

维生素 B₁ 的分析方法概述

★ 郭敏 (江西中医学院 南昌 330006)

★ 卢建中 (江中药业股份有限公司 南昌 330077)

关键词: 维生素 B₁; 分析方法; 综述

中图分类号: TQ 466.2 文献标识码: A

维生素 B₁(硫胺素), 其化学名称为氯化 4-甲基-3-[(2-甲基-4-氨基-5-嘧啶基)甲基]-5-(2-羟基乙基)噻唑鎓盐酸盐, 具有维持正常糖代谢及神经消化系统功能, 用于防治缺乏维生素 B₁ 所致的脚气病, 也用于神经炎、消化不良等症的辅助治疗。维生素 B₁ 在体内经焦磷酸激酶作用生成的焦磷酸硫胺素(TPP)是多种酶的辅酶, 在体内糖代谢中发挥极其重要的作用。目前我国药典规定维生素 B₁ 注射液及其片剂中维生素 B₁ 含量采用分光光度法测定。国内外对维生素 B₁ 的分析方法报道很多, 荧光法是常用的方法, 通常分析测定维生素 B₁ 的荧光分析法是在碱性介质中用 K₃Fe(CN)₆^[1]、HgCl₂^[2] 或在酸性或中性介质中用 BrCN^[3] 将维生素 B₁ 氧化成硫胺荧光, 通过测量硫胺荧光的荧光强度来分析维生素 B₁ 的含量。本文对维生素 B₁ 的含量测定方法进行了综述。

1 色谱法

1.1 薄层色谱法 薄层色谱法是将固定相均匀地涂铺在具有光洁表面的玻璃、塑料或金属板上形成薄层, 在此薄层上进行色谱分离的方法。臧荣春等^[4]采用胶束增溶技术, 在薄层色谱法中引入荧光分析法, 分析了植物材料中的维生素 B₁。在 CMC 硅胶 G 板上, 以氯仿-乙醇-丙酮-氨水(20:20:20:10 V/V)为展开剂展开。展开后在 360 nm 的激发波长下扫描, 所得回归方程是: $Y = 1.846X - 2.301$, $r = 0.992$; 检出限达 0.01 μg, 回收率约为 85%。本法具有设备简单、分离速度快、灵敏度高优点, 且试剂普通, 大薄层板一次可分析多个样品, 总时间较液相色谱法少。

1.2 高效液相色谱法 高效液相色谱法是以经典液相色谱法为基础, 引入了气相色谱的理论及实验方法, 发展而成的分离分析方法。具有适用范围广, 分离性能好, 分析速度快等优点。朱维华^[5]采用反相离子对 HPLC 法测定脑脊液中维生素 B₁ 的药物浓度, 最小检测量可达 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ g。其色谱条件为: 检测波长 270 nm; 流动相: 甲醇 250 mL 与 0.000 5 mol/L 己烷磺酸钠(内含 1% 冰醋酸)750 mL 混合, 流速 1 mL/min。进样 5 次, 测得回收率为 97.0%。本法灵敏度高, 脑脊液中的还原糖、氯化物和其它无机离子、脂溶性物质等均不干扰测定, 是一种较理想的测定方法。

暴永平等^[6]采用快速高效液相色谱分析测定食品中维生素 B₁ 的含量。其色谱条件为: 流动相: 50% 甲醇/磷酸盐缓冲液(pH = 7.0); 流速 1 mL/min; M420 荧光检测器(360/425 nm), 灵敏度 4X; 纸速 0.5 cm/min; 外标法定量分析。最小检出量为 0.1 ng, 回收率为 $94.4 \pm 1.27\%$ 。该方法简化了样品前处理, 大大缩短了分析时间, 且 Sep-pak C₁₈ 小柱可以反复使用 10 次左右, 成本可降低, 因此是一个值得在实验室推广的快速分析方法。

2 荧光法

荧光分析法是根据物质的荧光谱线位置及其强度进行物质鉴定和物质含量测定的方法, 其最主要的优点是测定灵敏度高和选择性好。

2.1 时间扫描动态荧光法 李松青等^[7]利用自制的简单装置和 K₃Fe(CN)₆ 在碱性条件下氧化维生素 B₁ 的反应, 在激发波长 372 nm, 发射波长 460 nm 处, 监视反应的进行, 记录荧光强度与时间关系曲

