

DOI: 10.3969/j.issn.2096-8248.2025.04.004

引用格式: 李德邦, 司鑫鑫. 硼酸配位反应荧光光度法测定维生素 B6 片剂的含量 [J]. 江苏海洋大学学报(自然科学版), 2025, 34(4): 28-33.

硼酸配位反应荧光光度法测定维生素 B6 片剂的含量

李德邦, 司鑫鑫

(江苏海洋大学 药学院, 江苏 连云港 222005)

摘要: 在 pH=6.40 的 Clark-Lubs 缓冲介质中, 维生素 B6 与硼酸发生配位反应形成 2:1 配合物阴离子, 其在激发波长 305 nm 下能发射荧光, 荧光最大发射波长位于 376 nm, 基于此现象提出了一种荧光分光光度快速测定维生素 B6 含量的新方法。实验发现体系的荧光强度差值与维生素 B6 质量浓度在 0.05~1.40 mg/L 范围内呈线性关系, 其相关系数为 0.995 4, 平均回收率为 99.51%, RSD 值为 0.24%, 方法检测限为 0.002 18 mg/L。所拟方法快速简便、成本低、灵敏, 可应用于维生素 B6 的含量检测。

关键词: 硼酸; 维生素 B6; 配位反应; 荧光分光光度法

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 2096-8248(2025)04-0028-06

Determination of vitamin B6 tablets by boric acid coordination reaction

LI Debang, SI Xinxin

(School of Pharmacy, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China)

Abstract: In Clark-Lubs buffer medium at pH=6.40, vitamin B6 undergoes a coordination reaction with boric acid to form a 2:1 complex anion, which emits fluorescence at 305 nm, and the maximum fluorescence emission wavelength is located at 376 nm, based on this phenomenon, a fluorescence spectrophotometric method for the rapid determination of the content of vitamin B6 is proposed. The fluorescence intensity difference of the system was found to be linear with the concentration of vitamin B6 in the range of 0.05—1.40 mg/L with the correlation coefficient of 0.995 4, the average recovery of 99.51%, the RSD value of 0.24%, and the detection limit of the method of 0.002 18 mg/L. The proposed method is fast, simple, low-cost, and sensitive, and it can be applied in the determination of the content of vitamin B6.

Key words: boric acid; vitamin B6; coordination reaction; fluorescence spectrophotometry

维生素 B6 (Vitamin B6, VB6) 又称吡哆素^[1], 是许多食物中的水溶性维生素, 包括肉、谷物、水果和蔬菜等, 也是生物体细胞中的中心分子^[2]。作为一

种辅酶, 维生素 B6 是 100 多种酶促反应的辅助因子, 参与人体的多种代谢反应^[3]。长期缺乏维生素 B6 可能会引起中枢神经系统和人体免疫功能受损^[4], 可

收稿日期: 2025-01-31; 修订日期: 2025-03-20

作者简介: 李德邦, 硕士研究生, 研究方向为生物药物, (E-mail) 17849068201@163.com。

通信作者: 司鑫鑫, 副教授, 博士, 研究方向为生物药物, (E-mail) sixx@jou.edu.cn。

以通过口服足够的维生素 B6 进行有效治疗,也可通过多样化的饮食或口服补充剂来预防^[5]。

目前对维生素 B6 含量的测定方法主要有紫外分光光度法^[6]、荧光分光光度法^[1]、碱性高锰酸钾三波长分光光度法^[7]、高效液相色谱法^[8-9]、超高效液相色谱法^[10]、高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS)^[11-12]等。相比之下荧光分光光度法操作快速、灵敏度高,因而被广泛应用于环境^[13]及药品^[14]、食品检测^[15]中。文献[1]中 pH 7.00、曲拉通 X-100 存在情况下,以 326 nm 为激发波长,测定维生素 B6 在 395 nm 发射波长下的荧光强度,建立了直接荧光分光光度法测定维生素 B6 含量的分析方法,其质量浓度测定范围在 8.06~72.5 mg/L。本实验研究发现,当加入维生素 B6 时,在 pH=6.40 的 Clark-Lubs 缓冲介质中,维生素 B6 与硼酸形成配合物使得荧光光谱强度明显增强,基于这一现象建立了硼酸配位增强荧光分光光度法,作为测定维生素 B6 含量的新方法,其质量浓度测定范围在 0.05~1.40 mg/L,显著低于文献[1]。

