

流动注射化学发光法测定芦丁

李利军¹, 钟招亨², 冯军², 陈其锋², 孔红星¹, 吴健玲²

1 广西工学院生物与化学工程系, 广西柳州 545006

2 广西大学化学与化学工程学院, 广西南宁 530004

摘要 在酸性介质中, 硫酸高铈氧化芦丁能产生弱发光, 而罗丹明 6G (Rh6G) 能大大增强此弱发光, 由此建立了流动注射化学发光法测定芦丁的新方法。研究了影响化学发光强度的各种因素, 优化了硫酸、硫酸高铈和 Rh6G 等条件, 对样品中可能存在的各种干扰物质进行了研究, 并初步探讨了化学发光反应可能的机理。该方法的线性范围为 $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 方法的检出限为 $8.1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 对 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的芦丁进行 11 次平行测定, 其相对标准偏差为 1.5%, 回收率为 99.0%~104.0%。该方法应用于芦丁片剂中芦丁含量的测定, 取得了满意的结果。

关键词 流动注射; 化学发光; 硫酸高铈; 罗丹明 6G; 芦丁

中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2007)08-1625-04

引言

芦丁, 具有抗氧化、抗基因突变的保健功能, 也是一种维生素类药(维生素 P), 具有降低毛细血管的异常通透性和脆性的作用。目前测定芦丁的方法有分光光度法^[1]、荧光法^[2]、电化学法^[3]、红外光谱法^[4]、高效液相色谱法^[5]、毛细管电泳法^[6]等。化学发光分析法由于其灵敏度高、线性范围宽、仪器设备简单, 越来越受到人们的青睐^[7-9]。化学发光法测定芦丁的文献也曾有报道^[10-12], 它们分别采用的是鲁米诺、次氯酸钠、铁氰化钾体系。本研究发现 Rh6G 在酸性介质中能大大增强硫酸高铈氧化芦丁的化学发光强度, 据此建立了一种测定芦丁的化学发光新体系, 并结合流动注射技术, 建立了一种简单、快速测定芦丁的新方法。与文献^[10-12]中测定芦丁的化学发光法相比, 该体系简单, 灵敏, 具有较宽的线性范围, 且有很好的选择性, 已成功地用于片剂中芦丁含量的测定。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

IFFM-D 型流动注射化学发光仪(西安瑞迈电子有限公司); 电子分析天平(上海奥豪斯公司); SZ 93 自动双重纯水

蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂); DL-60D 超声波清洗器(上海之信仪器有限公司)。

芦丁标准溶液($1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$): 精密称取 0.015 3 g 芦丁粉末(中国药品生物制品检定所, 对照品), 加(35℃)热水溶解并超声振荡 10 min, 然后用水定容于 25 mL 容量瓶中, 4℃冰箱保存, 使用时按适当比例稀释成工作液; 硫酸高铈溶液($1.5 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$): 精密称取 $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (汕头市光华化学厂) 0.606 4 g, 用 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ (广州市东红化工厂)溶解定容至 100 mL; Rh6G(中国医药集团上海化学试剂公司)溶液: 浓度为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 使用时用水逐级稀释至所需浓度。所用试剂(除芦丁外)均为分析纯, 水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

按图 1 所示的流程, 将标准溶液或样品溶液与 Rh6G 溶液混合后注入到硫酸高铈溶液(用一定浓度的硫酸配制, 防止变浑浊)中, 记录发光信号强度 I , 以此进行定量分析。

2 结果与讨论

2.1 化学发光动力学曲线

在 Rh6G 存在下, 硫酸高铈氧化芦丁属快速发光反应, 从开始发光到化学发光强度达到峰值约需 3.2 s, 从发光强度峰值衰减至本底附近约需 8.0 s(见图 2)。

