

学校编码: 10384
学号: 22420081151471

密级_____

廈門大學

硕士学位论文

苏丹红、维生素的液相色谱分离及在线光化学衍生 – 荧光光谱测定方法研究

Measurement of Sudan Dyes and Vitamins with HPLC and
Online Photochemical Derivatization - Fluorescence
Detection

刘 珺

指导教师姓名: 弓振斌 教授

专业名称: 海洋化学

论文提交日期: 2011年8月

论文答辩时间: 2011年8月

2011年9月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ 海洋分析化学 ）课题（组）的研究成果，获得（ 海洋分析化学 ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ 海洋分析化学 ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）： 刘珺

2011 年 9 月 15 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）： 刘珺

2011 年 9 月 15 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
英文缩略词表.....	V
第一章 绪论.....	1
1.1 光化学衍生分析方法的原理及特点.....	1
1.2 在线光化学衍生 – 荧光分析法.....	3
1.2.1 光源.....	4
1.2.2 光反应管（反应容器）.....	5
1.2.3 程序控制时间/光强的光衍生装置.....	6
1.3 在线光化学衍生 – 荧光分析法的应用.....	7
1.4 研究工作的意义及内容.....	9
参考文献.....	11
第二章 苏丹红的 HPLC 分离 – 在线光化学衍生 – 荧光光谱测定方 法.....	17
2.1 引言.....	17
2.2 实验部分.....	20
2.2.1 试剂与标准.....	20
2.2.2 仪器与设备.....	20
2.2.3 实验内容和步骤.....	20
2.3 结果与讨论.....	21
2.3.1 色谱分离条件的优化.....	21
2.3.2 光照前后苏丹红染料吸收光谱的变化.....	22
2.3.3 光照前后苏丹红荧光光谱性质及荧光检测器测定条件.....	24
2.3.4 光化学反应条件的优化.....	26
2.3.5 方法的分析性能参数.....	31

2.3 本章小结.....	34
参考文献.....	35
第三章 维生素的 HPLC 分离 – 在线光化学衍生 – 荧光光谱测定方法.....	38
3.1 引言.....	38
3.2 实验部分.....	43
3.2.1 试剂与标准.....	43
3.2.2 仪器与设备.....	43
3.2.3 实验内容和步骤.....	43
3.3 结果与讨论.....	44
3.3.1 色谱条件的优化.....	44
3.3.2 光照前后维生素吸收光谱的变化.....	45
3.3.3 光照前后维生素荧光光谱性质及荧光检测器测定条件.....	48
3.3.4 光化学反应条件的优化.....	52
3.3.5 方法的分析性能参数.....	56
3.4 实际样品的测定.....	59
3.5 本章小结.....	60
参考文献.....	61
第四章 结论与展望.....	65
4.1 结论.....	65
4.2 研究展望.....	65
攻读硕士学位期间发表的论文.....	67
攻读硕士学位期间参加的科研工作.....	67
致谢.....	68

Contents

Abstract (In Chinese)	I
Abstract (In English).....	III
English Abbreviations Table	V
Chapter I Preface	1
1.1 Principle and Characteristics of Photochemical Derivatization	1
1.2 Online Photochemical Derivatization	3
1.2.1 Lamps.....	4
1.2.2 Photochemical Reaction Tubes	5
1.2.3 Time/Energy Programmed Photochemical Reactor	6
1.3 Applications of Online Photochemical Derivatization	7
1.4 Objectives and Significance of This Work.....	9
References.....	11
Chapter II Determination of 4 Sudan Dyes with HPLC and Online Photochemical Derivatization - Fluorescence Detection.....	17
2.1 Introduction.....	17
2.2 Experiment.....	20
2.2.1 Reagents and Standards	20
2.2.2 Instrumental	20
2.2.3 Experimental Procedure.....	20
2.3 Results and Discussions.....	21
2.3.1 Optimization of HPLC Separation Conditions	21
2.3.2 Absorbance Spectra before and after UV Irradiation.....	22
2.3.3 Excitation and Emission Spectra and Parameters of Fluorescence Detector.....	24
2.3.4 Optimization of Photochemical Derivatization Conditions.....	26

2.3.5 Performance of Developed Method	31
2.4 Conclusions	34
References	35
Chapter III Determination of 7 Vitamins with HPLC and Online Photochemical Derivatization - Fluorescence Detection.....	38
3.1 Introduction.....	38
3.2 Experiment.....	43
3.2.1 Reagent and Standards	43
3.2.2 Instrumental	43
3.2.3 Experimental Procedure.....	43
3.3 Results and Discussions	44
3.3.1 Optimization of HPLC Separation Conditions	44
3.3.2 Absorbance Spectra before and after UV Irradiation.....	45
3.3.3 Excitation and Emission Spectra and Parameters of Fluorescence Detector.....	48
3.3.4 Optimization of Photochemical Derivatization Conditions.....	52
3.3.5 Performance of Developed Method	56
3.4 Analysis of Samples	59
3.5 Conclusions.....	60
References.....	61
Chapter IV Conclusions and Prospects.....	65
4.1 Conclusions.....	65
4.2 Prospects	65
Publications During the Study of Master of Science Degree	67
Research Project During the Study of Master of Science Degree.....	67
Acknowledgement	68

