

# N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)-二氯荧光素能量转移化学发光体系测定氯原酸的研究<sup>①</sup>

蒋邦龙<sup>1,2</sup>, 黄成<sup>2</sup>

1. 西南师大附中, 重庆 400700; 2. 西南大学 化学化工学院, 重庆 400715

**摘要:** 在碱性条件下, N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)氧化氯原酸, 在荧光染料二氯荧光素增敏作用下发生化学发光。基于此现象, 结合流动注射技术, 建立了测定痕量氯原酸的流动注射化学发光分析法。在优化的实验条件下, 氯原酸浓度在  $2.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2}$  mg/L 范围内与发光强度呈线性关系( $\Delta I = 1324.7 C + 56.9, C: \text{mg/L}, r^2 = 0.9979$ ), 检出限( $3\sigma$ )为  $1.1 \times 10^{-4}$  mg/L, 对  $5.0 \times 10^{-3}$  mg/L 苯酚 9 次平行测定, 相对标准偏差(RSD)为 3.5%。将该方法用于对药物制剂中氯原酸的测定, 结果令人满意。

**关键词:** 流动注射化学发光; N-溴代琥珀酰亚胺; 氯原酸; 能量转移

**中图分类号:** O657.39

**文献标识码:** A

氯原酸(Chlorogenic acid), 又名咖啡鞣酸, 是杜仲、金银花等多种中草药及其配伍中成药(如银翘解毒片)中抗菌消炎的有效成分之一, 其含量的多少已成为上述中药及其制剂的质量控制指标。目前, 氯原酸测定常用的方法主要包括紫外可见分光光度法<sup>[1]</sup>、荧光分析法<sup>[2]</sup>、红外光谱法<sup>[3]</sup>、电化学分析法<sup>[4]</sup>、高效液相色谱法<sup>[5-7]</sup>及毛细管电泳法<sup>[8-9]</sup>等。紫外可见分光光度法通常灵敏度不高; 电化学分析法则往往要对电极进行特殊的改性然后才能进行测定; 高效液相色谱法仪器相对昂贵, 检测成本高。近年来, 化学发光法由于往往具有检测线性范围宽、检测灵敏度高、仪器结构简单等特点, 在药物分析领域中发挥了重要作用。目前已有化学发光法测定氯原酸的报道, 例如, Wang<sup>[10]</sup>等人最近利用酸性高锰酸钾-甲醛-氯原酸发光体系用于对水果中氯原酸的测定。He C X<sup>[11]</sup>等人利用氯原酸抑制鲁米诺(Luminol)-铁氰化钾发光这一现象, 建立了一种测定烟草中氯原酸的方法。

我们研究发现, N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)在氢氧化钠碱性介质条件下, 可以氧化氯原酸产生微弱的发光, 而体系中添加二氯荧光素染料后可以大大提高发光强度, 并提高分析方法灵敏度。结合流动注射分析技术, 建立起对氯原酸的快速检测方法, 并成功用于对药剂中氯原酸的测定。

## 1 材料与实验方法

### 1.1 仪器与试剂

实验采用的流动注射化学发光分析系统结构组成如图 1 所示, 主要由 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)、HL-2 型恒流泵(上海青浦沪西仪器厂)、进样阀、流通池及连接各部分的管路(内径均为 0.8 mm)组成。实验数据的采集和处理均由 Windows 2000 系统下的 IFFM 分析仪配套软件完成。

氯原酸标准储备液(50.0 mg/L): 称取 5.0 mg 标准对照品(中国药品生物制品检定所), 二次水溶解,

① 收稿日期: 2007-03-12

作者简介: 蒋邦龙(1972-), 男, 重庆铜梁人, 教育硕士, 主要从事发光分析和化学教育。

滴加 5.0 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液, 然后定容至 100 mL 棕色容量瓶中, 4 °C 保存, 使用时逐级稀释; N-溴代琥珀酰亚胺溶液( $5.0 \times 10^{-2}$  mol/L); 准确称取 0.890 g N-溴代琥珀酰亚胺二次水溶解, 定容至 100 mL 棕色容量瓶中, 4 °C 保存, 使用时稀释至所需浓度. 荧光染料溶液: 用浓度为 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液分别配制浓度为  $5.0 \times 10^{-3}$  mol/L 荧光染料(荧光素、二氯荧光素、罗丹明 B 和罗丹明 6G)溶液备用, 实验中再以不同浓度的酸碱介质溶液进行稀释. 其余试剂均为分析纯, 水为二次蒸馏水.

