

鲁米诺-高碘酸钾化学发光体系测定维生素 B<sub>12</sub>

马明阳\*

(西安文理学院化学与化学工程学院,陕西 西安 710065)

**[摘要]** 目的:基于维生素 B<sub>12</sub> 在碱性条件下对鲁米诺-高碘酸钾化学发光体系有较强的抑制作用,建立测定维生素 B<sub>12</sub> 的新方法。方法:联用流动注射技术,利用该化学发光体系对药片中维生素 B<sub>12</sub> 的含量进行测定。结果:该方法测定维生素 B<sub>12</sub> 的线性范围为  $7.4 \times 10^{-8}$ ~ $7.4 \times 10^{-6}$  mol/L,检出限为  $2.0 \times 10^{-8}$  mol/L,维生素 B<sub>12</sub> 测定重复性实验的相对标准偏差为 1.28%( $n = 11$ )。结论:鲁米诺-高碘酸钾化学发光体系用于维生素 B<sub>12</sub> 的检测具有较高灵敏度,可用于测定维生素 B<sub>12</sub> 的含量。

**[关键词]** 化学发光;流动注射;鲁米诺;维生素 B<sub>12</sub>

**[中图分类号]** Q563.4

**[文献标志码]** B

**[文章编号]** 1007-4368(2014)08-1146-03

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20140831

维生素 B<sub>12</sub> 又称钴胺素,是唯一的含有矿物质的维生素。人体需要的维生素 B<sub>12</sub> 的量很少,使用过量可能引起过敏反应,甚至过敏性休克。目前国内外测定钴胺素的方法主要有高效毛细管电泳法<sup>[1-2]</sup>、荧光法<sup>[3]</sup>、高效液相色谱法<sup>[4]</sup>、电化学方法<sup>[5]</sup>。本研究发现,维生素 B<sub>12</sub> 在碱性条件下对鲁米诺-高碘酸钾体系的化学发光有较强的抑制作用,联用流动注射技术可建立测定维生素 B<sub>12</sub> 的新方法。相对于已有的化学发光体系,鲁米诺-高碘酸钾化学发光体系用于维生素 B<sub>12</sub> 的测定具有更高的灵敏度。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

IFFM-E 型流动注射化学发光分析仪(西安瑞迈电子科技有限公司),IFFS-A 型多功能化学发光检测器(西安瑞迈电子科技有限公司)。

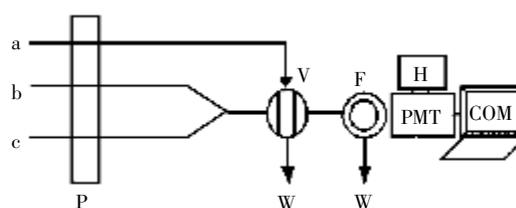
维生素 B<sub>12</sub> 标准溶液( $7.4 \times 10^{-4}$  mol/L)的配制:称取 0.1 g 维生素 B<sub>12</sub> (中国药品生物制品检定所)放入 50 ml 烧杯中,用少量水溶解后,定容于 100 ml 容量瓶中,作为贮备液,使用时用水逐级稀释至所需浓度。

鲁米诺储备液( $1.0 \times 10^{-2}$  mol/L)的配制:称取 1.77 g 鲁米诺(陕西师范大学分析科学研究所合成),用 10 ml 1.0 mol/L 的 NaOH(分析纯)溶液溶

解,加水定容于 1 000 ml 容量瓶中,室温下放置 7 d 后使用,使用时用 NaOH 溶液稀释至所需浓度。本实验中所用的水为去离子水。

### 1.2 方法

流动注射化学发光反应装置如图 1 所示,b 和 c 两种溶液先混合为载液,a 溶液通过八通阀注入载液,溶液混合后流入流通池产生化学发光,光电倍增管检测发光强度。参数由 IFFM-E 型流动注射化学发光分析仪设定。采样时间和进样时间均为 20 s,以峰高进行定量。



a,b,c:3 个进样口;F:流通池;V:八通阀;P:蠕动泵;PMT:光电倍增管。

图 1 流动注射化学发光分析法流程图

## 2 结果

### 2.1 条件的优化

#### 2.1.1 流路选择

考虑 3 种流路:①样品和高碘酸钾(KMnO<sub>4</sub>)先混合后,再注入鲁米诺溶液;②样品和鲁米诺溶液先混合,再注入 KMnO<sub>4</sub> 溶液;③KMnO<sub>4</sub> 和鲁米诺溶液先混合,再注入样品溶液。结果表明,在相同条件下,流路①产生的化学发光信号最强,信噪比最高,因

