

反相流动注射-化学发光法测定氢化可的松

范顺利^{*1} 李 薇¹ 林金明¹ 王学锋²

¹(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

²(河南师范大学化学与环境科学学院, 河南省环境污染控制重点实验室, 新乡 453002)

摘 要 在碱性介质中, 氢化可的松可被 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 氧化产生化学发光, 奎宁对此发光反应有显著的增敏作用。据此, 建立了反相流动注射-化学发光法测定氢化可的松的新方法。方法的线性范围和检出限分别为 0.05~50 mg/L 和 0.02 mg/L, 相对标准偏差($n=11$, $C=1.0$ mg/L)为 0.9%。方法用于药物中氢化可的松含量的测定, 结果与标准方法分光光度法测定结果吻合

关键词 反相流动注射, 化学发光, 氢化可的松

1 引 言

氢化可的松(Hydrocortisone, 简称为 Hd)为临床上常用的抗炎甾体类激素药物。目前, 测定氢化可的松的方法主要有分光光度法^[1~3]、荧光光度法^[4,5]、高效液相色谱法^[6~8]及毛细管电泳法^[9]等, 用化学发光法测定氢化可的松虽有文献报道^[10,11], 但均是基于甾类有机物对 $\text{Ce}(\text{C})\text{SO}_3^{2-}$ 化学发光体系的增敏作用建立的, 选择性较差, 测定范围及灵敏度也不够理想, 单独测定氢化可的松尚须配合高效液相色谱等分离手段。研究发现, 在 NaOH 碱性介质中, 铁氰化钾可以直接氧化氢化可的松产生化学发光, 奎宁对该反应具有显著的增敏作用。据此, 提出了一种测定氢化可的松的化学发光新体系。并结合反相流动注射技术, 建立起一种直接测定氢化可的松的新方法。该方法简单, 测定快速, 与文献报道的利用 $\text{Ce}(\text{C})\text{SO}_3^{2-}$ 发光体系测定氢化可的松的方法相比, 灵敏度高出近两个数量级, 且测定范围大, 选择性有一定改善。无须采取预分离措施, 用于药物中氢化可的松含量的测定, 结果满意。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

BPCL 微弱发光测量仪(中国科学院生物物理研究所); IFFL-D 型智能流动注射化学发光分析仪(西安瑞科电子有限公司)。氢化可的松标准储备液(100 mg/L): 在体积分数为 20% 的乙腈溶液中, 用氢化可的松对照品(中国药品生物制品检定所)配制; 铁氰化钾储备液: 5.0×10^{-2} mol/L; NaOH 溶液: 1.5 mol/L; 奎宁储备液(1.0×10^{-2} mol/L): 用 0.1 mol/L 的硫酸配制。其余试剂均为分析纯, 水为二次去离子水。

2.2 实验方法

按图 1 所示, 铁氰化钾由八通阀定量注入(75 μL)经三通混合的待测氢化可的松和 NaOH 载流中进行化学发光反应, 光电倍增管检测发光信号, 相对发光强度与氢化可的松浓度成正比。

3 结果与讨论

3.1 化学发光的动力学特性实验及机理探讨

采用 BPCL 微弱发光测量仪进行了 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -氢化可的松-奎宁化学发光反应的动力学特性实验: 用注射器将 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 注入到 NaOH 和分析试液的混合液中, 发现该反应体系在进样 2 s 后开始发光, 5 s 发光信号达到最大值, 11 s 发光信号衰减为零, 表明该发光反应为快反应; 研究还发现, 在碱性溶液中, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 分别氧化氢化可的松及奎宁时, 均有一定程度的发光, 但在氧化氢化可的松的反应

中加入一定量的奎宁可大大增强发光强度,说明奎宁对该发光反应具有显著的增敏作用。据文献[12]报道,在铁氰化钾氧化有机物的化学发光反应中,其发光体为有机物的氧化产物。在乙腈溶液中,氢化可的松没有荧光性,而可的松和奎宁均是荧光性较强的化合物^[13],据此可推断该发光反应的反应机理是氢化可的松的氧化产物可的松首先吸收反应所放出的化学能而被激发,激发态的可的松再将能量传递至荧光性更强的奎宁,使后者发出更强的光。

