

丙酮和乙醇双水相萃取、荧光法测定痕量维生素 B₂

龙文清

井冈山学院化学化工学院, 江西省配位化学重点实验室, 江西 吉安 343009

摘要 诸如乙醇、丙酮和乙腈等水溶性小分子有机溶剂在盐的作用下能够形成双水相体系用于目标物质的萃取。正是基于此, 提出了丙酮-盐-水和乙醇-盐-水体系双水相萃取、荧光测定痕量维生素 B₂ 的新方法。研究了盐和有机溶剂种类及用量、萃取时间、共存物和酸度等的影响。发现, 丙酮-(NH₄)₂SO₄-H₂O 和乙醇-(NH₄)₂SO₄-H₂O 体系对维生素 B₂ 的一次性萃取率分别为 97.6%~98.4% 和 94.2%~95.5%; 在最适条件下, 两种体系测定维生素 B₂ 的线性范围分别为 $1.5 \times 10^{-7} \sim 3.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2.0 \times 10^{-7} \sim 1.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 检出限分别为 0.031 和 0.041 μg 。该方法已成功用于片剂和注射液中维生素 B₂ 的测定, 相对标准偏差 1.5%~2.2%, 与中国药典方法对照, 相对误差 -1.8%~1.1%。与传统的液-液萃取和固相萃取比较, 本方法具有操作简便、萃取率高、干扰小、低毒等显著特点。

关键词 双水相萃取; 维生素 B₂; 荧光测定法; 丙酮; 乙醇; 硫酸铵

中图分类号: O657.3; O658.2; R917 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2007)10-2098-04

引言

萃取是一种十分重要的化学分离手段。传统的萃取分离通常是在两个互不相溶的相——有机相和水相间进行, 这种异相萃取的传质效率通常较低, 一般须较长时间振荡或多次萃取才能实现定量萃取, 费时, 且使用的有机溶剂危害环境。采用均相萃取、异相分离的双水相萃取(aqueous two-phase extraction, ATPE)则可以较好地克服上述缺点。以往对 ATPE 的研究大部分限于高聚物双水相体系^[1,2], 有关离子液体^[3]和表面活性剂^[4]的 ATPE 体系也时有报道。事实上, 某些能与水互溶的有机溶剂在无机盐作用下也可能形成双水相体系^[5], 只是有关这方面的研究目前还比较少, 有待进一步扩大和深入。与高聚物双水相体系相比, 水溶性有机溶剂-盐双水相体系具有操作简便、相分离速度快、价廉、低毒、分相清晰、对测定干扰小及萃取相不含粘度大、难处理的聚合物等特点^[5]。维生素 B₂ (VB₂, 又称核黄素) 临床用于防治口角炎、唇干裂、舌炎、阴囊炎、角膜血管化等维生素 B₂ 缺乏症, 测定方法有分光光度法^[6]、催化动力学法^[7]、磷光法^[8]、伏安法^[9]、化学发光法^[10]、荧光法^[11]和色谱法^[12]等。本文对水溶性有机溶剂乙醇和丙酮在无机盐作用下形成双水相的条件和萃取 VB₂ 的性质进行了对比研究, 建立了丙酮/乙醇-(NH₄)₂SO₄-H₂O 双水相萃取、荧光测定 VB₂ 的新

方法。用于 VB₂ 片剂和注射液的测定, 相对标准偏差 1.5%~2.2%, 与中国药典标准方法^[6]对照, 相对误差 -1.8%~1.1%。从总体上看, 用丙酮形成的双水相萃取、荧光测定 VB₂ 的方法要优于由乙醇形成的双水相。由于双水相的高效萃取作用, 使得本方法简便快速, 检出限和选择性得到优化。

1 实验部分

1.1 主要仪器和试剂

LS-55 型发光光度计(美国 Perkin Elmer 公司), 荧光方式, 激发/发射狭缝宽 2.5/2.5 nm; pH5-3C 数字型精密酸度计(上海雷磁仪器厂)。

维生素 B₂ (Sigma 公司) 标准溶液(避光保存), $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 乙醇; 丙酮; Na₂CO₃; (NH₄)₂SO₄; Na₂SO₄; Na₃PO₄ · 12H₂O; BaCl₂; NaCl; 所用试剂均为分析纯, 实验用水为一次蒸馏水经石英亚沸蒸馏水器重蒸。

