

流动注射-鲁米诺- Ag(III) 化学发光法 测定金银花中绿原酸^①

张红影 徐向东 石红梅 康维钧 李珊 李占华^{②a}

(河北医科大学公共卫生学院 石家庄市中山东路 361 号 050017)

a(邢台高等医学专科学校药理学教研室 河北省邢台市钢铁北路 618 号 054000)

摘要 碱性介质中绿原酸对鲁米诺- Ag(III) 化学发光体系有显著增敏作用,在一定范围内,绿原酸的浓度与化学发光强度成正比。据此,结合流动注射技术,建立了绿原酸化学发光测定的新方法,并研究了影响化学发光强度的因素。在最优条件下测得方法的检出限为 $0.50\mu\text{g/L}$,线性范围 $1.0\text{—}200.0\mu\text{g/L}$ 。对 $25.0\mu\text{g/L}$ 的绿原酸进行平行测定 11 次,其 RSD 为 2.1%,该法已用于金银花中绿原酸含量的测定。

关键词 流动注射;化学发光;绿原酸; Ag(III) 络合物

中图分类号:O657.39

文献标识码:B

文章编号:1004-8138(2011)01-0401-04

1 引言

绿原酸(Chlorogenic acid),又称三咖啡酰奎尼酸(3-caffeoylquinic acid),被认为是众多药材和中药抗菌解毒、消炎利胆的主要有效成分,通常被作为定性甚至定量的指标。目前测定绿原酸的方法有分光光度法^[1]、高效液相色谱法^[2]和毛细管电泳法^[3,4]等。

化学发光分析法由于其灵敏度高、线性范围宽、仪器设备简单,越来越受到人们的青睐。化学发光法测定绿原酸的文献也曾有报道,采用的是鲁米诺-铁氰化钾发光体系^[5]和鲁米诺- KIO_4 体系^[6],但鲁米诺- Ag(III) 化学发光体系用于绿原酸的测定未见报道。康维钧等研究发现,在碱性条件下, Ag(III) 可以氧化鲁米诺产生稳定的化学发光信号,由此建立了鲁米诺- Ag(III) 化学发光新体系,已成功用于皮质醇、肾上腺素和多巴胺的测定^[7,8],并指出该发光体系良好的应用前景。实验发现,在碱性介质中,绿原酸能显著增强鲁米诺- Ag(III) 体系的化学发光作用,且发光强度与绿原酸的浓度在一定范围内呈良好的线性关系。据此,结合流动注射技术,建立了流动注射-化学发光测定绿原酸的新方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

IFFM-E 型流动注射化学发光分析仪(西安瑞迈分析仪器有限公司);TU1901 型紫外可见分光光度计(北京普析仪器公司);1810-BC 型石英自动双重纯水蒸馏器(江苏省金坛市白塔石英玻璃厂)。实验用水为双重蒸馏水。

绿原酸标准储备液(0.10g/L):称取 0.0100g 绿原酸(中国药品生物制品检定所),用水定容至

① 河北省自然科学基金资助项目(No. c2010000480)

② 联系人,手机: (0) 13930120563; E-mail: lizhanhua98@126.com

作者简介:张红影(1983—),女,河北省枣强县人,硕士,主要从事卫生检验与卫生毒理学研究。

收稿日期:2010-09-09;接受日期:2010-10-18

100mL; Luminol 储备液($2 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$): 称取 0.886g 鲁米诺(Sigma), 加 1.0mol/L 的 NaOH 溶液 7mL 溶解后, 转移至容量瓶, 用水定容至 250mL; Ag(III) 储备液($3.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$), 按文献报导方法制备^[9]。Ag(III) 配离子储备液用其配合物的结晶当天配制使用, 浓度依据配合物在 362nm 处的摩尔吸光系数测定($\epsilon = 1.26 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)。 $[\text{Ag}(\text{HIO}_6)_2]^{5-}$ 配合物结构见图 1。所有储备液均储存于 4℃ 冰箱, 工作液在使用前由储备液逐级稀释制得。实验用水为双重蒸馏水。

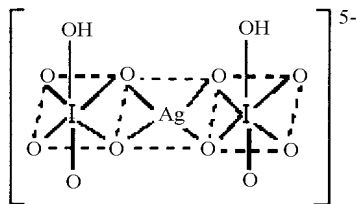


图 1 Ag(III) 配合物结构示意图

2.2 实验方法

实验流路如图 2 所示, Ag(III) 溶液先与鲁米诺溶液经过三通管混合均匀并充分反应, 待基线稳定后, 通过进样阀将绿原酸溶液注入到 Ag(III) 与鲁米诺的混合液流中发生化学发光反应, 记录化学发光信号, 以峰高定量。

