

荧光光谱法测定多种复杂样品中的维生素 B₂^①

马明阳^② 屈颖娟 李晨露

(西安文理学院化学与化工系 西安市雁塔区太白南路 168 号 710065)

摘要 运用丙酮-(NH₄)₂SO₄·H₂O 双水相萃取法对复杂样品进行预处理, 然后用荧光光谱法在 521nm 处测量有机相的荧光强度, 建立一种分离、测定复杂样品中维生素 B₂ 的新方法。在最适条件下, 该方法的线性范围为 2.0×10^{-7} — 1.4×10^{-3} mg/mL, 检出限为 1×10^{-8} mg/mL。该方法具有操作简便, 萃取率高, 干扰小等特点, 可用于复杂样品中维生素 B₂ 的分析测定。

关键词 双水相萃取; 维生素 B₂; 荧光光谱法; 丙酮; 硫酸铵

中图分类号: O657.32 **文献标识码:** B **文章编号:** 1004-8138(2011)03-1138-04

1 引言

维生素, 也称维他命, 是促进人体内新陈代谢的重要物质^[1]。B 族维生素是水溶性维生素中重要的一类, 当人体内缺乏 B 族维生素时可能导致多种疾病的产生, 而人体自身又无法合成这些化合物, 作为其中的一种重要组成部分维生素 B₂(VB₂, 又称核黄素), 临床用于防治口腔溃疡、唇干裂、舌炎、阴囊炎、角膜血管化等维生素 B₂ 缺乏症, 因而引起人们的广泛关注。

用荧光光谱法测定样品中维生素 B₂ 是目前最常用的测定方法, 但由于复杂样品成分较复杂, 干扰物质较多, 一些干扰物质消除不了, 从而影响了测定结果。本实验在样品处理时, 增加了一个双水相萃取的纯化步骤, 利用水溶性有机溶剂丙酮在无机盐作用下能形成双水相体系, 建立了丙酮-(NH₄)₂SO₄·H₂O 双水相萃取^[2]、荧光光谱测定 VB₂ 的新方法, 分离其他干扰物质, 达到进一步提纯目的, 提高分析的准确性。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

RF-5031PC 荧光分光光度计(日本岛津公司)。

核黄素(生物试剂)、丙酮、硫酸铵、盐酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、乙醇、草酸钾、醋酸锌、可溶性淀粉、蔗糖、抗坏血酸、苯甲酸钠、草酸钠、氯化钾、氯化铁、硫酸锌、硫酸铜、硫酸锰、磷酸钙(以上试剂均为分析纯, 西安试剂厂); 维生素 B₁ 片(10mg/片)、维生素 B₆ 注射液(50mg/mL)、多维元素片(江西南昌桑海制药厂); 伊利儿童成长牛奶(健骨型 125mL)。实验用水为蒸馏水。

维生素 B₂ 标准溶液(10mg/L): 准确称取 0.0050g 维生素 B₂, 用热蒸馏水溶解, 冷却后转入 500mL 容量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 转入棕色瓶中保存。

伊利儿童成长牛奶(健骨型)待测液: 取一盒 125mL 的伊利儿童成长牛奶(健骨型)倒入 250mL

① 西安文理学院专项科研项目(kyc2008)

② 联系人, 电话: (029) 85629286; E-mail: mmywxy@163.com

作者简介: 马明阳(1975—), 男, 陕西省周至县人, 讲师, 硕士, 主要从事光谱分析方面的研究工作。

收稿日期: 2010-08-05; 接受日期: 2010-09-03

的锥形瓶中,加入 5.00mL 无水乙醇(AR)、5.00mL 1% 草酸钾溶液,摇匀,再加入 2.00mL 醋酸锌溶液,混匀,待固体下沉后,用滤纸过滤,定容于 500mL 容量瓶中,作为待测液,转入棕色瓶中保存^[3]。

多维元素片待测液:取一片多维元素片研磨成粉末,用热蒸馏水溶解,用滤纸过滤,定容于 250mL 的容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀,稍后量取 5.00mL 溶液稀释定容到 50mL 容量瓶内,作为待测液,转入棕色瓶中保存^[4]。

2.2 实验方法

准确移取 2.00mL 的 VB₂ 溶液于 10mL 比色管中,加入 2.00mL 丙酮、1.0000g 的硫酸铵及一定量的蒸馏水,振荡静置 6min 分层,移取上层清液于 521nm 处测量荧光强度。

3 结果与讨论

3.1 荧光光谱

在使用丙酮-(NH₄)₂SO₄·H₂O 双水相体系荧光法测定 VB₂ 时,选用 449nm 为激发波长,发射波长则选用 VB₂ 的最大发射波长 521nm 为工作波长。

