

鲁米诺-高锰酸钾化学发光法测定芦丁片中芦丁的含量

白瑞霞*, 索素异(郑州市第一人民医院, 郑州 450004)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)05-0460-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.05.28

摘要 目的:建立一种快速、灵敏地测定芦丁含量的新方法。方法:利用在碱性条件下,芦丁对鲁米诺-高锰酸钾体系有强烈的增强作用的原理,结合流动注射技术,建立了流动注射化学发光法检测芦丁的新方法;反应试剂的浓度分别为:鲁米诺(2.0×10^{-5} mol/L)、高锰酸钾(8.0×10^{-5} mol/L)、氢氧化钠溶液(0.05 mol/L),主泵(P_1)、副泵(P_2)流速分别为2.12、3.45 ml/min,光电倍增管负高压为600 V,采样时间为15 s。结果:芦丁的检测质量浓度线性范围为 $2.0 \times 10^{-9} \sim 2.0 \times 10^{-7}$ g/ml($r=0.999 1$),检出限为 8.3×10^{-10} g/ml,平均加样回收率为101.57%,RSD=1.69%($n=3$)。结论:该方法简单、快速、灵敏性高,为芦丁药物的质量控制和体内分析提供了一种新的检测方法。

关键词 流动注射化学发光法;芦丁;鲁米诺-高锰酸钾体系;含量测定

Content Determination of Rutin in Rutin Tablets by Luminol-potassium Permanganate Chemiluminescence Method

BAI Rui-xia, SONG Su-yi (Zhengzhou First People's Hospital, Zhengzhou 450004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a novel, rapid and sensitive method for the determination of rutin. METHODS: Rutin was found to enhance the chemiluminescence (CL) signal of luminol-potassium permanganate system in alkaline medium. Based on flow injection (FI), a new FI-CL method was developed for the determination of rutin. The concentrations of reagents were luminol (2.0×10^{-5} mol/L), potassium permanganate (8.0×10^{-5} mol/L), sodium hydrate (0.05 mol/L); the flow rates of pumps were set at 2.12 ml/min (P_1) and 3.45 ml/min (P_2) with negative high voltage of 600 V and sampling time of 15 s. RESULTS: The linear range of rutin was $2.0 \times 10^{-9} \sim 2.0 \times 10^{-7}$ g/ml ($r=0.999 1$) with average recovery of 101.57% (RSD=1.69, $n=3$). The detection limit was 8.3×10^{-10} g/ml. CONCLUSIONS: The method is convenient, rapid and sensitive, and can provide a new method for the quality control and product detection of rutin.

KEY WORDS Flow injection chemiluminescence; Rutin; Luminol-potassium permanganate; Content determination

芦丁,又称维生素P,是一种分布广泛的黄酮类化合物,主要存在于槐米、芸香、荞麦、沙棘等植物中,具有抗氧化、抗基因突变的保健功能,能降低毛细血管通透性和脆性,促进细胞增生和防止血细胞凝聚,还具有抗炎、抗过敏、利尿、解痉、镇咳、降血脂等方面的作用^[1]。目前测定芦丁含量的方法有分光光度法^[2]、荧光法^[3-4]、电化学法^[5]、红外光谱法^[6]、高效液相色谱法^[7-11]、毛细管电泳法^[12-13]等。化学发光法由于其灵敏度高、线性范围宽、仪器设备简单,越来越受到人们的青睐^[14]。化学发光法测定芦丁的文献^[15-17]也曾有报道,化学反应体系分别采用的是硫酸铈-高锰酸钾、铁氰化钾体系。笔者发现芦丁在碱性介质中能大大增强高锰酸钾氧化3-氨基邻苯二甲酰肼(鲁米诺)的化学发光强度,据此采用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^[15-17]中测定芦丁的化学发光法相比,本体系灵敏度高(高2个数量级),线性范围更宽,且有很好的选择性,成功地用于片剂中芦丁含量的测定。本法也可为芦丁的体内分析提供借鉴。

1 材料

IFFM-E型流动注射化学发光分析仪、IFFS-A型多功能化学发光检测器(西安瑞迈分析仪器有限公司);KQ-300DE

* 副主任药师。研究方向:药物分析、临床药学。E-mail: syy80617@163.com

型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100080-200707,纯度:92.5%);芦丁片(山西云鹏制药有限公司,批号:C111001、C111009、C111013,规格:每片20 mg);鲁米诺(上海百灵威化学技术有限公司,批号:L970K04,纯度:98%);高锰酸钾、氢氧化钠等均为分析纯,水为二次蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

