

Luminol-Cu(II) 体系流动注射化学发光法 测定乙酰半胱氨酸

李红^① 杨育民

(渭南职业技术学院 陕西省渭南市杜化路4号 714000)

摘要 发现了 Luminol-Cu(II)-乙酰半胱氨酸化学发光体系, 探讨了影响化学发光反应的各个因素, 建立了测定乙酰半胱氨酸的流动注射化学发光新方法。该方法的线性范围为 $7.0 \times 10^{-10} - 1.0 \times 10^{-7}$ g/mL, 检出限为 2.0×10^{-11} g/mL, 相对标准偏差为 1.0% (1.0×10^{-8} g/mL, $n=11$)。该方法已用于药物制剂中乙酰半胱氨酸含量的测定。

关键词 化学发光; 流动注射; 乙酰半胱氨酸

中图分类号: O657.39

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2010)05-1968-03

1 引言

乙酰半胱氨酸是生物体内和药物中重要的巯基化合物^[1]。目前文献报道的测定乙酰半胱氨酸的方法有分光光度法^[2,3]、荧光法^[4]、电化学方法^[5]、高效液相色谱法^[6]和化学发光法^[7]。本文发现, 在 Cu(II) 存在条件下, 乙酰半胱氨酸与鲁米诺(Luminol) 在碱性介质中反应可检测到强的化学发光。结合流动注射技术, 对影响化学发光反应的各种因素进行考察, 建立了测定乙酰半胱氨酸的流动注射化学发光新方法。由于本方法无需外加氧化剂, 方法的背景信号很低, 检测灵敏度高。该方法已用于药物制剂中乙酰半胱氨酸含量的测定, 结果与药典方法^[8]的测定值无显著性差异。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

IFFS-D 型流动注射化学发光仪(西安瑞迈电子科技有限公司); IFFS-A 型多功能化学发光检测器(西安瑞迈电子科技有限公司)。

配制乙酰半胱氨酸(西安舟鼎国生物技术有限责任公司)标准溶液(5.0×10^{-3} g/mL)。该溶液冰箱中保存, 使用时用水逐级稀释至所需浓度。Luminol 溶液(5.0×10^{-4} g/mL)参照文献[9]配制。配制 Cu(II) 溶液(2.0×10^{-5} mol/L)。本实验所有试剂除 Luminol 外均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

2.2 实验方法

流路如文献[9]所示, 如图1, a、b 和 c 三个管道分别连接 Luminol 溶液、Cu(II) 溶液和乙酰半胱氨酸标准液(样品溶液)。待基线稳定后, 通过进样阀将 50 μ L Luminol 溶液注入到 Cu(II) 溶液和乙酰半胱氨酸溶液的合并流中, 引发化学发光反应, 记录化学发光信号。以相对峰高 ($\Delta I = I_s - I_b$) 对乙酰半胱氨酸定量, 式中: I_s ——样品的化学发光信号; I_b ——空白信号。

① 联系人, 手机: (0) 13186210983; E-mail: lhyxq@163.com

作者简介: 李红(1977—), 女, 陕西省蒲城县人, 讲师, 硕士, 主要从事化学发光分析方面的研究工作。

收稿日期: 2010-05-04; 接受日期: 2010-05-26

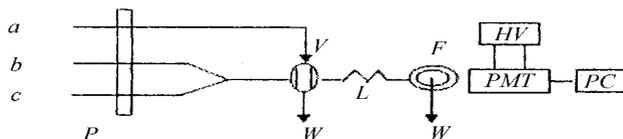


图 1 流动注射化学发光流程图

a——鲁米诺溶液;*b*——Cu(II) 溶液;*c*——乙酰半胱氨酸溶液;
P——蠕动泵;*V*——进样阀;*F*——流通池;*HV*——高压;*PMT*——
 光电倍增管;*PC*——计算机;*L*——混合管;*W*——废液。

3 结果与讨论

3.1 化学发光反应的动力学性质

系统研究了 Luminol-Cu(II)-乙酰半胱氨酸的化学发光反应动力学性质,如图 2 所示。当将 1.0mL 5.0×10^{-4} mol/L Luminol 溶液注入到 1.0mL 1.0×10^{-6} g/mL 乙酰半胱氨酸溶液,产生一个弱的化学发光信号(峰*a*)。在Cu(II)存在下,这一化学发光信号被显著增强(峰*b*)。从试剂混合到出现最大化学发光信号仅需 3s。可见,该化学发光反应为一快反应。

