

# 高效液相色谱法测定小米中维生素 B<sub>1</sub>

杨云霞, 刘彤, 王步军\*

(中国农业科学院作物科学研究所, 农业部谷物质量监督检验测试中心, 北京 100081)

**摘要:** 研究反相高效液相色谱法分离测定我国主要粮食作物小米原粮中 VB<sub>1</sub> 的方法。小米中的 VB<sub>1</sub> 经前处理的酸解提取、酶解、氧化衍生、提纯后, 可与小米中的淀粉、脂肪、蛋白质等物质完全分离。采用 VP-ODS C<sub>18</sub> 柱, 以甲醇: 乙酸钠 (0.5 mol/L, pH4.5)=20:80 作流动相分离, 用荧光检测器作定量测定, 方法高、中、低三个水平浓度样品回收率 (n=4) 91.59%~94.27%; 6 次重复性实验相对标准偏差 (RSD%) 为 2.8%~5.9%; 方法检出限 (S/N=3) 为 1.56 ng/ml。

**关键词:** VB<sub>1</sub>; 小米; 高效液相色谱

Study on Determination of Vitamin B<sub>1</sub> in Millet by High Performance Liquid Chromatography

YANG Yun-xia, LIU Tong, WANG Bu-jun\*

(Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agriculture Science, Cereal Product Quality Supervision and Inspection Center, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China)

**Abstract:** A method for the determination of vitamin B<sub>1</sub> (VB<sub>1</sub>) in millet which is one of important grain in china by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed. After extracting by hydrochloric acid and taka diastase, the enzymatically treated sample can separated from fecula, fatty compound and protein and so on in millet completely. A VP-ODS C<sub>18</sub> column was used for separation and elution was performed with methanol and sodium acetate (0.5 mol/L, pH4.5, 20:80). VB<sub>1</sub> was detected by fluorescence detector quantificationally. The average recoveries were 91.59%~94.27% of high, middle and low three level (n=4) in this method. The relative standard deviations (RSD%) were 2.8%~5.9% (n=6). The detection limit (S/N=3) was 1.56 ng/ml.

**Key words:** VB<sub>1</sub>; millet; HPLC

中图分类号: TS210.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)02-0337-03

维生素 B<sub>1</sub> (VB<sub>1</sub>) 又名硫胺素。其化学名称是氯化 3-[ (4-氨基-2-甲基-5-嘧啶基) 甲基]-5-(2-羟基乙基)-4-甲基-噻唑盐酸盐, 分子式: C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>C<sub>1</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>SHCl。硫胺素呈白色结晶状, 熔点为 248 °C<sup>[1]</sup>。VB<sub>1</sub> 是构成脱羧辅酶的主要成分, 参与细胞代谢中的三羧酸循环, 在三羧酸循环中, VB<sub>1</sub> 以硫胺素焦磷酸的形式和丙酮酸脱羧酶联合, 使丙酮酸脱去二氧化碳。VB<sub>1</sub> 和 VPP 参与糖类代谢。VB<sub>1</sub> 是维持机体正常代谢必需的水溶性维生素, 人体内 VB<sub>1</sub> 缺乏时会引起神经炎和脚气病<sup>[2]</sup>。

VB<sub>1</sub> 广泛分布于动植物界, 小米中含有丰富的 VB<sub>1</sub>, 是人体摄取 VB<sub>1</sub> 的主要途径, 同时 VB<sub>1</sub> 也是评价小米营养品质的要素之一。

我国目前常用的分析谷物中 VB<sub>1</sub> 的方法为 GB7628—87 《谷物维生素 B<sub>1</sub> 测定方法》, 该方法用活化过的人造沸石装填成分离制备柱, 分离样品中的 VB<sub>1</sub> 时, 先将滤液过柱, VB<sub>1</sub> 吸附在柱上, 然后用热酸性氯化钠洗脱 VB<sub>1</sub>, 收集、氧化、萃取后用荧光分光光度计测定<sup>[3]</sup>, 每次测定用硫酸奎宁工作液调整荧光仪。该方法样品的