芦丁对照品贮备液(1.0×10^{-4} g/ml):精密称取1 mg芦丁对照品,加水超声溶解,然后用水定容于10 ml量瓶中,4℃冰箱贮存,使用时按适当比例稀释成工作液;鲁米诺贮备液(1×10^{-3} mol/L):精密称取17.72 mg鲁米诺,用1 mol/L的氢氧化钠2 ml溶解,用水定容于100 ml棕色量瓶中,贮存于4℃冰箱中备用;高锰酸钾溶液(8×10^{-5} mol/L),每天新鲜制备。

芦丁样品溶液:准确称取20片芦丁于研钵中研细混匀,称量,求得每片的平均质量,然后准确称取片粉3.35 mg(约相当于1 mg芦丁质量的粉末),置于烧杯中,用温水溶解,超声振荡15 min,用水稀释并定容于100 ml量瓶中,混匀,精密吸取0.1 ml,置于100 ml量瓶中,用水稀释至刻度,混匀,过滤,即得。

2.2 试验流程、参数与化学发光动力学曲线

流动注射化学发光法流路如图1所示。

图1中管道为内径0.8 mm的聚四氟乙烯管(PTFE), R_1 、

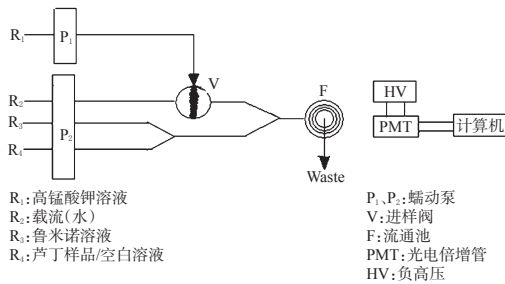


图1 流动注射化学发光法测芦丁流路示意图

Fig 1 Schematic diagram of rutin determined by FI-CL

R₂、R₃、R₄ 4个管道分别进高锰酸钾溶液、水、鲁米诺溶液和芦丁样品/空白溶液。将鲁米诺与芦丁混合后，由水载流再与高锰酸钾溶液混合，以水作空白得到发光强度 I₀，待空白稳定后将一定浓度的芦丁样品溶液注入，测定其发光强度 I_s。以 ΔI = (I_s - I₀) 与质量浓度 (c) 的线性关系进行定量。

结果，鲁米诺-高锰酸钾体系具有一定的化学发光强度；与水比较，芦丁的加入能明显增强鲁米诺-高锰酸钾体系的化学发光强度。其动力学曲线如图2所示。

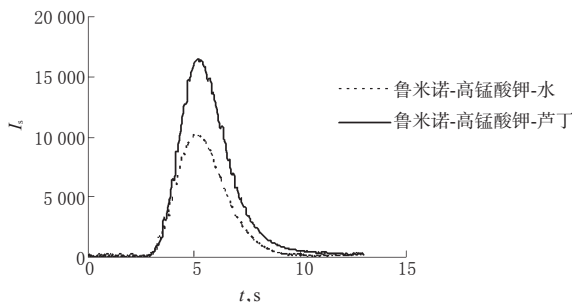


图2 化学发光动力学曲线

Fig 2 The kinetic curves of CL reactions

由图2可见，体系的化学发光强度在溶液混合3 s后迅速达到最大值，10 s后衰减至基线；加入芦丁后，发光动力学曲线与加入前基本相似，但发光强度大大增强。由此可见，芦丁加入鲁米诺-高锰酸钾体系的化学发光属于有较强增强作用的快速发光反应，本文正是基于此作用建立了芦丁流动注射增强化学发光的新分析方法。

2.3 发光条件的优化

2.3.1 反应介质浓度的选择。在鲁米诺溶液浓度为 2.0 × 10⁻⁵ mol/L、高锰酸钾溶液浓度为 8.0 × 10⁻⁵ mol/L、芦丁质量浓度为 1.0 × 10⁻⁷ g/ml 的条件下，考察了浓度分别为 0.008、0.01、0.02、0.04、0.05、0.08、0.1、0.2 mol/L 的反应介质(氢氧化钠溶液)对 ΔI 的影响，结果见图3。