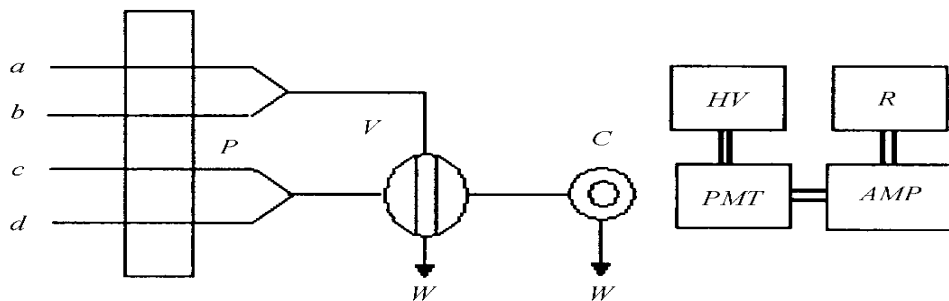


图 2 流动注射化学发光流路示意图

P——蠕动泵; V——注射阀; C——流通池; PMT——光电倍增管; AMP——放大器; HV——高压;
R——记录装置; W——废液; a——鲁米诺; b——Ag(III) 溶液; c——水; d——绿原酸溶液。

3 结果与讨论

3.1 流路参数的选择

在其它确定的情况下, 分别考察了光电倍增管的负高压、混合管长度和试剂流速对信噪比的影响。结果表明, 在光电倍增管的负高压为 -800V、混合管长度为 12cm 和试剂流速在 2.0mL/min 时信噪比最佳。

3.2 化学发光条件的选择

3.2.1 Ag(III) 碱度的选择

在本实验中, 鲁米诺-Ag(III) 体系的相关化学发光反应均是在碱性条件下进行的(溶于 KOH 溶液)。考察了 0.01—0.60mol/L 浓度范围内的 Ag(III) 碱度对光强的影响。实验发现, 随着 Ag(III) 碱度的增大, 其信号先增强后减弱, 但浓度噪声较大, 根据信噪比作图 3, 确定 Ag(III) 碱度的最佳浓度为 0.30mol/L。

3.2.2 鲁米诺碱度的选择

考察了 $0.001\text{--}0.05\text{mol/L}$ 浓度范围内的鲁米诺碱度对光强的影响。实验发现, 随着鲁米诺碱度的增大, 其信号先增强后减弱, 但噪声也随之增大, 根据最佳信噪比, 确定鲁米诺碱度的最佳浓度为 0.003mol/L 。

3.2.3 鲁米诺浓度的选择

考察了 $5.0\times 10^{-8}\text{--}1.0\times 10^{-6}\text{mol/L}$ 浓度范围内的鲁米诺对光强的影响。实验发现, 随着鲁米诺浓度的增大信号增强, 但噪声也随之增大, 在 $2.0\times 10^{-7}\text{mol/L}$ 浓度处有最佳信噪比。

3.2.4 Ag(III) 浓度的选择

考察了 $5.0\times 10^{-6}\text{--}6.0\times 10^{-5}\text{mol/L}$ 浓度范围内的 Ag(III) 对光强的影响。实验发现, 随着 Ag(III) 浓度的增大信号先增强后减弱, 但噪声也随之增大, 根据信噪比作图 4, 确定 Ag(III) 的最佳浓度为 $3.0\times 10^{-5}\text{mol/L}$ 。

3.3 线性范围、检出限和精密度

在上述选定的最佳实验条件下, 在 $1.0\text{--}200.0\mu\text{g/L}$ 的浓度范围内, 体系的化学发光强度与绿原酸的浓度呈良好的线性关系, 回归方程为 $y = 190.72 + 20614.64x$ 。检出限为 $0.50\mu\text{g/L}$, 低于文献[5]和[6]的报道。为考察方法的可靠性, 在最优条件下对 $25.0\mu\text{g/L}$ 的绿原酸连续进行平行测定 11 次, 相对标准偏差 RSD 为 2.1%。

3.4 干扰实验

在最佳的实验条件下, 试验了样品中可能有的共存物对绿原酸测定的影响。结果表明对于 $25.0\mu\text{g/L}$ 的绿原酸, 以引起的测定偏差小于 5% 为标准, 1000 倍的 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cl^- 、 NO_3^- 、淀粉, 500 倍的葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖对测定无干扰。

3.5 样品测定

金银花是忍冬科植物忍冬的干燥花蕾, 是临床常用的中药材之一, 绿原酸是金银花的主要药用成分。将干燥的金银花粉碎后过孔径 0.9mm 筛, 用烘箱 30°C 烘至恒重, 可得到药物提取的粉末样品。

准确称取干燥的金银花粉末样品 2.0000g , 置于 100mL 锥形瓶中, 加入 40mL 70% 乙醇, 锥形瓶口封闭后, 将锥形瓶置于超声波清洗器中, 超声提取 30min 后, 离心倾出上层清液, 再向装有残渣的锥形瓶中加入 40mL 70% 乙醇, 封闭锥形瓶口, 二次超声提取 30min , 离心倾出上层清液, 再向装有残渣的锥形瓶中加入 40mL 70% 乙醇, 第三次超声提取 30min , 离心倾出上层清液。将三次提取液合并, 取 5mL 减压浓缩挥干溶剂后, 用水稀释到 100mL 即得样品溶液。测得样品溶液中的绿原酸含量为 $126.6\mu\text{g/L}$ 。分别加入低中高浓度的绿原酸标准溶液, 测得回收率为 96.0%—98.3%。

