

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.01813

以黄连素/葫芦脲 [7] 包合物为荧光探针测定青霉胺

杨吉元 申爱卓 杜黎明* 李常风 吴昊 常银霞

(山西师范大学分析测试中心, 临汾 041004)

摘要 黄连素能和葫芦脲 [7] 生成 1:1 的主-客体稳定的包合物并使其荧光强度显著增强。当加入青霉胺后, 黄连素/葫芦脲 [7] 所形成的包合物的荧光迅速猝灭, 据此建立了一种简便灵敏的检测青霉胺的新方法。青霉胺浓度在 90 ~ 3000 $\mu\text{g/L}$ 范围内与荧光猝灭值 ΔF 呈良好的线性关系, 相关系数 0.9996。检出限为 30 $\mu\text{g/L}$ 。本方法的加标回收率为 98.3% ~ 103.6%, 相对标准偏差为 0.68% ~ 0.95%。本方法成功用于药片中青霉胺的测定。

关键词 荧光探针; 青霉胺; 黄连素; 葫芦脲 [7]

1 引言

葫芦脲 [n] (Cucurbit [n] uril, $n = 4 \sim 12$, CB [n]) 是超分子化学中继环糊精、冠醚及杯芳烃之后发展起来的一类新型高度对称的桶状系列大环化合物, 由 n 个甘脲单元和 $2n$ 个亚甲基单元键合而成, 具有疏水的内部空腔及由环绕的羰基氧原子组成的端口。这就使得它能够通过疏水作用、氢键、离子偶极等键合作用键合多种有机分子, 与极性和尺寸适合的有机客体可以形成包合物, 而包合物的形成可以改变客体分子的光物理和光化学性质^[1]。由于葫芦脲 [7] 粒 (CB [7]) 良好的水溶性和包合能力而使之在分子识别方面得到广泛应用^[2,3]。

青霉胺 (Penicillamine, PenA) 化学名称 3,3-二甲基-(D)-半胱氨酸, 是一种含有巯基的氨基酸, 由于它对铜、汞、铅等重金属离子有很强的络合作用, 可解由重金属离子引起的中毒; 青霉胺还有明显的免疫抑制作用和抗炎作用, 对类风湿性关节炎及慢性活动肝炎等免疫性疾病均有良好的疗效。目前, 青霉胺的分析方法有分光光度法^[4,5]、化学发光法^[6]、液相色谱法^[7,8]、毛细管电泳法^[9,10]和电化学法^[11,12]等。青霉胺分子本身无荧光, 文献 [13,14] 采用衍生化荧光光谱法测定了青霉胺。衍生化方法由于操作繁杂、灵敏度不高、重现性差而在实际应用中很难推广, 因此建立一种简便、快速、重现性好的测定青霉胺的高灵敏度荧光光谱新方法十分必要。

盐酸黄连素 (Berberine hydrochloride, BRH) 是一种异喹啉类生物碱, 具有抗菌、消炎作用。本课题组已经对异喹啉药物与 CB [n] 之间的超分子包合作用进行了研究^[15~17], 发现 CB [5~8] 均能与异喹啉药物生成 1:1 的主-客体包合物并使其药物的荧光强度显著增强。本实验采用荧光光谱法研究了青霉胺与 BRH 在 CB [7] 空腔中的包合竞争反应, 发现青霉胺能使 BRH/CB [7] 包合物的荧光发生剧烈猝灭, 其荧光猝灭强度与青霉胺的浓度呈良好的线性关系。据此建立了一种以 BRH/CB [7] 包合物为探针的测定青霉胺的荧光光谱新方法。本方法操作简便, 灵敏度高, 选择性好, 可用于药物制剂中青霉胺含量的测定。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

F-4500 型荧光分光光度计 (日本日立公司), 激发和发射狭缝均为 5.0 nm; PHS-3TC 精密数显酸度计 (上海天达仪器有限公司)。青霉胺标准品 (中国药品生物制品鉴定所), 于 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重, 准确称取适量的青霉胺标准品, 用二次蒸馏水配制成 1.0×10^{-3} mol/L 标准储备液, 所需标准工作液用水稀

2010-03-18 收稿; 2010-06-25 接受

本文系教育部高等学校博士学科点专项科研基金 (No. 20091404110001) 资助项目

* E-mail: lmd@dns.sxnu.edu.cn

释储备液而制得; 葫芦脲 [7] 按文献报道的方法制备和表征^[18], 用水配成 1.2×10^{-3} mol/L 的储备液; 盐酸黄连素(中国药品生物制品鉴定所) 配制 1.2×10^{-3} mol/L 盐酸黄连素溶液; 青霉胺片剂(上海医药集团有限公司信谊制药总厂 批号: 090304); 其余试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

