

阳离子交换固相萃取 – 流动注射化学发光法测定肾上腺色腓*

王琳¹, 付志锋^{1**}, 王永红²

(1. 西南大学药学院, 发光与实时分析教育部重点实验室, 重庆 400716; 2. 重庆市动物疫病预防控制中心, 重庆 401147)

摘要 目的: 基于酸性高锰酸钾氧化肾上腺色腓产生微弱的化学发光现象, 建立一种简单、灵敏、选择性高, 可用于药物质量控制和体内药物分析的肾上腺色腓的化学发光新方法。方法: 药物样品经阳离子交换固相萃取技术净化后, 采用流动注射化学发光法分析。结果: 方法测定肾上腺色腓的线性范围为 $7.0 \times 10^{-10} \sim 1.0 \times 10^{-7} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 检出限为 $2.0 \times 10^{-10} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (3σ), 对 $1.0 \times 10^{-8} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品连续进行 11 次平行测定, 相对标准偏差为 2.5%; 用于肾上腺色腓注射剂测定的回收率为 96% ~ 98%, 而用于尿样中加入肾上腺色腓 $1.00 \times 10^{-7} \sim 5.00 \times 10^{-9} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 回收率为 80.2% ~ 98.6%。结论: 该方法具有很高的灵敏度和较好的选择性, 不但可以用于制剂的分析, 还适用于血样、尿样等复杂的生物样品中极低浓度肾上腺色腓的分析。

关键词: 化学发光; 流动注射; 阳离子交换固相萃取; 肾上腺色腓; 高锰酸钾

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)10-1934-04

Cation exchange solid – phase extraction coupled with flow injection chemiluminescent analysis for detection of carbazochrome*

WANG Lin¹, FU Zhi-feng^{1**}, WANG Yong-hong²

(1. MOE Key Laboratory on Luminescence and Real-time Analysis, College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2. Animal Disease Prevention and Control Center of Chongqing, Chongqing 401147, China)

Abstract Objective: To establish a sensitive and simple method for the determination of carbazochrome based on that carbazochrome can be oxidized by acidic potassium permanganate to produce chemiluminescence. This method should be suitable for drug quality control and *in vivo* pharmaceutical analysis. **Method:** Coupled with solid – phase extraction for sample cleaning – up, carbazochrome was detected using flow injection chemiluminescent analysis. **Results:** The linear range was $7.0 \times 10^{-10} \sim 1.0 \times 10^{-7} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ with a detection limit of $2.0 \times 10^{-10} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (3σ). Standard sample at the concentration of $1.0 \times 10^{-8} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ was repeatedly detected for 11 times, and a relative standard deviation of 2.5% was obtained. The recoveries for injection sample was 96% – 98%, and those for urine samples spiked with carbazochrome standards at the concentrations of $1.00 \times 10^{-7} \sim 5.00 \times 10^{-9} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ were 80.2% – 98.6%. **Conclusion:** This method shows high sensitivity and good selectivity for carbazochrome detection. It can be used for assay commercial preparations as well as biological samples such as serum and urine. **Key words:** chemiluminescence; flow injection analysis; cation exchange solid – phase extraction; carbazochrome; potassium permanganate

肾上腺色腓(carbazochrome)为肾上腺素氧化产物肾上腺色素的缩氨脲水杨酸钠盐。该药物能增强毛细血管对损伤的抵抗力,降低毛细血管的通透性,促进受损毛细血管端回缩而止血。临床上主要用于毛细血管通透性增加所致的出血,如视网膜出血、胃

肠出血、子宫出血、脑溢血等^[1]。

目前文献中报道的检测肾上腺色腓的方法很少,且几乎都只用于测定简单的药物制剂。李洁等^[2]以高效液相色谱法测定了注射剂中肾上腺色腓含量,线性范围为 $10.74 \sim 107.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。师

* 西南大学中央高校基本科研业务费专项资金(XDJK2010C065)

