

电化学氧化-荧光分析法测定肾上腺素^①

李莹 杜虹 赵常志^②

(生态化工教育部重点实验室 青岛科技大学化学与分子工程学院 山东省青岛市郑州路 53 号 266042)

摘 要 通过电化学氧化肾上腺素,使其生成羟基吡啶类荧光物质($\lambda_{em} = 490\text{nm}$),实现了药物中肾上腺素含量的电化学氧化-荧光检测。研究结果表明,荧光强度与肾上腺素浓度分别在 $2.00 \times 10^{-7} - 1.00 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 和 $1.00 \times 10^{-6} - 4.00 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ 范围内呈良好的线性关系,检出限为 $6.70 \times 10^{-8} \text{mol/L}$ 。该方法用于药物制剂中肾上腺素含量的测定,相对标准偏差小于 1.88% ($n = 7$),加标回收率为 88.4%—116.6%。

关键词 电化学氧化-荧光分析法;肾上腺素

中图分类号:O657.32;O657.1

文献标识码:A

文章编号:1004-8138(2010)04-1498-05

1 引言

肾上腺素(Epinephrine, Ep),化学名称为(R)-4-[2-甲氨基-1-羟基乙基]-1,2-苯二酚,它与多巴胺、去甲肾上腺素、异丙肾上腺素等一系列酪氨酸的衍生物同属于儿茶酚胺类物质,是主要存在于交感神经细胞、中枢神经系统和肾上腺髓质中的一类重要的神经递质^[1]。作为应用于人体的药物,Ep 可以用来治疗神经失常、急性过敏、哮喘、支气管哮喘、心脏缓搏、青光眼,也可以用作止血剂。过量使用可能会改变毛细血管通透性,引致急性肺水肿^[2]。由于 Ep 的重要性和广泛应用,准确检测药物制剂中 Ep 的含量非常重要。已报道的测定 Ep 的方法较多。传统的方法包括分光光度法^[3]和高效液相色谱法^[4]。一般来说,由于样品前处理复杂和检测仪器灵敏度的限制,传统方法对 Ep 的检测往往难以满足临床诊断和基础研究的需要^[5]。近年来,报道了许多以电化学法为基础的检测技术,包括毛细管电泳法^[6],高效液相色谱电化学检测法^[7],化学修饰电极法^[8,9]等。但电化学法灵敏度欠佳,选择性不好,与毛细管电泳或液相色谱的联用技术仪器成本较高且操作复杂。荧光分析法操作简便,应用广泛,它主要可以分为 2 种类型,一是由不同的氧化剂氧化后,生成三羟基吡啶类的荧光物质^[10],该方法选择性较好,但产物的荧光稳定性较差,氧化剂的氧化能力也不易控制;另一种是加入乙二胺二盐酸,使之与待测物缩合,生成对二氮萘类的荧光物质^[11],这一方法灵敏度较高,稳定性好,但缺点在于儿茶酚类化合物几乎都能发生这类缩合,选择性不好。另外,导数-同步荧光法^[12]和双波长标准加入荧光法^[13]只是数据处理上的改进,与一般荧光法没有本质上的区别。本文将电化学法和荧光光度法相结合,用易于控制的电化学氧化代替化学氧化剂的氧化作用,并在电解后加入乙二胺四乙酸(EDTA)稳定荧光,较好的解决了制约传统荧光法中氧化反应不易控制和产物荧光不稳定的问题。对 Ep 实际药品的测定结果表明,本方法是一种灵敏度高、选择

① 应用化学国家重点实验室基金项目(KF0508)

② 联系人,电话:(0532)84022729;E-mail:zhaocz@qust.edu.cn

作者简介:李莹(1984—),女,山东省淄博市人,硕士研究生,主要从事药物分析研究工作。

收稿日期:2009-10-13;接受日期:2009-11-16

性较好的绿色分析方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

F-4500 荧光光度计(日本 Hitachi 公司);CHI832B 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司);直流稳压电源(美国 Atten 公司);圆柱形避光电解池;电化学氧化采用两电极系统:工作电极为铂片电极(面积为 $16 \times 8 \text{ mm}$),铂电极为辅助电极;循环伏安实验采用三电极系统:工作电极为铂电极, Ag/AgCl 电极为参比电极,铂电极为辅助电极。