线,测得最大荧光强度,方法线性范围为 $5.40 \sim 4.32 \times 10^3 \mu\text{g/L}$,相关系数为 0.999 8,检出限为 $1.44 \mu\text{g/L}$,相对标准偏差为 2.1% ($n=12$),回收率在 95%~104%之间。该方法简化了操作手续,缩短了分析时间,适用于药物制剂中维生素 B₁ 的测定。

2.2 光化学荧光分析法 郭祥群等^[8]报道了维生素 B₁ 和维生素 B₆ 的光化学动力学(波长选择和时间选择)荧光分析法联合测定的原理和方法。该法的建立是基于 B₁ 的光化学荧光衍生化反应和 B₆ 的光分解反应。B₁ 的浓度在 $0 \sim 1.4 \mu\text{g/mL}$ 呈良好的线性关系, $r=0.999$,检出限为 0.60 ng/mL ,相对标准偏差为 0.99% ($n=8$)。该法可以克服 K₃Fe(CN)₆ 对 B₆ 荧光的猝灭而对 B₁ 的测定产生的干扰,但操作繁琐,用于混合物的测定效果良好。

2.3 光化学反应——FIA 荧光分析法 郭祥群等^[9]提出并建立了一种用“光子”作试剂代替各种氧化剂的维生素 B₁ 光化学反应—FIA 荧光分析法。对反应体系的介质,注样速度,注样管长度以及注样方式进行了实验和讨论。维生素 B₁ 浓度在 $0 \sim 2.0 \mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好的线性关系, $r=0.999$,检出限为 2.0 ng/mL ($S/N=3$)。对 9 份含维生素 B₁ 为 $0.10 \mu\text{g/mL}$ 的试液进行平行测定,相对标准偏差为 2.7%。对维生素 B₁ 片剂分析,测得维生素 B₁ 含量为标示量的 94%,标准加入回收率为 97%~100%。对维生素 B₁ 注射液分析,测得维生素 B₁ 含量为标示量的 100%,标准加入回收率为 95%~100%。在尿液基质中做标准加入回收实验,回收率为 80%~83%。基于维生素 B₁ 在碱性介质中发生光化学反应生成强荧光物质的光化学—FIA 荧光分析法避免了 K₃Fe(CN)₆ 法难以克服的氧化剂用量不易控制,过量的 K₃Fe(CN)₆ 对产物荧光信号有猝灭及 HgCl₂ 法和 BrCN 法所用试剂毒性较大等缺点。该法简单、快速、灵敏度高。

2.4 同步荧光法 蒋淑艳^[10]研究了食品中维生素 B₁ 的同步荧光法测定条件。采用氯化钾-乙醇作柱层析洗脱液,碱性介质中氧化后立即调为中性,并加入表面活性剂 OP 对体系增稳增敏,取代丁醇萃取,经济方便。所得回归方程为: $F=3.614C+0.112$,相关系数 $r=0.999 6$,线性范围 $0 \sim 10 \mu\text{g}/25 \text{ mL}$,回收率为 95.3%~102%,相对标准偏差为 1.18%~2.01%。该法经济方便,用于几种粮食样品的测定。

2.5 荧光及导数荧光光谱法 高光恩等^[11]报道了用荧光法及二阶导数荧光光谱法同时测定多种维生素中维生素 B₁、B₂ 和 B₆ 的含量。用标准曲线法定量,维生素 B₁ 线性范围为 $0 \sim 5 \text{ ppm}$,回收率为 101.4%,相对标准偏差为 2.31%。该法以 370 nm 为激发波长,452 nm 为荧光波长测定 B₁ 标准系列溶液的荧光强度,以 468 nm 为激发波长,以扣除空白溶液后的荧光强度及二阶导数值为纵坐标,浓度为横坐标,绘制 B₁ 的标准曲线,得回归方程为 $C=0.008 6F-0.046 6$, $r=0.999 9$,线性范围可达 $5 \mu\text{g/mL}$ 。该法简便、快速、灵敏、准确,用于复方制剂中维生素 B₁ 的含量测定。

