

小米中 V_{B1} 的超声提取及高效液相色谱分析

李玉明^{1,2}, 屈景年^{1,2}, 赵静¹

(1. 衡阳师范学院化学与材料科学系, 湖南, 衡阳, 421008;

2. 功能金属有机材料湖南省普通高等学校重点实验室, 湖南, 衡阳, 421008)

摘要: 小米营养价值高, 富含维生素 $B1(V_{B1})$ 、胡萝卜素、氨基酸等, 其中 V_{B1} 的含量位居所有粮食之首。不仅营养丰富, 而且具有很高的药用价值, 具有养肾、健胃消食、安神、优生、延缓衰老等药用功效。维生素 $B1(V_{B1})$ 为抗神经炎维生素, 又称硫胺素, 是机体维持正常代谢和机能所必需的低分子有机化合物之一, 在医药及营养保健方面的用途十分广泛。 V_{B1} 的分析方法有多种, 但这些方法往往操作要求非常高或精密度不高, 不适用于分析小米中的 V_{B1} ; 而高效液相色谱法在维生素分析中有重要优势, 选择性好, 操作简便, 柱效高, 线性关系和精密度均好, 可以准确地测定出小米中 V_{B1} 的含量。本研究采用超声波提取法从小米中提取 V_{B1} , 通过高效液相色谱法, 探究小米中 V_{B1} 的最佳分析条件。通过大量的实验研究, 表明以甲醇:水=3:7 的混合液为流动相, 流动相的流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 265 nm, 柱温在 25℃ 为高效液相色谱分析小米中 V_{B1} 的最佳条件, 所建立的标准曲线具有良好的线性关系, 其相关系数 $R^2 = 0.999$ 。在此条件下分析 V_{B1} 的稳定性、小米中 V_{B1} 的含量、回收率和重复性。其平均回收率为 99.57%, 重复性相对标准偏差小于 1.11%; 测得小米中 V_{B1} 的含量为 0.35 mg/100 g。所建立的方法简单、快速、准确度高, 适宜小米中 V_{B1} 的分析研究。

关键词: 小米; V_{B1} ; 超声提取; 高效液相色谱法; 分析

中图分类号: TQ015.9; TP391.9; O6-39

文献标识码: A

文章编号: 1001-4160(2011)06-787-789

1 引言

小米又名粟, 古代叫禾, 是1种有着很高的营养价值和药用价值的粮食。小米富含维生素 $B1(V_{B1})$ 、胡萝卜素、氨基酸等, 其中 V_{B1} 的含量位居所有粮食之首。

V_{B1} 为抗神经炎维生素, 是人体生长和发育不可或缺的重要营养元素, 是机体维持正常代谢和机能所必需的低分子有机化合物之一。 V_{B1} 的提取方法有多种, 本研究采用超声波提取法从小米中提取 V_{B1} 。 V_{B1} 的主要分析方法^[1]有: 紫外分光光度法、荧光法^[2]、电化学法、偶氮染料比色法和高效液相色谱法(HPLC)等方法。由于 V_{B1} 本身没有荧光, 必须先将其氧化为硫色素才能进行荧光测定, 操作要求非常严格, 才能获得较满意的结果, 故荧光法不适用于分析小米中的 V_{B1} 的含量, 紫外分光光度法与偶氮染料比色法主要用于测定杂质含量较少的样品, 且精密度不高, 也不适用于分析小米提取液。同其他分离技术相比较, 液相色谱法在维生素分析中有重要优势^[3-6], 选择性好, 操作简便, 柱效高, 线性关系和精密度均好, 可以准确地测定出小米中 V_{B1} 的含量。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

LC-10Avp 高效液相色谱仪 (shim pack VP-ODS 柱 150×6.0 mm, 5 μ m), 日本岛津公司; AS3120 超声波脱气装置, 奥特赛恩斯仪器公司; AP-01 真空抽滤装置, 奥

特赛恩斯仪器公司; 电子分析天平, 梅特勒-托利多公司; TG1-16GA 台式高速离心机, 湖南星科科学仪器有限公司。

甲醇: 色谱纯, 天津巴斯夫化工厂; V_{B1} : 分析纯, 上海蓝季科技发展有限公司; 草酸: 分析纯, 沈阳医药公司; 纯水: 自制; 小米: 市售。

2.2 流动相、标液和样品溶液的配制

称取 1.000 g 的草酸溶于 2000 ml 纯水中, 摇匀, 用 0.45 μ m 微孔滤膜真空抽滤, 超声波脱气, 待用。将甲醇与含 0.5% 草酸的纯水按不同体积比分别混合, 超声波脱气, 作为流动相, 待用。