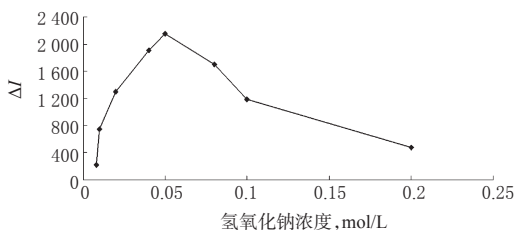


图3 氢氧化钠浓度对 ΔI 的影响

Fig 3 Effects of sodium hydrate concentrations on ΔI

由图3可见，在 0.008~0.05 mol/L 浓度范围内，ΔI 随氢氧

化钠浓度的增加而增大；在 0.05~0.2 mol/L 浓度范围内，ΔI 随氢氧化钠浓度的增加反而减小。故选择 0.05 mol/L 氢氧化钠作为最佳浓度。

2.3.2 鲁米诺浓度的选择。在该化学发光体系中，鲁米诺是还原剂，其浓度对化学发光强度有很大影响。测定鲁米诺浓度分别为 6.0 × 10⁻⁶、8.0 × 10⁻⁶、1.0 × 10⁻⁵、2.0 × 10⁻⁵、4.0 × 10⁻⁵、5.0 × 10⁻⁵、6.0 × 10⁻⁵ mol/L 时的化学发光强度。结果显示，ΔI 的增强值随着鲁米诺浓度的增加而增大，鲁米诺浓度在 2.0 × 10⁻⁵ mol/L 时 ΔI 最大。故选择鲁米诺的最佳浓度为 2.0 × 10⁻⁵ mol/L。

2.3.3 高锰酸钾浓度的影响。在反应体系中，高锰酸钾是氧化剂，可氧化鲁米诺产生化学发光，因此高锰酸钾的浓度是影响该体系化学发光强度的重要因素之一。固定芦丁的质量浓度为 1.0 × 10⁻⁷ g/ml、氢氧化钠的浓度为 0.05 mol/L、鲁米诺浓度为 2.0 × 10⁻⁵ mol/L，考察了高锰酸钾浓度为 1.0 × 10⁻⁵、2.0 × 10⁻⁵、4.0 × 10⁻⁵、5.0 × 10⁻⁵、6.0 × 10⁻⁵、8.0 × 10⁻⁵、1.0 × 10⁻⁴、2.0 × 10⁻⁴、3.0 × 10⁻⁴ mol/L 时对 ΔI 的影响。结果表明，高锰酸钾浓度为 8.0 × 10⁻⁵ mol/L 时，ΔI 最大。故选用此浓度作为试验的最佳浓度，详见图4。

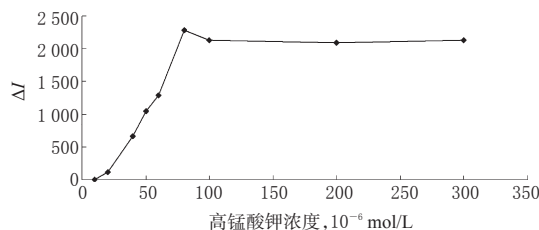


图4 高锰酸钾浓度对 ΔI 的影响

Fig 4 Effects of potassium hypermanganate concentrations on ΔI

2.3.4 光电倍增管的负高压。光电倍增管负高压分别为 300、400、500、600、700、800、900 V 时，随着光电倍增管负高压的增大，ΔI 逐渐增大，考虑到信号的稳定性及光电倍增管使用寿命，选择光电倍增管负高压为 600 V。

2.3.5 采样时间的选择。考察了采样时间在 5、10、15、20、25 s 时 ΔI 的变化。当采样时间为 15 s 时，空白值和样品值均稳定，信噪比最大。因此，在保证一定灵敏度的前提下，选择采样时间为 15 s。

