

# 铬天青 B 共振光散射技术 测定药物中的维生素 B<sub>12</sub>

何树华, 刘殷子顺, 向 杰, 江 虹\*

(长江师范学院化学化工学院, 重庆 408100)

**摘要:**探究了十六烷基溴化吡啶鎓 (HPB) 存在下铬天青 B 与维生素 B<sub>12</sub> 的缔合反应, 建立了测定药物中维生素 B<sub>12</sub> 的高灵敏共振光散射 (RLS) 新方法。在 pH 7.69 的弱碱性溶液中, 维生素 B<sub>12</sub> 与铬天青 B-HPB 反应, 以静电引力相互作用生成三元离子缔合物, 使 RLS 信号明显增强, 在最大 RLS 峰 371 nm 波长处, 体系的 RLS 增强强度 ( $\Delta I_{\text{RLS}}$ ) 与 0.003~2.71 mg/L 范围内的维生素 B<sub>12</sub> 的质量浓度呈很好的线性关系, 检出限为 0.002 5 mg/L。该方法简便、快速、准确、灵敏, 用于药物中维生素 B<sub>12</sub> 的测定, 加标回收率为 98.2%~102%, 相对标准偏差 RSD ( $n=5$ ) 为 1.5%~1.8%。

**关键词:** 铬天青 B; 十六烷基溴化吡啶鎓; 维生素 B<sub>12</sub>; 共振光散射

中图分类号: O657.3; R917

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2020)01-0230-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2020.01.049

## Determination of vitamin B<sub>12</sub> by resonance light scattering technique with chrome azure B

HE Shu-hua, LIU Yin-zi-shun, XIANG Jie, JIANG Hong\*

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China)

**Abstract:** The association reaction between chrome azure B and vitamin B<sub>12</sub> is studied in the presence of 1-hexadecylpyridinium bromide (HPB), and a highly sensitive and new resonance light scattering (RLS) method is established for the determination of vitamin B<sub>12</sub> in drugs. In a weak alkaline solution of pH = 7.69, vitamin B<sub>12</sub> reacts with chrome azure B-HPB to form a ternary ionic associate complex by electrostatic attraction, which leads to a significant enhancement of RLS signals. At the maximum RLS peak of 371 nm wavelength, the system's RLS enhancement intensity ( $\Delta I_{\text{RLS}}$ ) shows a good linear relationship with the mass concentration of vitamin B<sub>12</sub> in the range of 0.003-2.71 mg·L<sup>-1</sup>, and the detection limit is 0.002 5 mg·L<sup>-1</sup>. This method exhibits simple, rapid, accurate and sensitive. As it is applied to the determination content of vitamin B<sub>12</sub> in drugs, the recovery of standard addition is 98.2%-102%, and the relative standard deviation RSD ( $n=5$ ) is 1.5%-1.8%.

**Key words:** chrome azure B; 1-hexadecylpyridinium bromide; vitamin B<sub>12</sub>; resonance light scattering

维生素 B<sub>12</sub> 是人体不可缺少的一种重要维生素, 对人体的造血功能和人体的正常代谢有着重要影响, 对维持人体大脑的正常功能有着重要作用。人体中如果缺少或存在过多的维生素 B<sub>12</sub>, 将会出现各种疾病, 如维生素 B<sub>12</sub> 缺乏时会影响人体红细胞的发育和成熟, 尤其会严重影响到婴幼儿的生长发育; 当维生素 B<sub>12</sub> 过多时, 则会使人体产生某些过敏反应 (荨麻疹、湿疹、面部水肿等), 或造成人体神经兴奋、心悸或心前区疼痛等, 使人体健康受到严重影响。为了患者能合理用药, 对药物中维生素 B<sub>12</sub> 含量进行研究有着一定意义。就目前文献报道的检测方法看, 主要有高效液相色谱法<sup>[1-4]</sup>、液-质联用法<sup>[5-6]</sup>、荧光法<sup>[7]</sup>、电化学法<sup>[8-9]</sup> 和我国药典采用的