** 通讯作者 Tel: (023) 68250184; E-mail: fuzf@swu.edu.cn

兆忠^[3]采用单扫描示波极谱测定片剂中的肾上腺色胺含量,线性范围为 $0.4 \sim 10.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。此外,化学发光法测定肾上腺色胺也有报道,晨晓霓等^[4]利用恒电流电解产生的高活性 $\text{Mn}(\text{III})$ 直接氧化肾上腺色胺,产生强化学发光,建立了测定肾上腺色胺的化学发光分析法,检出限达 $5 \times 10^{-9} \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;聂峰^[5]等以高碘酸钠-过氧化氢化学发光体系,建立了测定肾上腺色胺的另一种流动注射化学发光分析法,检出限为 $2.7 \times 10^{-9} \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。和高效液相色谱法和极谱法相比,这2种化学发光分析方法在灵敏度上均表现出较大优势,但是,和前面的方法一样,仍然只是测定了成分比较简单的药物制剂,而未测血样、尿样等复杂的生物样品,这主要是因为化学发光分析方法选择性较差。

本文拟基于酸性高锰酸钾氧化肾上腺色胺产生微弱的化学发光现象,建立一种简单、灵敏、选择性强,可用于药物质量控制和体内药物分析的肾上腺色胺的化学发光新方法。

1 仪器与试剂

化学发光测定采用 IFFM 型流动注射化学发光分析仪(西安瑞迈电子科技有限公司),流路如图1所示,所有管路为内径为 0.8 mm 的硅橡胶管,各通道流速均为 $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,采样环体积为 $100 \mu\text{L}$ 。

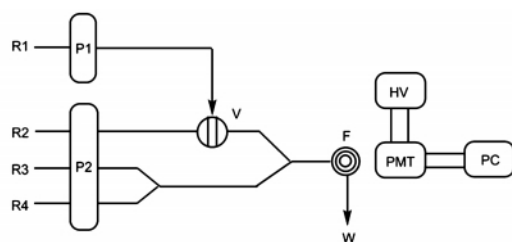


图1 肾上腺色胺的流动注射化学发光分析流路示意图

Fig 1 Schematic diagram for flow injection chemiluminescent analysis of carbazochrome

P1, P2: 蠕动泵(peristaltic pump) V: 进样阀(injection valve) F: 流通池(flow cell) W: 废液(waste) PMT: 光电倍增管(photomultiplier tube) HV: 负高压(high voltage) PC: 计算机(portable computer)

R1: 样品(sample) R2: 载流水(carrier water) R3: 酸性高锰酸钾(acidic potassium permanganate) R4: 甲醛(formaldehyde)

肾上腺色胺对照溶液: $2.0 \times 10^{-4} \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 准确称取肾上腺色胺(Sigma, 美国) 10 mg , 溶于少量超纯水($18.25 \text{ M}\Omega$, Millipore, 美国)中,并定容至 50 mL ,避光低温保存,使用时用超纯水逐级稀释至所需浓度。肾上腺色胺注射剂购自徐州莱恩药业有限

公司(标示量: 10 mg)。尿液采自实验室健康志愿者。高锰酸钾和甲醛均购自 Sigma (美国)。其他试剂均为分析纯,以超纯水直接配制。Strata X-C 强阳离子交换固相萃取柱($30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 购自 Phenomenex(美国)。

2 实验方法

2.1 化学发光测定方法 按图1的实验装置室温下操作。将输液管插入各相应溶液,开启蠕动泵,待基线稳定后,通过进样阀注入 $100 \mu\text{L}$ 对照品溶液或样品溶液,记录发光信号,以相对峰高定量。

2.2 尿样固相萃取 阳离子交换固相萃取柱先采用 1.0 mL 甲醇活化,再采用 1.0 mL 水平衡。含肾上腺色胺的尿样 $500 \mu\text{L}$ 以同体积水稀释后加入 $50 \mu\text{L}$ 甲酸调至弱酸性。将调节了 pH 的样品以 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速上样后,以盐酸溶液($0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和甲醇各 1.0 mL 冲洗固相萃取柱,以除去干扰杂质。真空干燥固相萃取柱 2 min ,以 $2 \times 500 \mu\text{L}$ 含 5% 氨水的甲醇将肾上腺色胺洗脱。洗脱液以氮气吹干,以 $500 \mu\text{L}$ 水重新溶解。