## 1.2 实验方法

分别将试样、载流(二次水)、N-溴代琥珀酰亚胺溶液以及荧光物质溶液, 通过相应的管道输入分析系统, 待基线稳定后, 通过进样阀注入样品溶液, 记录反应的发光信号. 以相对峰高定量.

## 2 结果与讨论

### 2.1 条件优化

初步实验表明, N-溴代琥珀酰亚胺化学发光体系用于对氯原酸测定时, 受到荧光染料种类及其浓度、N-溴代琥珀酰亚胺浓度、介质条件、流速等因素的影响, 因此对上述条件进行逐一优化, 以期获得最佳分析条件.

#### 2.1.1 荧光物质的影响

实验表明, 荧光染料物质的种类及其浓度是该发光体系重要的影响因素, 因此选取包括罗荧光素、二氯荧光素、丹明 B 和罗丹明 6G 在内的常见 4 种荧光染料进行对照实验, 并对荧光染料的最佳浓度分别进行了筛选, 实验结果见表 1. 从该表中可以看出, 上述 4 种荧光染料均对该发光体系有不同程度的增强作用, 且他们的增强发光的最佳浓度不尽相同. 总体上, 二氯荧光素对发光体系的增强作用是最明显的, 其最佳浓度为  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L, 因此选择上述浓度的二氯荧光素作为该发光体系的最佳荧光物质条件.

表 1 荧光物质对发光强度的影响

荧光染料	最佳浓度	相对发光强度
无荧光染料	—	1.0
二氯荧光素	0.2	71.5
荧光素	0.1	11.3
罗丹明 B	0.1	19.8
罗丹明 6G	0.1	20.1

#### 2.1.2 N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)浓度的影响

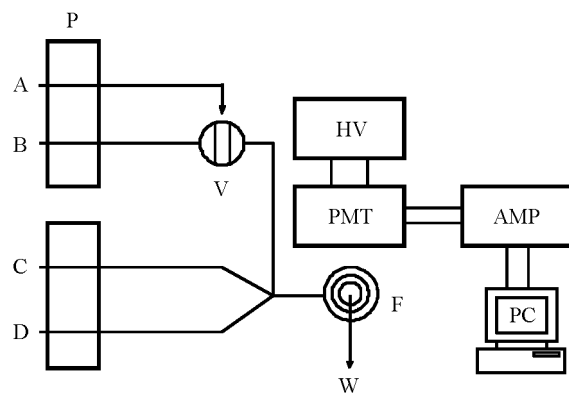
N-溴代琥珀酰亚胺浓度是该发光体系的又一重要参数, 实验中我们详细考察了 N-溴代琥珀酰亚胺在  $5.0 \times 10^{-5} \sim 5.0 \times 10^{-5}$  mol/L 浓度范围内对发光强度的影响情况. 结果表明, 不同浓度的 N-溴代琥珀酰亚胺浓度对该发光体系具有很大的影响, 并且该发光强度随 N-溴代琥珀酰亚胺浓度增加而增大, 当 N-溴代琥珀酰亚胺浓度  $2.0 \times 10^{-4}$  mol/L 发光强度达到最大, 超过  $2.0 \times 10^{-4}$  mol/L 时, 发光强度逐渐减弱(图 2). 因此, 我们选用  $2.0 \times 10^{-4}$  mol/L 作为 N-溴代琥珀酰亚胺最佳浓度条件.

#### 2.1.3 介质条件选择

我们分别以 0.1 mol/L 的硫酸、盐酸、乙酸、氢氧化钠、氢氧化钾和氨水为反应介质, 考察上述介质对该发光体系的影响, 结果表明, 只有在碱性介质条件下才有发光现象产生. 我们以氢氧化钠为研究对象, 详细考察了不同浓度氢氧化钠介质(0.02~0.2 mol/L)对该发光体系的影响. 实验表明, 在 0.02~0.07 mol/L 氢氧化钠浓度范围内, 该体系发光强度随着氢氧化钠浓度的增加而增强, 当其超过 0.07 mol/L 时则成逐渐下降趋势, 因此选用氢氧化钠的浓度为 0.07 mol/L 为最佳介质条件(图 3).