**[基金项目]** 西安市科技计划项目(CX12189WL15),陕西省重点建设学科项目资助

\*通信作者(Corresponding author),E-mail:mmywlyx@163.com

此,选择流路①。

### 2.1.2 氧化剂 KMnO<sub>4</sub> 浓度的选择

对 KMnO<sub>4</sub> 在  $2.0 \times 10^{-5}$ ~ $3.0 \times 10^{-4}$  mol/L 范围内进行考察,实验结果表明,当 KMnO<sub>4</sub> 浓度为  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L 时,检测到的相对发光强度最大(图 2),因此确定  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L 为 KMnO<sub>4</sub> 的最佳浓度。

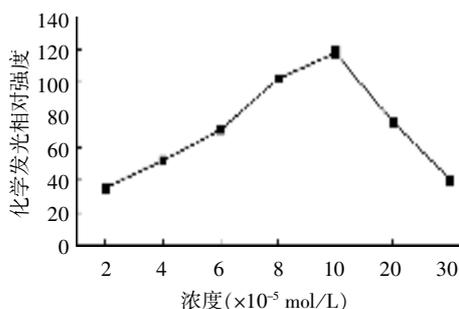


图 2 KMnO<sub>4</sub> 浓度的影响

### 2.1.3 鲁米诺浓度的选择

对鲁米诺在  $2.0 \times 10^{-5}$ ~ $1.8 \times 10^{-4}$  mol/L 范围内进行考察,实验结果表明,当鲁米诺浓度为  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L 时,检测到的相对发光强度最大(图 3),因此确定  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L 为鲁米诺的最佳浓度。

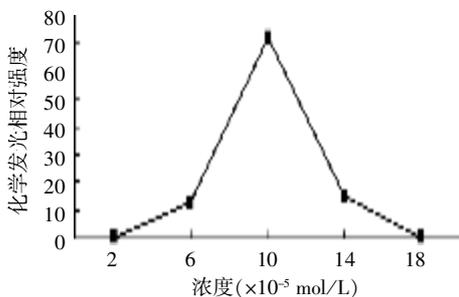


图 3 鲁米诺浓度的影响

### 2.1.4 鲁米诺溶液中 NaOH 浓度的选择

对鲁米诺中 NaOH 浓度在  $1.0 \times 10^{-4}$ ~ $1.0 \times 10^{-2}$  mol/L 范围内进行考察,实验结果表明,当 NaOH 浓度为  $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L 时,检测到的相对发光强度最大(图 4),因此确定  $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L 为鲁米诺溶液中 NaOH 的最佳浓度。

### 2.1.5 管长的选择

若混合管太短,则 KMnO<sub>4</sub> 和鲁米诺反应不充分,测量时基线较高,信噪比较低;混合管太长,则测量既费时间又费溶液。在 5~20 cm 范围内对混合管的长度进行了选择。结果表明,最合适的混合管长度为 10 cm。此时,反应具有最大的信噪比。

### 2.2 标准曲线、精密度和检出限

在选定的最佳条件下,钴胺素的浓度在  $7.4 \times 10^{-8}$ ~ $7.4 \times 10^{-6}$  mol/L 与发光强度呈线性关系,回归

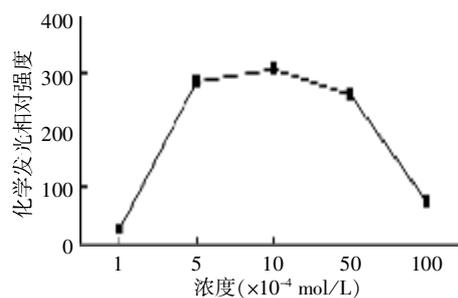


图 4 NaOH 浓度的影响

方程为:  $I = 38.19c + 17.67$ , 相关系数  $r = 0.9963$ 。根据 IUPAC 建议,测得本法的检出限为  $2.0 \times 10^{-8}$  mol/L。对  $7.4 \times 10^{-7}$  mol/L 的钴胺素进行 11 次平行测定,其相对标准偏差为 1.28%。

### 2.3 干扰

优化的条件下,考察了样品中可能的共存物对钴胺素测定的影响。以引起的测定偏差 < 5.0% 为标准,对  $3.7 \times 10^{-7}$  mol/L 的钴胺素溶液进行了干扰,结果表明,1 000 倍的 Cl<sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, 500 倍的淀粉、草酸、尿素、蔗糖,对维生素 B<sub>12</sub> 的测定不干扰。