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

维生素 B6(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);硼酸(分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司);磷酸氢二钾(分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司);氢氧化钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);盐酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);实验用水均为纯化水。

F97 型荧光分光光度计(上海奥析科学仪器有限公司);BS201S 型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司)。

1.2 溶液配制

维生素 B6 样品溶液:精密称取维生素 B6 100.0 mg 于小烧杯中,加入适量蒸馏水,搅拌至溶解,再转移至 100 mL 容量瓶中,加水定容,颠倒摇匀,得到质量浓度为 1 000.0 mg/L 的标准储备液装瓶备用,使用时吸取 5 mL 稀释成 5.0 mg/L 的维生素 B6 标准溶液待用。

硼酸溶液:精密称取 0.012 4 g 硼酸于小烧杯中,加入蒸馏水,用玻璃棒搅拌超声至溶解,再将溶液倒入 1 L 容量瓶中,加水定容,摇匀待用,得到浓度为 2.0×10^{-4} mol/L 的硼酸溶液。

1.3 实验方法

在 10 mL 具塞比色管中依次加入 0.20 mL 硼酸溶液,0.40 mL pH=6.40 的 Clark-Lubs 缓冲液,适量的维生素 B6 样品溶液,加蒸馏水定容,摇匀,即为测试溶液。同理,在 10 mL 具塞比色管中再按照以上方法配制不含维生素 B6 的空白溶液。将测试溶液、空白溶液分别置于 F97 型荧光分光光度计中,将光谱类型设置为发射光谱,激发光带宽和发射光带宽均为 10.0 nm,在激发波长 305 nm 激发下扫描得到体系的荧光光谱。在最大发射波长 376 nm 处进行测定,测定空白溶液的荧光强度 I_0 和含维生素 B6 的测试溶液的荧光强度 I_F ,并计算荧光光谱强度差,即 ΔI_F ($\Delta I_F = I_F - I_0$)。

2 结果与讨论

2.1 荧光光谱

将激发和发射狭缝宽度均设置为 10 nm,扫描速度设置为 1 000 nm/min,扫描空白溶液和含维生素 B6 的测试溶液,所得荧光图谱如图 1 所示。红色曲线是维生素 B6 与硼酸的反应产物的荧光图谱,其荧光强度最大波长位于 376 nm;蓝色曲线是空白溶液的荧光图谱,强度非常小。因此选择 376 nm 作为后续研究的检测波长。

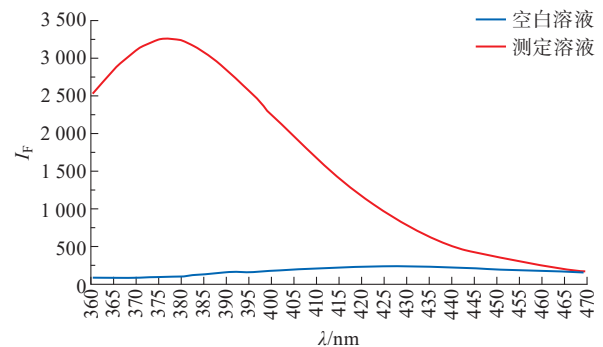


图1 荧光图谱

Fig. 1 Fluorescence pattern

2.2 实验条件优化

2.2.1 pH 的影响

硼酸与维生素 B6 在溶液中的存在形式会受到 Clark-Lubs 缓冲溶液 pH 的影响,因此,需要考察 pH 对体系的影响。当体系中维生素 B6 质量浓度为 0.50 mg/L 时,在“1.3”方法下仅加入 pH 为 3.40, 3.60, 4.20, 5.00, 5.60, 6.20, 6.40, 6.60, 6.80, 7.60 和 8.40 的缓冲溶液来改变体系 pH,以激发波长 E_X :305 nm、发射波长 E_M :376 nm 分别测其荧光强

度差值,结果如图2所示。在pH 3.40~6.40时体系的荧光强度差值随pH升高而显著增加,这是因为低pH范围内维生素B6上氮原子的质子化不利于荧光配合物的产生;在pH 6.80~8.40时体系的荧光强度差值随pH升高而显著降低,这是因为该荧光配合物中维生素B6结构上羟基的解离不利于荧光配合物的产生;在pH 6.40~6.80时体系的荧光强度差值呈现最大值而且呈现平台。因此,选择pH 6.40 Clark-Lubs 缓冲溶液来控制体系pH。