摘 要

光化学衍生是基于物质吸收一定波长的紫外或可见光辐射而引起的光化学反应而建立的一种分析技术。在线光化学衍生法相比传统的化学衍生有其独特的优势与特点,如对环境友好、操作简便、易实现自动化等,其与荧光分析法的结合大大拓展了荧光分析的应用范围,同时也为许多物质的低含量测定提供了新的技术,在药物分析、环境样品分析及复杂生物样品分析方面显示出广阔的应用前景。因此积极开拓适合该方法的目标物,或增强方法的实用性是具有重要的意义。本研究针对苏丹红和维生素的高效液相色谱(HPLC)分离-在线光化学衍生-荧光光谱测定方法进行了研究,并应用于实际样品的测定。研究论文分为四章:

第一章介绍了光化学衍生分析法的原理与特点,简要阐述了在线光化学衍生-荧光分析法的实验技术,并且综述了在线光化学衍生-荧光分析法在药物及其代谢物、维生素、农药、黄曲霉毒素方面的应用。

第二章建立了4种苏丹红染料(苏丹红I、II、III、B)的HPLC分离-在线光化学衍生-荧光光谱测定方法。采用C₁₈色谱分离柱,实验优化了色谱分离条件,光化学衍生条件包括光照时间、光照强度、反应温度及反应介质的酸度,程序控制时间/光强光化学反应器参数以及荧光检测波长,同时还与HPLC分离-光电二极管阵列(PDA)检测方法进行了比较。建立方法的检出限(DLs, 3 σ)为0.9(苏丹红III)~5.4 $\mu\text{g/L}$ (苏丹红II),均低于HPLC-PDA测定方法的检出限,相对标准偏差(RSDs, 0.1~1.0 $\mu\text{g/mL}$, $n=5$)小于5.4%。方法应用于辣椒油中苏丹红的测定,添加三个浓度水平的样品加标回收率在81.4%(苏丹红III)~100.4%(苏丹红II)之间。

第三章建立了7种维生素的HPLC分离-在线光化学衍生-荧光光谱测定方法。采用C₁₈色谱分离柱,实验优化了色谱分离条件,光化学衍生条件包括光照时间、光照强度、反应温度,程序控制时间/光强光化学反应器参数以及荧光

检测波长，同时也与 HPLC-PDA 测定方法进行了比较。建立的方法中 7 种维生素的检出限(DLs, 3σ) 在 $0.6 \mu\text{g/L}$ (B_2) ~ $37.6 \mu\text{g/L}$ (E) 之间, 均低于 HPLC-PDA 测定方法的检出限, 相对标准偏差 (RSDs, $0.3 \sim 2.0 \mu\text{g/mL}$, $n=6$) 小于 3.7%。方法应用于复合维生素片的测定, 样品的加标回收率在 85.0% (B_1) ~ 110% (B_6) 之间。

第四章对研究工作进行了总结, 并对后续工作进行了展望。

本研究工作的主要贡献在于, 建立了高效液相色谱柱后在线光化学衍生荧光测定 4 种苏丹红染料和 7 种维生素的新方法, 方法具有简便、快速、准确、检出限低、费用低的特点。该方法相比于传统的 HPLC 分离 - 光电二极管阵列检测器测定方法具有灵敏度高、选择性强等优点。

关键词: 苏丹红; 维生素; 高效液相色谱; 在线光化学衍生; 荧光测定

ABSTRACT

Photochemical derivatization (PCD) is a technique for analyte transferring or chemical species reforming based on the light irradiation induced chemical reaction. Online photochemical derivatization has many advantages, such as environment-friendly, easily control and automation, compared with ordinary chemical derivatization. This technique has greatly expanded the application of traditional molecular fluorescence detection, and provides a new way to detect lots of compounds which are naturally non- or weakly-fluorescence emission substances in the analysis of pharmaceuticals, organic pollutants, and biological and environmental samples. The thesis is aimed to develop new methods for determination of Sudan dyes and vitamins by HPLC with online photochemical derivatization and fluorescence detection. It contains four chapters as below:

Chapter I introduced the principle and characteristics of the PCD technique. The experimental and application of online PCD in pharmaceuticals, vitamins, pesticides and aflatoxins were summarized.

In chapter II, a new method using HPLC separation with online PCD and fluorescence detection was developed to determine 4 Sudan dyes. The analytes were separated on a C₁₈ column. The operating conditions for chromatographic separation and photochemical derivatization, and the parameters for photochemical reaction and fluorescence detection were optimized. Detection limits (DLs, 3 σ) ranged between 0.9 $\mu\text{g/L}$ (Sudan III) and 5.4 $\mu\text{g/L}$ (Sudan II). And the relative standard deviations (RSDs, 0.1 ~ 1.0 $\mu\text{g/mL}$, $n=5$) was lower than 5.4%. By using this method, the recoveries of 4 Sudan dyes in chilli oil were 81.4% (Sudan III) ~ 100.4% (Sudan II).