称取一定量的 V_{B1} 标准品, 用纯水溶解, 配制浓度分别为 0.02 mg/ml、0.04 mg/ml、0.06 mg/ml、0.08 mg/ml、0.10 mg/ml 的 V_{B1} 标准溶液, 用 0.45 μ m 微孔滤膜真空抽滤, 超声波脱气, 放置在避光处备用。

称取小米 10.00 g, 研磨成粉, 加入一定量的纯水和 50 ml 甲醇, 于室温下超声波提取 60 min, 将提取液高速离心分离 20 min, 取其清液, 再用 0.45 μ m 微孔滤膜抽滤, 然后将滤液倒入 100 ml 的容量瓶里, 定容, 超声波脱气, 作为样品溶液, 待用。

2.3 实验方法

设置液相色谱仪各条件, 用流动相走基线, 待基线平稳后, 取 5 μ l 系列浓度标准溶液进样, 测出峰面积, 得出线性回归方程, 比较出峰情况和回归方程, 确定最

收稿日期: 2011-03-16; 修回日期: 2011-05-11

基金项目: 衡阳市科技计划项目 (2010kn17)

作者简介: 李玉明(1978—), 男, 江西赣州人, 硕士, 讲师, E-mail: luck53681@sina.com.

佳分析条件^[7-9]。然后进行小米样品的含量、重复性、回收率分析。

3 结果与讨论

3.1 检测波长的确定

以纯水与甲醇比例为 7:3 作流动相, V_{B1} 的浓度为 0.06 mg/ml, 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 25℃ 的条件下分别在 255 nm、265 nm、275 nm、285 nm 等一系列波长处对标液进行测定, 结果显示在波长 265 nm 处峰面积最大, 吸收峰最高, 波形最好。因此, 确定以 265 nm 作为 V_{B1} 的检测波长。

3.2 V_{B1} 稳定性实验

将浓度为 0.01 mg/ml 的 V_{B1} 标液, 在室温下分别敞开放置(0、24、48、72) h, 各取 5 μ L 在最佳分析条件下测其浓度, 计算保存率, 分析其稳定性。实验结果表明, V_{B1} 在空气中性质不稳定, 容易分解, 敞开放置一天, V_{B1} 即将损失一半, 所以 V_{B1} 不宜长时间露置在空气中。

将浓度为 0.01 mg/ml 的 V_{B1} 标液, 分别日照(0、5、10、20) min, 按同样的方法分析 V_{B1} , 发现 5 分钟后 V_{B1} 的保存率小于 6.4%, 在日照情况下 V_{B1} 极不稳定, 以极快的速度分解, 故应避光存放。

3.3 最佳分析条件的确定和样品测定

在检测波长为 265 nm, 柱温为 25℃ 下用不同流动相和不同流速分析 V_{B1} 标液, 以甲醇:纯水=3:7 的混合液做流动相, 流动相速度为 1.0 ml/min 时峰面积-浓度回归曲线相关系数 $R^2 = 0.999$, 回归线方程为: $y = 1 \times 10^7 x - 105182$ (见图 1)。通过比较峰形、半峰宽及线性回归方程相关系数 R^2 的大小, 发现以甲醇:纯水=3:7 的混合液做流动相时其色谱峰峰形更好、峰高更高、半峰宽较窄, 说明此条件下出峰情况最好; 其线性相关系数 R^2 值最大, 更接近 1, 说明此条件下曲线相关性最好。

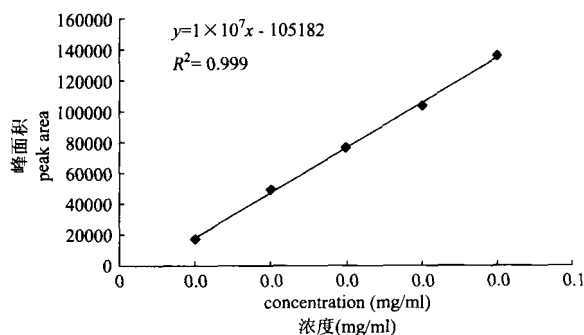


Fig.1 The regression curve of vitamin B1 standard solution concentration with peak area under the best conditions.