2.3.6 流路及流速的选择。芦丁与鲁米诺混合溶液先混合进入采样环中，然后再与高锰酸钾溶液混合，由水作载流进入发光池，芦丁能够明显增强鲁米诺-高锰酸钾体系的发光信号，故采用此流路。在主泵(P₁)流速为 1.20、1.66、2.12、2.58、3.04、3.50 ml/min，副泵(P₂)流速为 1.6、2.52、3.45、4.27、5.04、5.81 ml/min 时，分别考察了主、副泵流速对发光强度的影响。结果表明，主泵(P₁)流速为 2.12 ml/min、副泵(P₂)流速为 3.45 ml/min 时发光强度最大且稳定。因此主(P₁)、副泵(P₂)流速分别选择为 2.12、3.45 ml/min。

2.4 含量测定方法学考察

2.4.1 线性关系与检测限考察。在上述优化条件下，对一系列浓度的芦丁对照品溶液进行测定，用水作空白得发光强度 I₀，待空白稳定后将质量浓度分别为 2.0 × 10⁻⁹、4.0 × 10⁻⁹、8.0 × 10⁻⁹、1.0 × 10⁻⁸、2.0 × 10⁻⁸、6.0 × 10⁻⁸、1.0 × 10⁻⁷、2.0 × 10⁻⁷ g/ml 的芦丁对照品溶液注入，测定其 I_s，以 ΔI = I_s - I₀ 定量。以质量浓度

(*c*)为横坐标, ΔI 为纵坐标, 结果在 $2.0 \times 10^{-9} \sim 2.0 \times 10^{-7}$ g/ml 质量浓度范围内, ΔI 与 *c* 呈良好的线性关系, 线性方程为 $\Delta I = 785.46 + 2.0 \times 10^{10}c$ ($r = 0.9991$, $n = 8$), 检测限为 8.3×10^{-10} g/ml。

2.4.2 精密度试验。制备 1.0×10^{-8} g/ml 的芦丁对照品溶液, 在“2.2”项的试验条件下, 重复进样 11 次, 测定其 ΔI , 得 RSD = 1.81% ($n = 11$), 表明方法精密度良好。

2.4.3 加样回收率试验。称取已知含量的样品 67.0 mg, 精密称定, 分别加入低、中、高一定量芦丁对照品, 按“2.1”及“2.2”项下方法操作, 测定芦丁的含量, 计算加样回收率。结果, 低、中、高样品平均加样回收率分别为 104.0%、98.3%、102.4%, 总平均值为 101.57%; RSD 分别为 0.57%、1.90%、2.61%, 总平均值为 1.69% ($n = 3$)。结果表明该方法准确可靠, 详见表 1。

表 1 回收率试验结果 ($n = 3$)

Tab 1 Results of recovery tests ($n = 3$)

样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	RSD, %
20.4	20.0	41.2	104.0	0.57
20.4	40.0	59.7	98.3	1.90
20.4	100.0	122.8	102.4	2.61

2.4.4 干扰试验。为了评价所建立方法的选择性, 在已优化的试验条件下, 考察了芦丁片中可能添加的组分对芦丁含量测定的干扰。选择使用 1.0×10^{-8} g/ml 的芦丁溶液, 当干扰水平不超过 $\pm 5\%$ 时认为不干扰。试验结果表明, 共存物的最大允许量分别为: 1 000 倍的 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 NH_4^+ 、 Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} ; 500 倍的淀粉、糊精; 200 倍的葡萄糖、甘露醇、蔗糖、乳糖; 100 倍的聚乙二醇、山梨醇; 10 倍的 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 。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

取 3 批芦丁片, 每批按“2.1”项下方法制备 5 份样品溶液, 按“2.2”项下方法进行化学发光法检测, 以 ΔI 计算含量; 同时按照卫生部质量标准用紫外分光光度法测定芦丁含量。结果表明, 用本法测定 3 批样品 (批号: C111001、C111009、C111013) 中芦丁的含量分别为标示量的 100.8%、99.82%、101.9%, 紫外分光光法的测定结果分别为 101.0%、99.91%、101.5%。2 种方法测定结果一致且均符合规定, 无显著性差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 流路的选择

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 4 个管道加入的反应试剂不同将影响反应的进程。前期试验中试验了 3 种不同流路对化学发光强度的影响, 结果选择 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 4 个管道分别加入高锰酸钾、水、鲁米诺和芦丁样品溶液时, 该流路发光信号比较稳定且 ΔI 值较大。

