流动注射化学发光法测定山奈酚①

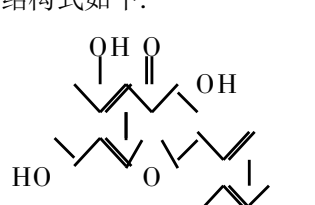
王书民②a,b　樊雪梅b　陈凤英b,c　郑行望a
a(陕西师范大学化学与材料科学学院　西安市长安南路 199 号　710062)
b(商洛学院化学与化学工程系　陕西省商洛市北新街东段 10 号　726000)
c(西北工业大学材料科学与工程学院　西安市友谊西路 127 号　710068)

摘　要　采用流动注射技术,研究了高锰酸钾–山奈酚–过氧化氢体系的化学发光行为,对影响化学发光强度的因素进行了试验,建立了流动注射化学发光法测定山奈酚的新方法。方法检出限为 1×10^{-10} g·mL^{-1},线性范围为 1.0×10^{-7}—1.0×10^{-4} g·mL^{-1}。对 1.0×10^{-6} g·mL^{-1}的山奈酚平行测定 11 次,其 RSD 为 2.1%。该方法用于三叶青中山奈酚含量的测定,结果令人满意。

关键词　化学发光;流动注射;高锰酸钾;双氧水;山奈酚
中图分类号: O657.39　　文献标识码: A　　文章编号: 1004-8138(2011)02-0962-05

1　引言

山奈酚(Kaempferol)别名 3,4′,5,7–四羟基黄酮(3,4′,5,7–Tetrahydroxyflavone),分子式 $C_{15}H_{10}O_6$。它是一种在自然界分布十分广泛的植物次生代谢物,通常可以从茶叶、花椰菜等植物中提取[1]。山奈酚具有抗癌、抗癫痫、抗炎抗菌、抗氧化、抑制衰老、缓解痉挛、抗溃疡、利胆利尿、止咳祛痰、抑制生育等作用[2—5]。山奈酚结构式如下:



目前,测定山奈酚的方法有高效液相色谱法[6]、毛细管电泳法[7]、薄层色谱法[8]、电化学法[9]及化学发光法[10]等,化学发光法由于具有灵敏度高、线性范围宽、仪器简单和操作方便等优点而引起人们的重视。

本实验发现,在酸性介质下,高锰酸钾能够氧化山奈酚产生微弱的化学发光,而过氧化氢可使其发光强度显著增强。据此采用流动注射技术,建立了高锰酸钾–过氧化氢–山奈酚化学发光体系以及测定山奈酚的方法。该法已成功用于三叶青中山奈酚含量的测定。

① 国家自然科学基金资助项目(20575040);商洛学院资助项目(10SKY015)
② 联系人,电话:(0914)2986027;手机:(0)13991420293;E–mail: happywshm@126.com
作者简介:王书民(1965—),男,陕西省富平县人,副教授,硕士,主要从事光谱分析和其他仪器分析方法的研究和应用工作。
收稿日期: 2010-11-12;接受日期: 2010-12-08
© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.c

2　实验部分

2.1　主要仪器和试剂

MPI-B 多参数化学发光分析测试系统 (西安瑞迈分析仪器有限公司); RFL-1B 超微弱单光子计数化学发光检测仪(西安瑞迈分析仪器有限公司); LC-10A 液相色谱仪(日本岛津公司); SPD-10A 紫外检测器(南宁威玛龙色谱工作站), 色谱柱为 Phenomenex C18(250mm×4.60mm, 5μm, 美国菲罗门公司); MAS-II 型微波萃取反应工作站(上海新仪微波化学科技有限公司); Arium 611 UV 超纯水器(北京赛多利斯系统有限公司)。

1.0×10^{-3}g·mL^{-1}山奈酚标准溶液(中国药品生物制品检定所, 纯度 99% 以上, 配制为储备液, 冷藏, 用时用水稀释); 1.0×10^{-2}mol·L^{-1}高锰酸钾溶液(配制好后放置 1 周, 用前用草酸钠标准溶液标定); 0.1036mol·L^{-1}草酸钠标准溶液($Na_2C_2O_4\cdot 2H_2O$, 南京化学试剂有限公司); 1.0×10^{-3}mol·L^{-1}过氧化氢溶液(用前配制); 4.0mol·L^{-1}硫酸、盐酸、硝酸和磷酸。