### 2.4 样品分析

取市售的维生素 B<sub>12</sub> 药片(每片含有效成分 25 μg)10 粒于研钵中研细混匀,求得每片的平均质量。准确称取相当于 1 片的质量,加去离子水溶解后定容为 50 ml,平行移取 3 份 10 ml 上清液,分别加入  $7.4 \times 10^{-7}$  mol/L 维生素 B<sub>12</sub> 标准溶液 5、4 和 6 ml 后稀释至 50 ml。按分析步骤分别测定加标前后的发光强度,根据标准曲线得到维生素 B<sub>12</sub> 含量,计算回收率。加标量、加标前后维生素 B<sub>12</sub> 测量结果及回收率结果见表 1。

## 3 讨论

维生素 B<sub>12</sub> 是一种由含钴的卟啉类化合物组成的 B 族维生素,现有文献报道的化学发光法测定维生素 B<sub>12</sub> 是基于钴在碱性介质中对鲁米诺-过氧化氢化学发光反应具有催化作用,从而实现对维生素 B<sub>12</sub> 的检测<sup>[6-7]</sup>。由于维生素 B<sub>12</sub> 中钴含量很低,因此方法灵敏度有限。本研究发现,维生素 B<sub>12</sub> 在碱性条件下对鲁米诺-高锰酸钾体系的化学发光有较强的抑制作用,联用流动注射技术建立了测定维生素 B<sub>12</sub> 的新方法。该方法用于维生素 B<sub>12</sub> 的测定具有更高的灵敏度。

采用流动注射技术时,不同的流路对发光信号的影响较大,因此实验中对流路进行了选择。影响化学发光反应的因素有氧化剂浓度、发光试剂浓度以

表1 样品中维生素 B<sub>12</sub> 含量的测定及回收率Table 1 Determination results of vitamin B<sub>12</sub> in sample and recovery experiments

样品	样品量(μg)	加标量(μg)	测定总量(μg)	相对标准偏差(% , n=5)	回收率(%)
1	24.86	25.00	50.80	2.1	103.8
2	26.30	20.00	45.32	3.2	95.1
3	24.10	30.00	53.20	3.0	97.0

及溶液的 pH 值, 这些因素都会影响产生的发光信号, 因此实验中对氧化剂 KMnO<sub>4</sub> 浓度、发光试剂鲁米诺浓度以及 NaOH 的浓度进行了选择。试剂在混合管中反应, 混合管的长度影响化学发光反应的完全程度进而影响发光信号, 因此实验中对混合管的长度也进行了选择。经过优化后的实验条件, 使得方法的灵敏度得到了提高, 为高灵敏检测维生素 B<sub>12</sub> 提供了新的分析方法。

## [参考文献]

- [1] Herbeth V, Drivas G, Foscaldi R. Multivitamin/mineral food supplements containing vitamin B<sub>12</sub> may also contain analogues of vitamin B<sub>12</sub> [J]. N Engl J Med, 1982, 307(4): 255-256
- [2] Kondo H, Binter MJ, Kolhouse JF. Presence and formation of cobalamin analogues in multivitamin-mineral pills [J]. J Clin Invest, 1982, 70(4): 889-898
- [3] Fumio W, Kastuo A, Shigeo T, et al. Comparison of a microbiological assay and a fully automated chemiluminescent system for the determination of vitamin B<sub>12</sub> in food [J]. Agric Food Chem, 1997, 45: 4661-4663
- [4] Cho CM, Ko JH, Cheong WJ. Simultaneous determination of water-soluble vitamins excreted in human urine after eating an overdose of vitamin pills by a HPLC method coupled with a solid phase extraction [J]. Talanta, 2000, 51(4): 799-806
- [5] 向伟, 李将渊, 马曾燕. 多壁碳纳米管修饰电极同时测定维生素 B<sub>2</sub>、B<sub>6</sub>、B<sub>12</sub> 和维生素 C [J]. 分析科学学报, 2007, 23(4): 437-440
- [6] 贾生华, 章竹君. 啤酒和制药废水中维生素 B<sub>12</sub> 的化学发光分析 [J]. 化学世界, 1983(7): 204-206
- [7] 朱金坤, 舒露, 吴敏, 等. 维生素 B<sub>12</sub> 的毛细管电泳-化学发光检测研究 [J]. 华东师范大学学报: 自然科学版, 2013(5): 97-10

[收稿日期] 2014-01-02

本刊邮发代号 28-61

网址: <http://jnmn.njmu.edu.cn>