2.6 荧光反应速率法 基于 K₃Fe(CN)₆ 在碱性溶液中氧化维生素 B₁ 的荧光动力学反应,李松青等^[12]利用自制的简单装置,以 NaOH 的加入为反应起点,监视荧光反应的进行,建立了荧光反应速率法测定维生素 B₁ 的方法。于激发波长 372 nm、发射波长 460 nm 处开始进行时间扫描。该法线性范围为 $0.013 5 \sim 5.40 \text{ g/L}$,线性相关系数为 0.999 6,检出下限为 $4.80 \mu\text{g/L}$,相对标准偏差为 2.8% ($n=15$),标准加入的回收率在 95.1%~101.3%之间。该法具有灵敏度高、选择性好、动态线性范围宽等优点。

3 电化学法

应用电化学原理进行物质成分分析的方法称为电化学分析法。电化学分析法具有设备简单、操作方便、方法多、应用范围广和便于推广等优点,另外,电化学分析法也有比较好的灵敏度、准确度与重现性。

3.1 两点电位滴定法 冯俊贤等^[13]提出了用两点电位滴定法测定维生素 B₁ 含量的新方法。在滴定终点前附近记录两次 AgNO₃ 标准溶液体积和相应的电极电位值,利用两点法公式计算滴定终点,从而确定维生素 B₁ 含量。本实验以银指示电极为正极,双盐桥饱和甘汞电极为负极,用 AgNO₃ 标准溶液进行电位滴定。该法简便易行,数据处理简单,样品溶液不需过滤,特别适用于片剂中维生素 B₁ 含量的测定。

3.2 离子选择性电极电位滴定法 景丽洁等^[14]采用离子选择性电极,在水溶液中用电位滴定法测定维生素 B₁ 的含量。以氯离子选择性电极为指示电极,饱和甘汞电极为参比电极,用浓度为 0.05 mol/L 的 AgNO₃ 标准溶液进行滴定,测定结果的相对标准

偏差为 0.8%, 相对误差为 -0.6%。该法操作简便, 不需标样, 用于维生素 B₁ 含量的常规测定。

3.3 线性扫描极谱法 孙炳耀等^[15]利用线性扫描极谱法研究了维生素 B₁ 的电化学性质, 发现以 pH5.00 的 HAc~NaAc 缓冲溶液作底液, 维生素 B₁ 在汞电极上有一个很灵敏的还原峰, 峰电位为 -1 390 mV (vs. SCE), 峰高与 B₁ 浓度在 10⁻⁶ ~ 10⁻⁴ mol/L 范围内呈线性 ($r = 0.999$)。此外, 实验还证明了 B₁ 的电极反应为一准可逆过程。将该法用于药片、大豆与米糠中维生素 B₁ 的测定, 结果与荧光法吻合。该法简单, 但对仪器要求高。

4 光度法

朱止平等^[16]探讨了反应介质, 显色时间、浓度与吸光度的关系, 研究出了一重氮苯磺酸反应光度法快速测定维生素 B₁ 的方法。以 495 nm 为工作波长, 最低检出量为 0.025 $\mu\text{g/mL}$, 加入回收率为 98.6% ~ 102.5%, 相对标准偏差为 2.5%。该法简便易行, 精密度高, 用于维生素 B₁ 的快速测定。

5 间接原子吸收法

任建成等^[17]提出了在强电解质溶液中, Ag⁺ 与维生素 B₁ 中 Cl⁻ 生成 AgCl 沉淀, 离心沉降, 不经过滤分离, 直接测其清液中剩余 Ag⁺ 含量, 间接计算出维生素 B₁ 含量的新方法。具有线性范围宽 (500 ~ 4 000 $\mu\text{g/5mL}$), 重现性好, 快速省时, 所用试剂少等优点, 利用本法测定了片剂和针剂中维生素 B₁ 含量。