#### 2.1.4 流速的影响

在流动注射分析中, 流速往往对化学发光强度具有一定的影响, 因此对载流、N-溴代琥珀酰亚胺溶液



A: 样品; B: 载流; C: N-溴代琥珀酰亚胺; D: 二氯荧光素 + NaOH; P: 蠕动泵; V: 进样阀; F: 流通池; W: 废液; PMT: 光电倍增管; HV: 负高压; AMP: 放大器; PC: 计算机

图 1 流动注射化学发光分析装置示意图

和二氯荧光素溶液流速均进行了筛选, 实验结果表明, 当上述 3 个流路流速分别为 1.5, 1.0 和 2.0 mL/min 时, 获得最大发光强度, 因此选择上述流速作为最佳分析条件.

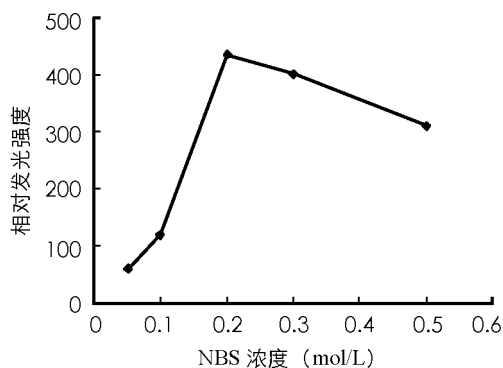


图 2 N-溴代琥珀酰亚胺浓度对发光强度的影响

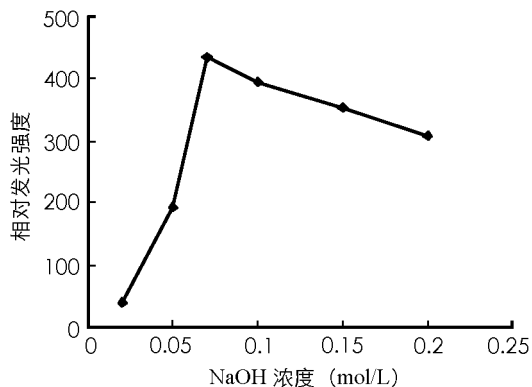


图 3 NaOH 浓度对发光强度的影响

## 2.2 分析特性

在选定的最佳条件下, 氯原酸浓度在  $2.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2}$  mg/L 范围内与发光强度呈良好线性关系, 其标准曲线为  $\Delta I = 1324.7 C + 56.9 (r^2 = 0.9979)$ . 根据 IUPAC 建议, 计算得其检出限为  $1.1 \times 10^{-4}$  mg/L ( $3\sigma$ ), 对  $5.0 \times 10^{-3}$  mg/L 氯原酸 9 次平行测定, 相对标准偏差(RSD)为 3.5%.

## 2.3 共存物影响

在选定的最佳条件下, 试验了药剂中常见组分及一些可能共存组分的干扰情况. 当控制测量误差在 5% 以内时, 结果表明, 对  $2.0 \times 10^{-3}$  mg/L 氯原酸的测定, 500 倍的  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{HCO}_3^{2-}$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Br}^-$ , 100 倍的  $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、淀粉、柠檬酸、葡萄糖、蔗糖及乳酸, 10 倍的  $\text{Sn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ , 等倍的  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  不干扰.

## 3 样品分析

参照药典[12]处理方法, 取 30 片某制药厂生产的银翘解毒片, 去糖衣, 然后研磨, 准确称取 3 份试样(每份均为 0.5 g, 准确至 0.3 mg), 加 20 mL 无水乙醇, 浸泡 15 min, 然后超声振荡 10 min, 静置, 过滤. 合并滤液, 加二次水定容至 50 mL. 测定时, 逐级稀释至测定的线性范围, 按本文所述方法测定其氯原酸含量. 并对上述 3 份样品进行加标回收实验, 结果表明, 本方法用于对银翘解毒片中氯原酸的测定是可靠的(表 2), 该方法具有简单、快速和灵敏等优点.

