

平行因子-同步荧光法测定食品中维生素 B₁, B₂ 和 B₆

倪永年, 蔡英俊

南昌大学化学系, 江西 南昌 330047

摘要 文章应用同步荧光法对维生素 B₁、B₂ 和 B₆ 的混合物进行了分析。由于维生素 B 的荧光波谱存在重叠本工作采用三维同步荧光技术结合平行因子分析法(PARAFAC), 对维生素 B₁, B₂ 和 B₆ 混合物的三维荧光数据进行了测定和解析, 并以高效液相色谱法(HPLC)作对照, 获得了较好的结果。实验中取 $E_x = 200 \sim 500 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 20 \sim 120 \text{ nm}$ 。

主题词 平行因子分析法; 同步荧光法; 维生素 B

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2005)10-1641-04

维生素 B 对人体具有十分重要的作用, 但它不能在人体中合成而只能从食物中摄取, 故对食品中维生素 B 的含量进行分析测定具有重要的意义。荧光分光光度法由于其灵敏度高、仪器简单、选择性好和测量快速等特点, 被广泛应用于维生素 B 的分析。由于各种维生素 B 之间有较严重的荧光光谱重叠, 因而分辨率较高的同步荧光技术被广泛采用。

Barary 等^[1]应用同步荧光分析法对维生素 B₁, B₂ 和 B₆ 进行了同时测定。Garcia 等^[2]在胶束介质中也采用同步荧光法对这 3 种维生素 B 进行了分析。刘春英等^[3]用导数同步荧光法对 3 种维生素 B 的测定进行了研究。倪永年等^[4]则采用化学计量学中的偏最小二乘法对上述 3 种维生素的同步荧光光谱图进行了解析, 并获得了较好的结果。

在同步荧光分析法中, $\Delta\lambda$ 值的选择较为重要, 它对体系的灵敏度和谱峰分离度有较大的影响。在前述文献中, 都是采用固定的 $\Delta\lambda$ 值来完成同步荧光测定, 因此选择适于混合物中各个组分的最佳 $\Delta\lambda$ 值是必要的。

本研究采用三维同步荧光光谱技术, 应用化学计量学方法中的平行因子法处理数据, 把三维数据中荧光强度- $\Delta\lambda$ 的曲线分辨出来, 较好地解决了最佳 $\Delta\lambda$ 值的选择问题和维生素 B 的分析。

1 平行因子分析法

平行因子分析法(PARAFAC)处理三维数据是基于三线分解理论^[5], 它的前提是数据在三方向呈线性。该法最大的优点是它的分解具有唯一性, 而在传统的二维数据的双线性分解中, 如果没有足够的辅助信息一般得不到真实的谱

图。在 PARAFAC 分解过程中, 只要选择正确的因子数目而且信噪比合适, 分解的结果便是反映真实的谱图。PARAFAC 法计算过程可以称为交替最小二乘(ALS)算法^[6]。

我们以同步荧光三维数据为例说明 PARAFAC 的计算步骤, 首先建立一个三线性模型

$$r_{i,j,k} = x_{i,n}y_{j,n}z_{k,n} + e_{i,j,k} \quad (1)$$

式中 $r_{i,j,k}$ 表示三维同步荧光光谱数据矩阵 \mathbf{R} 中第 i 个 $\Delta\lambda$ 和第 j 个激发波长(或发射波长)处样品 k 的同步荧光强度; n 表示模型所选择的因子数。矩阵 \mathbf{R} 也可理解为由 k 个样品的 ij 阶矩阵所组成的三维数据阵, \mathbf{E} 表示该模型对数据模拟时的随机残余误差。具体算法可分成以下几个步骤。

步骤 1: 对 \mathbf{X} 和 \mathbf{Y} 进行初始值设定, 然后利用以下方程求解 \mathbf{Z}

$$\mathbf{R}_C = \mathbf{CZ}^T \quad (2)$$

$$\mathbf{Z}^T = \mathbf{C}^+ \mathbf{R}_C \quad (3)$$

其中 \mathbf{R}_C 为 $ij \times k$ 阶矩阵, 它是把三维数据 \mathbf{R} 在 k 层面上在 $x-y$ 方向展开。 \mathbf{C} 为 $ij \times n$ 阶矩阵, 它由 \mathbf{X} 和 \mathbf{Y} 进行平铺而组成。