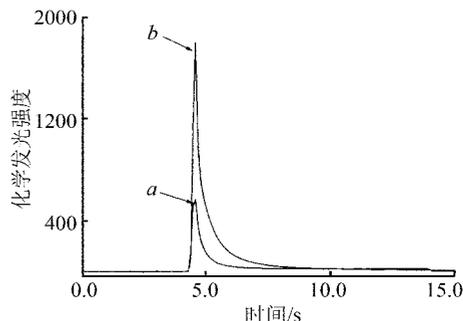


图 2 化学发光动力学曲线

a——将 1.0mL 5.0×10^{-4} mol/L Luminol 溶液注入到 1.0mL 1.0×10^{-6} g/mL 乙酰半胱氨酸溶液;
b——将 1.0mL 5.0×10^{-4} mol/L Luminol 溶液注入到 1.0mL 5.0×10^{-3} mol/L Cu(II) 和 1.0×10^{-6} g/mL 乙酰半胱氨酸混合溶液。

3.2 实验条件的选择

实验了 Cu(II)、Cr(III)、Co(II)、Ni(II)、Zn(II)、Mg(II)、Mn(II) 和 Cd(II) 等金属离子对 Luminol-乙酰半胱氨酸化学发光反应的影响。结果表明, Cu(II)、Co(II)、Cr(III) 均具有增强作用,但 Cu(II) 的增强作用最大。进一步考察了 Cu(II) 浓度在 1.0×10^{-5} — 6.0×10^{-5} mol/L 范围内对化学发光反应的影响。相对化学发光强度随着 Cu(II) 浓度的增大而增大,当 Cu(II) 浓度增大到 2.0×10^{-5} mol/L 时,相对化学发光强度达到最大值。因此本实验选择 Cu(II) 浓度为 2.0×10^{-5} mol/L。

考察了 Luminol 浓度在 5.0×10^{-5} — 1.0×10^{-3} mol/L 范围内与相对化学发光强度的关系。实验表明,相对化学发光强度随着 Luminol 浓度的增大而增大。当 Luminol 浓度为 5.0×10^{-4} mol/L 时,反应有较高的相对化学发光强度。因此本实验选择 Luminol 浓度为 5.0×10^{-4} mol/L。

本实验采用 0.1mol/L NaHCO_3 - NaCO_3 缓冲溶液为反应介质。考察了 Luminol 溶液的 pH 值在 10.5—13.0 范围内对 Luminol-乙酰半胱氨酸化学发光反应的影响。相对化学发光强度随 Luminol 溶液的 pH 值增大而增大,当 Luminol 溶液的 pH 值为 12.5 时,相对化学发光强度有最大值。故本文选择 Luminol 溶液的 pH 值为 12.5。

阀池距过短或过长都会影响混合溶液进入检测器的时间。为了检测到最大的化学发光强度,固定试剂流速为 0.83mL/min,在 10—40cm 范围内,考察了阀池距对乙酰半胱氨酸相对化学发光强度的影响。结果表明,阀池距为 15cm 时,反应具有最大的相对化学发光强度。

3.3 校准曲线、精密度和检出限

在最佳实验条件下,乙酰半胱氨酸浓度在 7.0×10^{-9} — 1.0×10^{-7} g/mL 范围内与相对发光强度呈良好的线性关系。校准曲线方程为 $\Delta I = 6.73C(10^{-8} \text{ g/mL}) + 1.24$ ($r = 0.9981$)。对浓度为 1.0×10^{-8} g/mL 乙酰半胱氨酸溶液进行 11 次平行测定的相对标准偏差为 1.0%。按照 IUPAC 建议,计算得该方法的检出限为 2×10^{-10} g/mL。

