

# 通用 H 点标准加入法直接测定绿色植物中的维生素 B<sub>2</sub>

李蕊<sup>1</sup> 白燕<sup>1\*</sup> 吴雅琴<sup>1,2</sup> 郭书好<sup>1</sup> 胡中伟<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>广州暨南大学化学系 广州 510632 <sup>2</sup>山西师范大学化学系 临汾 041004)

**摘 要** 应用通用 H 点标准加入法有效地消除了分光光度法测定维生素 B<sub>2</sub>(VB<sub>2</sub>)时叶绿素的干扰,可直接用于绿色植物中 VB<sub>2</sub> 含量的测定,无需分离,分析过程简单。通过模拟样品的测定、回收率实验以及质量控制,说明该方法的准确度高。建立了直接测定绿色植物中 VB<sub>2</sub> 含量的新方法,菠菜中 VB<sub>2</sub> 的含量为  $1.29 \times 10^{-6} \pm 0.07 \times 10^{-6} \text{g/g}$ ,与文献值相符。平均回收率为 98.6%,结果令人满意。

**关键词** 通用 H 点标准加入法 维生素 B<sub>2</sub> 叶绿素 分光光度法

## Directly Determination of VB<sub>2</sub> in Green Plants by General H-point Standard Addition Method

Li Rui<sup>1</sup>, Bai Yan<sup>1\*</sup>, Wu Yaqin<sup>1,2</sup>, Guo Shuhao<sup>1</sup>, Hu Zhongwei<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Department of Chemistry of Jinan University, Guangzhou 510632 <sup>2</sup> Department of Chemistry of Shanxi Normal University, Linfen 041004)

**Abstract** In this paper, the general H-point standard addition method (GHPSAM) for directly determination of VB<sub>2</sub> in green plants is proposed by spectroscopy, and this method can reduce the interferences of other substances. This method allows one to calculate the concentration of an analysis in the presence of unknown compounds, and the analytical process was easy without separateness. To illustrate the reliability of the proposed method, the concentration of VB<sub>2</sub> in simulacrum was determined and satisfactory results were obtained. The concentration of VB<sub>2</sub> in spinach was determined, its recovery and quality control was studied. The results were satisfactory, and the content of VB<sub>2</sub> in spinach was  $1.29 \times 10^{-6} \pm 0.067 \times 10^{-6} \text{g/g}$  and the recovery was 98.5%. The accuracy of this method was high. It is considered that this method could be applied and popularized.

**Key words** General H-point standard addition method, Riboflavin, Chlorophyll, Spectrophotometry

在绿色植物中维生素 B<sub>2</sub>(VB<sub>2</sub>)常与叶绿素或其它 B 类维生素共存,VB<sub>2</sub> 的吸收光谱与这些物质的吸收光谱相互重叠,一般均需经过繁琐复杂的提取分离过程才可进行 VB<sub>2</sub> 的测定。实际分析体系绝大多数属于灰色体系,既要校正基体和方法空白,也要消除化学干扰。目前解决这一难题的方法有 HELP 方法<sup>[1]</sup>,该方法可以从黑色分析体系或灰色分析体系的色谱-光谱二维数据中解析出存在分析物的纯光谱和纯色谱。但是算法原理比较复杂,在实际应用中存在困难。1998 年 Francisco 等首次提出 H 点标准加入法(HPSAM)<sup>[2]</sup>,其中基本 H 点标准加入法与 K 比例 H 点

李蕊 女, 25 岁, 硕士生, 现从事天然药物分析与研究。\*联系人, E-mail: baiyemail@163.net  
2003-10-22-收稿, 2004-03-16 接受

标准加入法<sup>[3]</sup>用于白色体系分析, 通用 H 点标准加入法(GHPSAM)<sup>[4,5]</sup>用于灰色体系分析。本文将通用 H 点标准加入法应用于菠菜中的 VB<sub>2</sub> 的直接测定, 有效地消除了叶绿素等物质的干扰, 并对其测定进行了质量控制。建立了直接测定绿色植物中 VB<sub>2</sub> 含量的新方法, 该方法样品处理过程和计算过程简单, 准确度高, 适于推广应用。