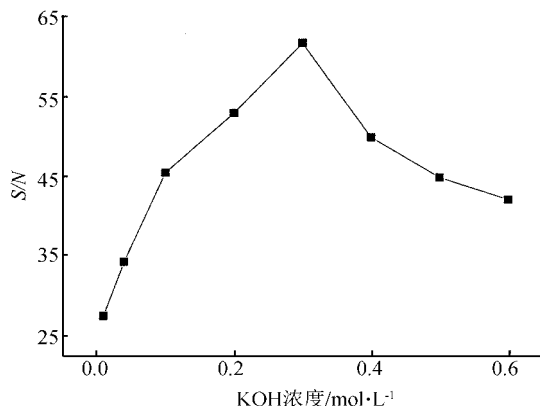


图 3 Ag(III) 溶液碱度对发光信号的影响

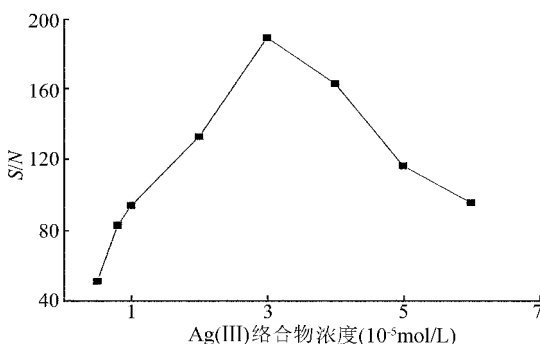


图 4 Ag(III) 络合物浓度对发光信号的影响

表 1 样品回收率

绿原酸样品溶液含量 ($\mu\text{g/L}$)	加入量 ($\mu\text{g/L}$)	测得含量 ($\mu\text{g/L}$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
126.6	20	145.8	96.0	96.8
	40	165.0	96.0	
	70	195.4	98.3	

4 结论

建立了测定绿原酸的高灵敏流动注射化学发光分析法,该方法简单、灵敏、快速,且线性范围宽,检出限低,被成功用于金银花中绿原酸的含量测定。

参考文献

[1] 袁华,邓良,孙炎彬等.可见分光光度法测定杜仲叶中的绿原酸[J].生物加工过程,2007,5(1):71—73.
[2] 黄铭铸,许波.HPLC 测定感冒咳嗽冲剂中的绿原酸[J].华西药学杂志,2008,23(4):484—485.
[3] 吕元琦,邹春华,袁倬斌.毛细管电泳法测定复方鱼腥草片中的绿原酸和槲皮素[J].分析测试学报,2004,23(6):106—108.
[4] 杨新,韩凤梅,程智勇等.银黄冲剂中黄芩甙和绿原酸的毛细管电泳分离分析[J].色谱,1999,17(6):573—575.
[5] 贺彩霞,陆明刚,崔华等.化学发光分析法测定绿原酸[J].发光学报,1997,18(1):65—70.
[6] 邱小香.流动注射化学发光法测定痕量绿原酸[J].曲阜师范大学学报,2010,36(2):105—108.
[7] Shi H M, Xu X D, Kang W J *et al.* Determination of Cortisol in Human Blood Serums by a New Ag(III) Complex-Luminol Chemiluminescent System[J]. *Anal. Biochem.*, 2009, 387(2): 178—183.
[8] Bai J B, Tian D H, Kang W J *et al.* Determination of Epinephrine by Flow Injection Analysis Coupled Ag(III) Complex-Luminol Chemiluminescence Detection[J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2009, 27: 745—750.
[9] Blikungeri A, Pelletier M, Monnier D. Contribution to the Study of the Complexes Bis(Dihydrogen Tellurato) Cuprate(III) and Argentate(III), Bis(Hydrogen Periodato) Cuprate(III) and Argentate(III) [J]. *Inorg. Chim. Acta.*, 1977, 22(7): 7—14.

Determination of Chlorogenic Acid in Honeysuckle
by Luminol–Ag(III) Chemiluminescence Method with Flow Injection

ZHANG Hong-Ying XU Xiang-Dong SHI Hong-Mei KANG Wei-Jun LI Shan LI Zhan-Hua^a
(School of Public Health, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, P. R. China)
^a(Department of Pharmacology, Xingtai Medical College, Xingtai, H ebei 054000, P. R. China)

Abstract The chlorogenic acid had remarkable sensitization effect on luminal-Ag (III) chemiluminescence(CL) system, and content of chlorogenic acid was proportional to CL intensities with limits. A novel method for determination of chlorogenic acid was established by chemiluminescence method with flow injection analysis, and the effects of factors of chemiluminescence intensities were investigated. Under optimum conditions, the detection limit was 0.50 $\mu\text{g/mL}$, and linear range was 1.0—200.0 $\mu\text{g/mL}$, with relative standard deviation($n=11$) of 2.1% for chlorogenic acid content of 25.0 $\mu\text{g/L}$. This method was applied for the determination of chlorogenic acid in honey suckle.

Key words Flow Injection; Chemiluminescence; Chlorogenic Acid; Luminol-Ag(III) Complex
© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.c>