3.2 实验条件优化

3.2.1 有机溶剂丙酮用量的选择

不改变其他实验条件和试剂用量而改变丙酮用量进行实验,结果表明,当丙酮用量为 2.00mL 时有机相荧光值最大,故本实验选用丙酮用量 2.00mL。

3.2.2 无机盐硫酸铵用量的选择

不改变其他实验条件和试剂用量而改变硫酸铵用量进行实验,结果表明,当硫酸铵用量为 1.0000g 时有机相荧光值最大,故本实验选用硫酸铵用量 1.0000g。

3.2.3 萃取时间的选择

不改变其他实验条件和试剂用量而改变萃取时间进行实验,结果表明,当静置时间为 6min 时有机相荧光值最大,故本实验选用萃取时间 6min。

3.2.4 酸度的选择

不改变其他实验条件和试剂用量而改变溶液酸度(用盐酸,磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲溶液来调节)进行实验,结果表明,在 pH= 4—6 时,有机荧光强度大而稳定,几乎与酸度无关。由于本实验体系中存在高浓度(NH₄)₂SO₄,构成了 NH₄⁺-SO₄²⁻ 酸碱缓冲溶液。经测定,缓冲溶液 pH 值为 5.42,正好在最佳酸度范围内,所以在通常情况下,体系不需要专门使用外加酸、碱来控制酸度。

3.3 萃取率

在上述最佳实验条件下,按实验方法测定丙酮-(NH₄)₂SO₄·H₂O 双水相体系中 VB₂ 浓度在 2.0×10⁻⁷mg/mL 至 1.0×10⁻⁴mg/mL 范围内的萃取率。结果发现萃取率都在 84% 以上,且 VB₂ 在 2.0×10⁻⁷—1.0×10⁻⁴mg/mL 浓度范围内与荧光值呈线性关系。表明此方法比较适合对维生素 B₂ 的萃取。结果见表 1。

表 1 维生素 B₂ 的萃取率

VB ₂ 浓度(μg/mL)	0.0002	0.0020	0.0060	0.0100	0.1000
<i>I_f</i>	1.299	10.757	33.893	68.990	471.812
萃取率(%)	84.69	89.60	90.42	86.93	92.78

3.4 共存物质的影响

实验发现,维生素 B₂ 的丙酮-(NH₄)₂SO₄-H₂O 双水相体系中,对 1.0×10⁻⁵ mg/mL 的 VB₂ 进行干扰实验,当允许相对误差为±5%时,结果表明 4000 倍的可溶性淀粉、蔗糖、草酸、K⁺、Na⁺、Zn²⁺、Cu²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Fe³⁺、Cl⁻、SO₄²⁻、PO₄³⁻ 不干扰;800 倍的抗坏血酸不干扰;400 倍的苯甲酸钠不干扰;10 倍的维生素 B₁、维生素 B₆ 不干扰。

3.5 校准曲线绘制、精密度和检出限

在最佳实验条件下,VB₂ 的质量浓度与荧光强度在 2.0×10⁻⁷—1.4×10⁻³ mg/mL 的范围内呈线性关系, r²= 0.9908。

对浓度为 1.0×10⁻⁵ mg/mL 的 VB₂ 标准溶液进行 11 次平行测定,所得方法的相对标准偏差为 0.27%。按照 IUPAC 的建议,计算得方法的检出限为 1×10⁻⁸ mg/mL。

3.6 样品分析

3.6.1 伊利儿童成长牛奶(健骨型 125mL)

用吸量管准确移取伊利儿童成长牛奶(健骨型)待测液 2.00mL 于比色管中,按照实验方法,与测定标准系列时相同的条件测定其荧光强度。根据所测得的相对发光强度可计算出样品中维生素 B₂ 含量为 0.1885mg/L。

3.6.2 多维元素片

用吸量管准确移取多维元素片待测液 2.00mL 于比色管中,按照实验方法,用测定标准系列时相同的条件测定其荧光强度。根据所测得的相对发光强度可计算出样品中维生素 B₂ 含量为 0.9508mg/L。

3.7 加标回收实验

为了进一步说明方法的准确性,做了加标回收率实验,分别取 5.00mL 样品溶液,向其中加入 1.00mL 标准样品溶液,测得加样回收率,结果见表 2。

表 2 回收率的测定

(n= 3)

试样名称	样品量 (mg/L)	加标量 (mg/L)	回收量 (mg/L)	回收率 (%)
伊利儿童成长牛奶(健骨型)	0.1885	0.30	0.5035	105
多维元素片	0.9508	1.00	1.9608	101

4 结论

本实验主要通过丙酮-(NH₄)₂SO₄-H₂O 双水相萃取对样品进行预处理,然后确定实验的最佳条件,做出校准曲线,然后对样品进行测定,并通过回收率实验进行对照,并测定一些离子和有机物对实验的干扰。可得知本实验采用的丙酮-(NH₄)₂SO₄-H₂O 双水相萃取、荧光光谱法测定 VB₂ 的方法能较好的满足复杂样品中 VB₂ 的测定。且此方法操作简单,检出限低,灵敏度高,回收率高,可用于复杂样品中维生素 B₂ 的分析测定。