## 1 方法原理<sup>[4,5]</sup>

假定混合物体系中 X 为待测组分(浓度为  $C_{0X}$ ), Y 为干扰物质(浓度为  $C_{0Y}$ )。通用 H 点标准加入法的应用前提为, 在 X 最大吸收波长两端存在一段波长区间 $[\lambda_c, \lambda_d]$ , 其间 Y 吸收呈线性关系, 即  $A_Y = a + b\lambda$  ( $b$  为斜率,  $a$  为截矩)。判断合适波长区间的方法是: 根据样品总分析信号(样品光谱), 其总吸光度  $A = A_X + A_Y = A_X + a + b\lambda$ 。以该光谱对波长  $\lambda$  求二阶导数有  $A'' = d^2A/d\lambda^2 = d^2A_X/d\lambda^2 = A_X'' = \varepsilon''C$ ,  $\varepsilon$  为分析物的吸收系数。上式表明, 样品吸光度与分析物吸收的二阶导数在干扰信号与波长存在线性关系的波长范围内其比值是一个常数。因而若以样品光谱与分析物光谱的二阶导数之比对波长作图所得曲线的水平区域范围就是干扰光谱存在线性的波长区域。

在混合物体系中, 将不同量已知浓度的 X( $C_{iX}$ ,  $i$  指加入标准溶液的编号,  $i = 0, 1, 2, \dots, m$ ) 分别准确加入到一系列混合体系中, 在测定波长区间内寻找 X 的等吸收波长  $\lambda_1, \lambda_2$ , 分别在  $\lambda_1, \lambda_2$  处测量其分析信号(吸光度)  $A_1$  和  $A_2$ 。根据朗伯-比尔定律, 可知:

$$A_1 = \varepsilon_1 C_{0X} + \varepsilon_1 C_{iX} + a + b\lambda_1 \quad (1)$$

$$A_2 = \varepsilon_2 C_{0X} + \varepsilon_2 C_{iX} + a + b\lambda_2 \quad (2)$$

取  $\lambda_m = (\lambda_1 + \lambda_2)/2$ , 则在波长  $\lambda_m$  处有:

$$A_m = \varepsilon_m C_{0X} + \varepsilon_m C_{iX} + a + b\lambda_m \quad (3)$$

因为  $\lambda_1, \lambda_2$  为等吸收波长, 所以  $\varepsilon_1 = \varepsilon_2$ 。作(1)、(2)的中线, 则:

$$A'_m = (A_1 + A_2)/2 = \varepsilon_1 C_{0X} + \varepsilon_1 C_{iX} + a + b\lambda_m \quad (4)$$

(3)式和(4)式交于点 H( $-C_H, A_H$ ), 即:

$$\varepsilon_m C_{0X} - \varepsilon_m C_H + a + b\lambda_m = \varepsilon_1 C_{0X} - \varepsilon_1 C_H + a + b\lambda_m \quad (5)$$

因为  $\varepsilon_m \neq \varepsilon_1$ , 所以只有当  $C_{0X} = C_H$  时, 才能使式(5)成立, 即 H 点处横坐标为待测样品浓度, 纵坐标为干扰物吸光度值。图 1 为通用 H 点标准加入法(GHPSAM)的示意图。

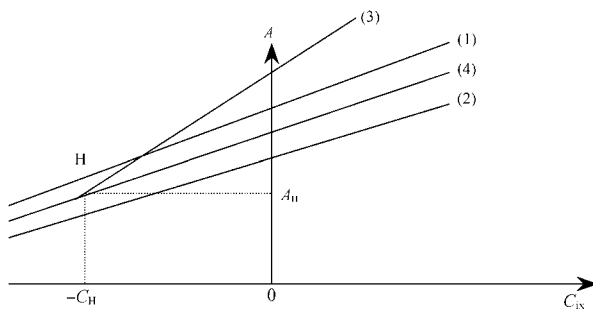


图 1 通用 H 点标准加入法示意图

Fig.1 Sketch fig of GHPSAM

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析)。冰乙酸(含量>99.0%)、维生素 B<sub>2</sub>(生化试剂)、醋酸钠(分析纯)、市售菠菜。实验用水均为二次蒸馏水。