1.2 实验方法

方法 1: 准确移取一定量的 VB₂ 标准溶液于 10 mL 比色管中, 加入适量 (NH₄)₂SO₄, 3.0 mL 丙酮或乙醇。用水稀释至刻度后振荡 1.0 min。静置分层, 移取上层清液于 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 444/521 \text{ nm}$ 处测量荧光强度 I_{F} , 同时做空白实验。

方法 2: 准确移取适量 VB₂ 标准溶液(含 VB₂ 为 m_1) 于

收稿日期: 2006-04-28, 修订日期: 2006-08-08

基金项目: 江西省教育厅科技基金项目(赣教字[2001]387号)资助

作者简介: 龙文清, 1960年生, 井冈山学院化学化工学院教授 e-mail: jalwq@163.com

带刻度的比色管中,加入一定量的盐及丙酮或乙醇,用水稀释至 10 mL 后振荡 1.0 min。静置分层,读取上层有机相体积,在 $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 444/521$ nm 处测量其荧光强度,确定 VB_2 含量 m_2 ,用式 $E = m_2/m_1$ 计算有机相对 VB_2 的萃取率 E 。

2 结果与讨论

2.1 荧光光谱

实验了乙醇、丙酮、 VB_2 水溶液、 VB_2 的 $(NH_4)_2SO_4$ 水溶液以及经乙醇、丙酮双水相萃取后 VB_2 的荧光光谱。发现在 $(NH_4)_2SO_4$ 作用下,由乙醇溶液和丙酮溶液(均不含 VB_2)形成的双水相中乙醇相及丙酮相的激发/发射峰分别为 224, 276/337 nm 和 336/382 nm;不同实验条件下 VB_2 的荧光光谱见图 1。由图 1 可以看出:① $(NH_4)_2SO_4$ 对 VB_2 水溶液的荧光光谱没有影响;② VB_2 在乙醇相中的荧光光谱峰形和峰位与其在水相时一致,峰位为 $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 368, 444/521$ nm;③ 丙酮的引入使得 VB_2 的荧光光谱峰形和峰位发生了一些变化:最为明显的是在 368 nm 辐射的激发下,发射光谱在 414 nm 处增加了一个峰,此峰随 VB_2 浓度的增大而降低,但若改用 444 nm 为激发波长,则发射光谱的峰形和峰位与 VB_2 的水溶液没有差别;激发光谱的峰形也有少许变化;④ 在其它条件相同时,丙酮相中 VB_2 的荧光峰大于乙醇相。实验还发现,不含 VB_2 的试剂空白乙醇相和丙酮相在 368 或 444 nm 辐射的激发下无荧光。考虑到同一条 VB_2 激发光谱曲线的 444 nm 激发峰大于 368 nm 激发峰,所以在使用乙醇/丙酮- $(NH_4)_2SO_4$ 双水相体系荧光法测定 VB_2 时均

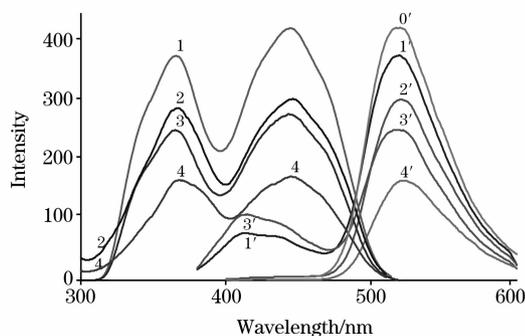


Fig. 1 Fluorescence excitation and emission spectra of vitamin B_2 (VB_2)

1, 0': $(NH_4)_2SO_4$ (3.5 g)-Acetone(3 mL)- VB_2 (30 nmol) ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 444/521$ nm)

1, 1': $(NH_4)_2SO_4$ (3.5 g)-Acetone(3 mL)- VB_2 (30 nmol) ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 368/521$ nm)

2, 2': $(NH_4)_2SO_4$ (2.8 g)-Ethanol(3 mL)- VB_2 (30 nmol) ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 444/521$ nm)

3, 3': $(NH_4)_2SO_4$ (3.5 g)-Acetone(3 mL)- VB_2 (20 nmol) ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 368/521$ nm)

4, 4': VB_2 (30 nmol) or $(NH_4)_2SO_4$ (3.5 g)- VB_2 (30 nmol) ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 444/521$ nm)

Total volume of the solution; 10 mL; Ambient temperature; 21 °C; Slit width; 2.5/2.5 nm; Scan speed; 200 nm · min⁻¹; Cycle time; 20 ms