3 实验条件的选择

3.1 酸性介质的影响 高锰酸钾需在酸性介质中才可有效氧化肾上腺色胺产生化学发光,实验中分别比较了同浓度的硫酸、硝酸、盐酸、高氯酸、磷酸以及多聚磷酸介质对化学发光强度的影响。结果表明:在硫酸介质中发光强度最大。进一步考察了硫酸浓度对发光强度的影响,发光强度随着硫酸浓度的增大而提高(图2-A)。但是,当硫酸浓度超过 $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,背景噪音明显升高,信号稳定性也明显变差,同时考虑到高浓度硫酸对管道的腐蚀以及试剂消耗量等因素,最终选择硫酸浓度为 $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.2 高锰酸钾浓度的影响 在 $1.0 \times 10^{-4} \sim 4.0 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的范围内考察了高锰酸钾浓度对化学发光强度的影响。结果表明:高锰酸钾浓度为 $4.0 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时化学发光强度最大(图2-B),因此选择该浓度进行后继实验。

3.3 增敏剂的影响 一些还原性物质常用于增高锰酸钾化学发光体系,如甲醛^[6,7]、甲酸^[7,8]、乙二醛^[9]、 H_2O_2 ^[10]、 Na_2SO_3 ^[11,12]、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ^[13]、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ^[14] 和 $\text{Mn}(\text{II})$ ^[15] 等,此外,也有一些荧光物质^[16] 和表面活性剂^[17] 也被报道具有增敏作用。本

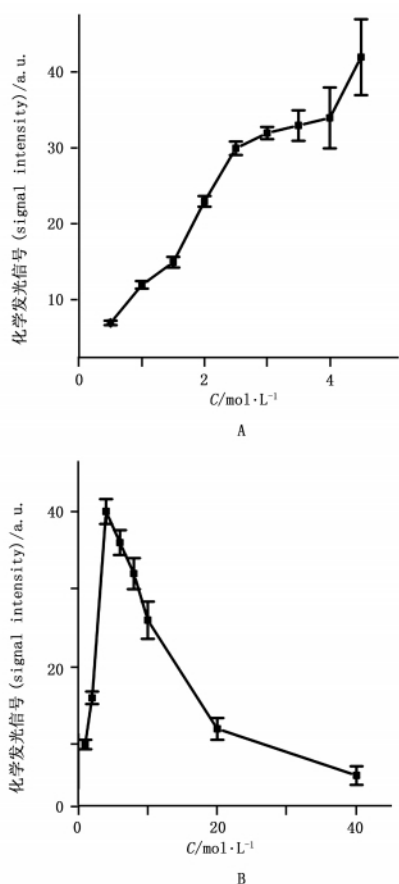


图2 硫酸(A)和高锰酸钾(B)浓度对化学发光信号的影响

Fig 2 Dependence of chemiluminescence signal on the concentrations of H₂SO₄ (A) and KMnO₄ (B)

实验中比较了这些增敏物质的作用,结果表明:甲醛的增敏效果最为明显。在1%~6%的范围内考察了甲醛浓度对化学发光的影响,发现发光强度随甲醛浓度增大而提高。考虑到甲醛为易挥发的有毒物质,选择3%的甲醛进行后继实验。

4 校准曲线、精密度及检出限

在选定的最优实验条件下,化学发光信号与肾上腺素浓度在 $7.0 \times 10^{-10} \sim 1.0 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系;回归方程为:

$$I = 4.727 \times 10^3 C + 6 \quad r = 0.9984$$

对 $1.0 \times 10^{-8} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品连续进行11次平行测定,RSD为2.5%;根据IUPAC建议,算出本法检出限为 $2.0 \times 10^{-10} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1} (3\sigma)$ 。