前处理繁琐, 耗时费材, 重现性差。

国内有人用荧光分光光度法或反相高效液相色谱法测定佛手、酵母细胞等的 VB<sub>1</sub><sup>[4-7]</sup>。本实验的目的是利用和 GB7628—87 《谷物 VB<sub>1</sub> 测定方法》相同的原理, 参考了英国等国家的 VB<sub>1</sub> 的测定方法<sup>[8]</sup>, 用高效液相色谱分离效率高、灵敏度高、重现性好的特点对小米中的 VB<sub>1</sub> 进行分离测定, 在大量试验的基础上, 建立起分析测定小米中 VB<sub>1</sub> 的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

小米粉碎过 80 目筛。

VB<sub>1</sub> 标准品 Dr. Ehrenstorfer 公司; 高峰淀粉酶 (Taka-Diastase) Fluka 公司。甲醇为色谱级; 水为重蒸馏水; 乙酸钠为分析纯。LC-20AB 液相色谱 [带荧光检测器 RF-10AXL、二元泵、色谱柱 VP-ODS (250L × 4.6)。

LC-Solution] 日本岛津公司; 高速离心机 2K15 Sigma 公司; 高压锅; 恒温箱。

收稿日期: 2007-04-29

作者简介: 杨云霞 (1972-), 女, 助理研究员, 博士研究生, 研究方向为农产品品质、质量与食品安全检测。

E-mail: yangyunxia@caas.net.cn

\* 通讯作者: 王步军 (1960-), 男, 研究员, 博士, 研究方向为农产品质量安全与标准制定。E-mail: wangbj@mail.caas.net.cn

## 1.2 方法

### 1.2.1 原理

VB<sub>1</sub> 在酸性条件下较稳定, 在碱性条件下可被铁氰化钾氧化成硫色素(图1 反应方程式), 该产物在紫外光激发下产生强大的蓝色荧光, 其荧光强度与 VB<sub>1</sub> 的含量成正比。

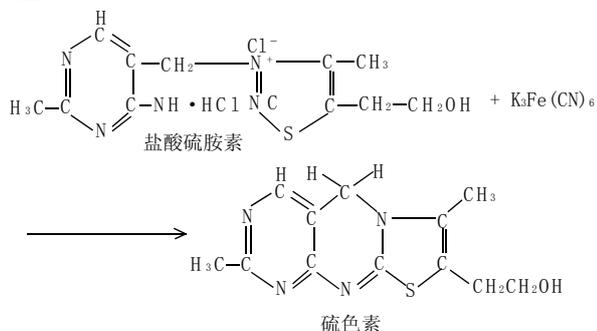


图1 反应方程式

Fig.1 Reactivity equation

### 1.2.2 样品前处理

称取过 80 目筛的小米试样 2g 于 50ml 三角瓶中, 准确加 25ml 0.1mol/L 的 HCl, 将三角瓶放入高压锅中在 121℃ 条件下加热酸解 30min, 冷却至室温。将样液离心 8min (10000r/min), 弃去杂质。将上清液用 2.5mol/L 的乙酸钠调其 pH 值为 4, 然后按每克试样加入 0.1g 高峰淀粉酶的比例向试样中加入高峰淀粉酶, 放试样于 40~45℃ 恒温箱保温酶解 16~24h, 其间振摇 2 次, 使酶与样液充分混匀。冷却至室温后用 0.2 μm 水系膜过滤, 取过滤后样液 1ml, 用 0.4g/L K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 的 NaOH 溶液 1ml 进行衍生, 涡旋快速混合 1min, 反应 5min 后加入 1ml 异丁醇, 涡旋快速混合提取 2min 后, 离心 5min (10000r/min), 取上清醇层用带荧光检测器的 LC 分析。

