

① 52-56 维生素 B₂ 和 B₆ 的同步荧光分析法及其在 维生素复合制剂中的应用 *

李耀群 黄贤智 许金钩 陈国珍 R977.22

(厦门大学化学系, 厦门 361005)

摘要 本文建立了维生素 B₂ 和 B₆ 的同步荧光分析法, 以 $\Delta\lambda = 58 \text{ nm}$ 进行同步扫描所得的两个同步荧光峰 (以发射波长表示, 分别位于 526 nm 和 389 nm) 用以同时分别定量维生素 B₂ 和 B₆。方法快速、灵敏。维生素 B₂ 和 B₆ 的工作曲线线性范围分别为 $0 \sim 1 \mu\text{g/ml}$ 和 $0 \sim 1.5 \mu\text{g/ml}$, 检出限分别为 0.5 ng/ml 和 1 ng/ml 。方法已应用于三种复合维生素 B 制剂中维生素 B₂ 和 B₆ 的分析。

关键词 维生素 B₂; 维生素 B₆; 荧光; 同步扫描

维生素的分析通常是先经分离后逐个分别测定⁽¹⁾, 步骤繁琐。周其镇等⁽²⁾曾用 CPA 分光计算法通过计算机矩阵处理的方式同时测定多种维生素。荧光分析法比分光光度法具有更高的灵敏度和更宽的线性范围, 是测定低含量维生素的有效方法之一。本文采用一种荧光分析新技术——同步荧光分析法^(3,4), 研究了维生素 B₂, B₆ 同时快速分析的可能性, 建立了维生素 B₂, B₆ 的同步荧光分析法。所提出的方法经应用于三种复合维生素 B 制剂中维生素 B₂ 和 B₆ 的同时分析, 得到较满意的结果。样品无需分离, 操作方便。

同步荧光分析法于 70 年代提出后, 以其谱图简化、选择性提高、散射光干扰减少等优点⁽⁵⁾而引起人们的注意, 获得广泛的应用。维生素 B₂ 和 B₁ 的同步荧光分析已见报道⁽⁵⁾。和经典荧光分析法相比, 同步荧光分析法在实验技术上的差别在于同时扫描激发波长和发射波长。根据扫描方式的区别, 同步荧光分析法又可分为固定波长法、可变角法和恒能量法^(6~8)。目前最广为使用的是固定波长同步荧光分析法, 即在扫描过程中使激发波长和发射波长两者之间始终保持固定的波长间隔 ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$)。一般进口的荧光分光光度计上都具有这种同步扫描功能, 便于该方法的推广应用。与固定波长法相比, 恒能量法和可变角法虽有特色, 但在普通荧光分光光度计上无法实现。基于上述考虑, 本文采用固定波长差扫描技术进行维生素 B₂ 和 B₆ 的同步荧光研究, 为复杂试样中的维生素 B₂ 和 B₆ 同时检出提供了一个有效的灵敏手段。

实 验 部 分

一. 仪器、试剂和药品

荧光分光光度计 日立 650-10 S 型。激发和发射单色仪带通均为 5 nm。测绘激发和发射光谱时扫描速度为 120 nm/min, 而同步扫描速度则为 60 nm/min。

缓冲溶液 pH 7.0。用 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液与 0.1 mol/L 柠檬酸溶液按体积比 6:1 混合调制而成。

本文于 1990 年 10 月 23 日收到。

* 国家自然科学基金资助项目

维生素B₂ (VB₂, 核黄素) 贮备液 准确称取 10 mg 维生素 B₂ (厦门鱼肝油厂提供), 用 0.02 mol/L 醋酸溶解, 配制成 200 ml 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的贮备液。维生素 B₂ 较难溶解必要时可略加温以促进溶解。使用时用缓冲液加以稀释。

维生素 B₆ (VB₆, 吡哆辛) 贮备液 准确称取 20 mg 维生素 B₆ (厦门鱼肝油厂提供), 用二次蒸馏水配制成 100 ml 浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的贮备液。使用时用缓冲液加以稀释。

复合维生素 B 溶液 市售品。准确移取 5 ml 复合维生素 B 溶液于 25 ml 量瓶中, 用水稀释至刻度。

复合维生素 B 片 市售品, 取 10 片复合维生素 B 片, 准确称其重量后研磨混和。准确称取约半片的粉重, 溶于水后定容至 50 ml。吸取 0.4 ml 于 10 ml 量瓶中, 用缓冲液稀释至刻度。