步骤 2: 对 \mathbf{X} 的估计值进行求解

$$\mathbf{R}_A = \mathbf{AX}^T \quad (4)$$

$$\mathbf{X}^T = \mathbf{A}^+ \mathbf{R}_A \quad (5)$$

其中 \mathbf{R}_A 为 $jk \times i$ 阶矩阵, 它是把三维数据 \mathbf{R} 在 i 层面上在 $y-z$ 方向展开。 \mathbf{A} 为 $jk \times n$ 阶矩阵, 它由 \mathbf{Y} 和 \mathbf{Z} 进行平铺而组成。

步骤 3: 对 \mathbf{Y} 的估计值进行求解

收稿日期: 2004-06-08, 修订日期: 2004-08-16

基金项目: 国家自然科学基金(20365002)和江西省自然科学基金(0320014)资助

作者简介: 倪永年, 1945 年生, 南昌大学化学系教授

$$\mathbf{R}_B = \mathbf{B}\mathbf{Y}^T \quad (6)$$

$$\mathbf{Y}^T = \mathbf{B}^+ \mathbf{R}_B \quad (7)$$

其中 \mathbf{R}_B 为 $ik \times j$ 阶矩阵, 它是把三维数据 \mathbf{R} 在 j 层面上在 $x-z$ 方向展开。 \mathbf{B} 为 $ik \times n$ 阶矩阵, 它由 \mathbf{X} 和 \mathbf{Z} 进行平铺而组成。

ALS 算法计算的过程可简述为: 先给 \mathbf{X} 和 \mathbf{Y} 确定一个初始值, 求得 \mathbf{Z} ; 然后根据求得的 \mathbf{Z} 和原来的 \mathbf{Y} 计算 \mathbf{X} ; 进而又用求得的 \mathbf{X} 和 \mathbf{Z} 求 \mathbf{Y} 。这样循环下去(步骤 1~3), 每次都是用最近一次估计得到的 \mathbf{X} 和 \mathbf{Y} 去求 \mathbf{Z} (或者是 \mathbf{Z} 和 \mathbf{Y} 求 \mathbf{X} 以及 \mathbf{X} 和 \mathbf{Z} 求 \mathbf{Y}), 直到连续两次迭代值之差小于一个设定值。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

F-3010 荧光分光光度计(日立), LC-6A HPLC(岛津), NaOH 溶液 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; H_2SO_4 溶液 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 铁氰化钾(1%): 称取 1 g 药品用水定容于 100 mL 容量瓶。使用时取 3 mL 用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液稀释到 10 mL; 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液(pH 7.2, 由 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸按 6:1(φ)混合而成); 维生素 B_1 : 0.021 7 g 盐酸硫胺素溶于少许 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸中, 然后用二次水定容于 100 mL 容量瓶; 维生素 B_2 : 0.021 0 g 核黄素溶于少量醋酸中, 用二次水中定容于 100 mL 容量瓶; 维生素 B_6 : 0.026 5 g 盐酸吡哆辛溶于少许 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸中, 用二次水中定容于 100 mL 容量瓶。以上实验所用水均为二次蒸馏水。

荧光测试条件: 带通 $E_x = 5 \text{ nm}$, $E_m = 5 \text{ nm}$, 扫描速度 $240 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$, 响应时间 2 s。HPLC 实验条件: 流动相 pH 5.5 的磷酸缓冲溶液与甲醇溶液(75:25, φ); 流量 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 压力: $95 \text{ kgf} \cdot \text{cm}^{-2}$ (即 $9.31 \times 10^6 \text{ N} \cdot \text{m}^2$, 亦即 9.31 MPa); $T = 29 \text{ }^\circ\text{C}$; 检测器: 紫外可见检测器; 检测波长 $\lambda = 254 \text{ nm}$ 。