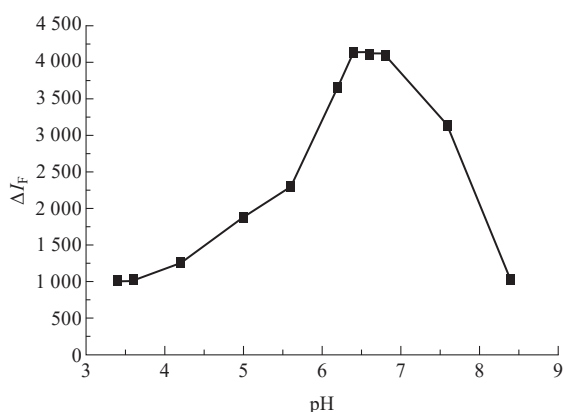


图2 不同pH的Clark-Lubs缓冲溶液对体系荧光强度差值的影响

Fig. 2 Effect of different pH of Clark-Lubs buffer solution on the fluorescence intensity difference of the system

2.2.2 缓冲溶液用量的影响

当体系中维生素B6质量浓度为0.50 mg/L时,随缓冲溶液用量体积的不同,荧光强度差值变化曲线如图3所示。

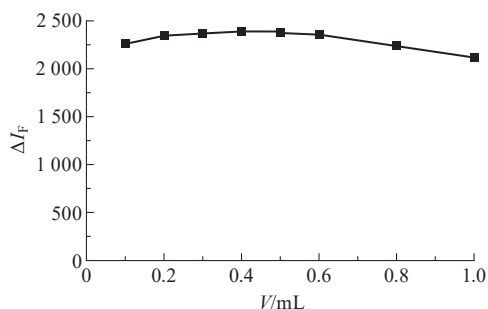


图3 Clark-Lubs缓冲溶液的用量对体系荧光强度差值的影响

Fig. 3 Effect of the amount of Clark-Lubs buffer solution on the fluorescence intensity difference of the system

pH 6.40的Clark-Lubs缓冲溶液用量在0.30~0.50 mL之间变化缓慢;用量少于0.30 mL时,体系不在最佳pH 6.80~8.40,导致荧光强度差值变

小;用量大于0.50 mL时,因产物阴离子型荧光配合物与体系中电解质的静电作用使荧光强度差值变小。因此,选用0.40 mL的pH 6.40 Clark-Lubs缓冲溶液进行后续实验。

2.2.3 硼酸用量的影响

当体系中维生素B6质量浓度为0.50 mg/L时,考察了反应试剂硼酸用量对体系的荧光强度差值的影响,结果如图4所示。硼酸溶液用量小于0.20 mL时体系的荧光强度差值随其用量增加而略微升高,这是因为维生素B6与硼酸反应的荧光产物随硼酸溶液用量增加而增加;硼酸溶液用量为0.20 mL时体系的荧光强度差值达到最大;硼酸溶液用量大于0.20 mL时体系的荧光强度差值随其用量增加反而略微降低,这是因为维生素B6与硼酸反应的荧光产物与过量硼酸发生离子缔合反应导致荧光产物减少。因此选用 2.0×10^{-4} mol/L的硼酸溶液0.20 mL进行后续的实验。

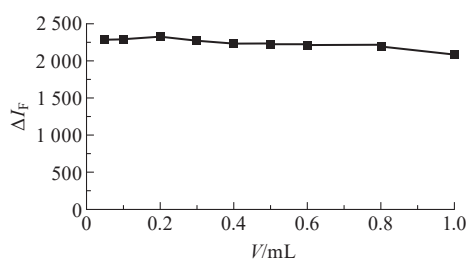


图4 硼酸溶液用量对体系荧光强度差值的影响

Fig. 4 Effect of the amount of boric acid solution on the difference in fluorescence intensity of the system