复合维生素 B 注射液 市售品。准确吸取 0.5 ml 注射液于 50 ml 量瓶中, 加水定容。准确吸取该溶液 0.3 ml 于 10 ml 量瓶中, 加缓冲液稀释至刻度。

二. 测定方法

取试液置于 1 cm 石英液池中, 在荧光分光光度计上以 $\Delta\lambda = 58 \text{ nm}$ 进行同步扫描。以所得的同步荧光光谱中 526 nm (以发射波长表示, 下同) 和 389 nm 波长处的同步荧光峰高分别测定 VB₂ 和 VB₆ 的含量。

结果与讨论

一. 激发光谱和发射光谱

取维生素 B₂ 和 B₆ 的贮备液, 分别用缓冲液配制成浓度为 0.8 和 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标准溶液, 测绘各自的激发光谱和发射光谱 (图 1)。维生素 B₂ 和 B₆ 的荧光发射峰分别位于 523 nm 和 393 nm。维生素 B₂ 的荧光激发峰有 276, 377 和 472 (最强) nm 等数个; 而维生素 B₆ 的激发峰位于 328 nm。

二. 固定波长差 $\Delta\lambda$ 的选择

用同步荧光技术同时分析混合物的最重要参数是两个单色仪之间的最佳波长差 $\Delta\lambda$ 。为此, 测绘了不同 $\Delta\lambda$ 时混合物的同步荧光光谱。由图 1 可知, 维生素 B₂ 和 B₆ 的 (主) 激发和发射峰波长间隔分别为 51 nm 和 65 nm, 因而采用 $\Delta\lambda$ 为 51 ~ 65 nm 之间的值进行同步扫描, 实验所得的同步荧光光谱均出现对应于 VB₂ 和 VB₆ 的二个同步荧光峰, 无光谱重叠现象, 可用于定量分析。但峰强度随 $\Delta\lambda$ 不同有所差异。选择 $\Delta\lambda = 51 \text{ nm}$, 有利于 VB₂ 的荧光激发和发射, 因此 VB₂ 荧光信号相对较强; 反之, 选择 $\Delta\lambda = 65 \text{ nm}$, 则 VB₆ 的荧光信号相对较强。

本实验采用 $\Delta\lambda = 58 \text{ nm}$, 这个 $\Delta\lambda$ 值对两种维生素都较适宜。该条件下, VB₂ 的同步荧光峰位于 526 nm, VB₆ 的同步荧光峰在 389 nm 波长处。图 2a 为 VB₂ 浓度相同, VB₆ 量不同

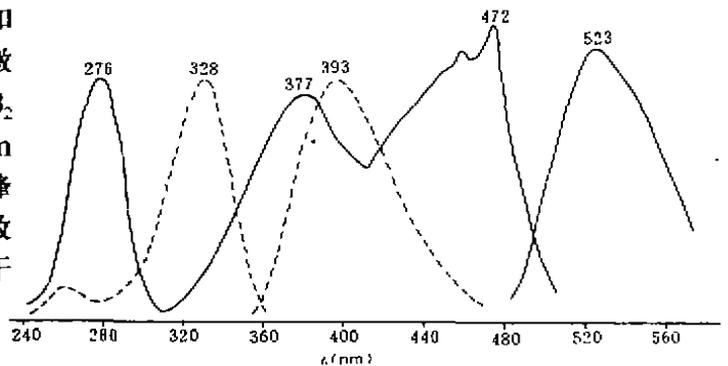


Fig 1. Fluorescence excitation and emission spectra for VB₂ (— 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and VB₆ (--- 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

的同步荧光光谱 ($\Delta\lambda = 58 \text{ nm}$)。由图可见, VB_6 的存在对 VB_2 没有影响, VB_6 本身的同步荧光信号与浓度成正比关系。图 2b 为 VB_6 浓度相同、 VB_2 量不同的情形。实验结果均证明 VB_2 和 VB_6 之间互不干扰, 同步荧光峰适合用以进行各自的定量测定。

三. 标准曲线

取不同量的维生素 B_2 和 B_6 贮备液于一系列 10 ml 量瓶中, 分别用缓冲液稀释至刻度, 配制成维生素 B_2 和 B_6 的系列标准溶液。以 526 nm 和 389 nm 处的同步荧光峰高分别对 VB_2 和 VB_6 浓度绘制标准曲线。 VB_2 在 $0 \sim 1 \mu\text{g/ml}$ 的范围内同步荧光强度与浓度之间呈线性关系, 相关系数为 0.9992, 检出限为 0.5 ng/ml ; VB_6 的线性范围为 $0 \sim 1.5 \mu\text{g/ml}$, 相关系数为 0.9996, 检出限为 1 ng/ml 。

