

鲁米诺-铁氰化钾化学发光体系测定利福平^①

屈颖娟^② 段淑娥 王少英

(西安文理学院化学系 西安市太白南路 168 号 710065)

摘 要 基于鲁米诺在碱性条件下可以被铁氰化钾氧化产生化学发光, 利福平对此化学发光具有增敏作用这一现象, 结合流动注射技术建立了一种直接测定利福平的流动注射化学发光分析新方法。该方法的线性范围为 $5.0 \times 10^{-8} \sim 3.0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 检出限为 $1 \times 10^{-8} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对 $3.0 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的利福平连续进行 11 次平行测定, 其相对标准偏差为 4.5%, 该方法已成功地测定了利福平眼药水中利福平的含量。

关键词 化学发光, 流动注射, 利福平, 鲁米诺-铁氰化钾。

中图分类号: O 657.39

文献标识码: B

文章编号: 1004-8138(2007)05-0978-04

1 引言

利福平(Rifampicin), 其化学名称为 3-[[(4-甲基-1-哌嗪基) 亚氨基] 甲基]-利福霉素, 是利福霉素类半合成广谱抗菌药, 对多种病原微生物均有抗菌活性。外用治疗沙眼及敏感菌引起的眼部感染。利福平对需氧革兰阳性菌具良好抗菌作用, 对军团菌属作用亦良好, 对沙眼衣原体、性病淋巴肉芽肿及鹦鹉热等病原体均具抑制作用^[1]。

目前, 测定利福平分析方法有高效液相色谱法^[2]、分光光度法^[3]、毛细管色谱法^[4], 化学发光分析法^[5-7]。上述方法中, 高效液相色谱法和毛细管色谱法存在操作复杂, 仪器昂贵, 对流动相有较高的要求等缺点, 分光光度法的灵敏度不高。化学发光分析法因其具有设备简单、线性范围宽、灵敏度高, 无背景信号等特点而备受人们的关注。现有测定利福平的化学发光分析方法主要有鲁米诺-过氧化氢化学发光体系测定利福平^[5]、铁氰化钾化学发光体系测定利福平^[6]、铜离子催化过氧化氢氧化利福平产生化学发光从而测定利福平^[7]等, 而鲁米诺- $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 发光体系测定利福平含量的化学发光分析方法目前尚未见报道。

我们经过研究发现, 在碱性介质中利福平对鲁米诺与 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 产生的化学发光信号具有强烈的增敏作用, 据此建立了测定利福平的流动注射化学发光分析新方法, 该方法已成功地用于利福平眼药水中利福平含量的测定。

① 基金项目: 西安文理学院专项科研基金(KY200524)

② 联系人, 手机: (0) 13909245840; E-mail: quyingjuan@163.com

作者简介: 屈颖娟(1979—), 女, 陕西省户县人, 助教, 硕士, 主要从事发光分析方面的研究工作。

收稿日期: 2007-07-27; 接受日期: 2007-08-10

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

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), Synergy 超纯水机(美国 Millipore 公司)。

利福平储备液($5.0 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$): 准确称取利福平标准品(中国药品生物制品检定所) 5mg, 用甲醇使其溶解, 并定容至 100mL 棕色容量瓶中, 摇匀, 避光于 4°C 储存备用, 使用时稀释至所需浓度; 鲁米诺(Sigma 公司) 储备液: $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$, 准确称取鲁米诺 0.1772g 用 0.1mol/L NaOH 溶解后, 定容于 100mL 容量瓶中, 置于棕色试剂瓶中于冷暗处保存; $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 储备液浓度为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 所用试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

2.2 实验方法

如图 1 所示, *a* 中通入 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, *b* 中通入 $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 鲁米诺(含 0.1mol/L NaOH), 将水注入 *c* 中, 先做空白实验, 测定其发光强度(I_0), 待空白稳定将一定浓度的利福平样品溶液注入 *c* 中, 以流动注射发光仪测量体系的化学发光强度(I_s)。化学发光强度增加值用 ΔI 表示($\Delta I = I_s - I_0$), 以 ΔI 进行定量。