紫外分光光度法<sup>[10]</sup> 等。这些方法中有的前处理繁杂、仪器价格较贵, 有的条件要求苛刻或灵敏度不够好、选择性不够高等。为此, 研究和检测维生素 B<sub>12</sub> 的简便、快速、灵敏的新方法具有重要意义。笔者通过实验表明, 用铬天青 B 作探针, 十六烷基溴化吡啶鎓作增敏剂的共振光散射技术对于维生素 B<sub>12</sub> 的检测具有快速、简便、准确, 并有高灵敏度的作用。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

精密酸度计: pH-3C 型, 上海虹益仪器仪表有限公司生产; 荧光分光光度计: F-2500 型, 设测定狭

收稿日期: 2019-03-19; 修回日期: 2019-11-10

基金项目: 重庆市教委科技基金资助项目 (KJ121307); 长江师范学院科技基金资助项目 (2018CXX111)

作者简介: 何树华 (1971-), 女, 学士, 教授, 研究方向为分子光谱分析, heshuhua20182019@163.com; 江虹 (1956-), 女, 学士, 教授, 研究方向为分子光谱分析, 通讯联系人, jianghongch@163.com。

缝 5 nm,  $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}} = 220 \text{ nm}$ , 日本日立公司生产。

维生素 B<sub>12</sub> (VB<sub>12</sub>, 中国食品药品检定研究院, 批号 100248-201504) 标准溶液: 135.5 mg/L 水溶液, 存于棕色瓶中, 冰箱 4℃ 避光保存, 用时用水稀释 10 倍配成操作液。十六烷基溴化吡啶鎓 (HPB, 百灵威科技有限公司生产) 溶液:  $4.00 \times 10^2 \text{ mg/L}$ 。铬天青 B (CMB, 成都市科龙化工试剂厂) 溶液:  $1.00 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。HCl (重庆川东化工集团有限公司) 溶液:  $0.10 \text{ mol/L}$ 。Tris (三羟甲基氨基甲烷, 齐一生物科技有限公司) 溶液:  $0.20 \text{ mol/L}$ 。Tris-HCl 溶液: pH 2.8~9.5, 用 pH 计测定而成。所用试剂均为分析纯, 水为超纯水。

样品: 市售维生素 B<sub>12</sub> 片 (1<sup>#</sup>) 和滴眼液 (2<sup>#</sup>)。

## 1.2 样品处理

取某厂家生产的 VB<sub>12</sub> 药片 (1<sup>#</sup>) 20 片, 避光去糖衣, 加水溶解, 超声 10 min, 过滤, 滤液置于 50 mL 棕色容量瓶中, 用水稀至刻度, 即为 1<sup>#</sup> 待测液, 避光保存于 4℃ 冰箱中。

取某厂家生产的 VB<sub>12</sub> 滴眼液 (2<sup>#</sup>) 1 支, 避光下将内容物置于 100 mL 棕色容量瓶中, 用水定容, 即为 2<sup>#</sup> 待测液, 避光保存于 4℃ 冰箱中。

## 1.3 RLS 强度的测定

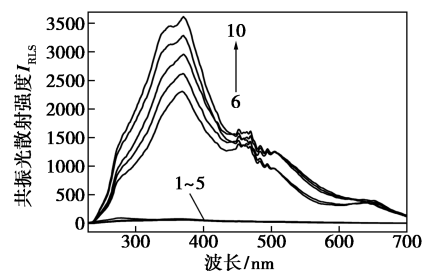
准确移取 CMB 溶液 2.00 mL、HPB 溶液 0.10 mL、VB<sub>12</sub> 标准操作液 0.00~2.00 mL 和 pH 7.69 Tris-HCl 溶液 1.50 mL 于 10 mL 具塞比色管中, 用水定容, 摇匀, 静置 20 min, 在荧光仪上同步扫描 RLS 光谱, 记录 371 nm 处体系的  $I_{\text{RLS}}$  和试剂空白的  $I_0$ , 再计算 RLS 的增强强度  $\Delta I_{\text{RLS}} = I_{\text{RLS}} - I_0$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 RLS 光谱