选用 444 nm 为激发波长。发射波长则选用 VB_2 的最大发射波长 521 nm 为工作波长。

2.2 有机溶剂和无机盐的影响

考察了无机盐 Na_2CO_3 , $(NH_4)_2SO_4$, Na_2SO_4 , $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$, $BaCl_2$ 和 $NaCl$ 在环境温度(21 °C)下对 1~5 mL 丙酮或乙醇溶于水后(总体积 10 mL)所形成溶液产生相分离的影响。

实验发现, $BaCl_2$, Na_2SO_4 和 $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ 既不能使乙醇也不能使丙酮溶液分相; $NaCl$ 和 Na_2CO_3 均不能使乙醇溶液分相;除 1 mL 乙醇外, $(NH_4)_2SO_4$ 能使 2~5 mL 乙醇溶于水后形成的乙醇溶液分相;当丙酮用量超过 2 mL 后, $NaCl$ 也能使其溶液分相; Na_2CO_3 只能将丙酮用量超过 3 mL 的丙酮溶液分相;只有 $(NH_4)_2SO_4$ 可使整个丙酮用量实验范围内的丙酮溶液分相。由此可见, $(NH_4)_2SO_4$ 使乙醇或丙酮溶液形成双水相的能力最强。

对于以上能构成双水相的体系的进一步实验表明,在其他条件不变时,随着乙醇或丙酮用量的增大,形成双水相所需盐的最小用量降低,析出的有机相体积与起初加入的有机溶剂体积的差值增大;当乙醇或丙酮用量大于 2 mL 时,随着盐用量的增加,析出的有机相体积减小并逐渐接近一恒定值,但始终大于起初加入的有机溶剂体积,表明有水进入了有机相;当乙醇或丙酮用量 ≤ 2 mL 时,随着盐用量的增加,析出的有机相体积逐渐增大至接近起初加入的有机溶剂体积。析出的有机相体积随盐用量增加而呈现出的变化规律表明,随着盐用量的增加,水与乙醇或丙酮的分离趋于完全。

与丙酮相比,由于乙醇有较大的水化能,所以能促使乙醇溶液形成双水相的盐的种类更少,形成双水相所需盐的用量也更大;对于相同浓度的乙醇和丙酮溶液,又由于 $(NH_4)_2SO_4$ 在前者的溶解度小于后者,所以进一步导致该条件下乙醇溶液的相分离效果不如丙酮溶液。相比之下,在盐用量较大时,丙酮溶液形成双水相所需静置的时间明显长于乙醇溶液。

考虑到后续荧光测定对双水相体系中有机相体积的最低要求,浓度低于 20% (φ , 下同)的乙醇或丙酮体系不可取,故图 2 仅给出 30%~50% 乙醇或丙酮溶液在 $(NH_4)_2SO_4$ 作用下析出有机相体积随 $(NH_4)_2SO_4$ 用量变化的曲线。若以

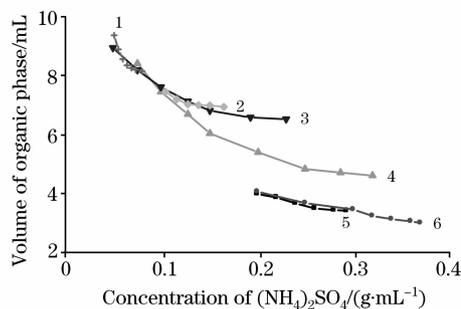


Fig. 2 Effect of $(NH_4)_2SO_4$ amount on volume of organic phase

1: 50% ethanol; 2: 40% ethanol; 3: 50% acetone;

4: 40% acetone; 5: 30% ethanol; 6: 30% acetone

Total volume of the solution; 10 mL; Ambient temperature; 21 °C

析出的有机相体积应尽量接近起初加入的有机溶剂体积及加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的量应尽量少为原则, 由图 2 可知, 以 $0.28 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 30% 乙醇溶液和 $0.35 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 30% 丙酮溶液较为合适。由于此时有机相体积趋于最小, 因而在其他条件不变时能得到尽可能强的 VB_2 荧光, 所以确定其为本文实验条件。