三叶青产自广西, 经陕西师范大学化学与材料科学学院的张君听教授鉴定, 其属于三叶青的干燥根。

除甲醇为色谱纯外, 所用试剂均为分析纯, 实验用水为超纯水。

2.2　实验方法

按图 1 安装仪器及管路, 将一定体积的山奈酚标准溶液或测试样品溶液与过氧化氢溶液混合后注入到高锰酸钾和硫酸混合溶液的载流中, 进行化学发光测定, 记录发光信号, 以峰高定量。实验表明, 在一定的条件下, 发光强度和山奈酚的浓度呈线性关系。

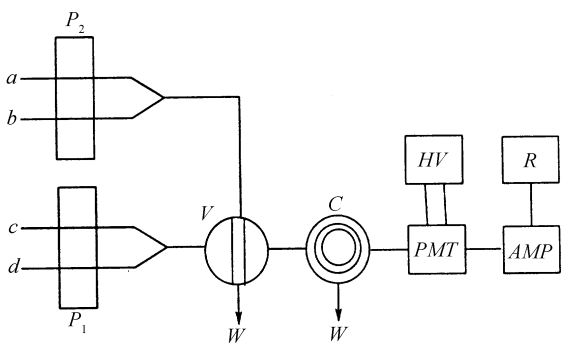


图 1　流动注射化学发光分析流程图

P_1, P_2——蠕动泵; C——流通池; V——进样阀; PMT——光电倍增管; HV——负高压; AMP——放大器; R——记录仪; W——废液; a——山奈酚或样品溶液; b——过氧化氢溶液; c——高锰酸钾溶液; d——硫酸溶液。

3　结果与讨论

3.1　流路参数选择

流通管内径 0.8mm, 采样管长 12cm, 阀池距为 10cm, 负高压 900V, 增益为 2, 当各管道流速均为 3mL·min^{-1}时, 具有最大的信噪比。

3.2　反应条件的选择

3.2.1　因素-水平表

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.c

影响发光反应发光强度的因素除了流路参数外, 还有介质种类、溶液酸度、高锰酸钾浓度、过氧

化氢浓度、山奈酚浓度等, 实验时其取值如表 1 所示。

表 1 因素-水平表

	酸的种类	酸的浓度	高锰酸钾浓度	过氧化氢浓度	山奈酚浓度
	A	*B*(mol·L^{-1})	*C*(mol·L^{-1})	*D*(mol·L^{-1})	*E*(g·mL^{-1})
1	HCl	4	1×10^{-4}	1×10^{-5}	1×10^{-7}
2	HNO_3	3	4×10^{-4}	4×10^{-5}	1×10^{-6}
3	H_2SO_4	2	6×10^{-4}	6×10^{-5}	1×10^{-5}
4	H_3PO_4	1	1×10^{-3}	1×10^{-4}	1×10^{-4}

3.2.2 正交设计试验

按照 5 因素、4 水平设计正交试验方案, 如表 2。按照选定条件分别进行试验, 记录发光强度或峰高, 以发光强度最大的条件作为最佳条件。

表 2 最佳条件的正交试验表 $\boldsymbol{L}_{16}(4^5)$

试验序号	*A*	*B*	*C*	*D*	*E*	*I*(a.u.)	*I*′= *I* − 367(a.u.)
1	1	1	1	1	1	255	− 112
2	1	2	2	2	2	340	− 27
3	1	3	3	3	3	410	43
4	1	4	4	4	4	440	73
5	2	1	2	3	4	380	13
6	2	2	1	4	3	340	− 27
7	2	3	4	1	2	285	− 82
8	2	4	3	2	1	335	− 32
9	3	1	3	4	2	550	183
10	3	2	4	3	1	480	113
11	3	3	1	2	4	320	− 47
12	3	4	2	1	3	350	− 17
13	4	1	4	2	3	410	43
14	4	2	3	1	4	360	− 7
15	4	3	2	4	1	335	− 32
16	4	4	1	3	2	275	− 92
K_1	23	127	− 178	− 218	− 1		
K_2	− 128	52	− 35	− 63	− 18		
K_3	232	− 118	187	77	42		
K_4	− 88	− 68	147	197	32		
k_1	5.6	31.8	− 44.5	− 54.4	− 0.3		
k_2	− 32	13	− 8.8	− 13.8	− 4.5		
k_3	58	− 29.5	46.8	19.3	10.5		
k_4	− 22	− 17	37.8	49.3	8		
R	90	61.3	90.3	103.7	15		