VB<sub>12</sub>、CMB、HPB 及它们的混合溶液的 RLS 光谱曲线见图 1。从曲线可知, 单独的 VB<sub>12</sub>、CMB、HPB 溶液的 RLS 十分微弱, CMB 的弱碱性溶液的 RLS 也很微弱, 当在弱碱性的 CMB 溶液中加入 VB<sub>12</sub> 后, 尽管它们之间可以发生反应生成新物质 (从图 2 结构式可知), 但新物质的 RLS 也很弱, 不能用于 VB<sub>12</sub> 定量分析。当在弱碱性的 CMB 溶液中加入 HPB 溶液后, RLS 显著增强。从图 2 结构式可知, CMB 与 HPB 间可以发生反应, HPB 可以增强 CMB, 使 RLS 显著增强。当在 CMB-HPB 的弱碱性溶液中加入 VB<sub>12</sub> 标准溶液后, 体系溶液的 RLS 信号随着 VB<sub>12</sub> 溶液质量浓度的增大而增强, 在 VB<sub>12</sub> 一定浓度范围内, 体系的 RLS 增强强度 ( $\Delta I_{\text{RLS}}$ ) 与 VB<sub>12</sub>

的质量浓度呈很好的线性关系。故该体系可用于 VB<sub>12</sub> 的定量分析。可能的反应机理: 从图 2 中物质结构式可知, CMB 带 2 个单位负电荷, HPB 带 1 个单位的正电荷, VB<sub>12</sub> 结构中有多个含孤对电子的 N 原子, 接受质子后在溶液中以阳离子形式存在。可见, 体系中存在 2 种竞争反应, 一是 HPB 先增强 CMB, 生成带负电荷的缔合颗粒, 再与 VB<sub>12</sub> 以静电引力结合生成电中性的三元离子缔合物; 二是 CMB 先与 VB<sub>12</sub> 反应生成带负电荷的缔合颗粒, 再与 HPB 作用生成电中性的三元离子缔合物。



1—1.36 mg/L VB<sub>12</sub>; 2— $2.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  CMB;  
3—4.00 mg/L HPB; 4— $2.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  CMB, pH 7.69;  
5—1.36 mg/L VB<sub>12</sub>- $2.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  CMB, pH 7.69;  
6~10—0.00, 0.678, 1.36, 2.03, 2.71 mg/L  
VB<sub>12</sub>- $2.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  CMB-4.00 mg/L HPB, pH 7.69

图 1 VB<sub>12</sub> 与 CMB-HPB 的 RLS 光谱

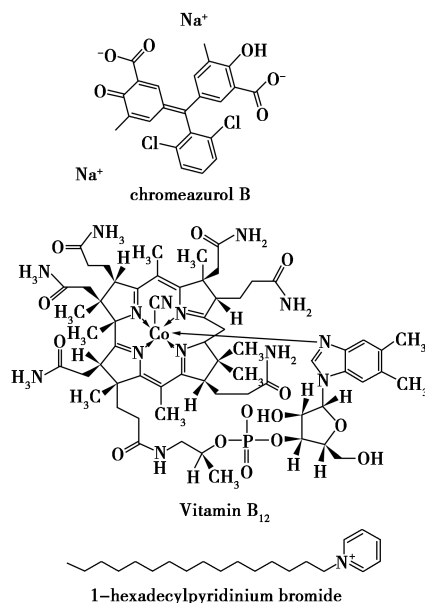


图 2 VB<sub>12</sub> 与 CMB 及 HPB 结构式

### 2.2 反应条件

#### 2.2.1 酸度

室温下, 考察了 VB<sub>12</sub> 标准溶液为 1.00 mL, CMB 溶液为 2.00 mL, HPB 溶液为 0.10 mL 时, 不同 pH