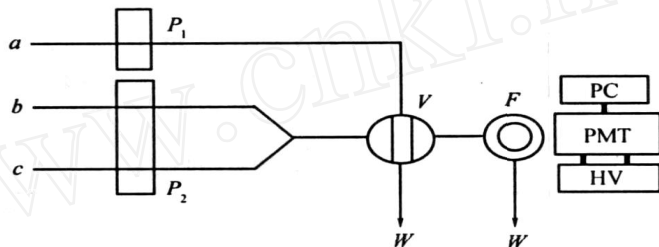


图 1 流动注射化学发光流路示意图

a——铁氰化钾; *b*——鲁米诺; *c*——水或标准品; PC——计算机; P_1, P_2 ——蠕动泵;
V——进样阀; F——流通池; W——废液; PMT——光电倍增管; HV——高压。

3 结果与讨论

3.1 反应介质及其浓度的影响

鲁米诺- $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 体系只有在碱性介质中才能产生化学发光, 分别以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH、 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 、硼砂为反应介质, 考察了介质对该化学发光体系的发光强度的影响, 结果表明, 在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 介质中发光强度大且比较稳定。同时也考察了不同浓度的 NaOH 对该化学发光体系发光强度的影响, 结果表明当 NaOH 的浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时该化学发光体系的信噪比最大(如图 2), 故本实验选择 NaOH 的浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

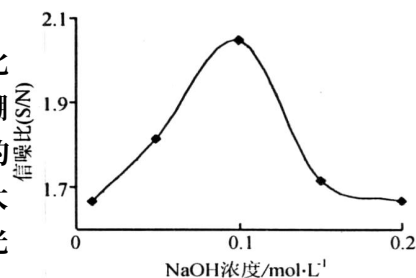


图 2 氢氧化钠浓度的选择

鲁米诺: $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$: $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.2 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 浓度的影响

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 可氧化鲁米诺产生化学发光, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的

浓度是影响该体系的化学发光强度的重要因素之一。固定利福平浓度为 $5.0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, NaOH 浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 考察了 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 浓度在 $3.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内对利福平增敏化学发光信号的影响。实验结果表明, 当 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的浓度为 $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 利福平呈现出最强的增敏化学发光信号作用, 故本实验选择 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的最佳浓度为 $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.3 鲁米诺浓度的影响

鲁米诺作为发光试剂直接影响着化学发光的强度, 本文考察了浓度在 $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 范围内的鲁米诺对该化学发光体系信噪比的影响。实验结果发现, 在 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 浓度为 $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NaOH 溶液的浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 随着鲁米诺浓度的增加, 该化学发光体系信噪比亦增大, 当鲁米诺浓度超过 $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 信噪比开始下降(如图 3), 故本实验选择鲁米诺的浓度为 $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

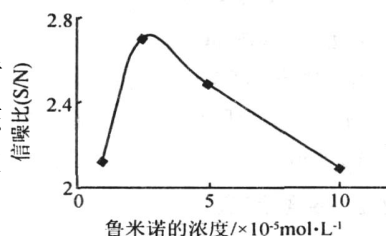


图 3 鲁米诺浓度的选择

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$: $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,
NaOH: $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.4 校准曲线、检出限和精密度

在上述选定的实验条件下, 利福平的浓度在 $5.0 \times 10^{-8} \sim 3.0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与增敏的化学发光强度呈良好的线性关系, 其线性方程如表 1 所示。对 $3.0 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的利福平连续进行 11 次平行测定, 其相对标准偏差为 4.5%, 按 IUPAC 规定, 计算所得利福平的检出限为 $1 \times 10^{-8} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表 1 校准曲线线性范围及回归方程

浓度范围 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	回归方程	相关系数 (r)	仪器参数 负高压(V)
$5.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\Delta I = 6.421C - 9.421$	0.9996	300
$1.0 \times 10^{-7} \sim 5.0 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\Delta I = 1.5C + 40.33$	0.9998	300
$7.0 \times 10^{-7} \sim 3.0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\Delta I = 0.647C + 86.16$	0.9989	300