收稿日期: 2005-12-16, 修订日期: 2006-03-18

基金项目: 广西青年科学基金项目(桂科青 0135003)和广西高校百名中青年学科带头人资助计划项目(桂教人[2002]467)资助

作者简介: 李利军, 1966 年生, 广西大学工学院教授 e-mail: lilijun0562@sina.com

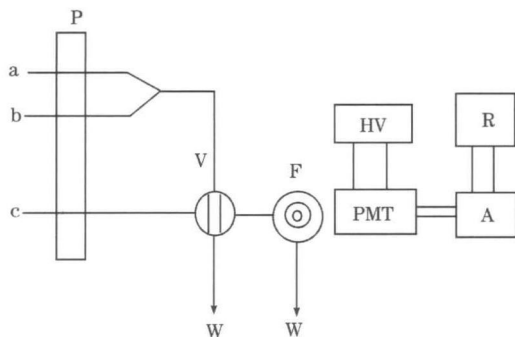


Fig 1 Schematic diagram of flow injection system for CL detection

P: Peristaltic pump; V: Injecting valve; F: Flow cell;
PMT: Photomultiplier tube; HV: Negative high voltage;
A: Amplifier; R: Recorder; a: Rutin; b: Rh6G;
c: $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ and H_2SO_4 ; W: Waste

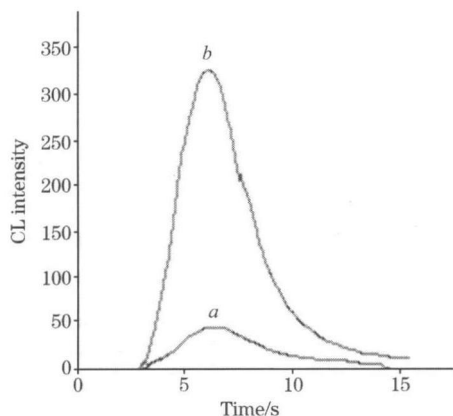


Fig 2 Kinetic curves of chemiluminescence

a: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ rutin + $0.015 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
 $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ + $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$;
b: a + $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rh6G

2.2 条件优化实验

2.2.1 流路参数的选择

(1) 流速的影响: 在流动注射分析中, 流速是影响测定灵敏度的一个重要因素。为了保证试样得到及时地更新, 主泵(图 1 中 a 和 b 管)的最佳流速为 $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$; 在化学发光流动体系中, 流速太慢会导致最大发光在流通池之前, 流速太快会导致最大发光在流通池之后, 本实验考察了在 $30 \sim 80 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 范围内流速对相对发光强度的影响, 发现副泵(图 1 中 c 管)的最佳流速为 $70 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 化学发光强度最大。

(2) 负高压的影响: 随着负高压的增加, 相对化学发光信号增强, 而电压很高时基线不稳定。本实验选择负高压 -800 V , 增益为 2。

(3) 采样体积的影响: 随着采样体积的增大, 化学发光信号值也逐渐增大。但由于反应量的增多, 导致反应不均匀, 重现性下降。在保证一定灵敏度的基础上, 本实验选择采样体积为 $100 \mu\text{L}$ 。

2.2.2 反应介质及其浓度的影响

在酸性介质中, 对硫酸高铈 Rh6G 芦丁体系, 分别以 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl , H_2SO_4 , HNO_3 , H_3PO_4 为反应介质, 试验了酸性介质对化学发光体系的发光强度的影响, 结果表明, 在 H_2SO_4 介质中化学发光强度大且稳定, 故本文选用 H_2SO_4 作为反应介质。同时也实验了 H_2SO_4 的浓度对化学发光强度的影响(见图 3), 当 H_2SO_4 浓度大于 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 发光强度显著减弱, 这可能是由于过高的酸度导致反应速度太快, 发光强度峰值在到达流通池时已经开始减弱, 导致观察到的发光信号减小。本实验选择 H_2SO_4 的浓度为 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

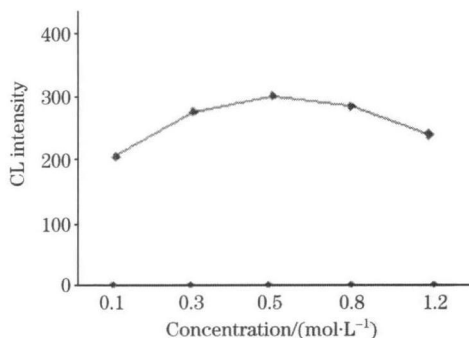


Fig 3 The effect of H_2SO_4 concentration on CL intensity

2.2.3 硫酸高铈浓度的影响

硫酸高铈在此化学发光反应中是氧化剂, 对化学发光强度影响很大。在硫酸高铈的浓度为 $1.0 \times 10^{-3} \sim 2.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内试验了硫酸高铈的浓度对化学发光强度的影响(见图 4)。当硫酸高铈的浓度增大时, 发光强度也增大, 但浓度过大时, 它本身可吸收光辐射, 发光强度反而下降。实验结果表明当硫酸高铈的浓度为 $1.5 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 发光强度最大。综合考虑它在硫酸介质中的溶解度和信噪比, 本实验选择硫酸高铈的浓度为 $1.5 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

