.0 μg, 平均回收率为 96.5%~ 101.9%。具体结果详见表 4。

表 3 精密度试验结果

维生素 B ₂ 含量 μg	测定次数 <i>n</i>	平均荧光 强 度	相对标准 偏差 %
0.8	9	1.209	6.6
4.0	11	15.199	2.8

表 4 准确度试验结果

加标量 μg	实测量 μg	回收率 %	平均回收率 %	<i>n</i>
0.5	0.487~0.520	97.4~104.0	101.9	6
0.8	0.785~0.810	98.1~101.2	99.8	6
1.6	1.490~1.660	93.1~97.5	96.5	5
4.0	3.550~3.850	93.8~99.2	95.7	5

3 小结 本方法简便,快速,灵敏度高,其精密度和准确度均达到分析要求。适合保健食品中维生素 B₂ 的测定。

参考文献:

[1] GB 12391-90. 食品中核黄素的测定方法[S]

[2] 张宏祥译. 日本药学会编著. 食品添加剂公定书—注释. 解说[M]. 第6版. 1997

[3] 张宏祥编译. 卫生试验法—注解[M]. 华文出版社, 1995

中图分类号: O657.3; TS218 文献标识码: B 文章编号: 1004—8456(2000)02—0020—03

反相高效液相色谱法测定猪肝中盐酸特仑克罗

赵 榕 吴国华 涂晓明

(北京市卫生防疫站, 北京 100013)

盐酸特仑克罗(Clenbuteroli Hydrochloridum), 分子式为 C₁₂H₁₈Cl₂N₂O·HCl, 化学名称为 α-[(叔丁氨基)甲基]-4-氨基-3,5-二氯苯甲醇盐酸盐, 是一种 β₂ 肾上腺受体激动药。在临床用于治疗哮喘。目前我国还没有批准在动物中使用。但猪肝中残留的盐酸特仑克罗引起的食物中毒屡有发生。目前未见分析方法的报道。我们建立了食物中毒试样—猪肝中盐酸特仑克罗的反相高效液相色谱测定法。现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 高效液相色谱系统: Waters—alliance 高效液相色谱系统, 配有 Waters—2690 泵控及自动进样系统, Waters—996 二极管阵列检测器, Millennium32 数据处理系统。离心机。甲醇 色谱纯。色谱条件

Shim-packCLC—ODS 色谱柱(岛津), 4.6 × 200 mm; 检测波长: 243 nm; 流速: 1.0 mL/min; 流动相: 0.01 mol/L 磷酸二氢钠水溶液: 甲醇= 65: 35。

1.2 实验方法

1.2.1 试样制备 取打碎混匀的试样 2.0 g 于 10 mL 比色管中, 加 60% 乙醇 4.0 mL 浸泡过夜, 转移提取物和内容物于离心管中; 4 000 r/min 离心 10 min; 转移上清液至另一比色管中。于离心管中再加入 60% 乙醇 4.0 mL, 搅拌残渣, 再在 4 000 r/min 离心 10 min; 合并上清液。再一次加入 60% 乙醇 2.0 mL, 重复同样操作, 合并上清液。根据试样含量进行适当浓缩。

1.2.2 色谱分析 分别取标准以及试样提取液 10 μL 进样。根据保留时间和扫描光谱定性, 试样峰高与标准峰高比较定量。

1.2.3 结果计算 $X = \frac{A \times V}{W \times N}$ 式中: *X* 为试样中盐酸特仑克罗含量, mg/kg; *A* 为试样测定液中盐酸特仑克罗的浓度, μg/mL; *V* 为提取液的体积, mL; *W* 为试样重量, g; *N* 为测定液浓缩倍数。