5 干扰试验

对于质量浓度为 $1.0 \times 10^{-8} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的肾上腺素,当测定的相对误差在 $\pm 5\%$ 范围以内时,肾上腺素片剂与注射剂中共存组分的允许量为:50000

倍蔗糖,20000倍NaAC,400倍Na₂SO₃,150倍NaH₂PO₄,100倍Na₂HPO₄与葡萄糖,20倍草酸钠,5倍抗坏血酸。

6 样品分析

6.1 制剂分析 取市售肾上腺素注射剂逐级稀释至检测的线性范围内,按照实验方法检测其含量,所得结果为10.5 mg(标示量为10 mg)。并以标准加入法测定回收率,结果满意,说明本方法具备较好的准确性,见表1。

表1 注射剂标准加入法测定回收率试验结果
Tab 1 Results of recovery test on injection

样品 (sample)	原始量 (original) /g · mL ⁻¹	加入量 (added) /g · mL ⁻¹	测得量 (found) /g · mL ⁻¹	回收率 (recovery) /%
注射剂(injection)	1.05×10^{-8}	0.50×10^{-8}	1.54×10^{-8}	98.0
		1.00×10^{-8}	2.01×10^{-8}	96.0

6.2 尿样分析 在尿样中分别加入不同浓度肾上腺素对照品溶液,以流动注射化学发光法分析其浓度,发现背景干扰较大,所得结果与实际值差异较大。基于此原因,考虑采用固相萃取对尿样进行净化。由于该药物极性较大,故决定采用阳离子交换固相萃取柱处理尿样,实验中发现强阳离子交换固相萃取柱具有较好的回收率。故采用该固相萃取柱净化样品后以流动注射化学发光法测定含量,并计算回收率,所得结果在80.2%~98.6%之间(见表2),符合生物样品测定要求。这表明选用的固相萃取方法具备较好的萃取能力。

表2 尿样标准加入法测定回收率实验结果
Tab 2 Results of recovery test on urine samples

样品 (sample)	加入量 (added) /g · mL ⁻¹	测得量 (found) /g · mL ⁻¹	回收率 (recovery) /%
尿样(urine)	5.00×10^{-9}	4.01×10^{-9}	80.2
	1.00×10^{-8}	0.84×10^{-8}	84.0
	5.00×10^{-8}	4.93×10^{-8}	98.6
	1.00×10^{-7}	0.93×10^{-7}	93.0

7 结论

在甲醛增敏作用下,高锰酸钾氧化肾上腺素可产生强烈的化学发光,基于此建立了肾上腺素的化学发光分析方法,其灵敏度超过目前所有文献

报道。该法还具备简单、快速、低成本等优势。同时,还发现阳离子交换固相萃取技术可有效地从生物样品中萃取该药物,以排除生物样品中复杂的共存物质的干扰。将两法联用,可体现出很高的灵敏度和较好的选择性,不但可以用于制剂的分析,还可用于血样、尿样等复杂的生物样品中极低浓度肾上腺色腺的分析,为药代动力学的研究提供了一个有用的工具。