的 Tris-HCl 溶液对体系灵敏度的影响,结果见图 3。从图中曲线可知,三元反应的最适酸度为 pH 7.69,此时体系的  $\Delta I_{RLS}$  最大,方法的灵敏度相对最高。故实验选用 pH 7.69 Tris-HCl 溶液。

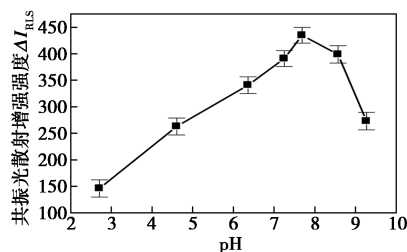


图 3 pH 对  $\Delta I_{RLS}$  的影响

### 2.2.2 pH 7.69 Tris-HCl 的用量

室温下,考察了  $VB_{12}$  标准溶液为 1.00 mL, CMB 溶液为 2.00 mL, HPB 溶液为 0.10 mL 时,不同用量的 pH 7.69 对体系灵敏度的影响,结果见图 4。从曲线可知, pH 7.69 的最佳用量为 1.5 mL, 此时的  $\Delta I_{RLS}$  最大,方法的灵敏度相对最高。故实验选用 1.50 mL pH 7.69 来控制三元反应的酸度。

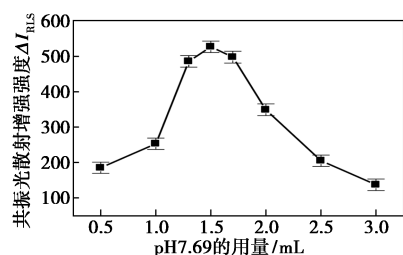


图 4 pH 7.69 的用量对  $\Delta I_{RLS}$  的影响

### 2.2.3 CMB 溶液的浓度

室温下,考察了  $VB_{12}$  标准溶液为 1.00 mL, pH 7.69 Tris-HCl 为 1.50 mL, HPB 溶液为 0.10 mL 时, CMB 溶液的浓度对体系灵敏度的影响,结果见图 5。从曲线可知,最适宜的 CMB 用量为 2.00 mL (即浓度为  $2.00 \times 10^{-5}$  mol/L), 此时体系的  $\Delta I_{RLS}$  最大,方法的灵敏度相对最高。故实验选用  $1.00 \times 10^{-4}$  mol/L CMB 溶液 2.00 mL。

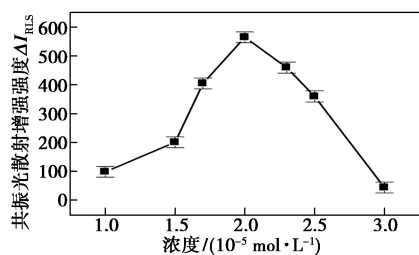


图 5 铬天青 B 浓度对  $\Delta I_{RLS}$  的影响

### 2.2.4 HPB 溶液的浓度

室温下,考察了  $VB_{12}$  标准溶液为 1.00 mL, pH

7.69 Tris-HCl 为 1.50 mL, CMB 溶液为 2.00 mL 时,不同浓度的 HPB 溶液对体系灵敏度的影响,结果见图 6。从曲线可知, HPB 溶液的最佳质量浓度为 4.00 mg/L, 此时体系的  $\Delta I_{RLS}$  最大,方法的灵敏度相对最高。故实验选用 0.10 mL  $4.00 \times 10^2$  mg/L HPB (即 4.00 mg/L) 溶液用于增敏体系的 RLS 强度。