Ep (美国 Sigma 公司)标准溶液($1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$):准确称取 0.0184 g Ep 标准品于小烧杯中,用适量 0.1 mol/L HAc 溶解,然后用水定容至 100 mL 棕色容量瓶中,于冰箱中冷藏保存,稀浓度的 Ep 标准溶液用电解液逐级稀释;电解液由 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)和 0.05 mol/L NaCl 支持电解质组成;EDTA 二钠盐(烟台三和化学试剂有限公司),先初配成 0.01 mol/L 的溶液,再标定至准确浓度;其他试剂均为分析纯。实验用水为二次去离子水。

2.2 实验方法

将工作电极于 4 mol/L HNO_3 溶液中浸泡,然后在二次蒸馏水中超声清洗,干燥备用。将 Ep 标准或样品溶液注入电解池中,加入 5 mL 电解液,将工作电极和辅助电极固定于电解池中,连接好稳压电源,控制电压在 0.45 V ,通电反应 5 min 。电解结束后,立即加入一定量的 Na_2CO_3 和 EDTA 溶液,充分混匀后进行荧光测定,以荧光强度定量 Ep 。

3 结果与讨论

3.1 物质的荧光光谱性质

未经过氧化的 Ep 几乎没有荧光发射,经电化学氧化后的产物在碱性条件下生成三羟基吲哚类物质,它能够发射出特征荧光峰。如图 1 所示,其激发波长位于 328 nm ,发射波长位于 490 nm ,与文献[14]基本相同。

3.2 氧化电位的选择

电化学氧化时,对溶液施加的氧化电位大小直接影响到氧化的反应程度,为了寻找合适的氧化电位,首先进行了 Ep 的循环伏安扫描。图 2 是浓度为 $5.00 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的 Ep 在 pH 9.0 的 PBS 缓冲溶液中的循环伏安曲线。从图中可以看到, Ep 的氧化峰位于 0.200 V 左右,考虑到过电位等因素的影响,体系研究了当施加电压在 $0.350\text{—}0.600 \text{ V}$ 间变化时氧化后产物的荧光强度。当电压在 0.45 V 时,相同时间内电化学氧化能获得最大的荧光。因此,本文选择 0.45 V 作为体系的最佳氧化电解电压。

3.3 电解时间的选择

电致荧光分析法定量的灵敏度是建立在 Ep 的电化学氧化的基础上,电解时间即样品氧化反应时间是一个非常重要的参数。在工作电极面积一定的情况下,较长的电解时间可以使氧化反应进行的较完全并获得最大的灵敏度。但电解时间过长会降低分析速度,甚至会导致过度氧化而使荧光强度降低。本文研究了电解时间在 $2\text{—}20 \text{ min}$ 范围内对 Ep 测定的影响,其结果显示,电解反应 5 min

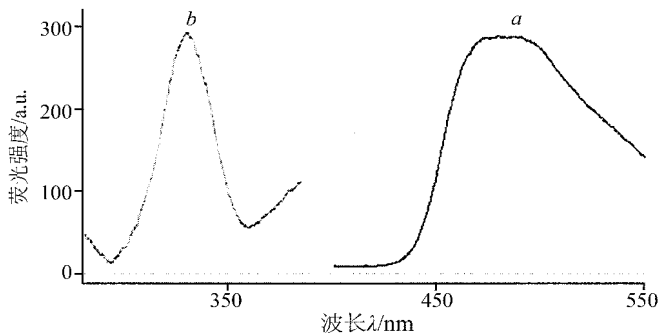


图1 肾上腺素电解产物的荧光(a)和激发光谱(b)

$[\text{Ep}] = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$

后荧光强度即达到最高点,之后随时间增长,产物荧光峰的强度开始逐渐下降,这可能是因为过长的电解时间,导致了其他没有荧光活性的氧化产物生成,从而导致荧光猝灭,荧光强度减弱。因而,选择电解时间为 5min。