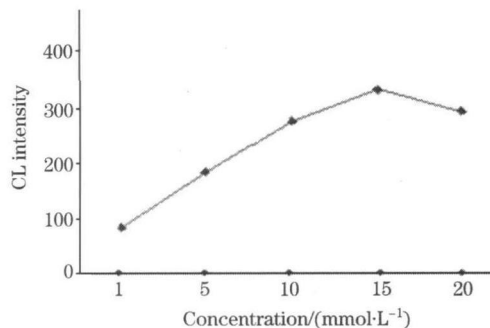


Fig 4 Effect of $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ concentration on CL intensity

2.2.4 增敏剂的选择及其浓度的影响

一些荧光物质可以作为化学发光反应的能量接受体而增强化学发光体系的发光强度。实验分别考察了罗丹明 6G、奎宁、8 羟基喹啉、荧光素对该发光体系的增敏作用。结果表明, 只有罗丹明 6G 对该体系发光强度有明显增强作用。发光强度随罗丹明 6G 浓度的增大而增强, 当其浓度为 $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时发光强度达到最大, 此后随着 6G 浓度的继续增大, 发光强度又趋向减小(见图 5)。这可能是由于过量

的罗丹明 6G 对光的吸收作用所致。本实验选择 $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 罗丹明 6G 溶液进行测定。

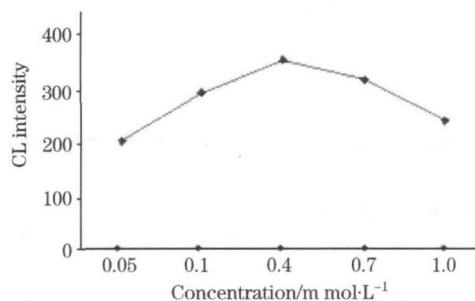


Fig 5 The effect of Rh6G concentration on CL intensity

2.3 工作曲线、精密度与检出限

在选定的最佳实验条件下, 芦丁浓度在 $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内与相对化学发光强度呈良好的线性关系, 其回归方程为 $I = 33.837 \times 10^5 c + 285.04$ ($n = 11$, $r = 0.9948$, c 芦丁浓度 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), I 为相对化学发光强度)。对浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的芦丁溶液进行 11 次平行测定, 得相对标准偏差为 1.5%。以空白信号平均值加上其标准偏差的 3 倍所对应的浓度为检测限, 计算出方法的检出限为 $8.1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 干扰试验

为了评价所建立分析方法的选择性, 在已优化的实验条件下, 考察了芦丁片剂中可能添加组份对芦丁含量测定的干扰。对 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的芦丁标准溶液的干扰进行了研究, 实验结果表明(以对发光强度的影响不超过 $\pm 5\%$ 计) 共存物的最大允许量: 1000 倍的 K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , SO_4^{2-} , Cl^- ; 700 倍的淀粉、糊精、蔗糖; 400 倍的葡萄糖、甘露醇;

200 倍的聚乙二醇; 100 倍的山梨醇。由于样品中这些物质的实际含量均低于允许量, 因此无需分离或其他预处理, 可直接测定。

2.5 样品分析

准确称取 20 片芦丁(每片标示量 20 mg, 四川亚宝光泰药业有限公司), 于研钵中研细混匀, 然后准确称取相当于 1 片药片质量的粉末于烧杯中, 用温水溶解, 超声振荡 15 min, 砂芯漏斗过滤, 定容于 100 mL 容量瓶中。测定时从 100 mL 容量瓶中取出 10 mL 定容于 50 mL 容量瓶, 作为样品溶液, 按实验所述方法测定其含量。测得样品溶液浓度为 $6.29 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, RSD% 为 1.1%, 计算出 1 片药片中含芦丁 19.2 mg。同时进行标准加入回收试验, 测得回收率为 99.0% ~ 104.0% (见表 1), 表明该方法准确可靠, 片剂中的共存组份对测定无干扰。

Table 1 Results of recovery test ($n = 5$)

Added /($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Found /($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Recovery /%	RSD /%	Average /%
1.00	1.02	102.0	1.4	
3.00	2.97	99.0	1.5	
5.00	5.20	104.0	1.3	101.6
7.00	7.10	101.4	1.1	