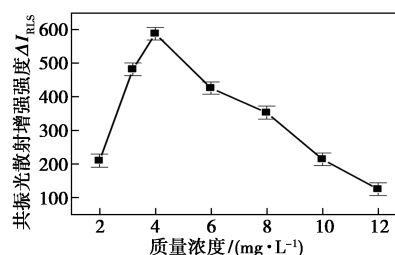


图 6 十六烷基溴化吡啶鎓质量浓度对  $\Delta I_{RLS}$  的影响

### 2.2.5 试剂加入顺序

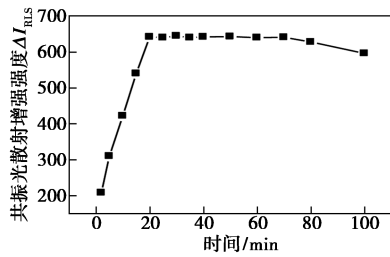
室温下,考察了  $VB_{12}$  标准溶液为 1.00 mL, pH 7.69 Tris-HCl 为 1.50 mL, CMB 溶液为 2.00 mL, HPB 溶液为 0.10 mL 时,这几种试剂的加入顺序对体系灵敏度的影响,结果见表 1。可知,它们的最佳加入顺序为: CMB、HPB、 $VB_{12}$ 、Tris-HCl。按该顺序加入各试剂溶液,体系的  $\Delta I_{RLS}$  相对最大,方法的灵敏度最高。故实验选择按最佳顺序加入各试剂溶液。

表 1 试剂加入顺序的影响

试剂加入顺序	$\Delta I_{RLS}$
$VB_{12}$ -CMB-Tris-HCl-HPB	602
$VB_{12}$ -Tris-HCl-CMB-HPB	618
$VB_{12}$ -HPB-CMB-Tris-HCl	622
CMB-Tris-HCl-HPB- $VB_{12}$	586
CMB-HPB- $VB_{12}$ -Tris-HCl	635

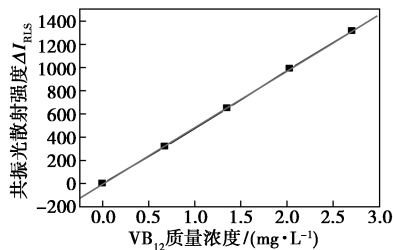
### 2.2.6 反应时间及稳定性

在上述选定的最佳实验条件下,考察了  $VB_{12}$ 、CMB 及 HPB 三者的反应时间对体系灵敏度的影响,结果见图 7。从曲线可知, 20 min 前,  $\Delta I_{RLS}$  随着时间的增加逐渐增大,曲线表现为一条斜线,表明此时间段内的三元反应并未完全。20~80 min 范围内,  $\Delta I_{RLS}$  基本不随着时间的增加而增大,表明此段时间内三元缔合物较为稳定。80 min 后,  $\Delta I_{RLS}$  随着时间的增加有逐渐下降的趋势,表明缔合物的稳定性从此有所降低,不再处于稳定状态。故缔合物稳定时间约 1 h, 实验选在 20 min 后测定。

图7 反应时间对 $\Delta I_{RLS}$ 的影响

### 2.3 标准曲线

在前面选定的最佳实验条件下,配制 0.00 ~ 2.00 mL VB<sub>12</sub>标准系列溶液,并按 RLS 强度的测定方法同步扫描 RLS 光谱,做  $\Delta I_{RLS}-\rho$  标准曲线,见图 8。从图 8 可知,该方法有很好的线性关系,线性范围为 0.003~2.71 mg/L,回归方程为  $\Delta I_{RLS} = -5.401 + 486.7\rho$  ( $\rho$ : mg/L),相关系数  $r = 0.9999$ ,检出限 ( $3S_b/S$ ) 为 0.0025 mg/L。