图 1 最佳条件下 V_{B1} 标液浓度与峰面积的回归曲线

因此, 得出分析小米中 V_{B1} 的最佳条件为: 流动相为甲醇:水=3:7 的混合液, 检测波长为 265 nm, 流动相速度为 1.0 ml/min, 柱温为 25℃。在最佳分析条件下, 测

得小米样品溶液 (见图 2) 的 V_{B1} 质量浓度为 0.35 μ g/ml, 则小米中 V_{B1} 的含量为 0.35 mg/100 g。

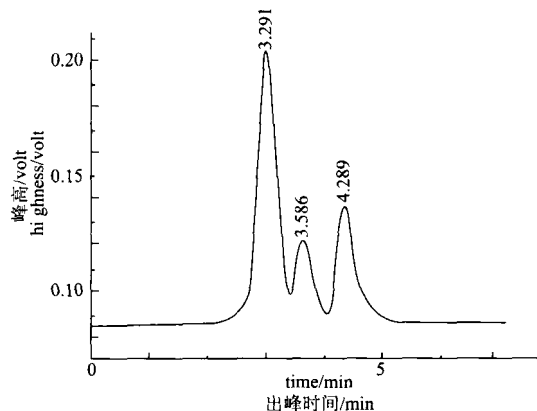


Fig.2 The high performance liquid chromatogram of millet sample when the mobile phase was methanol: water = 3:7 mixture, the detection wavelength was 265 nm, mobile phase velocity was 1.0 ml/min, column temperature was 25 °C.

图 2 流动相为甲醇:纯水=3:7 的混合液, 检测波长为 265 nm, 流动相速度为 1.0 ml/min, 柱温为 25℃ 时, 小米样品液色谱图

3.4 样品重复性实验

取 5 μ L 处理好的小米样品进样 ($n=4$), 测定各次的峰面积, 得出其相对标准偏差小于 1.11%。结果表明: 此高效液相色谱法重复性的精密度高, 重复性好, 方法可靠。

3.5 样品回收率实验

分别将 V_{B1} 标准品 0.04 mg、0.06 mg、0.08 mg 添加于原有 V_{B1} (0.02、0.02、0.06) mg 的小米样品溶液中, 配制好后, 吸取 5 μ L 进样, 实验所得的回收率为 98.33%~101.08%, 其平均值为 99.57%, 说明该方法的定量分析结果的准确度高, 能准确测出小米中 V_{B1} 的含量。

4 结论

(1) 以甲醇和水作溶剂, 通过超声波从小米中提取 V_{B1} 的提取方法, 简便高效。

(2) V_{B1} 的稳定性实验表明, V_{B1} 在空气中性质不稳定, 容易分解; 日照情况下 V_{B1} 极不稳定, 以极快的速度分解, 所以, V_{B1} 应避光保存且不宜长时间露置在空气中。

(3) 以甲醇:水=3:7 的混合液为流动相, 流动相的流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 265 nm, 柱温在 25℃ 的条件下为高效液相色谱分析小米中 V_{B1} 的最佳条件, 此条件下所建立的标准曲线具有良好的线性关系, 测得小米中 V_{B1} 的含量为 0.35 mg/100 g。本文的分析方法简单、快速、准确度高, 适宜于小米中 V_{B1} 含量的测定。

References:

- 1 Liu Na. Studies on the Analysis Method of Water Soluble B Group Vitamins in Food. Beijing: Beijing Chemical Industry University, 2008, 4(6):114-115.