3.4 电解液 pH 值的确定

文献报道磷酸盐缓冲溶液是 E_p 发生氧化反应的良好介质^[15]。同时实验发现,当 E_p 浓度为 $1.00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$,在 BR 和 $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ 缓冲溶液中按同样条件进行试验,电解后的溶液没有观察到荧光,说明在此环境中 E_p 不能被氧化,或是产物没有荧光活性。本文研究了在不同 pH 值的 PBS 中, E_p 的电化学氧化情况,实验结果表明,在中性和弱碱性的 PBS 中电化学氧化反应可以顺利进行,生成具有荧光活性的物质,这与文献[15]的结论相同。但为了避免在碱性介质中 E_p 的自然氧化,本文选择 $\text{pH} = 7.4$ 的 PBS 作为电解的反应介质。

3.5 Na_2CO_3 浓度的影响

E_p 氧化后的产物只能发出微弱的荧光,它需要在碱的作用下,才能转变成具有较强荧光的三羟基吲哚类物质^[5]。经试验发现,在氧化后的溶液中再加入适量的碱,溶液的荧光强度有显著增强。不同种类的碱对荧光的增强效果不同,本文研究了加入 Na_2CO_3 、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 和 Na_2HPO_4 3 种碱性化合物时对电解产物荧光的影响。结果显示在其他相同条件下,加入 Na_2CO_3 并使其在测试液中的浓度为 0.01 mol/L 时,荧光强度最大。

3.6 EDTA 浓度对荧光的影响

经氧化反应得到的荧光物质,在碱性溶液中很不稳定,需要加入合适的荧光稳定剂来稳定荧光,以便检测。在常用的几种荧光稳定剂中,由于 EDTA 成分简单,易于取得,性质稳定,并且不含可能影响荧光测定的元素,所以我们选择 EDTA 作为本体系的荧光稳定剂。试验后发现,在溶液电解后,加入适量 EDTA,能获得更大的荧光强度。在确定荧光稳定剂的浓度时,在 $1.0 \times 10^{-6} \sim 4.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的浓度范围内进行了试验。结果表明,当 EDTA 浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时是最佳浓度。

3.7 分析方法的评价

在以上所确定的最佳实验条件下,对一系列标准 E_p 溶液进行测定,并绘制校准曲线,结果如图 3 所示,荧光强度与肾上腺素浓度分别在 $2.00 \times 10^{-7} \sim 1.00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 和 $1.00 \times 10^{-6} \sim 4.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 范围内呈良好的线性关系。其线性回归方程分别为 $F = 167C + 7 (r^2 = 0.9988)$ 和 $F = 11.856C + 179.5 (r^2 = 0.9956)$ 。其中 F 为荧光强度, C 为 E_p 浓度 (mol/L)。方法的检出限为 $6.70 \times 10^{-8} \text{ mol/L} (S/N = 3)$,对 7 份浓度为 $1.00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 的 E_p 溶液进行重复测定,相对标准偏差(RSD)为 1.36%。

3.8 干扰实验

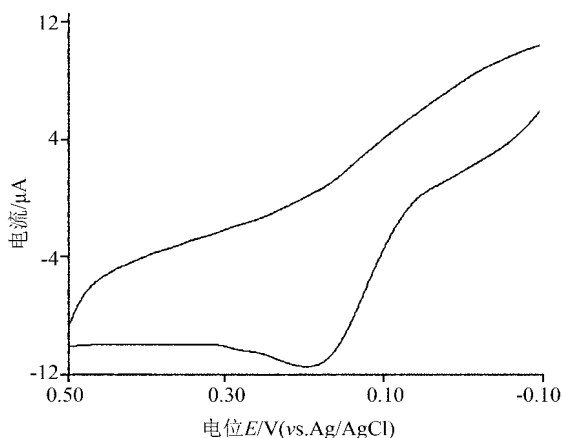


图 2 肾上腺素的循环伏安曲线
[E_p] = $5.00 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$; $\nu = 100 \text{ mV/s}$ 。

相对误差在 5% 以内时, 低于 500 倍 E_p 浓度的 NH_4^+ 、 SO_4^{2-} , 100 倍的葡萄糖不影响 E_p 的测定。强氧化性的 $Cr_2O_7^{2-}$ 、 MnO_4^- 、 H_2O_2 有干扰。一般待测药品中不含有以上物质, 所以不需要掩蔽, 可直接进行测定。本文研究了与 E_p 结构相似的化合物, 如去甲肾上腺素(NE_p)、去氧肾上腺素(IPt)、异丙肾上腺素($NOEp$)、多巴胺(DA) 对测定结果的影响。研究结果表明(图 4), 除去甲肾上腺素外, 同浓度的其他 4 种化合物不影响 E_p 的测定。

