

高效液相色谱法测定猪肝中维生素 B₂ 的含量

LC-214

摘要： 本文建立了高效液相色谱法测定猪肝中维生素 B₂ 含量的方法。样品参照国标《GB 5009.84-2016》中的前处理方式，分别进行提取、衍生化、上机分析。维生素 B₂ 在 0.02-0.5 μg/mL 浓度范围内具有较好的线性关系，线性相关系数 $r > 0.9998$ ，系统精密度良好。

关键词： 高效液相色谱法 维生素 B₂ 猪肝

维生素 B₂ (化学式: C₁₇H₂₀N₄O₆) 又叫核黄素, 微溶于水。是体内黄酶类辅基的组成部分, 参与机体复杂的生物氧化过程, 具有重要药理作用。核黄素生物利用度低, 极易引起各种核黄素缺乏症。我国流行病学调查表明: 核黄素缺乏症的发病率为 20%-40%, 主要表现为口、眼和外生殖器部位的炎症, 如口角炎、唇炎、舌炎、眼结膜炎和阴囊炎等。

如果缺乏维生素 B₂, 可选择奶类及其制品, 动物内脏 (肝、肾和心等), 蛋黄, 多种鱼类 (特别是鳝鱼、

鲫鱼等), 菠菜、胡萝卜等蔬菜, 橘子和柑橙等水果食用, 一般不必额外补充。

《GB 5009.85-2016 食品中维生素 B₂ 的测定》标准中规定了测定食品中维生素 B₂ 的液相色谱方法。本实验参照标准中的实验条件, 使用岛津 Prominence-i LC-2030 高效液相色谱仪对猪肝中维生素 B₂ 含量进行测定, 结果表明, 该方法检测灵敏度高, 重复性好, 可以满足标准中的检测要求。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津一体机 Prominence-i LC-2030 液相色谱仪 (配 RF-20A 荧光检测器)。

1.2 分析条件

色谱柱: Symmetry C18 (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm)

流动相: A: 乙酸钠溶液 (0.05 mol/L); B: 甲醇

流速: 1 mL/min

柱温: 30°C

检测波长: 激发波长 462 nm, 发射波长 522 nm;

进样体积: 20 μL

洗脱方式: 等度洗脱, A: B=65: 35 (v/v)

■ 样品前处理

取样品约 500 g, 用组织捣碎机充分打匀均质, 分装入洁净棕色磨口瓶中, 密封避光存放备用。

称取 10.00 g 均质后的试样于 100 mL 具塞锥形瓶中, 加入 60 mL 0.1mol/L 盐酸溶液, 充分摇匀, 塞好瓶塞。将锥形瓶放入高压灭菌锅内, 121°C 下保持 30min, 冷却至室温后取出。用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 6.0-6.5, 加入 2 mL 混合酶溶液, 摇匀后置于 37°C 培养箱中过夜酶解。将酶解液转移至 100 mL 容量瓶中加水定容至刻度, 离心, 取清液, 过 0.45 μm 水相滤膜作为待测液。

注: 操作过程应避免强光照射。

■ 结果与讨论

3.1 标准品溶液色谱图和线性范围

精密量取维生素 B₂ 标准品适量，用甲醇稀释成浓度为 0.02、0.05、0.1、0.2、0.5 μg/mL 五个浓度的标准溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，维生素 B₂ 标准品溶液色谱图如图 1 所示。

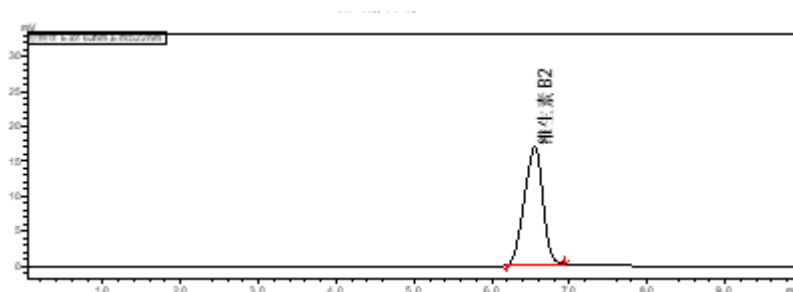


图 1 标准品溶液色谱图 (0.1 μg/mL)

以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，采用外标法建立标准曲线，结果如图 2 所示。所得曲线线性关系良好，线性方程、线性范围、相关系数和检出限（检出限、定量限根据最低浓度点计算得出）见表 1。

