

同步荧光分析法测定维生素 E*

王晋玲 许金钩**
(厦门大学化学系 361005)

R 977.25

本文提出了维生素 E 的同步荧光测定新方法。在正己烷介质中,采用 $\Delta\lambda=40\text{nm}$ 进行同步扫描,维生素 E 的同步荧光光谱在 322nm 波长处呈现同步荧光峰。可消除溶剂拉曼光的影响而用于准确测定维生素 E。在 0.02~6.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内,同步荧光峰的峰高与维生素 E 的浓度呈线性关系, $r=0.9999$,方法的检测限为 0.007 $\mu\text{g}/\text{ml}$,相对标准偏差为 1.1%($n=8$)。用于维生素 E 胶丸样品的测定,平均回收率为 $103\pm 1.8(\text{SD})\%$ ($n=10$)。

关键词: 维生素 E 同步荧光分析

维生素 E 原用于治疗妇女不孕症和先兆性流产,近年来还发现它在老年医学方面也有一定用途,最近国外有报道它对肿瘤的防治有一定效果,因此维生素 E 的检测愈加受到重视。已报道的维生素 E 的荧光分析法,有以 295nm 射线激发,在 325nm^[1] 或 340nm^[2] 波长下测定维生素 E 的荧光强度,或用硝酸将维生素 E 氧化为生育酚红,后者在冰醋酸中与邻苯二胺缩合,然后测定缩合物的荧光强度^[3]。上述方法,或受溶剂拉曼光的严重干扰而影响测定的灵敏度和准确度;或者操作手续比较麻烦,降低了分析速度。本文提出的同步荧光分析法,可消除拉曼光的影响,直接测量维生素 E 的荧光强度,方法简便快速,灵敏度高,选择性好。

实验部分

一、仪器与试剂

Hitachi 650-10S 荧光分光光度计。

正己烷(分析试剂或化学试剂)首先用活性炭处理,然后在水浴上蒸馏提纯;维生素 E 系由厦门鱼肝油厂提供。

维生素 E 正己烷溶液(0.40mg/ml);严格避光贮存,使用时在棕色容量瓶中将此贮存液加正己烷稀释配制成浓度为 4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶

液。

二、实验方法

于 10ml 容量瓶中加入 $\leq 60\mu\text{g}$ 维生素 E 的标准溶液或试液,用正己烷稀释至刻度,摇匀。将溶液移入 1cm 石英液池中在荧光分光光度计上以波长间隔 $\Delta\lambda=40\text{nm}$ 扫描其同步荧光光谱,测量同步荧光峰(322nm)的荧光强度信号值。在同样条件下进行溶剂空白测定,并记录维生素 E 溶液与溶剂之间同步荧光峰的荧光强度信号的差值 ΔF 。以 ΔF 对维生素 E 的浓度作工作曲线。

荧光分光光度计的仪器条件设置:响应正常;工作状态 正常;灵敏度 $\times 1$;EX,EM 8nm。

实际工作时,也可以测量在 $\lambda_{ex}=282\text{nm}$, $\lambda_{em}=322\text{nm}$ 条件下维生素 E 溶液与溶剂之间荧光强度信号的差值,而不必扫描整条同步荧光光谱。

结果与讨论

一、拉曼光的干扰问题

瑞利光和拉曼光对荧光分析有显著的影响,往往成为荧光分析方法灵敏度的主要限制因素,还会降低测定的准确度。

维生素 E 的荧光峰与溶剂的拉曼峰严重

* 国家教委博士点基金资助项目

** 通讯联系人

重迭,因而其常规荧光测定法受拉曼光的影响十分严重。实验中曾试图通过改变激发单色器和发射单色器的狭缝宽度以及改变激发波长以消除拉曼光的干扰,但效果都不能令人满意(见图1)。

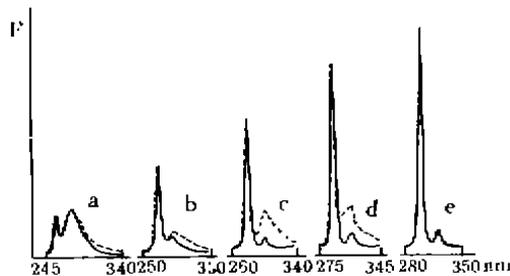


图1 激发波长分别在260(a)、270(b)、280(c)、290(d)和300(e)nm时维生素E(·····)和正己烷(—)的荧光光谱 EX, EM: 5nm。

由于同步扫描荧光测定方法具有使光谱简化、谱带窄化、减小光谱重迭和减小散射光的影响等优点^[4],因而我们试图通过同步荧光测定的办法以克服溶剂拉曼光的干扰,实验结果证实这一办法是可行的(见图2)。在维生素E的同步荧光峰(322nm)处测量其荧光强度信号,可以消除拉曼光的干扰。

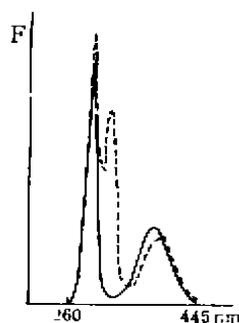


图2 维生素E(·····)和正己烷(—)的同步荧光光谱 $\Delta\lambda = 40\text{nm}$ EX, EM: 8nm 维生素E = 1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$