2.2 操作步骤

移适量的 VB_1 , VB_2 和 VB_6 溶液于 25 mL 容量瓶中, 加入 5 mL 缓冲溶液和 1.1 mL 碱性铁氰化钾溶液, 摇匀静置 10 min。用 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 溶液调节至中性, 再加入 5 mL 缓冲溶液, 用二次水稀释至刻度, 在荧光分光光度计上测量其荧光强度。

3 结果与讨论

3.1 同步三维荧光光谱图

按照操作步骤配制测定溶液, 以同步荧光方式进行扫描, 分别在 $\Delta\lambda = 20, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100$ 和 120 nm 处扫描。 $E_x = 220 \sim 500 \text{ nm}$ (读数间隔为 5 nm), 得三维同步荧光谱图(见图 1)。可以发现 3 种维生素 B 的发射光谱得到了一定的分离, 但还有相当部分的重叠, 3 种维生素 B 的最佳 $\Delta\lambda$ 值也不相同, 如仅选用一个 $\Delta\lambda$ 值会带来灵敏度的降低, 故本工作用 PARAFAC 法对三维同步荧光谱图进行处

理。

3.2 合成样的分析

根据正交设计 $L_{16}(4^5)$ 分别配制了 16 组校正和 16 组预报试样, 按实验方法对它们进行同步荧光三维扫描并记录数据。根据这些数据采用 PARAFAC 法建立了解析模型, 并对预报组试样进行浓度预报, 表 1 给出了它们的分析结果。

3.3 PARAFAC 对三维同步荧光光谱的分解

象双线性模型一样, 我们可以根据模型对数据进行拟合而建立正确的模型。一般的做法是以判别式中的误差对因子数作图, 如果得到的曲线在某处开始变化较小, 该处所对应的因子数就是合适的因子数。如果得到的误差大于已知的实验误差, 那就说明数据中有更多的系统变量, 需要建立更高维数的数学模型。在本工作中, 我们利用相对标准偏差(RSD)对因子数作图^[7], 见图 2。可以看到在因子数为 4 的时候, 模型具有最小的 RSD 值, 故建立 4 因子的 PARAFAC 模型是合适的。

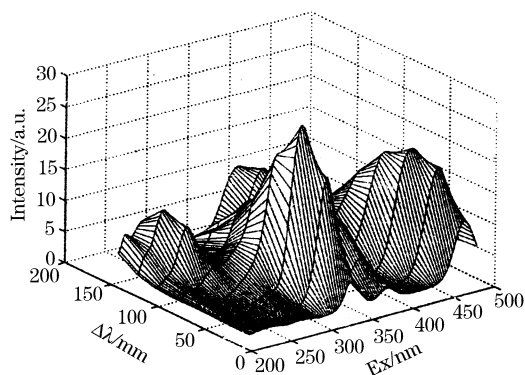


Fig. 1 The synchronous fluorescent spectra of the mixture of vitamin B

$cv_{B_1} = 0.868 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $cv_{B_2} = 0.84 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $cv_{B_6} = 1.06 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

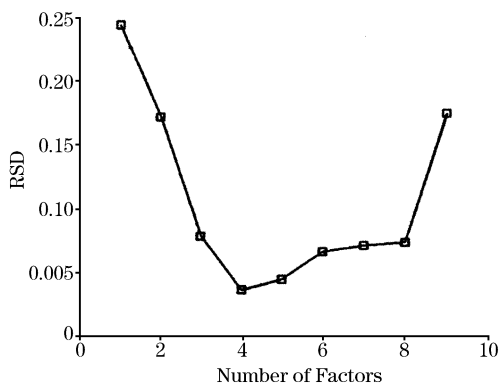


Fig. 2 The plot of RSD vs. number of factors selected for PARAFAC

3.4 平行因子法用于 $\Delta\lambda$ 的选择

根据平行因子对三维同步荧光数据的分解, 可以得到各组维生素的荧光强度- $\Delta\lambda$ 二维图(见图 3)。从图中可以看到, PARAFAC 所得荧光强度- $\Delta\lambda$ 谱图与真实的谱图非常吻合, 说明了 PARAFAC 分解的唯一性和准确性。从图中我们