3.2 有机溶剂的选择

甾类化合物不溶于水,能溶于乙腈、甲醇和氯仿,微溶于丙酮。实验考察了丙酮、甲醇和乙腈对该体系发光强度的影响,结果表明:用体积分数为 20% 的乙腈溶液作溶剂时发光强度最大,结果见表 1。

3.3 增敏剂的选择及其浓度影响

考察了十二烷基磺酸钠、奎宁、罗丹明 B、罗丹明 6G 及 8-羟基喹啉等常用增敏剂对该发光体系的影响,结果表明(表 1):奎宁对该发光体系有显著的增敏作用。奎宁浓度对发光强度的影响如图 2 所示。综合考虑增强作用与空白信号两方面的因素,实验选择奎宁的浓度为 4.0×10^{-5} mol/L。

表 1 有机溶剂和增敏剂对化学发光强度的影响

Table 1 Effect of organic solvents and different sensitizers on the CL intensity

有机溶剂 Organic solvents	体积分数(%) Volume scores	相对发光强度 Relative CL (I_{CL})	增敏剂 (4.0×10^{-5} mol/L) Sensitizers	相对发光强度 Relative CL (I_{CL})
CH ₃ OH	10	29	8-羟基喹啉 Oxine	2
CH ₃ COCH ₃	10	55	十二烷基磺酸钠 Sodium dodecyl sulfonate	16
CH ₃ CN	10	212	罗丹明 B Rhodamine B	22
	20	258	罗丹明 6G Rhodamine 6G	79
			奎宁 Quinine	256

注(note): 氢化可的松浓度(concentration of hydrocortisone): 1.0 mg/L

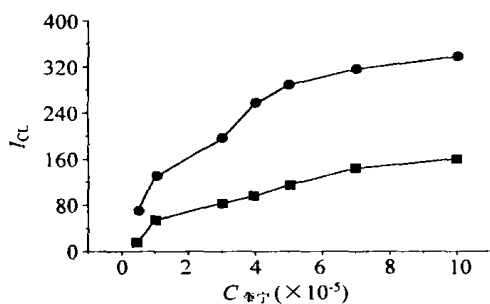


图 2 奎宁浓度对发光强度的影响

Fig. 2 Effect of quinine concentration on CL intensity

(■) 空白信号 (blank signal); (●) 发光信号 (luminescence signal).
 $C_{K_3Fe(CN)_6} = 5.0 \times 10^{-4}$ mol/L, $C_{NaOH} = 4 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{Hd} = 1.0$ mg/L.

3.4 NaOH 浓度的影响

铁氰化钾与氢化可的松的反应需在碱性介质中进行,适当浓度的 NaOH 可加快反应速度,提高化学发光的强度。当 NaOH 浓度大于 1.5 mol/L 时,发光强度趋向平稳。实验选择 NaOH 浓度为 1.5 mol/L。

3.5 铁氰化钾浓度的影响

实验表明, $K_3Fe(CN)_6$ 浓度在 $0 \sim 2.0 \times 10^{-4}$ mol/L 范围内化学发光强度随铁氰化钾浓度的增大而

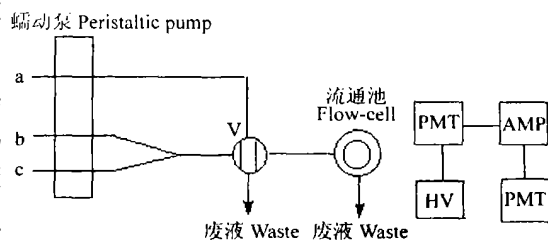


图 1 流动注射化学发光反应测定的实验装置图

Fig. 1 Schematic diagram of the flow injection chemiluminescence (CL) assembly

a. $K_3Fe(CN)_6$; b. 分析试液(氢化可的松+奎宁)(sample; hydrocortisone + quinine); c. NaOH; V. 八通阀(eight-way valve); PMT. 光电倍增管(photomultiplier tube); AMP. 放大器(amplifier); HV. 负高压(negative high voltage); REC. 记录仪(reconder).