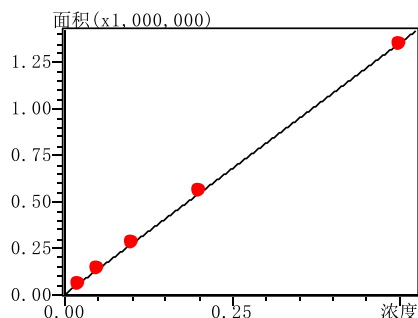


图 2 维生素 B₂ 标准品校准曲线

表 1 校准曲线参数

中文名称	标准曲线	相关系数 r	线性范围 (μg/mL)	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
维生素 B ₂	$Y = 2.697e+006X + 5233.07$	0.9998	0.02-0.5	0.07	0.22

3.2 精密度实验

按照 1.2 分析条件测定，选择浓度为 0.4 μg/mL 的猪肝基质加标样品连续进样测定 6 次，重复性色谱图如图 3 所示。维生素 B₂ 的保留时间 RSD% 为 0.054%；峰面积 RSD% 为 0.339%，结果见表 2。精密度实验结果表明，Prominence-i LC-2030 高效液相色谱仪具有良好的精密度。

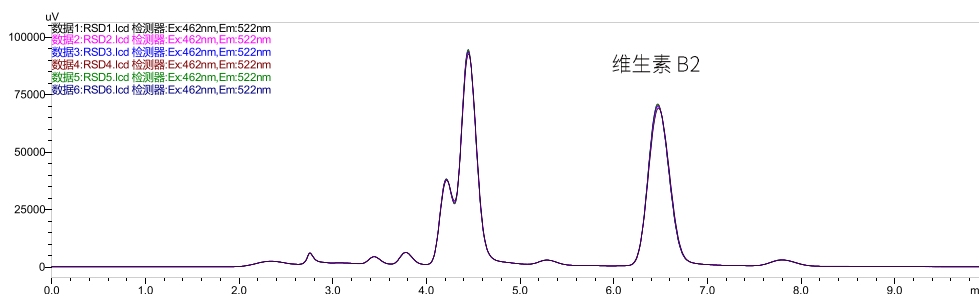


图 3 基质标准溶液 6 针重复性色谱图 (浓度 0.5 μg/mL)

表 2 维生素 B₂ 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

名称	RSD% (0.4 µg/mL)	
	R.T.	Area
维生素 B ₂	0.054	0.339

3.3 回收率试验

称取空白猪肝样品, 加入一定量维生素 B₂ 标准品, 使加标浓度为 0.05、0.10 mg/100g, 按照 2. 中所述前处理方式处理加标样品, 每个加标浓度分别进行三个平行实验, 然后按 1.2 中条件进行测试。空白猪肝样品色谱图见图 4, 空白基质中检出维生素 B₂, 浓度为 0.324 mg/100g。加标样品的回收色谱图见图 5, 根据标准添加法计算平均回收率, 两个添加水平的平均回收率分别为 84.0 %、83.0 %, 满足该标准中规定, 结果详见表 3。

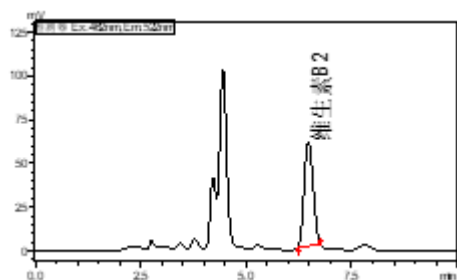


图 4 空白样品色谱图

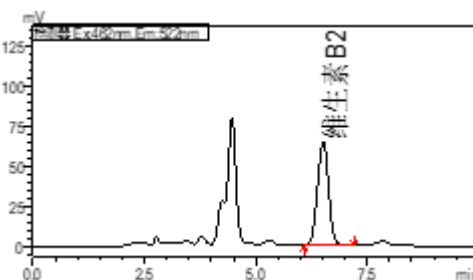


图 5 加标样品色谱图 (加标量 0.10 mg/100g)

表 3 加标回收率 (n=3)

名称	加标水平 (mg/100g)	实际检测样品浓度 (扣除基质响应) (mg/100g)			平均回收率 %	RSD%
		平行 1	平行 2	平行 3		
维生素 B ₂	0.05	0.042	0.041	0.043	84.0	1.9
	0.10	0.087	0.080	0.082	83.0	3.5

■ 结论

本文采用岛津 Prominence-i LC-2030 高效液相色谱系统, 参考《GB5009.84-2016》中规定的检测方法, 建立了一种测定食品中维生素 B₂ 含量的方法。该方法检测灵敏度高, 重复性好, 维生素 B₂ 在 0.02-0.5 µg/mL 浓度范围内具有较好的线性关系, 线性相关系数 $r > 0.9998$ 。加标回收实验回收率在 80.0-87.1% 之间, 连续 6 次进样保留时间 RSD% 为 0.054%、峰面积 RSD% 为 0.339%, 系统精密度良好。实验表明, 该方法完全满足标准中的各项规定, 可用于食品中维生素 B₂ 的检测。

岛津应用云