可以清楚的找到 3 种维生素的最佳 $\Delta\lambda$ 值分别为 90 nm (VB₁), 50 nm (VB₂) 和 100 nm (VB₆), 这给普通同步荧光分析法中的 $\Delta\lambda$ 值的选择提供了科学的实验根据。

Table 1 Analytical results of mixtures of vitamin B by PARAFAC method

Samples	Added/(mg · L ⁻¹)			Found/(mg · L ⁻¹)			Recovery/%		
	VB ₁	VB ₂	VB ₆	VB ₁	VB ₂	VB ₆	VB ₁	VB ₂	VB ₆
1	0.191	0.756	0.636	0.188	0.777	0.548	98.4	103	86.2
2	0.191	1.34	0.954	0.205	1.31	0.931	107	97.8	97.6
3	0.191	2.02	1.38	0.181	1.98	1.31	94.8	98.0	94.9
4	0.191	2.35	1.91	0.181	2.49	1.88	94.8	106	98.4
5	0.277	0.756	0.954	0.275	0.756	0.893	99.3	100.0	93.6
6	0.277	1.34	0.636	0.283	1.28	0.596	102	95.5	93.7
7	0.277	2.02	1.91	0.258	2.02	1.82	93.1	100	95.3
8	0.277	2.35	1.38	0.280	2.42	1.39	101	103	101
9	0.416	0.756	1.38	0.415	0.847	1.34	99.8	112	97.1
10	0.416	1.34	1.91	0.357	1.30	1.83	85.8	97.0	95.8
11	0.416	2.02	0.636	0.421	1.91	0.588	101	94.6	92.4
12	0.416	2.35	0.954	0.442	2.45	0.887	106	104	93.0
13	0.625	0.756	1.91	0.620	0.761	1.89	99.2	101	99.0
14	0.625	1.34	1.38	0.618	1.24	1.41	98.9	92.5	102
15	0.625	2.02	0.954	0.644	1.86	0.92	103	92.1	96.4
16	0.625	2.35	0.636	0.618	2.31	0.573	98.9	98.3	90.1
RSDs				4.6%	4.7%	4.4%			
RSD _T				4.6%					
Mean-recovery							103%	103%	106%

Table 2 Determination results of vitamin B in commercial samples [mg · (100 g)⁻¹]

	Found			Added			Found			HPLC method		
	VB ₁	VB ₂	VB ₆	VB ₁	VB ₂	VB ₆	VB ₁	VB ₂	VB ₆	VB ₁	VB ₂	VB ₆
1	0.33	4.49	3.20	0.25	1.22	1.54	0.51	4.74	4.17	0.49	4.51	4.01
2	0.44	1.87	0.41	0.26	1.28	1.61	0.67	2.37	1.85	0.65	2.12	1.79
3	0.44	2.19	0.57	0.31	1.47	1.85	0.71	2.69	2.35	0.70	2.40	2.20
4	32.5	41.3	22.5									
5	0.023	0.29	\	0.08	0.11	0.13	0.10	0.37	0.14	0.09	0.36	0.13
6	0.015	0.15	\	0.08	0.11	0.13	0.09	0.24	0.14	0.08	0.22	0.12

1, 婴儿奶粉; 2, 全脂奶粉; 3, 甜奶粉; 4, 复合维生素片(mg · g⁻¹); 5, 西红柿; 6, 黄瓜

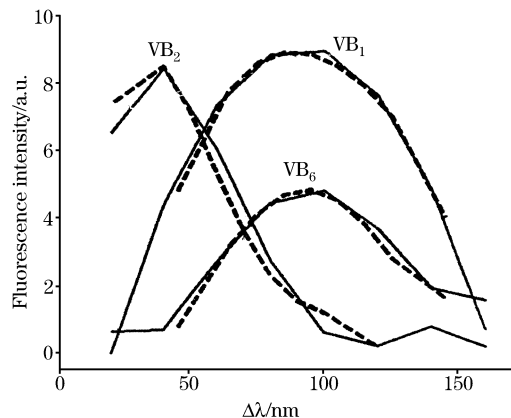


Fig. 3 The graph of fluorescence intensity vs. $\Delta\lambda$

Solid line, actual E_x spectra; Dotted line, E_x spectra obtained by PARAFAC; $c_{VB_1} = 0.868 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{VB_2} = 0.84 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{VB_6} = 1.06 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $E_x = 290 \text{ nm}$