表 2 银翘解毒片中氯原酸测定结果

样品编号	测定值 (mg/g) *	加入量 (mg/g)	回收测定值 (mg/g)	回收率 (%)
1	$5.02 \pm 0.09$	1.20	6.28	105
2	$4.39 \pm 0.18$	2.05	6.51	103
3	$5.21 \pm 0.21$	3.13	8.26	97

\* 平均值  $\pm$  SD, n=3

## 参考文献:

- [1] 马柏林, 董娟娥, 梁淑芳, 等. 纸色谱分离和分光光度法测定氯原酸[J]. 分析化学, 2001, 29(7): 868-868.
- [2] 白小红, 魏雁声, 齐竹华, 等. 反相胶束增稳室温荧光法测定中药痕量有效成分氯原酸的研究[J]. 分析试验室, 1999, 18(1): 35-37.
- [3] Shao X G, Zhuang Y D. Determination of chlorogenic acid in plant samples by using near-infrared spectrum with wavelet transform preprocessing[J]. Analytical Sciences, 2004, 20 (3): 451-454.
- [4] Namazian M, Zare H R. Electrochemistry of chlorogenic acid: experimental and theoretical studies [J]. Electrochimica Acta, 2005, 50 (22): 4350-4355.
- [5] Zhang Q L, Li J, Wang C, et al. A gradient HPLC method for the quality control of chlorogenic acid, linarin and luteo-

- lin in Flos Chrysanthemi Indici suppository [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, 43 (2): 753 – 757.
- [6] Gao R, Zheng Q, Gong T, et al. Gradient high-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of chlorogenic acid and baicalin in plasma and its application in the study of pharmacokinetics in rats [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, 43 (1): 335 – 340.
- [7] Yuan X D, Koh H L, Chui W K. A high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of arctiin, chlorogenic acid and glycyrrhizin in a Chinese proprietary medicine [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005, 39 (3–4): 697 – 704.
- [8] Yan J W, Wang M, Lu J D. Determination of rutin, quercetin, and chlorogenic acid in mulberry leaves by capillary zone electrophoresis[J]. Analytical Letters, 2004, 37 (15): 3287 – 3297.
- [9] Han S Q. Capillary electrophoresis with chemiluminescence detection of rutin and chlorogenic acid based on its enhancing effect for the luminol–ferricyanide system[J]. Analytical Sciences, 2005, 21 (11): 1371 – 1374.
- [10] Wang X X, Wang J W, Yang N J. Chemiluminescent determination of chlorogenic acid in fruits [J]. Food Chemistry, 2007, 102 (1): 422 – 426.
- [11] He C X, Cui H, Zhao G W. The determination of chlorogenic acid in cigarettes by inhibited chemiluminescence analysis [J]. Analytica Chimica Acta, 1997, 351 (1–3): 241 – 246.
- [12] 中国药典委员会编, 中华人民共和国药典[S]. 北京: 化学工业出版社, 1995: 596.

## Determination of Chlorogenic Acid with a Flow Injection Chemiluminescence Method Based on N-bromosuccinimide and Dichlorofluorescein

JIANG Bang-Long<sup>1,2</sup>, HUANG Cheng<sup>2</sup>

1. High School Attached to Southwest University, Chongqing, 400700, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing, 400715, China

**Abstract:** A simple, sensitive flow injection chemiluminescence method for the determination of chlorogenic acid was developed in the present paper. The method is based on the chemiluminescence (CL) reaction of chlorogenic acid with N-bromosuccinimide in a sodium hydroxide medium, sensitized by the fluorescent dye dichlorofluorescein. The proposed procedure allows quantitation of chlorogenic acid in the concentration range of  $2.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2}$  mg/L ( $\Delta I = 1324.7 C + 56.9$ ,  $C$ : mg/L,  $r^2 = 0.9979$ ), with a detection limit of  $1.1 \times 10^{-4}$  mg/L ( $3\sigma$ ). The relative standard deviation (RSD) is 3.5% for  $5.0 \times 10^{-3}$  mg/L chlorogenic acid ( $n=9$ ). The method applied to the determination of chlorogenic acid in pharmaceutical preparations gave satisfactory results.

**Key words:** flow injection chemiluminescence; N-bromosuccinimide; chlorogenic acid; energy transfer

责任编辑 欧 宾