## 2.2 实验方法

**2.2.1 提取叶绿素** 取新鲜菠菜叶,洗净去叶柄和中脉,用滤纸吸净表面水分。准确称取 5g 菠菜叶,剪碎,用研钵研磨,依次用丙酮、石油醚萃取叶绿素 60mL,保存至棕色瓶中。

**2.2.2 测试样品的制备** 模拟样品测试液:取 5.00mL 提取的叶绿素与 30.00mL  $1.00 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 VB<sub>2</sub> 标准溶液混合作为模拟样品,VB<sub>2</sub> 的含量为  $2.50 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

菠菜测试液:菠菜洗净去根,用滤纸吸净表面水分。准确称取 5g 菠菜剪碎研磨,加入 50mL 水抽滤得待测溶液,闭光低温保存待用。移取 4.00mL 菠菜液用水定容至 10mL 作为测试液。

**2.2.3 GHPSAM 法测定方法** 准确移取 1.50mL 模拟样品测试液或 1.50mL 菠菜测试液 5 份于 5 个 10mL 容量瓶中,分别加入  $1.00 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 VB<sub>2</sub> 标准溶液 0.00、1.00、2.00、3.00、4.00mL,定容。分别在波长  $\lambda_1=421\text{nm}$ 、 $\lambda_2=471\text{nm}$  及  $\lambda_m=446\text{nm}$  处测定各溶液的吸光度,按照 GHPSAM 方法原理计算 VB<sub>2</sub> 的含量。

## 3 结果与讨论

### 3.1 VB<sub>2</sub> 和叶绿素吸收光谱以及波长区间的选择

图 2 为 VB<sub>2</sub> 和叶绿素的吸收光谱图,叶绿素与 VB<sub>2</sub> 的紫外光谱图有重叠,不宜直接采用吸光光度法测定绿色植物中 VB<sub>2</sub>。在 400~480nm 波长区域内 VB<sub>2</sub> 和菠菜样品的二阶导数比值恒定(见图 3),说明以叶绿素为主的干扰组分在波长区间[400nm, 480nm]范围内吸收呈线性,可以使用 GHPSAM 法消除干扰,因此选择 VB<sub>2</sub> 定量分析的光谱区域为[400nm, 480nm]。

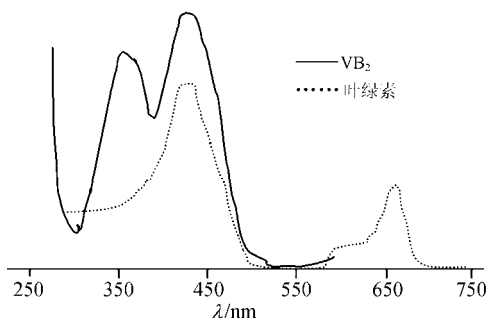


图 2 紫外吸收光谱图

Fig.2 Absorption curves

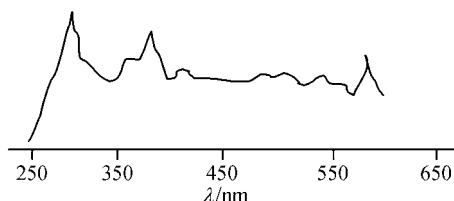


图 3 VB<sub>2</sub> 与菠菜二阶导数吸收比值

Fig.3 Specific value of Second-derivative Absorption curves of VB<sub>2</sub> and spinach

### 3.2 模拟样品中 VB<sub>2</sub> 的测定

分别采用 GHPSAM 法和标准加入法( $\lambda_{\text{max}}=446\text{nm}$ )测定模拟样品中 VB<sub>2</sub> 含量,结果见表 1。

表 1 样品测定结果

Tab.1 Results of simulacrum and spinach

样品	VB <sub>2</sub> 含量/(g/g)					
	通用 H 点标准加入法( $\times 10^{-5}$ )					平均值(置信度为 95%)
模拟样品( $2.50 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ VB <sub>2</sub> )	2.48	2.44	2.53			$(2.48 \pm 0.04) \times 10^{-5}$
菠菜样品/(g/g)	1.37	1.30	1.25	1.33	1.20	$(1.29 \pm 0.07) \times 10^{-6}$