2.6 反应机理的探讨

在没有罗丹明 6G 存在时, 硫酸高铈与芦丁的反应为微弱化学发光反应, 观察不到明显的化学发光信号, 当罗丹明 6G 存在时, 即产生明显的化学发光, 其机理可能是罗丹明 6G 为活性较高的荧光物质^[13], 在硫酸高铈与芦丁进行氧化还原反应时, 它可以快速吸收反应释放的能量而跃迁至激发态, 处于激发态的罗丹明 6G 分子又以光辐射的形式返回基态从而产生化学发光^[14, 15]。

参 考 文 献

- [1] WANG Shu lan, HU Kuí san(王淑兰, 胡奎三). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 1995, 23(4): 15.
- [2] ZHANG Su bin, ZHAO Huí chun, CHEN Shì lù(张素斌, 赵慧春, 陈世禄). Journal of Beijing Normal University • Natural Science(北京师范大学学报 • 自然科学版), 2002, 38(2): 237.
- [3] Zoulis N E, Efstathiou C E. Anal. Chim. Acta, 1996, 320: 255.
- [4] DU De guo, SUN Su qin, ZHOU Qun, et al(杜德国, 孙素琴, 周 群, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2000, 20(4): 474.
- [5] LIN Jiaryuan, YU Lei(林建原, 余 磊). Chinese Journal of Chromatography(色谱), 2001, 19(3): 243.
- [6] LI Xiang jun, XIONG Hui, YUAN Zhuσ bin(李向军, 熊 辉, 袁倬斌). Chinese Journal of Analytical Laboratory(分析实验室), 2001, 20(5): 41.
- [7] LIAN Ning, WANG Jiarr chao, LENG Wei hong, et al(连 宁, 王建朝, 冷文红, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(7): 1038.
- [8] LIU Er-bao, WEI Hong qing(刘二保, 卫洪清). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(8): 1213.
- [9] XIE Cheng-gen, LI Hu ar fen(谢成根, 李淮芬). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(12): 1521.
- [10] Song Zhenghua, Hou Shuang. Talanta, 2002, 57: 59.
- [11] LI Bao-xin, LIU Wei, ZHANG Zhu jun(李保新, 刘 伟, 章竹君). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2001, 29(4): 428.
- [12] NIE Feng, LI Lì-qing, FENG Mar liang(聂 峰, 李丽清, 封满良). Chinese Journal of Analytical Laboratory(分析实验室), 1999, 18(1): 54.
- [13] LIU Bao sheng, SUN Hu ar yang, LIU Zhì chao, et al(刘保生, 孙化阳, 刘智超, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(11): 2093.
- [14] Weibing Liu, Yuming Huang. Analytica Chimica Acta, 2004, 506: 185.
- [15] WANG Lun, ZHU Chang-qing, YANG Geng, et al(王 伦, 朱昌青, 杨 耿, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 1995, 23(1): 85.

Determination of Rutin by Flow Injection Chemiluminescence Method

LI Lì jun¹, ZHONG Zhao heng², FENG Jun², CHEN Qi feng², KONG Hong xing¹, WU Jiarr ling²

1. Department of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Technology, Liuzhou 545006, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China

Abstract A new flow injection chemiluminescence method for the determination of rutin was established. The method was based on the chemiluminescence reaction of rutin with cerium (IV) sulfate in sulfuric acid condition sensitized by rhodamine 6G. Various factors affecting the chemiluminescence intensity of the system were investigated, and the condition of sulfuric acid, cerium (IV) sulfate and Rhodamine 6G etc was optimized. We have done research on all kinds of possible disturbers in the sample. The possible mechanism of the proposed method was also studied. The method is simple, convenient and sensitive. The linear relationship between the intensity of chemiluminescence and the concentration of rutin is over the range of 1.0×10^{-7} – 1.0×10^{-4} mol \cdot L⁻¹. The detection limit is 8.1×10^{-8} mol \cdot L⁻¹, the relative standard deviation is 1.5% for 11 measurements of 1.0×10^{-5} mol \cdot L⁻¹ standard solution. This method has been successfully applied to the determination of rutin in tablets with recoveries between 99.0% and 104.0%.

Keywords Flow injection; Chemiluminescence; Cerium(IV) sulfate; Rhodamine 6G; Rutin

(Received Dec. 16, 2005; accepted Mar. 18, 2006)