2.2 实验方法

于 10 mL 比色管中分别加入 1.0 mL 1.2×10^{-4} mol/L CB[7] 溶液和 1.0 mL 1.2×10^{-4} mol/L 的 BRH 溶液, 再加入 1.0 mL 0.1 mol/L HCl 溶液, 在 (25.0 ± 1) °C 下振摇 15 min, 加入适量青霉胺溶液, 再振摇 15 min, 用水定容至刻度, 并用 10 mm 石英池, 以 347 nm 为激发波长, 在 495 nm 处测定试剂空白荧光强度 F_0 及青霉胺加入到包合物溶液后的荧光强度 F , 计算荧光猝灭值 ΔF ($\Delta F = F_0 - F$), 以 ΔF 对青霉胺浓度作工作曲线。

3 结果与讨论

3.1 CB[7] 对 BRH 的荧光增敏作用

研究了 BRH 及其包合物的光谱特性。由图 1 可见, BRH 在水溶液中仅有微弱的荧光发射, 在 CB[7] 存在下可观察到 BRH 显著增强的荧光, 且最大发射波长发生大幅度红移。荧光光谱特征的变化被认为是异喹啉类药物与葫芦脲形成包合物的结果^[15, 19]。

3.2 青霉胺猝灭 BRH/CB[7] 包合物荧光

当加入青霉胺后, BRH/CB[7] 包合物荧光剧烈猝灭, 在不同浓度青霉胺存在下, BRH/CB[7] 的荧光猝灭值见图 2。随着青霉胺浓度的增加, 荧光强度减弱, 青霉胺在一定的浓度范围内与其相应的荧光猝灭值 ΔF 之间呈良好的线性关系。这些结果归因于青霉胺和 BRH 之间对 CB[7] 疏水空腔的竞争, 由于青霉胺的引入使得部分 BRH 被挤出 CB[7] 的空腔, 导致 CB[7] 和青霉胺之间包合物的形成而使之荧光猝灭。

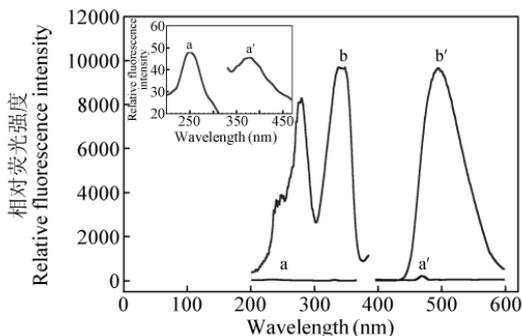


图 1 BRH 和 BRH-CB[7] 的荧光光谱

Fig. 1 Fluorescence spectra of berberine hydrochloride (BRH) and BRH-cucurbit[7]uril (CB[7])

a, a' BRH, $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 338/418$ nm; b, b' BRH-CB[7], $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 343/495$ nm; pH = 2.0. $C_{BRH} = 12 \mu\text{mol/L}$; $C_{CB[7]} = 12 \mu\text{mol/L}$.

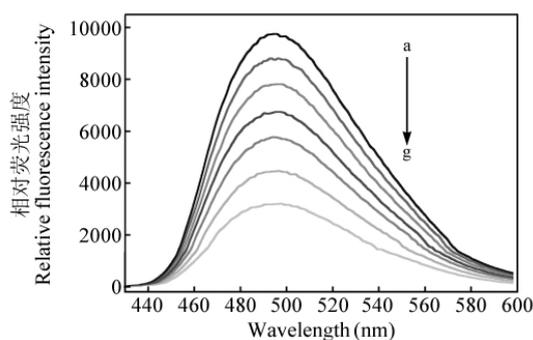


图 2 PenA 的浓度对 BRH-CB[7] 包合物荧光强度的影响

Fig. 2 Effect of concentration of penicillamine (PenA) on fluorescence spectra of BRH-CB[7] inclusion complex

$C_{CB[7]} = 12 \mu\text{mol/L}$; $C_{BRH} = 12 \mu\text{mol/L}$, C_{PenA} (a-g): (0, 0.6, 0.9, 1.8, 2.7, 4.0, 6.0) mg/L.

3.3 溶液酸度的影响

在体系中加入不同浓度 HCl 溶液, 在 pH 1~6 的范围内考察了酸度对 ΔF 的影响。结果表明, 在体系中加入 0.5~2.0 mL 0.1 mol/L HCl 溶液时, ΔF 最大且基本不变。因此本实验选用加入 1.0 mL 0.1 mol/L HCl 来调节溶液的酸度。

3.4 BRH 和 CB[7] 浓度的影响

按实验方法进行, 固定 BRH 的浓度, 改变 CB[7] 用量, 测定荧光强度, 发现 CB[7] 的浓度为 1.2×10^{-5} mol/L 时荧光最强, 固定 CB[7] 的浓度, 改变 BRH 浓度, 当 BRH 浓度达到 1.2×10^{-5} mol/L 时, 增加 BRH 的量, 荧光强度不再变化。因此 BRH 与 CB[7] 的最佳使用浓度均为 1.2×10^{-5} mol/L。