图8 VB<sub>12</sub>工作曲线

### 2.4 共存物质的影响

在选定的最佳实验条件下,考察了某些常见的有机物和无机物对测定 VB<sub>12</sub>的影响,在相对误差不大于 ±5% 时,100 倍的 Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Cl<sup>-</sup>、I<sup>-</sup>、S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>、蔗糖、葡萄糖、甘氨酸、L-谷氨酸、L-异亮氨酸、L-色氨酸、L-亮氨酸、L-丙氨酸、L-白氨酸,50 倍的 Sn<sup>2+</sup>、Sr<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>、CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、L-赖氨酸、L-组氨酸、尿素、麦芽糖、D-果糖、柠檬酸三钠,20 倍的 Fe<sup>3+</sup>、淀粉、维生素 B<sub>2</sub> 等不干扰测定。可见,该方法有很好的选择性。

### 3 分析应用

分别取 1.2 节下的 1<sup>#</sup> 和 2<sup>#</sup> VB<sub>12</sub>待测液各 1.00 mL,按 1.3 节下的实验方法和条件测定各样液中 VB<sub>12</sub>的含量,分别做 5 次平行测定。根据回归方程及谱图求得待测液及原始药样品中 VB<sub>12</sub>的含量。为了判断方法的准确度,再通过样品的加标回收试验,各样品做 5 份平行测定,结果见表 2。

表2 样品分析结果及回收试验 (n=5)

样品	1 <sup>#</sup>	2 <sup>#</sup>
标示量/(mg·片 <sup>-1</sup> 或支 <sup>-1</sup> )	0.025	1.60
测得值/(mg·片 <sup>-1</sup> 或支 <sup>-1</sup> )	0.0236	1.56
加标量/μg	6.78	6.78
测得平均值/μg	16.1	22.5
平均回收率/%	98.2	102
RSD/%	1.8	1.5

### 4 结论

用铬天青 B 作探针,十六烷基溴化吡啶鎓作增敏剂检测 VB<sub>12</sub>的共振光散射技术具有高灵敏的优点,并简便、快速、准确,方法的选择性良好,适于药物中 VB<sub>12</sub>的定量检测。

### 参考文献

- [1] Marley E C, Mackay E, Young G. Characterisation of vitamin B<sub>12</sub> immunoaffinity columns and method development for determination of vitamin B<sub>12</sub> in a range of foods, juices and pharmaceutical products using immunoaffinity clean-up and high performance liquid chromatography with UV detection[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2009, 26(3): 282-288.
- [2] Schimpf K, Spiegel R, Thompson L, et al. Determination of vitamin B<sub>12</sub> in infant formula and adult nutritional products by HPLC: First Action 2011.10[J]. AOAC International Journal, 2012, 95(2): 313-318.
- [3] 徐硕,金鹏飞,邝咏梅,等. HPLC 法测定复合维生素 B 片中的微量叶酸、维生素 B<sub>12</sub> 和生物素[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(6): 1091-1097.
- [4] 潘瑶,唐建华,龙必强,等. 建立 RP-HPLC 法同时测定复合维生素注射液中的 11 种维生素含量[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(3): 443-449.
- [5] Ross W, Derek M, Karly H, et al. Determination of vitamin B<sub>12</sub> in equine urine by liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry[J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2018, 50: 634-639.
- [6] Lee J H, Shin J H, Park J M, et al. Analytical determination of vitamin B<sub>12</sub> content in infant and toddler milk formulas by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2015, 35(6): 765-771.
- [7] Gopi K, James J. Determination of vitamin B<sub>12</sub> via pH-dependent quenching of the fluorescence of nitrogen doped carbon quantum dots[J]. Microchimica Acta, 2017, 184(10): 3883-3891.
- [8] Mohammad H P, Elmira A, Jalal A, et al. Highly sensitive and selective electrochemical sensor for detection of vitamin B<sub>12</sub> using an Au/PPy/FMNP@TD-modified electrode[J]. Sensors & Actuators B: Chemical, 2018, 261: 335-344.
- [9] 刘根,陈珍,孙登明. 差分脉冲伏安法同时测定维生素 B<sub>2</sub> 和维生素 B<sub>12</sub>[J]. 分析试验室, 2014, 33(1): 82-86.
- [10] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 1236. ■