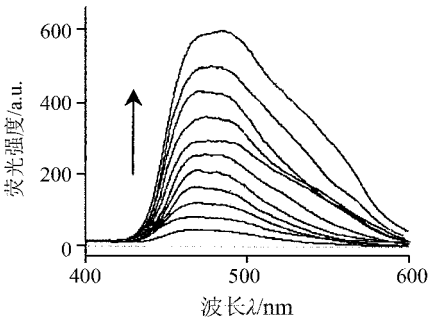


图 3 不同浓度肾上腺素电解产物的荧光光谱
曲线从下到上: $[E_p]/\times 10^{-6}mol/L$: 0. 20, 0. 40, 0. 60, 0. 80, 1. 00, 2. 00, 4. 00, 6. 00, 10. 0, 20. 0, 40. 0; $\lambda_{ex}=328nm$ 。

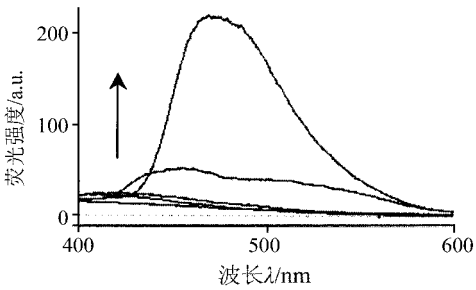


图 4 肾上腺素和干扰物质电解产物的荧光光谱
曲线从下到上: $DA, NEp, IPt, NOEp, Ep. C=1.00\times 10^{-6}mol/L; \lambda_{ex}=328nm$ 。

3. 9 样品的测定

取购自药店的 E_p 注射液, 用纯水稀释至适合浓度, 按实验方法进行含量测定。同时进行加标回收实验, 结果见表 1。可见本方法对实际样品测定的 RSD 小于 1. 88%, 加标回收率在 88. 4%—116. 6% 之间。

表 1 肾上腺素注射液中肾上腺素的测定结果

样品序号	标示量 (mg)	本法结果 (mg, $n=7$)	RSD (%, $n=7$)	加入量 (mg)	测得总量 (mg)	回收率 (%)
1	1.00	0.928	0.77	0.50	1.494	98.8
2	1.00	1.037	1.53	0.50	1.515	95.6
3	1.00	1.006	0.84	0.50	1.448	88.4
4	1.00	0.899	1.01	0.50	1.482	116.6
5	1.00	1.010	1.88	0.50	1.545	107.0

参考文献

[1] Burtis C A, Ashwood E R. *Tietz Testbook of Clinical Chemistry*[M]. Philadelphia: Saunders W. B., 1998. 1570—1572.
[2] Goodman L S, Gilman A. *The Pharmacological Basis of the Rapapeutics, Ninthed*[M]. New York: McGraw-Hill, 1996. 105—112.
[3] Nagaraja P, Vasantha R A, Sunitha K R. A New Sensitive and Selective Spectrophotometric Method for the Determination of Catechol Derivatives and Its Pharmaceutical Preparations[J]. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 2001, **25**(3—4): 417—424.
[4] Oosterhuis B, Brunt K, Westerink B H C *et al.* Electrochemical Detector Flow Cell Based on a Rotating Disk Electrode for Continuous Flow Analysis and High Performance Liquid Chromatography of Catecholamines[J]. *Anal. Chem.*, 1980, **52**(1): 203—205.
[5] 刘诚, 黄俊, 肖海燕. 肾上腺素的检测进展[J]. *传感器与微系统*, 2006, **25**(11): 1—4.
[6] 王立世, 杨晓云, 莫金垣. 毛细管电泳扫描伏安电化学法分离检测肾上腺素, 氯丙嗪和异丙嗪[J]. *色谱*, 1999, **17**(5): 435—437.
[7] Fotopoulou M A, Ioannou P C. Post-Column Terbium Complexation and Sensitized Fluorescence Detection for the Determination of Norepinephrine, Epinephrine and Dopamine Using High-Performance Liquid Chromatography[J]. *J. Anal. Chim. Acta*, 2002, **462**(2): 179—185.