3.2 反应介质的选择

在反应介质的选择中, 分别采用相同浓度的氢氧化钠、碳酸氢钠、碳酸钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠和氢氧化钠-碳酸钠作为反应介质考察对信号强度的影响。结果表明, 用氢氧化钠溶液稀释鲁米诺溶液, 不仅可以增强鲁米诺-高锰酸钾体系的化学发光信号, 还可提高化学发光信号的重现性。

目前, 报道测定芦丁含量的方法如分光光度法、荧光法、高效液相色谱法及毛细管电泳法等或存在运行成本高, 或仪

器昂贵、耗时, 或专属性差等缺点, 且文献中报道的化学发光法测定芦丁含量时所用的反应体系及方法的灵敏度偏低。而本文所建立的新方法则避免了上述方法中的缺点, 能快速、准确、灵敏地对芦丁含量进行测定, 同时运行成本低, 可用于芦丁的质量控制和体内分析研究。

参考文献

- [1] Kuntic V, Pejic N, Ivkovic B, et al. Isocratic RP-HPLC method for rutin determination in solid oral dosage forms [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43(2): 718.
- [2] 蔡卓, 赵静, 江彩英, 等. 偏最小二乘紫外分光光度法同时测定复方芦丁片中 2 组分的含量 [J]. *中国药房*, 2009, 20(31): 2 454.
- [3] 牛承岗, 董川, 晋卫军, 等. 芦丁、丹皮酚固体表面延迟荧光分析法 [J]. *分析化学*, 2000, 28(1): 35.
- [4] 李改茹, 常军民, 程煜凤, 等. 荧光法测定维药刺糖中黄酮类化合物含量 [J]. *中国新药杂志*, 2010, 19(22): 2 103.
- [5] Zoulis NE, Efstathiou CE. Preconcentration at a carbon paste electrode and determination by adsorptive-stripping voltammetry of rutin and other flavonoids [J]. *Anal Chim Acta*, 1996, 320(2/3): 255.
- [6] 何书美, 乔兰侠, 刘敬兰. 红外光谱法测定芹菜叶提取物中总黄酮的含量 [J]. *分析科学学报*, 2008, 24(2): 201.
- [7] 孙银华. 双波长高效液相色谱法测定复方芦丁片中维生素 C 和芦丁的含量 [J]. *安徽医药*, 2012, 16(1): 30.
- [8] 马君义, 张申霞, 赵保堂. RP-HPLC 法测定不同厂家芦丁片和复方芦丁片中芦丁的含量 [J]. *西北师范大学学报*, 2010, 46(5): 74.
- [9] 林远凤, 黄燕萍. HPLC 法测定复方芦丁片中芦丁的含量 [J]. *黑龙江医药*, 2008, 21(2): 8.
- [10] 何翠薇, 覃洁萍, 黄俏妮. HPLC 法测定木薯叶中芦丁的含量 [J]. *中国药房*, 2011, 22(23): 2 160.
- [11] 陈鑫, 刘永刚, 王耀欣, 等. HPLC 法同时测定大枣中芦丁和酸枣仁皂苷 B 的含量 [J]. *中国药房*, 2010, 21(3): 247.
- [12] 隋因, 郭涛, 孙沂, 等. 高效毛细管电泳法测定心舒口服液腺苷、芦丁和阿魏酸的含量 [J]. *中国医院药学杂志*, 2005, 25(3): 233.
- [13] 孙莲, 阿合买提江, 马晓丽, 等. HPCE 法同时测定新疆药桑叶中芦丁、异槲皮苷、槲皮素与绿原酸的含量 [J]. *中国药房*, 2011, 22(23): 2 177.
- [14] 刘丽娟, 王辉, 梅林, 等. 流动注射-化学发光检测利福平 [J]. *药物分析杂志*, 2011, 31(11): 2 131.
- [15] 李利军, 钟招亨, 冯军, 等. 流动注射化学发光法测定芦丁 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, 27(8): 1 625.
- [16] 瞿鹏, 徐茂田. 流动注射化学发光法测定芦丁 [J]. *商丘师范学院学报*, 2004, 20(2): 106.
- [17] 李保新, 刘伟, 章竹君. 铁氰化钾化学发光体系测定芦丁 [J]. *分析化学研究简报*, 2001, 29(4): 428.

(收稿日期: 2012-05-17 修回日期: 2012-07-11)