3.5 温度和反应时间的影响

在 5 ~ 90 °C 范围内考察了温度和反应时间对青霉胺和 BRH 包合竞争反应的影响, 当体系温度低于 40 °C 时 ΔF 最大且稳定。当高于 40 °C 时, 由于包合物受热分解, ΔF 下降。考察了不同的反应时间对荧光性质的影响, 结果表明, 随着反应时间的增加, ΔF 值依次增强, 反应 15 min 后, ΔF 值即可达到最大值, 且在至少 5 h 内保持不变。故本实验选择在室温下反应 15 min 后即可测定。

3.6 线性范围与检出限

在上述实验条件下, 青霉胺浓度在 90 ~ 3000 $\mu\text{g/L}$ 范围与 ΔF 呈良好的线性关系 $\Delta F = 1.0443C + 1077.74$ 相关系数为 0.9996。本方法的检出限 ($S/N = 3$) 为 30 $\mu\text{g/L}$ 。

3.7 荧光探针的响应机理和荧光猝灭方式

BRH 在水溶液中仅能发射微弱的荧光, 当加入 CB [7] 后, BRH 的荧光强度显著增强, 其原因是由黄连素进入了 CB [7] 的疏水性空腔, 导致了 CB [7] 和 BRH 形成包合物^[12]。这就使 BRH 处在一个更加疏水和保护性的微环境之中, 防止了本体溶液中水分子及其它物质对 BRH 的激发态的猝灭。另外, 与环糊精相比, CB [7] 具有更强的刚性结构, CB [7] 的刚性结构减少了捕获的 BRH 分子在空腔内运动的自由度。当青霉胺加入 BRH/CB [7] 包合物溶液后, 青霉胺本身的亲油性和合适的体积大小, 使其更容易地进入 CB [7] 的疏水空腔, 从而形成了青霉胺和 BRH 的竞争反应。部分 BRH 分子由于青霉胺的引入将会被挤出 CB [7] 空腔外。由于 BRH 的光化学特性强烈依赖于它的局部微环境, 青霉胺加入将使 BRH 失去 CB [7] 疏水空腔的保护, 从而导致包合物荧光强度的降低。

通常, 物质的荧光猝灭主要有猝灭剂与荧光物质之间的碰撞引起的动态猝灭, 基态复合物的形成而引起的静态猝灭, 荧光物质的激发态与基态猝灭剂之间的电子转移及能量转移等机理。采用 Stern-Volmer 方程计算青霉胺对 BRH/CB [7] 包合物荧光猝灭常数发现, Stern-Volmer 图不是一条直线, 而是一条弯向 Y 轴的上升曲线 (图 3), 据此判断青霉胺对 BRH/CB [7] 包合物的荧光猝灭并非单纯的动态猝灭或者静态猝灭, 而是两种猝灭的结合, 即同时发生了动态猝灭和静态猝灭。

3.8 干扰物质的影响

选择经常在药物制剂中使用的淀粉、滑石粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、果糖和硬脂酸盐等赋形剂, 对在青霉胺荧光分光光度法测定中可能存在的一些干扰进行了研究, 对含有一定量的青霉胺和含有不同浓度赋形剂的样品进行测定, 结果表明, 上述 1000 倍的单一赋形剂对青霉胺测定结果均无干扰。

3.9 药片分析

取 10 粒药片将其研细成粉末, 准确称取相当于青霉胺 12.5 mg 药物粉末, 置于 100 mL 容量瓶中, 加入 20 mL 水, 超声 3 min 使其溶解, 然后用水定容至刻度。将此溶液进行过滤, 弃去 10 mL 前滤液, 用水将 10 mL 后续液稀释 10 倍, 摇匀, 得到 12.5 mg/L 青霉胺溶液。进一步稀释得实验所需样品溶液, 然后按 2.2 节进行测定, 其结果见表 1, 获得满意的回收率。

表 1 药片的测定结果与回收率

Table 1 Analytical results and recovery tests of penicillamine tablet

本底值 Content (ng)	加入量 Added (ng)	测得值 Found (ng, n = 5)	回收率 Recovery (%, n = 5)	相对标准偏差 RSD (%, n = 5)
196	200	395	99.5	0.85
398	400	791	98.3	0.95
801	800	163	103.6	0.68