In chapter III, 7 water-soluble and fat-soluble vitamins, which were ordinarily used in multi-vitamine tablets, were separated and detected with online PCD and

fluorescence detector. All the water- and fat-soluble vitamins were separated on a C₁₈ column with mixture of phosphate buffer-methanol as mobile phase. The optimization of chromatographic separation conditions, photochemical derivatization conditions, and the parameters for photochemical reaction and fluorescence detection has been investigated. Detection limits (DLs, 3 σ) ranged between 0.6 $\mu\text{g/L}$ (B₂) and 37.6 $\mu\text{g/L}$ (E). And the relative standard deviations (RSDs, 0.3 ~ 2.0 $\mu\text{g/mL}$, $n=6$) was lower than 3.7%. By using this method, the recoveries of 5 vitamins in multivitamin tablets were 85.0% (B₁) ~ 110% (B₆).

Chapter IV is a summary of this study. The advantages and prospects for PCD technique and in further research were also proposed in this section.

Keywords: Sudan dyes; Vitamins; High performance liquid chromatography; Online photochemical derivatization; Fluorescence detection

英文缩略词表

缩略词	英文	中文
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高效液相色谱
FI	Flow Injection	流动注射
PDA	Photo-Diode Array	光电二极管阵列
FLD	Fluorescence Detector	荧光检测器
PCD	Photochemical Derivatization	光化学衍生
PLC	Programmable Logic Controller	可编程控制器
PCR	Photochemical Reactor	光化学反应器
PTFE	Polytetrafluoroethylene	聚四氟乙烯
B ₁	Thiamine Hydrochloride	硫胺素, 维生素 B ₁
B ₂	Riboflavin	核黄素, 维生素 B ₂
B ₆	Pyridoxine Hydrochloride	盐酸吡哆辛, 维生素 B ₆
NIC	Nicotinamide	烟酰胺
B ₁₂	Cyanocobalamin	钴胺素, 维生素 B ₁₂
A	Retinol	维生素 A
E	Tocopherols	生育酚, 维生素 E
DL	Detection Limit	检出限
LOQ	Limit of Quantitative Detection	定量下限
R	Linear Correlation Coefficient	线性相关系数
RSD	Relative Standard Deviation	相对标准偏差

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 绪论

1.1 光化学衍生分析方法的原理及特点

光化学衍生 (Photochemical Derivatization, PCD) 分析法又称光化学反应 (Photochemical Reaction Detection) 分析法, 是基于光化学反应而建立的一类分析方法。光化学反应是基于物质吸收一定波长的紫外或可见光辐射而引起的诸如加成、取代、水解、降解、光氧化、光还原、光异构化、缩合、聚合等化学变化^[1-4], 如图 1-1 所示。这些光化学反应会导致物质的结构或性质发生某些变化, 产生新的功能团, 使得光化学衍生产物的摩尔吸光系数、荧光特性或电化学特性等较母体有明显的改善, 从而提高分析的灵敏度和选择性。因此, 光化学衍生分析法常根据光衍生产物的特性与紫外 - 可见光、电化学、荧光、化学发光等测定技术结合组成相应的分析测定技术。

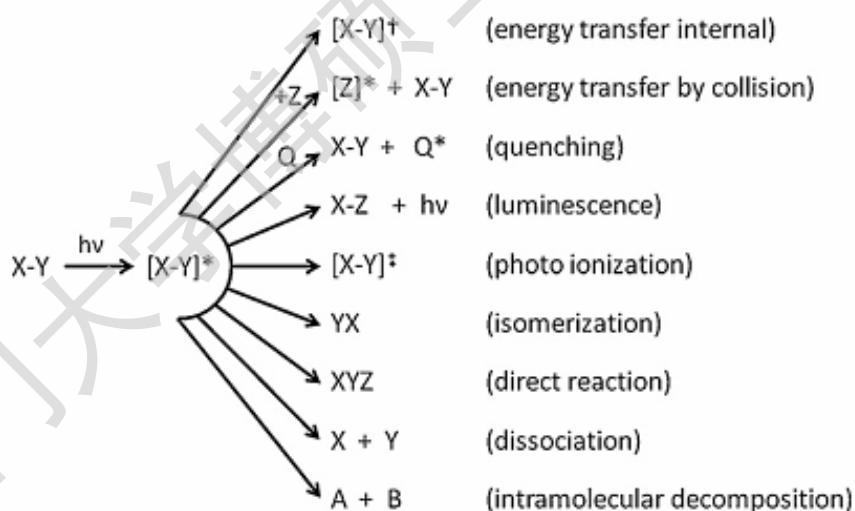


图 1-1 光化学反应的类型^[5]

Fig. 1-1 General classification of photochemical reactions^[5]

光化学衍生分析法是以目标物分子吸收光子后从基态跃迁至激发态, 继而发生激发态化学反应为基础的^[4]。以光化学衍生 - 荧光分析法即光化学反应与荧光分析技术的结合为例, 它是由光化学反应和光反应产物发光两个过程组成的。这两个过程均以光的吸收为起点。前一个过程可表示为:

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库