- [8] 王歌云, 王宗花, 肖素芳等. 碳纳米管修饰电极对多巴胺和肾上腺素的电分离及同时测定[J]. 分析化学, 2003, **31**(11): 1281—1285.
- [9] Gong J, Lin X. A Glassy Carbon Supported Bilayer Lipid-Like Membrane of 5, 5-Ditetradecyl-2-(2-Trimethyl-Ammonioethyl)-1, 3-Dioxane Bromide for Electrochemical Sensing of Epinephrine[J]. *Electrochim. Acta*, 2004, **49**(25): 4351—4357.
- [10] 童裳伦, 吕国才, 许志良. 改进的三羟基咪唑法测定肾上腺素[J]. 浙江大学学报(理学版), 2000, **27**(5): 350—353.
- [11] Seki T. Modified Ethylenediamine Condensation Method and Its Application in the Analysis of Catecholamines by Ion-Exchange Chromatography[J]. *J. Chromatography*, 1978, **155**(4): 415—420.
- [12] 吴惠毅, 陈晋, 王卫国等. 导数-同步荧光法同时测定尿液肾上腺素和去甲肾上腺素[J]. 分析化学, 1997, **25**(4): 496.
- [13] 张桂玲, 阚存国. 双波长标准加入荧光法同时测定肾上腺素和去甲肾上腺素[J]. 青岛海洋大学学报, 2000, **30**(1): 131—136.
- [14] Peyrin L, Cottet-Emard J M. Automated Specific Fluorimetric Methods for Epinephrine and Norepinephrine Assay in a Single Biological Extract[J]. *Anal. Biochem.*, 1973, **56**(2): 515—531.
- [15] 宋远志. 用紫外分光光度法及荧光光度法研究肾上腺素在不同 pH 条件下的稳定性[J]. 理化检验(化学分册), 2008, **44**(9): 854—856.

Determination of Epinephrine by Electrooxidized-Fluorescence Analysis

LI Ying DU Hong ZHAO Chang-Zhi

(Key Laboratory of Eco-Chemical Engineering, Ministry of Education, College of Chemistry & Molecular Engineering,
Qingdao University of Science & Technology, Qingdao, Shandong 266042, P. R. China)

Abstract A simple and sensitive electrogenerated fluorescence method has been developed by combining electrolysis and fluoremetry for the determination of epinephrine, and its product has a characteristic fluorescence at 490 nm. Under the optimum conditions, the electrogenerated fluorescent intensity is proportional to the concentration of epinephrine in the range of 2.00×10^{-7} — 1.00×10^{-6} mol/L and 1.00×10^{-6} — 4.00×10^{-5} mol/L, and the detection limit is 6.70×10^{-8} mol/L. The relative standard deviation is less than 1.88% ($n=7$) and the recovery is in the range of 88.4%—116.6% for the determination of epinephrine in pharmaceutical samples.

Key words Electrooxidize-Fluorescence Analysis Method; Epinephrine

这真是令人啼笑皆非——重大发明创造被视为“旧货”！

欢迎作者将被退稿佳作，再投本刊

在 20 世纪的科技成就中，激光可算是重大发明创造之一。第一台激光器是 1960 年由美国物理学家梅曼（见《邮票上的科学家——佼佼者之路》中之 M4）研制出来的。然而《物理评论快报》却拒绝刊登梅曼的论文，理由是：这是微波激射物理学方面的文章，对快速出版物不再有价值。这真是令人啼笑皆非！

接着，梅曼将论文寄到了英国《自然》杂志，这篇 300 字的简短文章立即被接受。发表后引起全世界轰动。后来，梅曼被列入了美国发明家名人堂。

为了吸取历史教训，本刊收到的论文，即使其观点与审稿人有尖锐的意见冲突，只要是言之有理，也给予发表。因为“仁者见之谓之仁，智者见之谓之智”（《周易·系辞上》），不同人从不同角度看问题，难免不同。我们欢迎作者将被退稿佳作，再投本刊。

光谱实验室编辑部