### 1.2.3 色谱工作条件

流动相: 甲醇: 乙酸钠 (0.5mol/L, pH4.5)=20:80; 流速: 0.8ml/min; 激发波长 366nm, 发射波长 435nm。进样量 10 μl, 以保留时间定性, 色谱峰面积定量。

### 1.2.4 标准溶液的配制

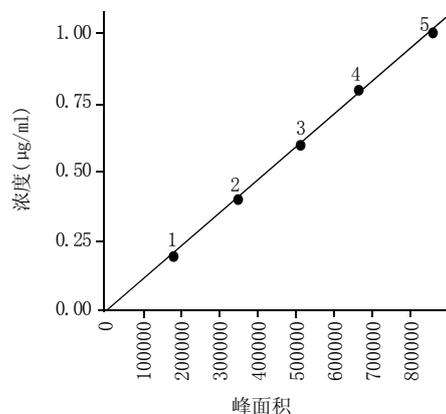
精确称取 VB<sub>1</sub> 0.01g 于 100ml 容量瓶中, 用 0.1mol/L HCl 溶解稀释到刻度, 配制成 100 μg/ml 的标准储备液。

精密量取上述标准储备液 1ml, 用 0.1mol/L HCl 稀释至 100ml 做标准工作液, 标准工作液的浓度为 1 μg/ml。梯度法依次取标准工作液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0ml, 再依次加入 0.1mol/L HCl 0.8、0.6、0.4、0.2ml, 使每个梯度标准液的终体积为 1ml, 然后再分别加入 0.4g/L K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 的 NaOH 溶液 1ml 进行氧化, 使 VB<sub>1</sub> 氧化成硫色素, 反应 5min 后分别加 1ml 异丁醇提取硫色素。

### 1.2.5 标准曲线的建立

对 1.2.4 配制的梯度标准溶液上机测定, 用岛津 LC-Solution 工作站采用外标峰面积法定量, 绘制出 VB<sub>1</sub> 浓

度-峰面积标准曲线, 标准品在 0.2~1.0 μg/ml 浓度范围内峰面积与浓度的线性关系良好(图 2)。



$Y = aX + b$ ,  $a = 1.189539 \times 10^{-6}$ ,  $b = -7.826432 \times 10^{-3}$ ,  $R^2 = 0.9987933$ ,  $R = 0.9993965$ , 平均 RF =  $1.167444 \times 10^{-6}$ , RF 标准偏差 =  $2.456309 \times 10^{-8}$ , RF 相对标准偏差 = 2.104006%。

图2 标准工作曲线的相关性

Fig.2 Relativity of calibration curve

## 2 结果与分析

### 2.1 加标回收实验

取同一品种小米, 分别称取 2.0g 左右样品 12 份, 分别加入“1.2.4”中浓度为 1 μg/ml 标准工作液 0.5、2、5 ml, 做低、中、高浓度三个水平的加标回收实验, 每个梯度浓度做 4 个平行, 按“1.2.2”条件下的样品处理方法进行处理。3 个质量浓度的方法回收率结果见表 1。方法的回收率实验反映了测定方法的准确性, 从实验结果可见, 方法回收率均大于 90%, RSD 在 0.47%~2.89%。VB<sub>1</sub> 标准品色谱图见图 3, 小米 VB<sub>1</sub> 色谱图见图 4。

表1 同一品种小米中添加三个浓度水平 VB<sub>1</sub> 的回收率(n=4)  
Table 1 Methodological recovery of determination of VB<sub>1</sub> in same variety millet sample (n=4)

| 添加量(ml)          | 0.5        | 2.0        | 5.0        |
|------------------|------------|------------|------------|
| 回收率(%)±标准偏差(SD%) | 93.19±2.54 | 91.59±1.67 | 94.27±1.23 |
| 相对标准偏差(RSD%)     | 2.89       | 1.53       | 0.47       |