由于叶绿素和 VB<sub>2</sub> 吸光度叠加,因而使标准加入法测得的 VB<sub>2</sub> 浓度(标准加入法测定模拟样

品结果  $4.17 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  要大于实际浓度。而利用 GHPSAM 法可以很好地消除叶绿素的干扰,测定的结果与实际浓度相符。

### 3.3 菠菜中 VB<sub>2</sub> 含量的测定

采用 GHPSAM 法测定菠菜中 VB<sub>2</sub> 含量, 结果如表 1 所示。对于菠菜中的 VB<sub>2</sub> 含量, 文献值<sup>[6]</sup>为  $1.00 \times 10^{-6} \sim 2.00 \times 10^{-6} \text{ g/g}$ , 实验的测定结果与文献值相符。回收率实验结果见表 2。

表 2 回收率实验结果  
Tab.2 Recovery of VB<sub>2</sub> in spinach with GHPSAM

菠菜测试液 $m(\text{VB}_2)/\mu\text{g}$	加入量 $m(\text{VB}_2)/\mu\text{g}$	测得量 $m(\text{VB}_2)/\mu\text{g}$	回收量 $m(\text{VB}_2)/\mu\text{g}$	回收率/%	平均值/%	RSD/%
0.075	0.030	0.106	0.031	103.3	98.2	5.6
0.082	0.030	0.109	0.027	90.0		
0.080	0.060	0.138	0.058	96.7		
0.072	0.060	0.134	0.062	103.3		
0.078	0.120	0.195	0.117	97.6		

### 3.4 分析质量控制

为了直观地显示分析过程是否处于受控状态, 判断显著差异存在与否, 建立了模拟样品中 VB<sub>2</sub> 测定的质量控制图。对于 VB<sub>2</sub> 含量为  $1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的模拟样品, 其质量控制图如图 4 所示。

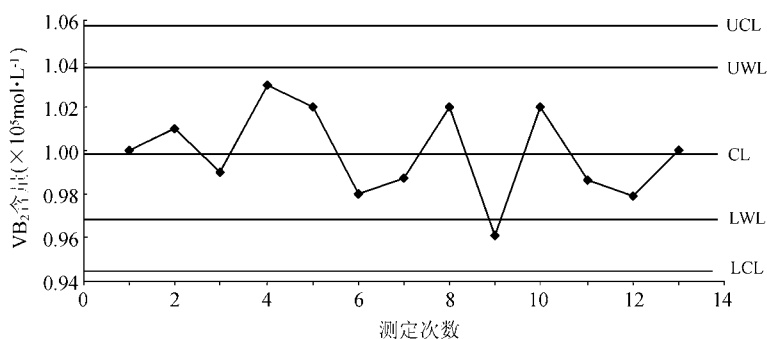


图 4 质量控制图

Fig.4 Quality control

13 次测定平均值为  $0.99 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 标准偏差为  $1.96 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。图 4 中所有的点均在上下控制限内, 分布合理、可靠。

## 4 结论

利用通用 H 点标准加入法可以直接测定绿色植物(如菠菜)中 VB<sub>2</sub> 的含量, 通用 H 点标准加入法快速简便, 准确度高, 样品处理过程简便易行, 计算过程简单, 便于推广应用。

## 参考文献

- [1] O M Kvalheim, Y Z Liang. Anal. Chem., 1992, 64: 936~950.
- [2] R F Bosch, F P Campins. Analyst, 1988, 113: 1011~1016.
- [3] G M Liu, X L Ma, P Li. Anal. Lett., 1993, 26(4): 801~806.
- [4] L A Tortajada-Genaro, C F Pilar, F Blasco-Gomez et al. Analyst, 2000, 125: 771~776.
- [5] 慈 薇, 吴玉田, 刘荔荔 等. 分析化学, 2002, 30(6): 709~711.
- [6] 曾强 编 著. 常吃蔬菜的营养价值. 北京: 知识出版社, 1990: 47~48.