2.3 酸度和振荡时间的影响

当体系 $\text{pH} < 2$ 时, 乙醇溶液不出现两相, 而丙酮溶液的双水相在 $\text{pH} 1$ 时仍清晰可见, 但此时丙酮相体积增大不少。这是由于乙醇和丙酮水化能的差异及 SO_4^{2-} 质子化后其盐析作用减弱所致。随着 pH 的增大, 有机相荧光强度增大, 在 $\text{pH} 4 \sim 6$ 时, 有机相荧光强度大而稳定, 几乎与酸度无关。当 pH 进一步增大时, 有机相荧光强度不稳定、对 pH 值敏感, 这是由于 VB_2 在高 pH 介质条件下不稳定^[13] 的缘故。由于体系存在高浓度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 构成了 $\text{NH}_4^+ - \text{SO}_4^{2-}$ 酸碱缓冲溶液。经测定, 缓冲溶液 pH 值为 5.3, 正好在最佳酸度范围内, 所以在通常情况下, 体系无须专门使用外加酸、碱来控制酸度。

由于双水相萃取属均相萃取, 因而传质速率大, 萃取效率高, 定量萃取所需时间短。实验发现, 振荡萃取 1.0 min 就足以使 VB_2 的萃取率达最大, 故本文选择振荡萃取 1.0 min。

2.4 干扰实验

实验发现, 对于 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{VB}_2$ 的乙醇或丙酮双水相体系, 当允许相对误差为 $\pm 5\%$ 时, 下列物质的允许倍数至少为: 果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉(4 000); 抗坏血酸、脱落酸、赤霉素、乳酸、酒石酸、柠檬酸、丙酸、草酸、尿素(2 000); 苯酚、叶酸、吡啶、5-羟色胺、色氨酸、吡啶-3-乙酸、吡啶-3-丁酸、 α -萘乙酸、 β -萘乙酸、 α -萘氧乙酸、 β -萘氧乙酸、硫胺素(400); 水杨酸、苯甲酸(200)。由于采用双水相萃取, 使得常见无机离子如 Na^+ , Fe^{3+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , NH_4^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , K^+ , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , Cl^- , NO_3^- 和 S^{2-} 等不易被有机相萃取, 即使其含量高达 VB_2 4 000 倍时也未发现干扰。由此可见, 本方法的选择性较好。

2.5 维生素 B_2 萃取率及其标准曲线和检出限

在上述选定条件下, 按实验方法 2 测定了丙酮和乙醇双水相体系中 VB_2 浓度在 $1 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内的萃取率。结果发现, 丙酮和乙醇相对 VB_2 的一次性萃取率分别为 97.6%~98.4% 和 94.2%~95.5%, 表明两种方法对 VB_2 的萃取率高而稳定。

经过实验, 获得了本方法荧光强度 I_F 与 VB_2 浓度 c 的线性回归方程及相关系数、线性范围、检出限($S/N=3$), 见表 1。由表 1 可知, 本方法检出限比改良的光黄素荧光法^[11] 检出限的 0.06 μg 还低了许多。

Table 1 Analytical parameters for vitamin B_2

体系	线性范围 / $(10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$I_F = A + Bc(10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$		相关系数	检出限 / $(10^{-2} \mu\text{g})$
		A	B		
Acetone- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.15~3.5	0.046 31	140.9	0.999 6	3.1
Ethanol- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.20~1.5	0.022 41	102.3	0.999 5	4.1

2.6 样品分析

取 20 片维生素 B_2 片剂于研钵中, 研细混匀。准确称取一定量研细的粉末, 用水溶解并定容于 100 mL 棕色容量瓶中, 静置后的清液作为维生素 B_2 片剂待测液。取 10 支维生素 B_2 注射液混匀, 准确称取一定量于 100 mL 棕色容量瓶

中, 用水定容, 此即维生素 B_2 注射液待测液。

准确移取待测液适量(控制维生素 B_2 浓度在本法线性范围内), 按实验方法 1 在以上选定条件下采用标准曲线法测定维生素 B_2 含量, 测定结果见表 2。

Table 2 Determination results of vitamin B_2 in samples ($n=5$)

样品	中国药典法 ^[6] / $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	(丙酮- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 法) / $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	RSD/%	相对误差 /%	乙醇- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 法 / $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	RSD/%	相对误差 /%
片剂	67.62	66.72	1.9	-1.3	66.40	2.2	-1.8
注射液	2.510	2.538	1.5	1.1	2.485	1.7	-1.0

3 结论

本文报道的丙酮- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和乙醇- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相萃取、荧光测定 VB_2 的方法能较好地满足痕量 VB_2 的测定要求。由于丙酮和乙醇在水化能、极性和化学性质等方面的差异, 导致了其中 VB_2 的荧光光谱、萃取性能和分析测定