参考文献

- 1 CHEN Xin-qian(陈新谦), JIN You-yu(金有豫), TANG Guang(汤光). New Edition of Medica(新编药理学). 16th Ed(第十六版). Beijing(北京): People's Medical Publishing House(人民卫生出版社) 2007. 569
- 2 LI Jie(李洁), WANG Xue-qin(王雪芹). HPLC determination of carbazochrome injection and its related substances(HPLC 法测定肾上腺色腺注射液含量及有关物质). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2008 28(10): 1712
- 3 SHI Zhao-zhong(师兆忠). Determination of carbazochrome by linear-sweep oscillopolarography(药物制剂中肾上腺色腺含量的测定). *Mod Prev Med*(现代预防医学) 2007 34(6): 1130
- 4 CHEN Xiao-ni(晨晓霓), ZHANG Cheng-xiao(张成孝), LÜ Jiu-ru(吕九如). Flow injection chemiluminescence determination of adreson with electrogenerated manganese(Ⅲ)(在线电生锰(Ⅲ)流动注射化学发光法测定肾上腺色腺). *Chin J Anal Chem*(分析化学) 2000 28(9): 1126
- 5 NIE Feng(聂峰), HE Yun-hua(何云华), WANG Zhi-yin(王志银). Chemiluminescence determination of carbazochrome salicylate in sodium periodate-carbazochrome salicylate system(NaIO_4 -肾上腺色腺体系化学发光法测定肾上腺色腺). *Chin J Anal Lab*(分析实验室) 2000 19(6): 56
- 6 Li BX, Guo LL, Ma LM, et al. Flow-injection chemiluminescence determination of chrysin and baicalein assisted by theoretical prediction of chemiluminescence behavior of chrysin and baicalein. *Spectrochim Acta A* 2008 71(3): 892
- 7 Townshend A, Pulgarín JAM, Pardo MTA. Flow injection chemiluminescence determination of naftopidil based on potassium permanganate oxidation in the presence of formaldehyde or formic acid. *Anal Bioanal Chem* 2005 381(4): 925
- 8 Fan SL, Zhang LK, Lin JM. Post-column detection of benzenediols and 1,2,4-benzenetriol based on acidic potassium permanganate chemiluminescence. *Talanta* 2006 68(3): 646
- 9 Wei GL, Wei CL, Dang GC, et al. Determination of puerarin in pharmaceutical injection by flow injection analysis with acidic potassium permanganate-glyoxal chemiluminescence detection. *Anal Lett*, 2007 40(11): 2179
- 10 YANG Min-li(杨敏丽), LI Li-qing(李丽清), ZHANG Zhu-jun(章竹君), et al. Determination of dipyrindamole by flow injection analysis with chemiluminescence detection(流动注射化学发光法测定双嘧达莫). *Chin J Anal Chem*(分析化学) 2000 28(2): 161
- 11 Zhuang YF, Zhang SC, Yu JS, et al. Flow injection determination of papaverine based on its sensitizing effect on the chemiluminescence reaction of permanganate-sulfite. *Anal Bioanal Chem* 2003 375(2): 281
- 12 Payán MR, López MÁB, Fernández-Torres R, et al. Hollow fiber-based liquid-phase microextraction (HF-LPME) of ibuprofen followed by FIA-chemiluminescence determination using the acidic permanganate-sulfite system. *Talanta* 2009 79(3): 991
- 13 YANG Min-li(杨敏丽), LI Li-qing(李丽清), ZHANG Zhu-jun(章竹君), et al. Chemiluminescence system of KMnO_4 -trime-thoprin- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (高锰酸钾-甲氧苄啶-硫代硫酸钠化学发光反应). *Chin J Anal Chem*(分析化学) 2001 29(4): 410
- 14 LI Li-qing(李丽清), YANG Min-li(杨敏丽), LÜ Jiu-ru(吕九如), et al. Determination of vitamin B6 by flow injection chemiluminescence method(流动注射-化学发光法测定维生素B6). *Chin J Anal Lab*(分析实验室) 1998 17(3): 5
- 15 Slezak T, Terry JM, Barnett NW, et al. Autocatalytic nature of permanganate oxidations exploited for highly sensitive chemiluminescence detection. *Anal Chem* 2010 82(6): 2580
- 16 Adcock JL, Francis PS, Barnett NW. Chemiluminescence spectra for the oxidation of sulphite in the presence of fluorescent and non-fluorescent enhancers. *Anal Chim Acta* 2009 652(1-2): 303
- 17 Chen H, Lu C, Lin JM, et al. Chemiluminescence behavior of sodium hydrogen carbonate in the potassium permanganate-hydrogen peroxide reaction. *Sci China Ser B - Chem* 2010 53(8): 1784

(本文于2010年11月3日收到)