注: 367—所有测定结果的平均值, a.u.。

数据分析可以看出, 高锰酸钾浓度、双氧水的浓度对测试结果影响最为显著, 酸的种类影响比较显著, 酸的浓度影响比较小, 山奈酚浓度对测试结果影响不大。根据结果, 测试条件可选为: 以 4mol·L^{-1} H_2SO_4 溶液为介质, 6.0×10^{-4}mol·L^{-1}高锰酸钾溶液, 1.0×10^{-4}mol·L^{-1}过氧化氢溶液为测试剂, 测定 1×10^{-6}g·mL^{-1}山奈酚溶液。这个条件即使不是最佳试验条件, 也应该是距离最佳条件最近的实验条件。如不作特殊说明, 后边的试验条件均和该条件一致。

3.3 干扰实验

以 1×10^{-6}g·mL^{-1}山奈酚溶液进行干扰实验, 结果表明, 当测试误差(即干扰水平) 在±5% 范围内时, 1000 倍的氯化钠、氯化钾、氯化铵; 100 倍的葡萄糖、麦芽糖、柠檬酸; 20 倍的淀粉、糊精;

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.c

1 倍的碳酸钠、氯化钙、硫酸锌、硫酸铜、硝酸汞不产生干扰; 0.001 倍的苯酚、苯二酚、苯三酚、萘酚等酚类物质对实验有干扰。

3.4　校准曲线、精密度及检出限

在选定条件下, 山奈酚的浓度在 1.0×10^{-7}—1.0×10^{-4} g·mL^{-1}范围内与化学发光强度呈良好的线性关系。为了提高测定的精密度和准确度, 校准曲线按照山奈酚浓度的数量级分段绘制, 校准曲线的基本参数见表 3。

表 3　校准曲线的线性范围及回归方程

山奈酚浓度范围(g·mL^{-1})	线性回归方程	线性相关系数
1.0×10^{-7}—1.0×10^{-6}	$\lg I = 0.43 + 3.13\lg C$	0.9991
1.0×10^{-6}—1.0×10^{-5}	$\lg I = 0.26 + 3.51\lg C$	0.9994
1.0×10^{-5}—1.0×10^{-4}	$\lg I = 0.55 + 3.67\lg C$	0.9989

对 1.0×10^{-6} g·mL^{-1}的山奈酚进行了 11 次平行测定, 其 RSD 为 2.1%, 根据 IUPAC 建议, 计算出本方法的检出限为 1×10^{-10} g·mL^{-1}。

3.5　样品分析

三叶青(Tetrastigmatis hemsleyani) 又名有角乌蔹莓、石老鼠[11]。主要分布于长江以南, 以块根或全草入药, 具有清热解毒、祛风化痰、活血祛风的功效[12]。药理研究证实, 槲皮素和山奈酚等黄酮类化合物是三叶青抗菌、止血、抗氧化的主要有效成分[13,14]。

三叶青中山奈酚成分含量标准测定方法为高效液相色谱法[12](HPLC), 检测波长 370nm; 流速 1.0mL/min。

准确称取 7 份三叶青粉末(每份 1g), 分别置于 100mL 磨口圆底烧瓶中, 加入 5% 盐酸溶液和 70% 乙醇(1∶4) 混合溶液 25mL, 准确称量。用超声波萃取 1h, 放冷后再称量, 用 70% 乙醇补足损失的重量, 过滤, 滤液过 0.45μm 的微孔滤膜, 作为测试液。

利用 HPLC 分别测定上述 7 份三叶青测试液中的山奈酚含量, 结果记录为标准值。

分别在 7 份三叶青测试液中加入山奈酚 0.60×10^{-6} g·mL^{-1}(加入值), 用本方法测量山奈酚含量, 结果记录为测得值, 计算回收率。结果如表 4。

表 4　样品中山奈酚含量测试结果　　(n= 7)

样品编号	标准值 (10^{-6} g·mL^{-1})	加入值 (10^{-6} g·mL^{-1})	测得值 (10^{-6} g·mL^{-1})	回收率 (%)
1	0.60	0.60	1.21	102
2	0.60	0.60	1.17	95
3	0.60	0.60	1.20	100
4	0.60	0.60	1.19	98
5	0.61	0.60	1.24	105
6	0.60	0.60	1.21	102
7	0.60	0.60	1.23	105