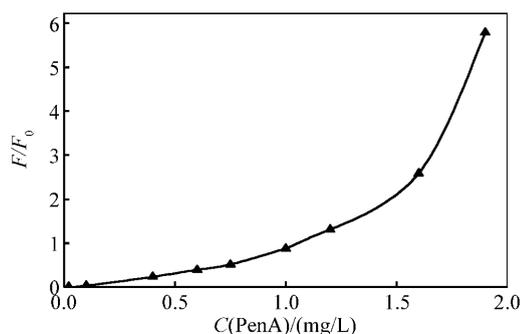


图 3 PenA 对 BRH/CB [7] 包合物荧光猝灭的 Stern-Volmer 图

Fig. 3 Stern-Volmer plots for the quenching of BRH/CB [7] by PenA

References

- 1 Ong W , Kaifer M G , Kaifer A E. *Org. Lett.* , **2002** , 4(10) : 1791 ~ 1794
- 2 Wei F , Feng Y Q. *Talanta* , **2008** , 74(4) : 619 ~ 624
- 3 YU Hua-Peng(余化鹏) , SUN Jun-Yong(孙军勇) , WU Lian(吴炼) , XU Hong-Wei(徐洪伟) , WANG Lun(王伦) , ZHOU Yun-You(周远友) . *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)* , **2009** , 29(4) : 1041 ~ 1044
- 4 Al-Majed A A. *J. Pharm. Biomed. Anal.* , **1999** , 21(4) : 827 ~ 833
- 5 Suliman F E O , Al-Lawati H A J , Al-Kindy S M Z , Nour I E M , Salama S B. *Talanta* , **2003** , 61(2) : 221 ~ 231
- 6 Zhang Z D , Baeyens W R G , Zhang X R , Weken G V D. *Analyst* , **1996** , 14(8-10) : 939 ~ 945
- 7 Saetre R , Rabenstein D L. *Anal. Chem.* , **1987** , 50(2) : 278 ~ 280
- 8 Yamashita G T , Rabenstein D L. *J. Chromatogr.* , **1989** , 180(2) : 259 ~ 263
- 9 Zinellu A , Carru C , Sotiga S , Deiana L. *J. Chromatogr. B* , **2004** , 803(2) : 299 ~ 304
- 10 Yang X , Yuan H , Wang C , Su X , Hu L , Xiao D. *J. Pharm. Biomed. Anal.* , **2007** , 45(2) : 362 ~ 366
- 11 Shahrokhian S , Bozorgzadeh S. *Electrochim. Acta* **2006** , 51(20) : 4271 ~ 4276
- 12 Torriero A A J , Piola H D , Martinez N A , Panini N V , Raba J , Silber J J. *Talanta* , **2007** , 71(3) : 1198 ~ 1204
- 13 Cavrini V , Gatti R , Roveri P , Cesaroni M R. *Analyst* , **1988** , 113(9) : 1447 ~ 1452
- 14 Segarra-Guerrero R , Sagrado-Vives S , Martinez-Calatayud J. *Microchem. J.* , **1991** , 43(3) : 176 ~ 180
- 15 Li Y P , Wu H , Du L M. *Chinese Chemical Letters* , **2009** , 20(3) : 322 ~ 325
- 16 Li C F , Du LM , Zhang H M. *Spectrochim. Acta A* , **2010** , 75(2) : 912 ~ 917
- 17 Li C F , Du L M , Wu W Y , Sheng A Z. *Talanta* , **2010** , 80(5) : 1939 ~ 1944
- 18 Kim J , Jung I S , Kim S Y , Lee E , Kang J K , Sakamoto S , Yamaguchi K , Kim K. *J. Am. Chem. Soc.* , **2000** , 122(3) : 540 ~ 541
- 19 Megyesi M , Biczok L , Jablonkai I. *J. Phys. Chem. C* , **2008** , 112(9) : 3410 ~ 3416

Determination of Penicillamine Using Fluorescence Probe of Complexation Between Berberine and Cucurbit [7] uril

YANG Ji-Yuan , SHEN Ai-Zhuo , DU Li-Ming* , LI Chang-Feng , WU Hao , CHANG Yin-Xia
(Analytical and Testing Center , Shanxi Normal University , Linfen 041004)

Abstract Berberine can react with cucurbit [7]uril (CB [7]) to form 1:1 host-guest stable complexes and the fluorescence intensity of the complexes is greatly enhanced. The dramatic quenching of the fluorescence intensity of CB [7]/BRH (berberine chloride) complexes is observed with the addition of penicillamine. A new simple and sensitive method for the detection of penicillamine was developed. Good linear relationship between the penicillamine concentration within 90 – 3000 $\mu\text{g/L}$ and the corresponding value of the fluorescence quenching ΔF was obtained with a correlation coefficient (r) of 0.9996. The detection limit was 30 $\mu\text{g/L}$, the recovery was 98.3% – 103.6% , and RSD was 0.7% – 1.0% . The proposed method has been successfully applied to the determination of the drug in tablets.

Keywords Fluorescence probe; Penicillamine; Berberine; Cucurbit [7] uril

(Received 18 March 2010; accepted 25 June 2010)