二、实验条件选择

1. $\Delta\lambda$ 的选择 在正己烷介质中,维生素E荧光的最大激发波长和最大发射波长分别为285nm和310nm。如采用 $\Delta\lambda = 310 - 285 =$

25nm进行同步扫描,固然可以获得较高的维生素E同步荧光峰,但与溶剂的拉曼峰严重重迭,并不可取。分别试验了15、20、30、35、40和50nm等各种 $\Delta\lambda$ 值,结果表明,采用 $\Delta\lambda = 40\text{nm}$ 效果最佳,既消除了拉曼光,又兼顾了测定的灵敏度。

2. EX和EM带通的选择 EX和EM带通的选择,将会影响测定的灵敏度和选择性。因此作了两组实验,首先将(EX, EM)带通分别选定(2, 8)、(4, 6)、(5, 5)、(6, 4)和(8, 2)(单位均为nm),以 $\Delta\lambda = 40\text{nm}$ 扫描维生素E的同步荧光光谱,结果表明EX和EM带通取相同值效果最佳;接着EX和EM带通分别同样取4、5、6、7、8、9和10nm进行另一组实验,结果表明EX和EM同样取8nm的效果最佳,同时兼顾了降低背景干扰和保持测定的灵敏度两个方面。

3. 溶剂的选择 分别以正己烷、环己烷、无水乙醇、乙醚和丙酮作溶剂配制维生素E溶液,并在同样的仪器条件下测定它们的常规荧光光谱以及不同 $\Delta\lambda$ 值下的同步荧光光谱。结果表明,常规荧光光谱都存在拉曼光的干扰问题,而同步荧光光谱以正己烷为溶剂的效果最佳。

三、线性范围、检测限和精密度

在上述实验条件下,方法的线性范围为0.02~6.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$,工作曲线的回归方程为 $\Delta F = 204.4C + 4.6$,相关系数为0.9999。测定了11份空白溶液的空白值,求出其标准偏差值 S_0 ,再按检测限的计算公式 $C_{\text{LOD}} = 3 \cdot S_0/S$ (S为工作曲线的斜率)求得检测限 $C_{\text{LOD}} = 0.007 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。

分别取4.0 μg 维生素E8份,按上述实验方法进行平行测定,实验结果相对标准偏差为1.1%。

四、干扰试验

移取8.0 μg 维生素E于10ml容量瓶中,加入不同量的脂溶性维生素A和维生素D,依实验方法进行测定,按5%的相对误差为许可范围考虑,实验结果维生素A和维生素D的

允许量分别为 18 单位和 3 μ g。

五、样品测定和回收率试验

取维生素 E 胶丸 20 粒,按中国药典(1990 年版,二部)装量差异的检验方法求得每丸内容物的平均装量为 149.6mg。

准确称取上述内容物 10.0mg,用正己烷溶解并定量移入 10ml 容量瓶中,加正己烷稀释至刻度,摇匀。再用正己烷将此溶液准确稀

释 50 倍,所得试液每 1ml 含内容物 20 μ g。

取一定量上述试液,按实验方法进行测定并对照工作曲线求得每 1mg 胶丸内容物中维生素 E 的含量,结果列于表 1。在试液中外加维生素 E 标准进行回收率测定,10 次测定的平均回收率为 103%,SD 为 1.8。

参考文献

- 1 侯少范,朱振源. 生物材料中生育酚的荧光测定法. 分析化学, 1982, 10: 535
- 2 Duggan D E, Bowman R L, Brodie B B, et al. A spectrophotofluorometric study of compounds of biological interest. Arch Biochem Biophys. 1957, 68: 1
- 3 Kofler M. Die getrennte bestimmung der tocopherole. Helv Chim Acta, 1947, 30: 1053
- 4 许金钧. 同步激发发光光谱分析. 光学与光谱技术, 1983, 4(3): 12

(本文于 1991 年 3 月 22 日收到)

表 1 胶丸内容物中维生素 E 含量测定结果

取样量(μ g)	测得量(μ g)	含量(%)
20.0	7.1	35.5
20.0	7.4	37.0
20.0	7.2	36.0
40.0	14.7	36.8
40.0	14.4	36.0
40.0	14.4	36.0

Determination of Vitamin E by Synchronous Spectrofluorimetry

Wang Jinling and Xu Jingou

(Department of Chemistry, Xiamen University, 361005)

A new synchronous spectrofluorimetric method for the determination of vitamin E was developed. Using $\Delta\lambda=40\text{nm}$ for synchronous scanning, a synchronous fluorescence spectrum of vitamin E was obtained and the peak at 322nm, which is free from the interference of Raman light, can be used for the accurate determination of vitamin E. The calibration curve is linear over the range of 0.02~6.0 $\mu\text{g/ml}$ ($r=0.9999$), the detection limit is 0.007 $\mu\text{g/ml}$, and the coefficient of variation is 1.1% ($n=8$). This method has been used to determine vitamin E in the capsule sample, and the mean recovery is 103% \pm 1.8 (SD).

Key words: vitamin E; synchronous spectrofluorimetry