

维酶素中辅酶和 VB₂ 的液相色谱分析

叶水英 赵玉娟 于建国

(中国林科院森环所 100091)

摘要 维酶素作为营养保健食品添加剂,对萎缩性胃炎和食道上皮细胞增生有显著疗效。本文采用高压液相色谱法对维酶素中维生素 B₂ 和两种辅酶 (FMN 和 FAD) 进行了分析。结果 VB₂ 平均含量为 5.46mg/g,辅酶含量为 1.74mg/g,回收率为 86.6%~93.5%,精度为 8.2%,该法可做为鉴定维酶素质量的分析方法。

关键词 维酶素 高压液相色谱 维生素 B₂ 辅酶

前 言

维酶素作为营养保健食品添加剂,对萎缩性胃炎和食道上皮细胞增生有显著疗效。它的有效成分是三种形态的核黄素:游离的维生素 B₂ (VB₂)、两种结合态的辅酶形式:黄素单核苷酸 (FMN) 和黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAN)。这两种辅酶参与细胞物质递氢代谢反应,是生物构成多种黄酶体系必须的辅酶。

同时分析维酶素中这三种形态核黄素,对于鉴定维酶素的品质和进一步研究它的药理都有十分重要的意义。为此,我们首先采用高压液相色谱法对维酶素中维生素 B₂ 和两种辅酶进行了定性、定量分析。并对北京中发生物工程研究所等 6 个厂家的维酶素产品进行了分析,VB₂ 平均含量为 5.46mg/g,辅酶含量为 1.74mg/g,回收率为 86.6%~93.5%,分析的精度为 8.2%。其中 VB₂ 含量与药典法测定结果相一致。该法可作为鉴定维酶素质量的方法。

实验部分

1. 试剂

- 1.1 0.2% (V/V) 乙酸溶液;
- 1.2 35% (V/V) 甲醇溶液;
- 1.3 VB₂ 和辅酶 (FMN 和 FAD) 标准生化试剂 (进口);
- 1.4 重蒸水。

2. 仪器

Waters208 型高压液相色谱仪;检测器为 481 型可调 UV 检测器;检测波长为 262nm; AUFS

为 0.10。

3. 色谱条件

3.1 色谱柱

Spherical C18 (ODS 柱),柱温为室温。

3.2 流动相

35%MeOH—64%H₂O—0.005M 离子对试剂 (PicB7);流速为 0.5ml/min。

4. 样品制备

精确称取磨细的维酶素样品 0.5g (W),置于 100ml 棕色容量瓶内,加入 0.2% (V/V) 乙酸溶液 90ml,放在暗处浸提过夜,然后用 0.2% 乙酸溶液定容,摇均,过滤或离心,作为待测液 (V)。

5. 标准溶液的配制

精确称取标准生化试剂维生素 B₂ (VB₂) 和辅酶 (FMN 和 FAD) 各 2.5mg,置于 25ml 棕色容量瓶内,加入 0.2% (V/V) 乙酸溶液溶解、定容。标准溶液中辅酶的浓度皆为 0.1μg/μl (C₁)。

6. 计算

样品中辅酶 (FMN 和 FAD) 或 VB₂ 的含量 C₂ (mg/g):

$$C_2 = \frac{S_2 \times V_1 \times V}{S_1 \times V_2 \times W} C_1$$

式中

V₁——注入的标准溶液的体积 (μl);

V₂——注入的样品待测液的体积 (μl);

S₁——标准溶液相应的辅酶 (FMN 和 FAD) 或 VB₂ 的峰面积;

S₂——样品待测液相应的辅酶 或 VB₂ 的峰

面积;

V——样品溶液总体积 (ml);

W——样品的质量 (g);

C₁——标准溶液辅酶或 VB₂ 的浓度 (μg/μl);

C₂——样品中辅酶或 VB₂ 的含量 (mg/g)。

(V₁), 得到的标准色谱图如图 1, 相应的辅酶或 VB₂ 的峰面积为 S₁; 注入的样品溶液体积为 5~10μl (V₂), 得到的样品色谱图如图 2, 相应的辅酶或 VB₂ 的峰面积为 S₂。采用内标定性辅酶或 VB₂ 的峰 (如图 3), 测定的回收率为 86.6%~93.5% (见表 1)。VB₂ 峰的平均保留时间为 5.07min; FMN 和 FAD 平均保留时间分别为 2.80 和 3.57min。

结果与讨论

1. 测定时, 注入的标准溶液体积为 2~5μl

表 1 不同厂家维生素酶产品的分析结果与精度

| 编号 | VB ₂ | | | 辅酶 | | |
|--------|-----------------|---------|---------|-----------|---------|---------|
| | 含量 (mg/g) | 回收率 (%) | 精度 (±%) | 含量 (mg/g) | 回收率 (%) | 精度 (±%) |
| 1# | 5.91 | 89.7 | 7.3 | 1.54 | 81.0 | 9.1 |
| 2# | 4.76 | 90.9 | 8.4 | 1.21 | 88.4 | 10.2 |
| 3# | 6.51 | 95.3 | 6.5 | 2.04 | 90.8 | 8.7 |
| 4# | 7.16 | 100.1 | 6.0 | 2.74 | 89.4 | 8.5 |
| 5# | 5.52 | 94.6 | 5.1 | 2.07 | 79.4 | 7.3 |
| 6# | 2.81 | 90.7 | 8.0 | 0.81 | 90.8 | 9.9 |
| 平均值 | 5.46 | 93.5 | 6.9 | 1.74 | 86.6 | 9.0 |
| 比色法测定值 | 5.73 | | | | | |