参考文献

- [1] 刘源,翟丽屏,相有章等. 维生素分析方法的研究现状及进展[J]. 中国地方病防治杂志, 2006, 21(1): 29—31.
- [2] 龙文清. 丙酮和乙醇双水相萃取、荧光法测定痕量维生素 B₂[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(10): 2098—2101.
- [3] 沙纪辉. 鲜牛奶及全脂奶粉中维生素 B₂ 的荧光测定方法[J]. 福建医药杂志, 1987, 9(1): 22—23.
- [4] 张福娣,蔡碧琼,杨远才. 荧光法测定医用维生素 B₂ 片剂中维生素 B₂ 的含量[J]. 福建分析测试, 2004, 13(3—4): 2027—2029.

Determination of Vitamin B₂ of Various Complex Samples by Fluorescence Spectrometry

MA Ming-Yang QU Ying-Juan LI Chen-Lu

(Department of Chemistry and Chemical Engineering, Xi'an University of Arts and Science, Xi'an 710065, P. R. China)

Abstract The complex samples were disposed with aqueous two-phase extraction based on acetone-(NH₄)₂SO₄-H₂O, and the fluorescent intensity of organic phase in 521nm was determined by fluorescence spectrometry. A new method for the separation and determination of complex samples of vitamin B₂ was established. Under the optimum conditions, the linear ranges of this method was 2.0×10^{-7} — 1.4×10^{-3} mg/mL, and the detection limit was 1×10^{-8} mg/mL. This method has advantages such as simple operation, high extraction rate, little interference, etc., and is suitable for determination of vitamin B₂ in complex samples.

Key words Aqueous Two-Phase Extraction; Vitamin B₂; Fluorescence Spectrometry; Acetone; Ammonium Sulfate

欢迎参观《北京天科邮票展览馆》

《北京天科邮票展览馆》由《科学家纪念邮票展览馆》、《陆达纪念馆》和《卢嘉锡纪念馆》等 3 部分组成,是科普类别的公益性展览馆,免费参观。在北京市工商行政管理局注册号为:110229009367903;北京市质量技术监督局颁发的组织机构代码为:78616185X;北京市国家税务局和北京市地方税务局颁发的税务登记证号为:11022978616185X;中国人民银行颁发的开户许可证核准号为:J1000047864702;开户行为:北京市农村商业银行夏都支行,账号:1403000103000010416。中华人民共和国国有土地使用证的证号为:京延国用(2002 出)字第 283 号;中华人民共和国房屋所有权证的证号为:京房权证延私字第 09140 号。

《科学家纪念邮票展览馆》展品内容:古今世界各国发行的、有关科学家或他们的发明创造的纪念邮票(复印件),大小为 210×297mm(A4 纸),共有 529 件。其中 190 位科学家为诺贝尔奖得主。每件展品均附有本馆编辑的有关科学家的简介,并如实叙述一些科学家的学术观点,仅供参考。

《陆达纪念馆》展品内容:1. 纪念陆达同志(代序,王鹤寿);2. 陆达传略;3. 《陆达纪念馆》照片目录;4. 《陆达纪念馆》照片(共 35 张);5. 《陆达纪念馆》(后语,周开化)。

《卢嘉锡纪念馆》展品内容:1. 伟人已逝 风范长存——纪念卢嘉锡先生(章振乾);2. 卢嘉锡生平;3. 《卢嘉锡纪念馆》照片目录;4. 《卢嘉锡纪念馆》照片(共 65 张);5. 《卢嘉锡纪念馆》(后语)(《光谱实验室》编辑部)。

3 馆展品内容已分别在《光谱实验室》2007 年第 1 期、2008 年第 1 期和 2009 年第 1 期刊登并出有单行本。

参观须知:1. 参观者应当具有高中(含)以上文化程度;2. 地址:北京市延庆县刘斌堡乡刘斌堡村东,刘斌堡乡中心小学东侧;3. 展厅面积 300 平方米;绿化面积 3000 平方米;4. 馆内禁止吸烟,禁止触摸展品;保持清洁卫生,爱护花木和陈设;每人入馆时间不得超过 2 小时;5. 赴馆乘车路线:北京德胜门乘 919 路公交车到终点站(延庆站,快车 12 元,1 小时 30 分;慢车 8 元,有“一卡通”者 4 折),再乘 920 路公交车或小面包车到“刘斌堡东”站,下车即到(5 元,25 分钟);6. 参观者请 1—3 日前电话预约登记,联系电话:(010) 62183031;52513126;13716729706。

注:陆达,钢铁研究总院前院长;卢嘉锡,中国科学院前院长;王鹤寿,原冶金工业部部长,第一届中共中央纪律检查委员会副书记;章振乾,福建省民盟名誉主委、厦门大学原教务长。

《光谱实验室》编辑部