2.2.4 反应时间的影响

改变反应时间,考察时间稳定性对荧光强度差值的影响,结果如图5所示,体系荧光强度差值随着时间增加而略微呈现下降趋势。因此,实验中采取即配即做模式。

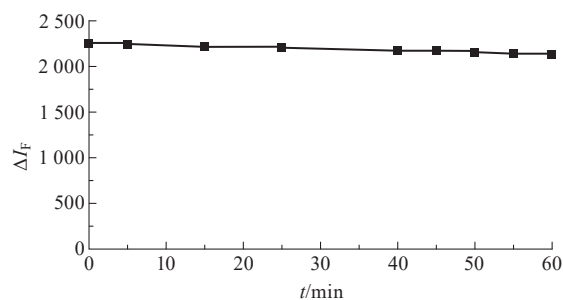


图5 反应时间对荧光强度差值的影响

Fig. 5 Effect of reaction time on the difference in fluorescence intensity

2.2.5 试剂加入顺序的影响

试剂不同的加入顺序也会对荧光强度差值产生影响,因此需要对其进行考察。结果(见图6)表明,当试剂加入顺序依次为 0.20 mL 的硼酸溶液(a)、0.40 mL 的 pH 6.40 Clark-Lubs 缓冲溶液(b)和维生素 B6 溶液(c)时,体系的荧光强度差值最大,与“1.3”节一致。因此,选择硼酸溶液-缓冲溶液-维生素 B6 溶液作为加入顺序进行后续实验。

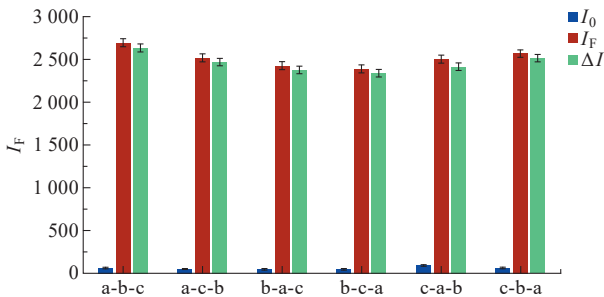


图6 试剂加入顺序对荧光强度的影响

Fig. 6 Effect of reagent addition order on fluorescence intensity

2.3 工作曲线与检出限

在最优实验条件下,按照“1.3”方法在 10 mL 具塞比色管中分别加入硼酸和缓冲溶液,然后依次吸取质量浓度为 5.0 mg/L 的维生素 B6 标准溶液 0.10, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00, 1.20, 1.40, 1.60, 1.80, 2.00, 2.20, 2.40, 2.60 和 2.80 mL 分别置于不同的比色管中配制测试溶液,同步配制空白溶液,在激发

波长 E_X :305 nm、发射波长 E_M :376 nm 条件下,分别测定标准溶液的荧光强度 I_F ,以维生素 B6 质量浓度 c 为横坐标,荧光强度差值 ΔI_F 为纵坐标,绘制维生素 B6 荧光分光光度标准曲线(见图7)。

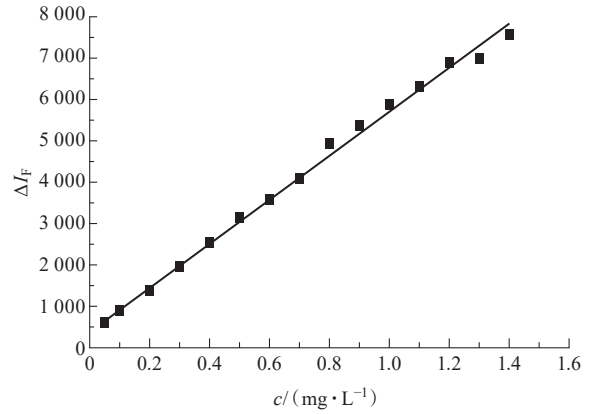


图7 工作曲线

Fig. 7 Working curve

结果表明,维生素 B6 质量浓度在 0.05~1.40 mg/L 范围内与 ΔI_F 呈良好的线性关系,其线性回归方程为 $\Delta I_F=5\ 291.6c+122.95$,相关系数为 0.995 4,检出限(LOD)计算公式为 $LOD=3\sigma/k$,其中,对空白溶液平行测定 18 次,求得标准偏差即为 σ ,工作曲线的斜率为 k ,依据实验测得数据计算出该方法的检出限为 0.002 18 mg/L。本方法与其他分析方法的参数进行比较,本方法灵敏度高和检测限低(如表 1 所示)。

表 1 本方法与其他分析方法的参数进行比较

Table 1 Comparison of parameters between this method and other analytical methods