试样浓度若过高, 会产生荧光自熄灭或组分间能量转移问题, 不利于分析。

四. 精密度

取含维生素 B_2 $0.7 \mu\text{g/ml}$ 和 B_6 $0.8 \mu\text{g/ml}$ 的混合标准溶液 7 份, 平行测定, 相对标准偏差分别为 1.3% 和 1.6%。

五. 加料回收试验

分别在三种制剂 (复合维生素 B 溶液、片剂和注射剂) 配成的溶液中加入已知量的 VB_2 和 VB_6 进行回收实验, 结果如表 1。

Tab 1. Result of recoveries ($n=3$)

Multi-vitamin B	VB_2				VB_6			
	Added ($\mu\text{g/ml}$)	Found ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)	CV (%)	Added ($\mu\text{g/ml}$)	Found ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)	CV (%)
Solution	0.500	0.492	98.4	3.3	0.750	0.701	93.5	1.5
Tablet	0.250	0.256	102.4	1.9	0.125	0.127	101.6	1.5
Injection	0.500	0.526	105.2	0.5	0.750	0.793	105.7	0.5

六. 样品测定

复合维生素 B 溶液, 复合维生素 B 片和复合维生素 B 注射液同步荧光光谱均和标准溶液的光谱一致, 于 526 nm 和 389 nm 出现同步荧光峰。三种样品虽然都含有 VB_1 、烟酰胺、泛酸盐及保护剂等, 但这些物质在实验条件下均不显现同步荧光信号, 不干扰 VB_2 和 VB_6 的测定。图 3 为复合维生素 B 溶液的同步荧光光谱。测定结果如表 2。

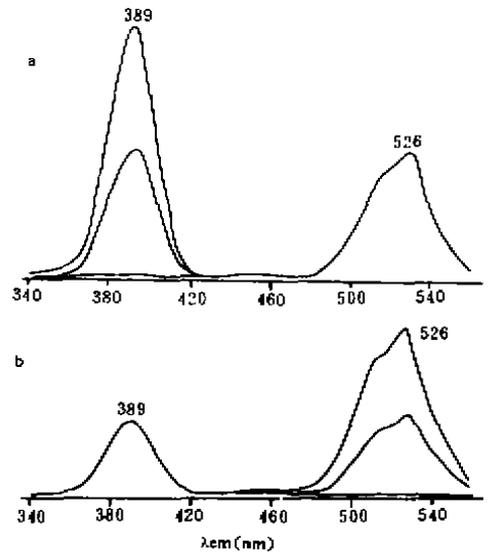


Fig 2. Synchronous fluorescence spectra ($\Delta\lambda = 58 \text{ nm}$). (a) VB_2 ($0.4 \mu\text{g/ml}$) and VB_6 ($0, 0.5, 1.0 \mu\text{g/ml}$). (b) VB_6 ($0.6 \mu\text{g/ml}$) and VB_2 ($0, 0.5, 1.0 \mu\text{g/ml}$).

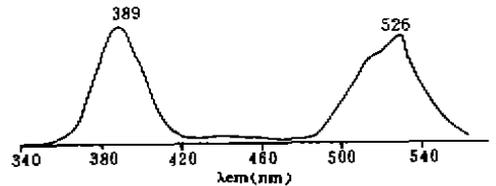


Fig 3. Synchronous fluorescence spectrum of multivitamin B solution.

Tab 2 . Determination of samples

Multi-vitamin B	VB ₂				VB ₆			
	Content (% of labelled amt)		Average (%)		Content (% of labelled amt)		Average (%)	
Solution	103.7	106.8	108.3	106.3	89.1	86.1	85.6	86.9
Tablets	102.3	101.0	98.0	100.4	90.0	90.0	90.0	90.0
Injection	96.8	95.2	95.2	95.7	92.3	91.3	92.3	92.0

三种复合维生素 B 制剂的实验结果已证明了本方法的可靠性。该法可望推广到其它实际体系中,只要其共存组分不发生同步荧光干扰。实际样品中可能含某些其吸收光谱与 VB₂ 或 VB₆ 荧光发射光谱交叠的吸收物质,为保证不发生荧光重吸收现象,可在工作曲线的中下部进行测定。