4 实际样品的测定

4.1 样品的处理^[8]

(1)奶粉: 称取适量奶粉, 于三角烧瓶中, 加入 0.1 mol · L⁻¹的 HCl 50 mL, 摇匀盖好, 置于沸水中水浴加热 30 min 后, 取出冷却。然后用 2 mol · L⁻¹的 NaOH 溶液调节 pH 至 5 左右, 使蛋白质和其他杂质沉淀, 过滤并定容; (2)水果: 一定量切解均匀的水果(苹果和桔子等)样品, 加入 0.1 mol · L⁻¹的 HCl 50 mL, 用食品搅拌机捣碎匀浆, 称取匀浆, 后续操作同(1); (3)复合维生素 B 片: 准确称取一定量研磨碎的复合维生素 B 片, 用 0.1 mol · L⁻¹的 HCl 溶解, 然后调节 pH 至 5 左右, 用二次水定容。

4.2 样品的测定

取多种样品按照上述方法处理后, 用同步荧光法进行测量, 以 4 因子的 PARAFAC 模型对样品数据进行计算, 并用高效液相色谱法(HPLC)作为对照, 结果如表 2。我们发现用

PARAFAC 法对实际样品的分析结果与高效液相色谱法非常接近,证明了该方法的可行性。

本文的研究成果在医学上和保健上有重要的实际意义;而文献[9]亦报道了类似的工作。

PARAFAC 表现出了很强的解析能力,它所特有的分解唯一性特征,使得 PARAFAC 在样品分析中获得了很好的结果,说明了 PARAFAC 法在三维数据的处理上有其优越性。

5 结 论

在对 3 种维生素 B 的同步荧光三维数据的处理过程中,

参 考 文 献

- [1] Barary M, Abdel-Hamid M. *Pharmazie*, 1986, 41: 483.
- [2] Garcia L, Blazquez S, San Andres M P, et al. *Anal. Chim. Acta*, 2001, 434(2): 193.
- [3] LIU Chun-ying, CHEN Hua-zhang, CHEN Shi-bin(刘春英, 陈华章, 陈时斌). *Journal of Instrumental Analysis(分析测试学报)*, 1998, 17(1): 64.
- [4] GONG Xiao-feng, HUANG Jian-feng, NI Yong-nian(弓晓峰, 黄坚锋, 倪永年). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*, 1994, 22(9): 935.
- [5] Hopke P K, Paatero P, Hong J, et al. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 1998, 43: 25.
- [6] Bro R. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 1997, 38(2): 149.
- [7] NI Yong-nian, ZHANG Lin-lin(倪永年, 张霖霖). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 1996, 16(3): 74.
- [8] Hollman P C H, Slangen J H, Wagstaffe P J, et al. *Analyst*, 1993, 118: 481.
- [9] WU Gen-hua, HE Chi-yang(吴根华, 何池洋). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2003, 23(3): 535.

Simultaneous Synchronous Spectrofluorimetric Determination of Vitamin B₁, B₂ and B₆ by PARAFAC

NI Yong-nian, CAI Ying-jun

Department of Chemistry, Nanchang University, Nanchang 330047, China

Abstract In the present study, a synchronous spectrofluorimetric method has been applied to the simultaneous determination of vitamin B₁, B₂ and B₆. However, their spectra are overlapped so it is difficult to determine them individually. The parallel factor analysis (PARAFAC) was applied to the resolution of the overlapped spectra of mixtures of vitamin B₁, B₂ and B₆. The $\Delta\lambda$ range used was from 20 to 120 nm, and the excitation wavelength range was selected from 200 to 500 nm. From the measured fluorescence data a four-factor PARAFAC model was established, and was applied to the determination of a set of synthetic validation samples and some commercial samples with satisfactory results. This work shows that PARAFAC method is a powerful chemometric tool to the determination of mixtures of vitamin B₁, B₂ and B₆.

Keywords PARAFAC; Synchronous fluorescence; Vitamin B

(Received Jun. 8, 2004; accepted Aug. 16, 2004)