- 2 Gao Jiayou, Wu Shu. Fluorescence determination of Vitamin B1. Physical Testing and Chemical Analysis Part B Chemical Analysis, 1999, 35(3):133-134.
- 3 Wang Li, Zhou Guangming, Deng Chuanyue. Determination of thiamin and ascorbic acid by reversed-phase high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. Journal of Analytical Science, 2006, 22(5):533-535.
- 4 Xiao Dongguang, Bi Lin, Han Yingsu. Determination of intracellular thiamine of yeast by RP-HPLC. Food and Fermentation Industries, 2005, 31(10):120-121.
- 5 He Limin, Lv Daizhu, Su Yijuan. Simultaneous determination of water-soluble vitamins by high performance liquid chromatography. Natural Science Journal of Hainan University, 2004, 22(1):54-56.
- 6 Borivoj K, Jitka P, David P, Vojtech A, Radka M, Jan V, Rene K, Vlastimil K. The detection of vitamins in food. Analytical Chimica Acta, 2004, 520:57-67.
- 7 Xu Jingsheng, Yu Huifang, Bao Xiaoyu. Instrument Analysis. Nanjing: Nanjing University Press, 2004.
- 8 Yu Shilin. Methods and Application of High Performance Liquid Chromatography. Beijing: Chemical Industry Press, 2000.
- 9 Wang Zhengfan. Chromatography Analysis of Quantitative and

Qualitative. Beijing: Chemical Industry Press, 2000.

中文参考文献:

- 1 刘娜. 食品中水溶性维生素 B 分析方法的研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2008, 4(6):114-115
- 2 高甲友, 吴曙. 荧光光度法测定维生素B1[J]. 理化检验-化学分册, 1999, 35(3):133-134.
- 3 王莉, 周光明, 邓传跃. 反相高效液相色谱-增敏化学发光同时测定 VB1 和 VC[J]. 分析科学学报, 2006, 22(5):533-535.
- 4 肖冬光, 毕琳, 韩英素. 反相高效液相色谱法检测酵母胞内 VB1 含量[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(10):120-121.
- 5 贺利民, 吕岱竹, 苏贻娟. 高效液相法同时测定多种水溶性维生素[J]. 海南大学学报(自然科学版), 2004, 22(1):54-56.
- 7 许金生, 于慧芳, 包晓玉. 仪器分析[M]. 南京: 南京大学出版社, 2004.
- 8 于世林. 高效液相色谱方法及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- 9 汪正范. 色谱定量与定性分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.

Ultrasonic extraction of V_{B1} in millet and analysis by high performance liquid chromatography

Li Yuming^{1,2}, Qu Jingnian^{1,2} and Zhao Jing¹

(1. Department of Chemistry and Material Science, Hengyang Normal University, Hengyang, 421008, Hunan, China)

(2. Key Laboratory of Functional Organometallic Materials of Hengyang Normal University, College of Hunan Province, Hengyang, 421008, Hunan, China)

Abstract: The millet has high nutritional value, contains a lot of vitamin B1 (V_{B1}), carotenoids, amino acids, etc. In which the content of V_{B1} ranked first in all the food. The millet not only is nutritious, but also has high medicinal value, to anti-aging in maintaining human health, has an important role in maintaining kidney, digestion, calming the nerves, Eugenic, etc. V_{B1} is the anti-neuritis vitamin, also known as thiamine, is one of low molecular organic compounds necessary to maintain normal metabolism and function for the body, and is in a wide range of uses in the medical and nutritional care. There are several analysis methods of V_{B1} , but these methods often require high performance or its precision is not high enough, not for the analysis of V_{B1} in the millet; however, high performance liquid chromatography(HPLC) analysis of the vitamin has important advantages, for example, high specificity, simple operation, efficient column, good linearity and high precision. The content of V_{B1} in the millet can be accurately determined by HPLC. In this study, V_{B1} was extracted from millet by ultrasonic extraction method, the optimum HPLC conditions of V_{B1} in the millet were explored. A large number of experimental studies showed that the methanol: water = 3:7 as mobile phase, mobile phase flow rate at 1.0 ml/min, UV detection at 265 nm, column temperature at 25 °C was the optimum HPLC conditions of V_{B1} in the millet, the established standard curve had good linear relationship, the correlation coefficient $R^2 = 0.999$. Under these conditions, the stability of V_{B1} , the content of V_{B1} in the millet, recovery of V_{B1} and method repeatability were analyzed. The average recovery of V_{B1} was 99.57%, method repeatability's relative standard deviation of less than 1.11%; the content of V_{B1} in the millet was 0.35 mg/100 g. The method is simple, fast, accurate and suitable for the analysis of V_{B1} in the millet.

Keywords: millet, V_{B1} , ultrasonic extraction, high performance liquid chromatography, analysis

(Received: 2011-03-16; Revised: 2011-05-11)