3.5 干扰实验

对 $1.0 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的利福平进行了干扰实验, 结果发现 1000 倍量的葡萄糖、淀粉、硫脲, 200 倍量的 NH_4^+ , 100 倍量的糊精, 50 倍量的 K^+ 、 Mg^{2+} , 同倍量的 Ca^{2+} 几乎不产生干扰, 同倍量的 Ni^{2+} 、维生素 C 产生正干扰。

3.6 样品分析

按利福平眼药水(沧州光明药业有限公司, 标示量 10mL: 10mg)的说明将药丸和缓冲溶液混合均匀, 吸取适量的利福平眼药水经适当稀释后, 进行样品分析, 结果如表 2 所示。

表 2 样品分析结果

样品	本底值 (10^{-7} mol/L)	加入值 (10^{-7} mol/L)	测得值 (10^{-7} mol/L)	回收率 (%)	RSD (%) ($n=3$)
样品 1	0.82	0.6	0.58	97	4.3
样品 2	1.13	1.0	1.04	104	3.9

4 结论

基于利福平对鲁米诺- $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 化学发光体系的化学发光信号具有强烈的增敏作用而建立

了测定利福平的流动注射化学发光分析新方法, 在所选定的实验条件下, 利福平浓度与增敏的化学发光强度呈现良好的线性关系, 该方法已成功地测定了利福平眼药水中利福平的含量。

参考文献

- [1] 陈新谦, 金有豫 新编药理学[M]. (第14版). 北京: 人民卫生出版社, 2000 216—217.
- [2] 李平, 匡佩琳 HPLC 测定利福平胶囊含量[J]. 中国抗生素杂志, 2002, 25(1): 68—69.
- [3] 回瑞华, 候冬岩 三波长-光谱法测定利福平的含量[J]. 光谱学与光谱分析, 1995, 15(5): 95—98.
- [4] 张亮, 毕宝英 毛细管色谱法测定复方利福平片中异烟肼和吡嗪酰胺的含量[J]. 中国现代应用医学杂志, 1999, 6(6): 41—43.
- [5] 陈文山, 张迎雪 鲁米诺-过氧化氢化学发光体系测定利福平[J]. 化学研究, 2004, 15(1): 38—39.
- [6] 张琰图, 杨维平, 章竹君等 铁氰化钾化学发光体系测定利福平的研究[J]. 分析试验室, 2003, 22(2): 33—35.
- [7] 刘伟, 保新, 章竹君等 测定利福平的化学发光新体系[J]. 分析化学, 2002, 30(1): 86—88.

Determination of Rifampicin with Lumino1-K₃Fe(CN)₆ Chemiluminescence System

QU Ying-Juan DUAN Shu-E WANG Shao-Ying

(Department of Chemistry, Xi'an University of Arts and Science, Xi'an 710065, P. R. China)

Abstract A method for the determination of rifampicin by chemiluminescence coupled with flow injection was developed based on the chemiluminescence of the oxidation of Lumino1 by K₃Fe(CN)₆ in alkaline solution. The relative chemiluminescence intensity is proportional to rifampicin concentration over the range $5.0 \times 10^{-8} - 3.0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ with a detection limit of $1 \times 10^{-8} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$. 11 times of parallel determination of $3.0 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ rifampicin show that the relative standard deviation (RSD) is 4.5%. The proposed method has been successfully applied to the determination of rifampicin in eye drops samples.

Key words Chemiluminescence, Flow Injection Analysis, Rifampicin, Lumino1-K₃Fe(CN)₆.

2008 年《光谱实验室》征订启事

《光谱实验室》2008 年订价与 2007 年相同:

双月刊, 16 开, 每册 240 页, 单月 25 日出版, 每份年订价为 240 元(1-6 期); 零售价为: 第 1 期 70 元/本, 其余 40 元/本。

欲订阅的读者请到全国各地邮电局(所)办理订阅手续, 邮发代号为 82-863。错过时间者, 可直接通过邮局汇款向本编辑部联络处订阅。

地址: 北京市 81 信箱 66 分箱 刘建林, 邮编: 100095, 电话: (010) 62452937。

《光谱实验室》编辑部

2007 年 9 月 25 日