方法的加标回收率为 95%—105%, 表明回收结果很好, 方法可行, 可以用于准确测定样品中的微量山奈酚。

4　结论

利用高锰酸钾-过氧化氢-山奈酚化学发光体系测定山奈酚, 检出限低(1×10^{-10} g·mL^{-1}), 线性范围宽(1.0×10^{-7}—1.0×10^{-3} g·mL^{-1}), 误差小(经过 11 次平行测定, RSD 为2.1%), 加标回

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.c

收率为 95%—105%, 方法可行, 可以用于准确测定样品中的微量山奈酚。

参考文献

[1] Olszewska M. Separation of Quercetin, Sexangularetin, Kaempferol and Isorhamnetin for Simultaneous HPLC Determination of Flavonoid Aglycones in Inflorescences. Leaves and Fruits of Three Sorbus Species[J]. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, **48**(3): 629—635.

[2] Niering P, Michels G, Watjen W *et al*. Protective and Detrimental Effects of Kaemperol in Rat H4ⅡE Cell: Implication of Oxidative Stress and Apoptosi[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, **209**(2): 114—122.

[3] Cos P, De Bruyne T. Apers S *et al*. Phytoestrogensl Recent Developments[J]. *Planta Med.*, 2003, **69**(7): 589—599.

[4] 陈育华, 周克元, 袁汉尧. 山奈酚药效的研究进展[J]. 广东医学, 2010, **31**(8): 1064—1066.

[5] 肖骁, 张慧娟, 庞思平. 光谱法研究山奈酚与 ct-DNA 的相互作用[J]. 光谱实验室, 2009, **26**(5): 1011—1014.

[6] 姚莉韵, 王丽平. HPLC 法测定八角莲注射液中山奈酚的含量[J]. 中成药, 1998, **20**(6): 19—20.

[7] Aguilar-Sanchez R, Ahuatl Garcia F, Davila Jimenez M M *et al*. Chromatographic and Electrochemical Determination of Quercetin and Kaempferol in Phytopharmaceuticals[J]. *J. Pharm and Biomed Anal.*, 2005, **38**(2): 239—249.

[8] 李义国, 王晶. 薄层扫描法测定不同产地菟丝子中山奈酚成分[J]. 中外健康文摘, 2009, **6**(27): 225—227.

[9] 吕元琦, 邬春华, 袁倬斌. 毛细管电泳法测定沙棘药物制品心达康片中的山奈酚和槲皮素[J]. 化学试剂, 2004, **26**(6): 342—344.

[10] 李丽. 高锰酸钾-鲁米诺-流动注射化学发光测定山奈酚[J]. 遵义师范学院学报, 2007, **9**(2): 58—60.

[11] 国家中医药管理局. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999, 448—451.

[12] 伍昭龙, 吕江明. 中药三叶青的研究现状[J]. 中国民族民间医药杂志, 2006, **78**(1): 15—18.

[13] 刘东, 杨俊山. 中国特有植物三叶青化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1999, **24**(10): 611—612.

[14] 刘东, 鞠建华, 林耕等. 三叶崖爬藤中的新黄酮碳甙[J]. 植物学报, 2002, **44**(2): 227—229.

Determination of Kaempferol with Flow Injection Chemiluminescence

WANG Shu-Min[a,b] FAN Xue-Mei[b] CHEN Feng-Ying[b,c] ZHENG Xing-Wang[a]

a(School of Chemistry and Materials Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, P. R. China)

b(Department of Chemistry and Chemical Engineering, Shangluo University, Shangluo, Shaanxi 726000, P. R. China)

c(School of Materials Science and Engineering, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710068, P. R. China)

Abstract Chemiluminescence reaction of potassium permanganate-kaempferol-perhydrol system was investigated with flow injection technique. The effect of factors on chemiluminescence intensity was tested, and a new method for determination of trace kaempferol was established with flow injection chemiluminescence. The linear range for kaempferol was between 1.0×10^{-7} g · mL^{-1} and 1.0×10^{-4} g · mL^{-1} with the detection limitation of 1×10^{-10} g · mL^{-1}, and the relative standard deviation was 2.1% for kaempferol concentration of 1.0×10^{-6} g · mL^{-1} for 11 repeated measurements. The method is applied to determine the content of kaempferol in radix tetrastigme with satisfactory results.

Key words Chemiluminescence; Flow Injection; Potassium Permanganate; Perhydrol; Kaempferol

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.c