序号	分析方法	测定波长/nm	线性范围/(mg·L ⁻¹)	检测限/(mg·L ⁻¹)	参考文献
1	紫外分光光度法	394	2~40	/	文献[16]
2	荧光光度法	326/395	8.06~72.5	/	文献[1]
3	碱性高锰酸钾三波长分光光度法	420 525 610	2~14 2~18 2~14	/	文献[7]
4	超高效液相色谱法(UPLC)	291	0.5~50	0.04	文献[10]
5	硼酸配位反应荧光光度法	305/376	0.05~1.40	0.002 18	本文方法

2.4 共存物质的影响

当体系中维生素 B6 质量浓度为 0.50 mg/L 时,在最优实验条件下考察了共存物质对本实验维生素 B6 测定的干扰,结果如表 2 所示。测定的相对误差

均 $\leq \pm 5\%$,发现这些物质与维生素 B6 不能发生反应,即表明无干扰,进一步说明所建立的分析方法具有较好的选择性。

表2 干扰物质的影响

Table 2 Effects of interfering substances

序号	干扰物质	干扰物/被测物(最大倍数)	相对误差/%
1	KIO ₃	320	1.10
2	K ⁺	320	-0.59
3	NH ₄ ⁺	40	-2.90
4	CMC	280	3.91
5	Na ⁺	320	-0.91
6	Zn ²⁺	240	2.41
7	F ⁻	40	-2.90
8	Cl ⁻	320	-0.59
9	SO ₄ ²⁻	240	2.41
10	PO ₄ ³⁻	320	-0.91
11	山梨酸钾	20	-1.20
12	苯甲酸钠	5	0.80
13	维生素C	10	2.61
14	维生素B1	5	-1.52

2.5 回收率试验

精密移取待测溶液 0.30 mL, 按照“1.3”方法, 平行测定 10 次, 以回归方程分析处理数据, 得出的结果如表 3 所示。维生素 B6 的回收率在 99.13%~99.76% 之间, 平均回收率为 99.51%, 相对标准偏差 (RSD) 为 0.24%。RSD 值均小于 ±5%, 表明本方法测定的含量准确度高, 含量可控。

表3 维生素 B6 含量的回收率分析

Table 3 Recovery analysis of vitamin B6 content

次数	质量浓度 / (mg·L ⁻¹)	测定质量浓度 / (mg·L ⁻¹)	回收率 / %	平均回收率 / %	相对标准偏差 / %
1		0.299	99.76		
2		0.299	99.74		
3		0.297	99.13		
4		0.299	99.71		
5		0.298	99.50		
6	0.30	0.298	99.48	99.51	0.24
7		0.299	99.53		
8		0.297	99.13		
9		0.298	99.38		
10		0.299	99.73		

2.6 样品分析

取维生素 B6 片 15 片 (标示量为 10 mg/片), 研细后精密称取 5 mg 置于 1 L 容量瓶中, 加水溶解, 定容, 摇匀过滤, 弃去初滤液。按照“1.3”方法, 对样品溶液进行检测分析, 并计算样品中维生素 B6 的相对标准偏差 (RSD), 结果如表 4 所示。测定的 RSD 在 0.17%~0.35% 之间, 并与紫外分光光度法^[16]比较, 两者测定结果一致。

表4 维生素 B6 样品分析测定结果 (n=15)

Table 4 Results of analytical determination of vitamin B6 samples (n=15)

样品序号	标示量 / (mg·片 ⁻¹)	本法平均测定量 / (mg·片 ⁻¹)	本法 RSD/%	紫外光度法平均测定值 / (mg·片 ⁻¹)	紫外光度法 RSD/%
1	10.0	9.95	0.29	9.65	0.26
2	10.0	9.94	0.35	9.75	0.30
3	10.0	9.93	0.17	9.61	0.26

3 反应机理

在实验条件下, 用摩尔比法测定了维生素 B6 与硼酸配位反应的摩尔比, 如图 8 所示。

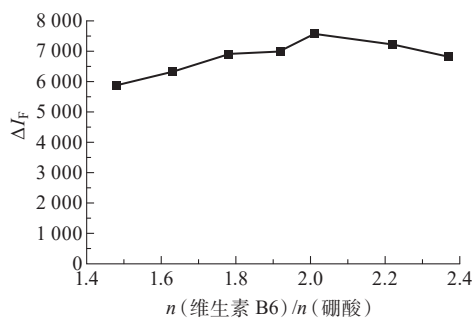


图8 摩尔比测定

Fig. 8 Mole ratio determination

结果是 $n(\text{维生素 B6}) : n(\text{硼酸}) = 2:1$, 说明有 2 个维生素 B6 分子, 其分子上的酚羟基和处于酚羟基邻位的羟基亚甲基上的醇羟基与硼酸发生了配位反应最终形成配合物阴离子, 该配位反应的摩尔比测定反应式如图 9 所示, 该含硼配合物阴离子的形成使体系荧光增强。