3.4 干扰试验

对 1.0×10^{-8} g/mL 乙酰半胱氨酸溶液进行了干扰试验。在保持测量相对误差在 $\pm 5\%$ 范围内, 1000 倍的乳糖、葡萄糖、蔗糖、糊精、淀粉、糖精钠、尿素、 Sr^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 NH_4^{+} 、 SO_4^{2-} 、 NO_3^{-} 、 Cl^{-} 、 Br^{-} ; 100 倍的精氨酸、酪氨酸、赖氨酸、组氨酸、果糖、亚硫酸钠、 Mg^{2+} ; 50 倍的色氨酸、异白氨酸、白氨酸、亮氨酸、苯丙酸钠、山梨醇、 Zn^{2+} ; 10 倍的异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、氨基丙氨酸、苯甲酸钠、丝氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、苏氨酸、柠檬酸、 CO_3^{2-} 、 Cd^{2+} ; 5 倍的核黄素、苯甲酸; 1 倍的胱氨酸、 Pb^{2+} 对测定不干扰。

3.5 样品分析

该方法被用于乙酰半胱氨酸颗粒和泡腾片中乙酰半胱氨酸的含量测定, 并与药典方法^[8]进行对照, 结果见表 1。经 t 检验, 在 95% 的置信水平上两种方法的测定结果无显著性差异。

表 1 样品中乙酰半胱氨酸含量的分析结果

样品	标示量	本方法	RSD($n=3$)	药典方法
颗粒(08A05/01)	0.1g/包	0.104g/包	1.2%	0.103g/包
泡腾片(080103)	0.6g/片	0.620g/片	1.6%	0.612g/片

4 结论

在 $\text{Cu}(\text{II})$ 存在条件下, 无需外加氧化剂, 乙酰半胱氨酸与 Luminol 反应可检测到强的化学发光信号。详细研究了影响化学发光的各种因素, 建立了乙酰半胱氨酸的流动注射化学发光新方法, 并将其应用于实际样品的分析。

参考文献

- [1] 王正刚. 含硫氨基酸衍生物的研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2001, 23(1): 38—41.
- [2] Garcia - Molina F, Penalver M J, Rodriguez-Lopez J N *et al.* Enzymatic Method with Poly-Phenol Oxidase for the Determination of Cysteine and N-Acetylcysteine[J]. *J. Agricul. Food Chem.*, 2005, 53(16): 6183—6189.
- [3] Suarez W T, Vieira H J, Fatibello-Filho. Generation and Destruction of Unstable Reagent in Flow Injection System: Determination of Acetylcysteine in Pharmaceutical for Mutations Using Bromine as Reagent[J]. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005, 37(4): 771—775.
- [4] Elham A T, Nagiba Y H, Fahima A A *et al.* Fluorimetric Determination of some Sulfur Containing Compounds through Complex Formation with Terbium(Tb^{3+}) and Uranium (U^{3+})[J]. *J. Fluoresc.* 2007, 17(3): 293—300.
- [5] 任超超, 高作宁. N-乙酰-L-半胱氨酸在多壁碳纳米管修饰玻碳电极上的电催化氧化及电分析方法[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(7): 1183—1186.
- [6] Celma C, Allue J A, Prunonosa J *et al.* Determination of N-Acetylcysteine in Human Plasma by Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry[J]. *J. Chromatogr. A.*, 2000, 870(1—2): 13—22.
- [7] 刘红萍. 流动注射化学发光法测定 N-乙酰半胱氨酸的研究[J]. 化学研究与应用, 2007, 19(4): 454—456.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 4.
- [9] Li H, Du J X. Sensitive Chemiluminescence Determination of Three Thiol Compounds Based on $\text{Cu}(\text{II})$ -Catalyzing Luminol Reaction in the Absence of an Oxidant[J]. *J. Anal. Lett.*, 2009, 42(13): 2131—2140.

Determination of Acetylcysteine in Luminol-Cu(II) System by Flow Injection Chemiluminescence

LI Hong YANG Yu-Min

(Weinan Vocational and Technical College, Weinan, Shaanxi 714000, P. R. China)

Abstract A new chemiluminescence system, Luminol-Cu(II)-acetylcysteine was investigated. The experimental conditions that affected the chemiluminescence reaction were carefully optimized. Under the selected conditions, the concentration of acetylcysteine was linear related to the chemiluminescence intensity in the range of 7.0×10^{-10} — 1.0×10^{-7} g/mL. The detection limit was 2.0×10^{-11} g/mL. The relative standard deviation was 1.0% for the 11 replicate determinations of 1.0×10^{-8} g/mL acetylcysteine solution. The method was applied to the determination of acetylcysteine in pharmaceutical preparations.

Key words Chemiluminescence; Flow Injection; Acetylcysteine All rights reserved. <http://www.c>