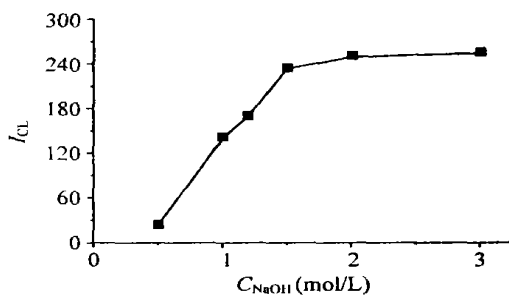


图 3 NaOH 浓度对发光强度的影响

Fig. 3 Effect of NaOH concentration on CL intensity

$C_{K_3Fe(CN)_6} = 5.0 \times 10^{-4}$ mol/L, $C_{奎宁} = 4 \times 10^{-5}$ mol/L,
 $C_{Hd} = 1.0$ mg/L.

迅速增大。当其浓度为 $2.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-3}$ mol/L 时发光强度最大且稳定;浓度大于此范围时发光强度又有所降低,这可能是铁氰化钾溶液的黄色增加了对光能的吸收。实验选择的铁氰化钾浓度为 5.0×10^{-4} mol/L。

实验表明,采用反相流动注射技术定量注入 $K_3Fe(CN)_6$ 时,发光信号稳定且灵敏度高。当流速为 2.8 mL/min,输液管内径为 0.8 mm,采样环长度为 15 cm (75 μ L) 时,发光信号最大且有最佳信噪比。

3.6 校准曲线、检出限和精密度

在选定的最佳实验条件下,氢化可的松浓度 C (mg/L) 在 0.05 ~ 50 mg/L 范围内与发光强度 I_{CL} (相对发光强度单位) 呈良好的线性关系,为提高测定精密度,校准曲线分段绘制,回归方程的基本参数列于表 2。对 1.0 mg/L 氢化可的松标准溶液连续 11 次测定,相对标准偏差为 0.9%。根据 IUPAC 建议,计算该方法的检出限为 0.02 mg/L。

3.7 干扰实验

在选定的实验条件下,对 1.0 mg/L 氢化可的松,以相对误差小于 5%,考察了一些常见组分及共存组分对其测定的影响。结果表明,1000 倍的 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 SO_4^{2-} 、 Cl^- 、 CN^- 、 NO_3^- , 200 倍的 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 NH_4^+ 、 Br^- 、 CO_3^{2-} , 100 倍的 SO_3^{2-} 、醋酸根、淀粉、糊精、乳糖、半乳糖,50 倍的葡萄糖、果糖,30 倍的维生素 C、明胶、聚乙二醇 4000,10 倍的蔗糖、对苯二酚,5 倍的 Hg^{2+} 不干扰测定。

3.8 样品分析

取数支氢化可的松针剂(标示量 5 g/L),用体积分数为 20% 的乙腈稀释定容,准确移取稀释后的待测溶液适量按照实验方法进行测定,并与标准方法分光光度法^[1]测定结果进行了对照,同时做标准加入回收实验,结果见表 3。

表 3 针剂中氢化可的松含量的测定 ($n=6$)

Table 3 Determination results of hydrocortisone in injection samples ($n=6$)

样品 Samples	分光光度法 Spectrophotometry (g/L)	本方法 FF-CL (g/L)	加标量 Added (g/L)	测得总量 Total found (g/L)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
Inj. 1	5.01	4.96	1.0	5.98	102.0	0.8
Inj. 2	5.09	5.12	2.0	7.09	98.5	1.0

References

- Editorial Committee of Pharmacopoeia of People's Republic of China(中华人民共和国药典委员会). *The Pharmacopoeia of People's Republic of China* (Vol. 2)(中华人民共和国药典,二部). Beijing(北京): People's Health Press(人民卫生出版社), 1990: 382
- Li Menglong(李梦龙), Qiu Ximin(邱细敏), Shi Leming(石乐明). *Chinese J. Anal. Lab.* (分析实验室), 1991, 10 (2): 20~27
- Lemus Gallego J M, Perez Arryo J. *Anal. Chima. Acta*, 2002, 460: 85~97
- Fenske M. *Chromatographia.*, 1998, 47(11-12): 695~700
- Portugal H, Pauli A M, Pascor J. *Analyst*, 1988, 16(1): 63~67
- Sudo A. *J. Chromatogr.*, 1990, 528: 453~461
- Nozaki O, Ohata T, Ohba Y. *J. Chromatogr.*, 1991, 570: 1~11
- Doppenschmitt S A, Scheidel B, Harrison F, Surmann J P. *J. Chromatogr. B*, 1996, 682: 79~88
- Min J, Wen R J. *Chinese Chemical Letters*, 2002, 13(9): 867~870
- Nikolaos T D, Antony C C. *Anal. Chima. Acta*, 1994, 290: 190~200
- Wu Yingchun(吴迎春), Liu Qianguang(刘谦光), Wang Yiqun(王亦群), Lai Puhui(赖普辉), Sun Wenji(孙文基).