6 结语

维生素 B₁ 是机体维持正常代谢和机能所必需的低分子有机化合物之一, 在糖代谢中发挥重要作用, 对其分析方法进行研究是很有必要的。在上述仪器分析方法中, 多数方法测样前均需绘制工作曲线, 再根据线性回归方程计算维生素 B₁ 含量, 所以曲线的准确与否直接关系到测定结果的准确度, 因此应严格控制对照品液的配制和测定条件。其分析方法很多, 但各有优缺点, 薄层扫描法重现性好, 但对点样量及点样技术的要求较高; 高效液相色谱法方法专一、灵敏, 但仪器较为昂贵, 测定条件苛刻; 荧

光法选择性好, 灵敏度高, 但分析时间长、手续繁, 还需另外一种物质来组成发光体系。光谱法简便易行, 精密度高, 但分析时间长, 操作繁琐。电化学法使用设备易得, 操作简单, 但样品前处理较繁琐。因此, 维生素 B₁ 的分析方法还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Chnesorge W E, Rogers L B. Fluorometric determination of thiamine and riboflavin in mixtures[J]. Anal. Chem. 1956, 28: 1 017~1 021
- [2] Edmin E E. An improved procedure for the determination of thiamine. In: Methods in Enzymology • Vitamins and Coenzymes (Part D) [M]. New York: Academic Press Inc, 1979, 51~54
- [3] Kawasaki T. Determination of thiamine and its phosphare esters by high performance liquid chromatography. In: Methods in Enzymology • Vitamins and Coenzymes (Part G) [M]. New York: Academic Press Inc, 1986, 15~20
- [4] 臧荣春, 马志超. 薄层色谱法同时分析植物材料中的维生素 B₁、B₂、B₆ [J]. 色谱, 1989, 7(4): 243~245
- [5] 朱维华. 反相离子对 HPLC 法测定脑脊液中维生素 B₁、维生素 B₆、地塞米松和氢溴酸加兰他敏 [J]. 药物分析杂志, 1992, 12(5): 311~312
- [6] 暴永平, 张宇秋, 王朝旭, 等. 食品中维生素 B₁ 和 B₂ 的快速高效液相色谱分析 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 1991, 25(3): 225~227
- [7] 李松青, 夏殊, 陈小明. 测定维生素 B₁ 的时间扫描动态荧光法 [J]. 分析测试学报, 2001, 20(3): 51~53
- [8] 郭祥群, 许金钧, 王晋玲, 等. 光化学荧光分析法研究: VII. 维生素 B₁ 和 B₆ 的联合测定 [J]. 分析化学, 1992, 20(8): 910~913
- [9] 郭祥群, 许金钧, 赵一兵, 等. 光化学反应——FIA 荧光分析法测定维生素 B₁ [J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 1993, 32(1): 75~81
- [10] 蒋淑艳. 同步荧光法测定食品中维生素 B₁ [J]. 光谱实验室, 1997, 14(2): 83~85
- [11] 高光恩, 杨桂英. 荧光及导数荧光光谱法同时测定维生素 B₁、B₂ 和 B₆ 的含量 [J]. 沈阳药学院学报, 1992, 9(1): 18~21
- [12] 李松青, 胡朝晖, 夏殊, 等. 荧光反应速率法测定 VB₁ 研究 [J]. 湘潭大学自然科学学报, 2001, 23(1): 64~67
- [13] 冯俊贤, 宋丽英, 李素娟, 等. 两点电位滴定法测定维生素 B₁ [J]. 分析化学, 1999, 27(4): 453~456
- [14] 景丽洁, 宋闯, 于泳, 等. 离子选择性电极电位滴定法测定维生素 B₁ 的含量 [J]. 分析化学, 2002, 30(11): 1 402
- [15] 孙炳耀, 钟红舰, 赵蕾, 等. 维生素 B₁ 的电化学性质研究及测定 [J]. 郑州大学学报 (理学版), 2002, 34(3): 74~77
- [16] 朱止平, 李东风. 维生素 B₁ 快速定量分析方法的研究: 一重氮苯磺酸反应光度法 [J]. 分析化学, 1992, 20(11): 1 360
- [17] 任建成, 王怀友, 朱丽, 等. 维生素 B₁ 分析方法的探讨——间接原子吸收法 [J]. 山东师范大学学报 (自然科学版), 1994, 9(1): 51~54

(收稿日期: 2006-06-09)

欢迎投稿! 欢迎订阅!