### 2.2 精密度测定实验

取不同品种小米 6 份, 分别称取 1.5g 左右小米样品 36 份, 每个品种 6 个重复。按“1.2.2”条下的样品处理方法进行处理, 上机测定, 测定结果见表 2, 相对标准偏差在 2.8%~5.9%。

### 2.3 空白对照实验

不加任何试样, 按 1.2.2 进行前处理, 按 1.2.3 上机测定, 结果在硫色素相应保留时间的位置无色谱峰。由此可见样品前处理过程不影响测定。

### 2.4 最低检出限实验

以信噪比等于 3 时为方法的检出限, 此方法的最

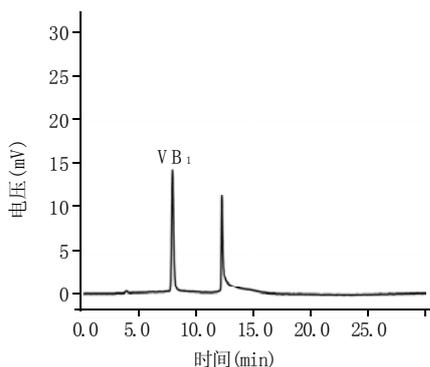


图3 VB<sub>1</sub>标准品色谱图

Fig.3 Chromatogram of standard solution

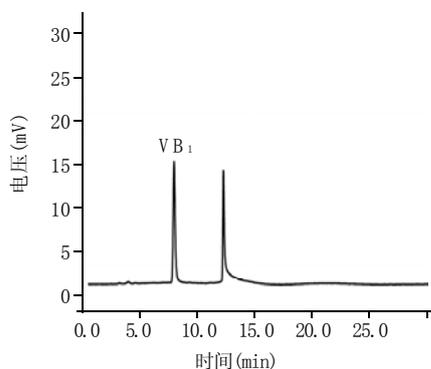


图4 小米样品VB<sub>1</sub>色谱图

Fig.4 Chromatogram of millet sample

表2 6个不同品种小米测定结果重现性实验(n=6)

Table 2 Precision of determination of VB<sub>1</sub> in different variety millet samples (n=6)

| 小米品种 | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 相对标准偏差(%) |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|
| A    | 0.287 | 0.321 | 0.288 | 0.293 | 0.326 | 0.314 | 5.7       |
| B    | 0.313 | 0.313 | 0.338 | 0.326 | 0.318 | 0.309 | 3.4       |
| C    | 0.229 | 0.232 | 0.222 | 0.218 | 0.217 | 0.230 | 2.9       |
| D    | 0.356 | 0.353 | 0.410 | 0.381 | 0.386 | 0.361 | 5.9       |
| E    | 0.289 | 0.274 | 0.274 | 0.280 | 0.300 | 0.299 | 4.1       |
| F    | 0.316 | 0.304 | 0.272 | 0.282 | 0.296 | 0.312 | 5.8       |

低检出限为 1.56ng/ml, 在我国小米中 VB<sub>1</sub> 的平均含量为 0.35mg/100g, 所以此方法完全可以满足小米中 VB<sub>1</sub> 含量的测定。

### 3 讨论

3.1 在小米中 VB<sub>1</sub> 是以硫胺素焦磷酸(图 5)的结合态存在的, 高温高压下 0.1mol/L HCl 是将硫胺素焦磷酸提取出来, 只有用高峰淀粉酶经过 16~24h 的酶解才能将 VB<sub>1</sub> 从结合态释放出来。所以测定原粮中 VB<sub>1</sub> 与测定食品中添加的 VB<sub>1</sub> 的区别在于如何得到游离状态的 VB<sub>1</sub>, 同时也是测定的难点。

3.2 谷物中 VB<sub>1</sub> 的检测是用荧光分光光度计法, 样品前处理中需用柱层析法处理, 样液上机测定需设空白对照, 过程繁琐, 操作系统误差大。由于液相色谱柱的分离功能可以将复杂的成分分离开, 所以用高效液相色谱法