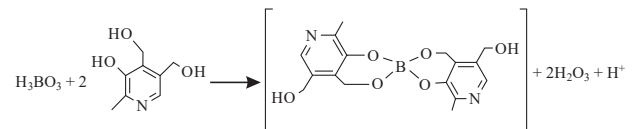


图9 硼酸与维生素 B6 的配位反应

Fig. 9 Coordination reaction of boric acid with vitamin B6

4 结论

在 pH 6.40 的 Clark-Lubs 缓冲溶液中, 维生素

B6 与硼酸发生配位反应形成具有荧光的含硼维生素 B6 配合物阴离子, 导致体系的荧光光谱强度明显增强, 据此建立了硼酸配位反应增强荧光法来检测维生素 B6 含量的新方法, 且该方法灵敏度高、快速、简便, 可用于大批量维生素 B6 制剂含量的快速检测。

参考文献:

- [1] 洪石, 韦文美, 贺品玉. 荧光分光光度法测定酵母粉中维生素 B6 的含量[J]. 安徽化工, 2020, 46(5): 105-107.
- [2] PARRA M, STAHL S, HELLMANN H. Vitamin B₆ and its role in cell metabolism and physiology [J]. Cells, 2018, 7(7): 1.
- [3] 王新铭, 郝振芝. 维生素 B₆ 的药理作用与临床应用 [J]. 医学理论与实践, 1990(2): 38-40.
- [4] 郭庆. 维生素 B6 缺乏与慢性肾功能衰竭 [J]. 国外医学情报, 1991(17): 6.
- [5] BROWN M J, AMEER M A, DALEY S F, et al. Vitamin B6 Deficiency [M]. StatPearls. Treasure Island: StatPearls Publishing LLC, 2025.
- [6] 唐万军, 陈栋华, 王利华, 等. 紫外分光光度法同时测定复方甲硝唑片中甲硝唑和维生素 B6 的含量 [J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2005, 24(3): 17-20.
- [7] 李雯, 陶翔宇, 李照谊, 等. 碱性高锰酸钾三波长分光光度法测定维生素 B6 的含量 [J]. 化工时刊, 2024, 38(1): 25-28.
- [8] ZHANG Xiaochun, TANG Xiaoying, DALY T M. A one-step NIST traceable HPLC method for quantitation of vitamin B₆ and 4-pyridoxic acid in human plasma [J]. Practical Laboratory Medicine, 2020, 21 (prepublish): e00160.
- [9] 刘丽艳, 张宏馨, 黄珊, 等. 双波长 HPLC- 荧光法同时测定褪黑素和维生素 B6 [J]. 河北大学学报(自然科学版), 2019, 39(5): 491-497.
- [10] 高奇, 郭德才, 王海燕, 等. UPLC 法测定维生素 B₆ 注射液的含量 [J]. 中国药理学杂志(网络版), 2023, 21(1): 19-24.
- [11] 杨玉平, 谢柏艳. 液质联用法同时测定保健食品中维生素 B1、维生素 B6、烟酸、烟酰胺和咖啡因的含量 [J]. 湖北农业科学, 2023, 62(9): 124-129.
- [12] SALLABI S M, AISHAH A, MANAL A, et al. Determination of vitamin B₃ vitamers (Nicotinamide) and vitamin B₆ vitamers in human hair using LC-MS/MS [J]. Molecules, 2021, 26(15): 1-3.
- [13] 龙剑英, 陆往, 褚娟. 金丝富集 - 冷原子荧光分光光度法测定环境空气中气态汞 [J]. 广州化工, 2023, 51(4): 119-121.
- [14] 陈艳, 陈庆强. 荧光分光光度法在医药上的应用 [J]. 广东药学, 2002(4): 63-65.
- [15] 李莹婷. 荧光分光光度法测定食品中抗坏血酸的不确定度评估 [J]. 现代食品, 2017(3): 120-122.
- [16] 陈恕华. 紫外分光光度法测定维生素 B6 [J]. 理化检验(化学分册), 2005(7): 521.

(责任编辑: 李琴)