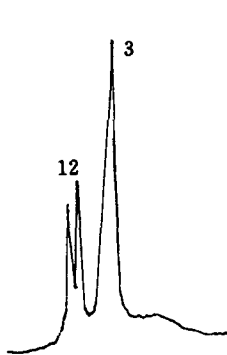


图 1 VB₂ 和辅酶标准溶液色谱图 (色谱条件: 见本文)
峰: 1,2 辅酶 (FMN 和 FAD);
3 VB₂

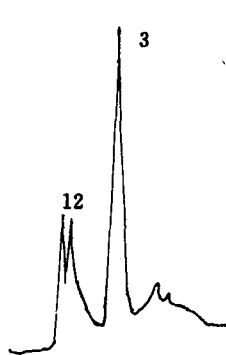


图 2 样品溶液色谱图 (色谱条件: 见本文)
峰: 同图 1

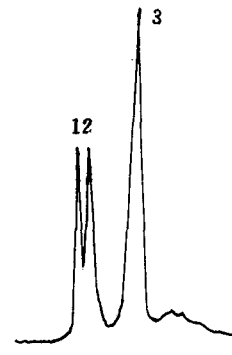


图 3 标准加样品溶液的色谱图 (色谱条件: 见本文)
峰: 同图 1

2. 对北京中发生物工程研究所等六家维酶素产品的分析表明, VB₂ 与辅酶 (FMN 和 FAD) 有一定相关关系。一般说来, VB₂ 高, 辅酶含量也高 (见表 1)。VB₂ 的平均含量为 5.46mg/g, FMN 和 FAD 平均含量为 1.74mg/g。其中 VB₂ 的含量与用药典 (63 年版) 比色法测定结果完全一致 (见表 1)。VB₂ 和辅酶分析的精密密度分别为 6.3% 和 9.0%。

3. 检测波长的选择, 以紫外全波扫描中得到最灵敏波长 262nm。如果仪器不具备可调波长检测器, 也可用固定波长 254nm 进行检测, 但灵敏度低约 30%。

4. 在我国, 利用新鲜豆渣生产维酶素的工艺日益发展, 维酶素在医药和食品中的应用更加广

泛。为了确保维酶素生产的质量, 防止产品掺假, 建议将维酶素的质量标准从 VB₂ 含量一项指标改为 VB₂ 和辅酶 (FMN 和 FAD) 两项指标, 这将更科学地反映维酶素的医药保健作用。为此, 可将该法列为鉴定维酶素质量的测定方法。

参考文献

1. Gereal Chem. 1980, Vol. 57, P70~71
2. 陈文为. 医学通报 1956, 4, 64
3. 陈文为. 营养学报, 1956, 1 (1), 49
4. 黄昌霞. 中国医学报, 1988, 6, 23
5. Lc dingham, G. A., Industrial ferametions Ann. Rew. Microbiol., 1953, 7, 444

Determiration of Coenzymes and VB₂ in WeiMeiSu By HPLC

Ye Shuiying Zhao Yujuan Yu Jianguo
(Forest Ecology and Environmental Science Institute
Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091)

Abstracts Weimeisu is an additive of nutritious health food, which has significantly active effect on cure of wasting gastritis and accretion of epithelialcells of esophagus. The active constituents are three forms of riboflavin, that is free vitamin B₂ (VB₂) and two coenzymes, Flavin mononucleotide (FMN) and Flavin adenine dinucleotide (FAD).

VB₂ and the two coenzymes in Weimeisu were analyzed by HPLC. Products from Beijing ZhongFa Bioengineering Institute and other factories were analyzed, the average value of VB₂ was 5.46mg/g and coenzyme was 1.74mg/g, the rate of recovery was 86.6%~93.5%, and the accuracy of analysis was 8.2%. The value of VB₂ was in accordance with the results got through the method of pharmacopoeia. The method could be used to certifiect the quality of Weimeisu.

Key Words Weimeisu HPLC VB₂ Coenzyme

(上接 16 页)

参考文献

1. 刘景心, 段莉梅, 孙元洪·高等学校化学学报, 1992, 13 (3): 300~302
2. 刘英平, 刘景心, 孙元洪·内蒙古大学学报自然科学版, 1996, 27 (1): 66~69
3. 兰州大学化学系, 中国科学院上海药物研究所编, 有机微量定量分析。北京: 科学出版社, 1978, 290
4. NaKamoto K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Campcund. 4th Ed. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1986
5. Manhas Bs, Trikha AK. J. Indian Chem. Soc., 1982, 59(2):315