Chinese J. Anal. Lab. (分析实验室), **2000**, 19(6): 30~32

12 Li Baoxin (李保新), Liu Wei (刘伟), Zhang Zhujun (章竹君), *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2001**, 29(4): 428~430

13 Iglesias Y, Fente G, Vazquez B I, Franco G, Cepeda A, Mayo S. *Anal. Chima. Acta*, **2002**, 468: 43~52

Reverse Flow Injection Chemiluminescence Determination of Hydrocortisone

Fan Shunli^{*1}, Li Wei¹, Lin Jinming¹, Wang Xuefeng²

¹(Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085)

²(Henan Key Laboratory for Environmental Pollution Control, College of Chemistry and Environmental Science, Henan Normal University, Xinxiang 453002)

Abstract A new reverse flow injection chemiluminescence (CL) method for the determination of hydrocortisone is described. The method is based on CL reaction of hydrocortisone with hexacyanoferrate (B) intensely sensitized by quinine in alkaline medium. The linear range of the method is 0.01~50 mg/L and the detection limit is 0.02 mg/L. The RSD ($n=11$, $c=1.0$ mg/L) is 0.9%. The method has been used to determine hydrocortisone in medicine. The results accord with those of spectrophotometric method.

Keywords Reverse flow injection, chemiluminescence, hydrocortisone

(Received 11 September 2003; accepted 14 June 2004)

2005年第九届全国化学传感器学术会议邀请及征文通知 (第一轮通知)

中国仪器仪表学会分析仪器学会、中国化学会、江苏省化学化工学会应用化学专业委员会定于2005年4月8~11日在扬州市召开“第九届全国化学传感器学术交流会”，由扬州大学、湖南大学、上海师范大学和江苏电分析仪器厂联合承办。

本次会议将邀请国内从事化学传感器研究的著名科学家及中青年学者参加，会议在全国范围内开展征文，欢迎投送论文并到会交流。会议论文经审阅通过后在中国仪器仪表学会主办的《化学传感器》专业期刊上公开出版发行。有关征文事宜通知如下：

一、征文范围

1. 化学及生物传感器进展评述；2. 化学传感技术基础理论；3. 新型敏感材料；4. 新型化学传感器研究(离子敏；气敏；光敏；生物敏；温敏；热敏；电化学压电晶体及表面声波；基于微生物技术的薄膜及厚膜传感器等)；5. 化学传感器在各领域的新应用；6. 敏感器件制造技术；7. 传感器的信号处理；8. 化学传感器的产业化；9. 其它。

二、征文要求

1. 作者应提交电子版论文的详细摘要，其中包括题目(附英文)、作者、单位、主要结果和讨论、主要参考文献，全文不超过2页(含图表)，请用A4纸、小四号字体打印。论文务必提供稿件联系人的电话、通讯地址、E-mail地址；2. 应征论文发至：fenxi@yzu.edu.cn 或 xyhu@yzu.edu.cn，截稿日期2005年2月28日；3. 已在刊物上发表或全国会议上报告过的论文不在应征之列。

三、会议内容

1. 学术论文报告会；2. 促进产、学、研等方面的国内外联系及推广、研讨新技术，加强国内外合作；3. 交流、展示有关资料、专利、产品和技术成果；4. 会后组织与会者进行参观考察。

四、会议地点

江苏扬州市四望亭路180号，扬州大学

会议联系人：江苏省扬州大学瘦西湖校区化学化工学院，邮编：225002 联系人：张俊桂、胡效亚(教授)

Tel: 0514-7975568, 7975587 Fax: 0514-7975244 E-mail: fenxi@yzu.edu.cn, xyhu@yzu.edu.cn

中国分析仪器学会化学传感器专业委员会