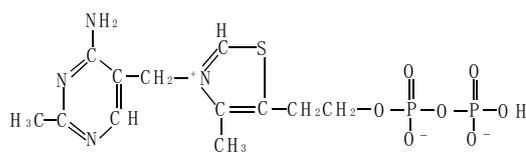


图5 硫胺素焦磷酸结构图

Fig.5 Generic structure of thiamine phosphate

谱法可以简化前处理步骤, 从而提高方法的回收率。荧光检测比紫外检测灵敏度高 10~1000 倍<sup>[9]</sup>, 在摸索检测方法的过程中, 用紫外检测器分析, 由于 VB<sub>1</sub> 属于阳离子化合物, 直接检测 VB<sub>1</sub> 用 C<sub>18</sub> 柱进行分离要选择离子对试剂, 离子对试剂不易购买而且价格昂贵。小米中 VB<sub>1</sub> 的含量很少, 用紫外检测器分析已达到仪器的检测底限, 所以重现性很差。本实验利用硫色素易溶于异丁醇的性质萃取分离出硫色素, 用荧光检测器测其荧光来定量。

3.3 据文献<sup>[10-11]</sup>报道, 碱性条件下氧化盐酸硫胺常用的试剂有铁氰化钾、氯化汞和溴化氰, 本实验用铁氰化钾做氧化剂使 VB<sub>1</sub> 氧化为硫色素后随即用异丁醇进行萃取, 实验结果很稳定, 还原性杂质对硫色素的干扰甚少, 考虑到氯化汞和溴化氰对人体和环境的二次污染, 没有用氯化汞和溴化氰作氧化剂。进一步的实验将细致分析三者还原的区别。

3.4 本实验的关键步骤为 1.2.2, 提取出的 VB<sub>1</sub> 用 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 的 NaOH 溶液进行氧化, 因为 VB<sub>1</sub> 在碱性条件下易被破坏, 所以涡旋要快。实验中对 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 的浓度和用量设计了梯度试验, 参考小米中 VB<sub>1</sub> 的含量, 确定 0.4g/L K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 的 NaOH 溶液 1ml 进行氧化最为合理。

### 4 结论

本方法通过做加标回收、精密度、空白对照和最低检出限实验, 从相对标准偏差和回收率来看, 该方法完全可以用来检测小米中 VB<sub>1</sub> 的含量。

### 参考文献:

- [1] GB 14751-93 食品添加剂维生素B<sub>1</sub>(盐酸硫胺)[S].
- [2] 聂洪勇, 黄伟坤. 维生素及其分析方法[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1987.
- [3] GB 7628-87 谷物维生素B<sub>1</sub>测定方法[S].
- [4] 金晓玲, 徐丽珊. 荧光分光光度法测定佛手维生素B<sub>1</sub>[J]. 特产研究, 1999(4): 23-25.
- [5] 肖冬光, 毕琳. 反相高效液相色谱法检测酵母胞内VB<sub>1</sub>含量[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31: 120-121.
- [6] 张翊, 赵莹. VB<sub>1</sub>胃内漂浮片在家兔体内的药物动力学研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2003(5): 332-335.
- [7] 龙朝阳, 高燕红, 许秀敏, 等. 高效液相色谱柱后化学衍生法测定食品中VB<sub>1</sub>及叶酸含量[J]. 分析化学, 2004, 32: 1341-1344.
- [8] Foodstuffs-determination of vitamin B<sub>1</sub> by HPLC[S]. BS EN 14122 2003.
- [9] 高向阳. 新编仪器分析[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [10] MOHAMED I, HUSSEIN S A, EI-SHABOURI S R. Spectrofluorimetric assay of thiamine hydrochloride in injections and multivitamin preparation[J]. Assoc of Chem, 1988, 71(6): 1131-1133.
- [11] CALATAYUD J M, BENITO C G, GIMENEZ D G. FIA-fluorimetric determination of thiamine[J]. J Pharm Bio Anal, 1990(8): 667-670.