参 考 文 献

1. 中华人民共和国药典, 1985 年版, 二部, 北京: 人民卫生出版社, 1985, 562~570.
2. 周其镇, 等. CPA 分光算法同时测定多种维生素的研究. 药 学 学 报 1987; 22: 896.
3. Vo-Dinh T. Multicomponent analysis by synchronous luminescence spectrometry. *Anal Chem* 1978; 50: 396.
4. Wehry EL, ed. *Modern Fluorescence Spectroscopy*. Vol 4. New York: Plenum, 1981.
5. 许金钧, 等. 同步荧光分析法同时测定维生素 B₁ 和 B₂. 医 药 工 业 1985; 16: 487.
6. Inman EL and Winefordner JD. Constant-energy synchronous fluorescence for reduction of Raman scatter interference. *Anal Chim Acta* 1982; 138: 245.
7. Miller JN. Recent development in fluorescence and chemiluminescence analysis. *Analyst* 1984; 109: 191.
8. 李耀群, 黄贤智. 固定能量同步发光光谱测定法. 分 析 化 学 1989; 17: 1154.

SYNCHRONOUS SPECTROFLUORIMETRY FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF RIBOFLAVIN AND PYRIDOXINE AND ITS APPLICATION IN MULTIVITAMIN PREPARATIONS

YQ Li, XZ Huang, JG Xu and GZ Chen

(Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005)

ABSTRACT A new method for the simultaneous determination of riboflavin and pyridoxine by synchronous spectrofluorimetry is described. The measurement was carried out in a buffer solution of pH 7 with $\Delta\lambda = 58$ nm for synchronous scanning. Under the experimental conditions two peaks appeared at 526 nm and 389 nm in the obtained synchronous fluorescence spectrum, corresponding to riboflavin and pyridoxine, respectively. This method was proved to be simple and specific. The fluorescence relative intensity is linearly related with concentration over the range of 0 ~ 1 $\mu\text{g/ml}$ and 0 ~ 1.5 $\mu\text{g/ml}$ for

riboflavin and pyridoxine, respectively. The detection limit was 0.5 ng/ml for riboflavin and 1 ng/ml for pyridoxine. The relative errors of the measurements were less than 5% for artificial samples.

The proposed method has been applied to the analyses of riboflavin and pyridoxine in three kinds of commercial multivitamin preparations. The obtained synchronous spectra of multivitamin preparations coincided with those of the mixed standard solution of riboflavin and pyridoxine. Recoveries of 93.5 ~ 105.7% were obtained.

Key words Riboflavin; Pyridoxine; Fluorescence; Synchronous scanning

全国药物分析学术报告会会讯

中国药学会全国药物分析学术论文报告会于1991年11月7~10日在武汉召开。这次会议是自1987年中国药学会成立80周年庆祝大会以来,药物分析内容全面的一次大会,参加人数多、内容丰富。共有189名代表参加,会议共收到论文470余篇,大会交流了146篇,其中:综述和新技术在药物分析中的应用12篇;液相色谱法39篇(包括超临界流体色谱、胶束动电毛细管色谱等);紫外分光光度法及比色法44篇;荧光(磷光)分析8篇以及红外光谱法、原子吸收分光光度法、电化学分析法等。

此次学术报告会内容广泛,具有以下特点:

1. 分析理论和基础的探讨

(1)手性色谱柱分离对映体的三点作用是适用于外消旋体红外光谱分析,其规律是只有含有三个和三个以上极性基团的分子,其外消旋体的图谱才与对映体的图谱不一致。

(2)胶束动电毛细管色谱法中,胶束相(或称假固定相)和水相(即流动相)都同时在毛细管中移动,与经典的液相或气相色谱法有不同之处,在经典的分配色谱公式中引入胶束和水相流速比 γ ,即可应用经典的保留方程于本法。

2. 新分析技术的应用

(1)傅立叶变换质谱用于合成产物的研究及聚合物分子量分布、组成等。

(2)胶束动电毛细管色谱用于复方制剂(复方磺胺药)的分析。

(3)超临界流体色谱法应用于中药牛膝中齐墩果酸的测定。

(4)发光化学分析在国内正在从事研究,并取得不少成绩。

3. HPLC法在本次学术报告中占1/3,特别是应用于中药分析占1/4,药品体液分析占1/4,其余1/2是西药定量及杂质检查。

4. 气相色谱法用GC/MS联机以及裂解色谱、顶空进样等技术的探讨和应用。

5. 药物晶型问题有新的发现,其中多数是用红外光谱测出,辅以x-射线衍射及其它方法证实。

6. 计算分光光度法应用于多组分分析。

(本刊讯)