参数等存在差异。从总体上看, 丙酮- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相萃取、荧光法测定 VB_2 表现出了更大的优势。本文研究的双水相萃取方法不仅较好地克服了像传统的液-液萃取和固相萃取等异相萃取暴露出来的缺陷, 而且还较目前研究颇多的高聚物双水相萃取显示出了更多的优势。其与荧光分析法联用更使得分析测定的灵敏度、选择性和便捷性等得到了提升, 值得进一步发扬光大。

参 考 文 献

- [1] DENG Fan-zheng, WEI Ying, CHEN Ying, et al(邓凡政, 魏 迎, 陈 影, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2004, 24(12): 1637.
- [2] Yoshikuni N, Baba T, Tsunoda N, et al. Talanta, 2005, 66(1): 40.
- [3] Gutowski E K, Broker A G, Rogers D R, et al. J. Am. Chem. Soc., 2003, 125(22): 6632.
- [4] LONG Wen-qing(龙文清). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学), 2005, 33(7): 1013.
- [5] Liu H L, He C Y, Wen D W, et al. Anal. Chim. Acta, 2006, 557(1-2): 329.
- [6] Pharmacopoeia Committee of the Ministry of Health of the People's Republic of China(中国卫生部药典委员会编). China Pharmacopoeia the People's Republic of China, Vol. II (中国药典, 二部), 2000. 786.
- [7] Pérez-Ruiz T, Martínez L C, Tomás V. Anal. Chim. Acta, 1987, 198: 63.
- [8] HUANG Ru-heng(黄如衡). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2000, 28(2): 180.
- [9] Wan Q J, Yang N J, Zhang H L, et al. Talanta, 2001, 55(3): 459.
- [10] WANG Lin, SONG Zheng-hua(王 林, 宋正华). Acta Pharmaceutica Sinica(药学学报), 2002, 37(10): 793.
- [11] WANG Miao-yun, YE Wei-yun, JIANG Cui-ping(王妙云, 叶蔚云, 蒋翠萍). Chinese Journal of Health Laboratory Technology(中国卫生检验杂志), 2005, 15(3): 333.
- [12] Llorenç M P, M Elisa C P, Mayte G A, et al. J. Chromatogr. A, 2003, 984(2): 223.
- [13] HUANG Wei-kun(黄伟坤). Food Testing and Analysis(食品检验与分析). Beijing: China Light Industry Press(北京: 中国轻工业出版社), 1989. 85.

Determination of Trace Vitamin B₂ by Fluorimetry after Aqueous Two-Phase Extraction Based on Acetone and Ethanol

LONG Wen-qing

College of Chemistry and Chemical Engineering, Jinggangshan College, Jiangxi Province Key Laboratory of Coordination Chemistry, Ji'an 343009, China

Abstract Small molecular water-miscible organic solvent, such as ethanol, acetone and acetonitrile, can be used to form aqueous two-phase system for extraction of analytes in the presence of salts. Just based on it, the acetone-salt-H₂O and the ethanol-salt-H₂O systems were developed for the determination of trace vitamin B₂ coupled with fluorimetry after aqueous two-phase extraction. Various factors including the type and amount of salts and organic solvents, extraction time, coexistent substance, and pH were studied. The experimental results show that the extraction efficiencies of vitamin B₂ in the acetone-salt-H₂O and the ethanol-salt-H₂O system were 97.6%-98.4% and 94.2%-95.5%, respectively, in one-step extraction. Under the optimal conditions, these two extraction techniques gave linear dynamic ranges of 1.5×10^{-7} - 3.5×10^{-6} mol · L⁻¹ and 2.0×10^{-7} - 1.5×10^{-6} mol · L⁻¹, with detection limits of 0.031 and 0.041 μg, respectively. Both techniques were applied directly to determination of vitamin B₂ in pharmaceutical tablets and injections with satisfactory results. The relative errors were -1.8%-1.1% as compared with China pharmacopoeia and the relative standard deviations were 1.5%-2.2% for vitamin B₂ in the above samples. Compared with conventional liquid-liquid extraction or solid-phase extraction, these methods have outstanding advantages such as simple operation, high extraction efficiency, little interference with analytes and low toxicity.

Keywords Aqueous two-phase extraction; Vitamin B₂; Fluorimetry; Acetone; Ethanol; Ammonium sulphate

(Received Apr. 28, 2006; accepted Aug. 8, 2006)