

文章编号: 1000-7032(2012)05-0558-04

# 荜茇宁与邻硝基苯基荧光酮的荷移反应及其测定

敖登高娃\*, 安娜, 领小, 苗澍

(内蒙古大学 化学化工学院, 内蒙古 呼和浩特 010021)

**摘要:** 建立了一种测定荜茇宁的方便快捷的荷移分光光度法。荜茇宁和邻硝基苯基荧光酮在中性三酸缓冲液中发生电荷转移反应, 荷移络合物在 515 nm 处有最大吸收, 表观摩尔吸光系数为  $6.571 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。该络合物的组成是 1:1, 药物质量浓度在 0.054 6 ~ 10.92  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内服从比尔定律, 检出限为 0.015 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。对反应机理进行了初步探索, 并利用本方法对生物样品中的荜茇宁进行了加标回收, 回收率为 99.8% ~ 100.9%, 相对标准偏差(RSD)为 0.90%。

**关键词:** 电荷转移反应; 邻硝基苯基荧光酮; 荜茇宁; 分光光度法

中图分类号: O657.32

文献标识码: A

DOI: 10.3788/fgxb20123305.0558

## Spectrophotometric Determination of Piperlonguminine Based on The Charge Transfer Reaction Between Piperlonguminine and *o*-Nitrophenyl Fluorone

AODENG Gaowa\*, AN Na, LING Xiao, MIAO Shu

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

\* Corresponding Author, E-mail: hxgaowa@126.com

**Abstract:** A rapid and convenient spectrophotometric method for the determination of piperlonguminine was established in the present work. The method utilized charge transfer reaction between piperlonguminine and *o*-nitrophenyl fluorone in pH 7.00 buffer solution. The maximum absorption wavelength of the charge transfer complex was at 515 nm and the apparent molar absorptivity was  $6.571 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  with a 1:1 stoichiometry. Beer's law was obeyed in the range of 0.054 6 ~ 10.92  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of piperlonguminine with the detection limit of 0.015 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The reaction mechanism was discussed preliminarily. The proposed method was applied to the biological and urine samples spiked with standard piperlonguminine solution. The recovery of the samples was within the range of 99.8% ~ 100.9% and relative standard deviation (RSD) was 0.90%.

**Key words:** charge transfer reaction; *o*-nitrophenyl fluorone; piperlonguminine; spectrophotometry

### 1 引 言

荜茇(Long pepper)是胡椒科植物荜茇(Piper-

longum L.)的未成熟果穗,是常用的中、蒙、藏药。具有温中散寒、理气止痛之功效。荜茇宁(Piperlonguminine)是从荜茇中经提取分离获得的胡椒

收稿日期: 2011-12-01; 修订日期: 2012-03-16

基金项目: 国家自然科学基金(20965004); 内蒙古自然科学基金(2010BS1203)资助项目

作者简介: 敖登高娃(1956-), 女, 内蒙古锡林浩特人, 教授, 主要从事药物分析方面的研究。

E-mail: hxgaowa@126.com

碱类衍生物,具有明显的降血脂作用<sup>[1-2]</sup>。但迄今为止都没有发现能有效地测定其在生物样品中含量的文献。

生物体光学检测已应用于体内药物含量与代谢作用的研究。我国这一方面的未来发展方向上,应着力发展新的分析检测技术与方法,特别是应用于解决一系列化学药、蒙药、中药、生物技术药等质量控制所面临的关键问题的新原理和新技术<sup>[3]</sup>。

本文在实验室合成萆苈宁对照品的基础上,首次对萆苈宁的显色反应进行研究,建立了分光光度法检测的新方法,具有简便快速、灵敏度高的优点。利用本方法对生物样品中的萆苈宁进行了加标回收,回收率为99.8%~100.9%,有望测定生物样品中萆苈宁的含量。

## 2 实验

### 2.1 仪器与试剂

仪器:紫外可见分光光度计 UV-3400(日本日立);pHS-3C 型酸度计(上海第二分析仪器厂);数显恒温水浴锅 HH-S(金坛市医疗机械厂)等。

试剂:邻硝基苯基荧光酮(上海长科试剂研究所)乙醇溶液,10 mmol/L 的储备溶液,1 mmol/L 的工作液溶液;萆苈宁对照品(自制,99.9%)乙醇溶液,1 mmol/L 的储备溶液,0.1 mmol/L 的工作液;三酸缓冲溶液( $H_3PO_4$ 、 $CH_3COOH$ 、 $H_3BO_3$ -NaOH),pH=7.0。实验所用的其他试剂均为分析纯,水为二次蒸馏水。

### 2.2 实验方法

在10 mL 比色管中,依次加入0.1 mmol/L 的 *o*-NPF 溶液 2.0 mL、萆苈宁溶液适量及三酸缓冲溶液(pH=7.0)2.0 mL,用二次水稀释至刻度,室温放置10 min 后,以试剂空白为参比,用1 cm 比色皿在波长515 nm 处测定吸光度。

## 3 结果与讨论

### 3.1 吸收光谱

在300~600 nm 范围内测定溶液吸光度如图1所示。萆苈宁在可见光区无吸收峰(曲线a),*o*-NPF在467 nm 和498 nm 处有吸收峰(曲线b),萆苈宁与*o*-NPF 的荷移产物的最大吸收波长在515 nm 处(曲线c)且在该处的吸光度与萆苈宁的浓度成正比,据此拟定测定萆苈宁的分析方法。实验选择515 nm 作为测定波长。

### 3.2 酸度及缓冲溶液的影响

改变溶液的pH 值将会影响络合物的组成和稳定性,从而影响体系的光谱性质<sup>[4]</sup>。我们实验了不同pH 值的 $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ -HC、三酸和tris-HCl 缓冲体系对体系灵敏度的影响,结果表明,在pH 值为7.0 的三酸缓冲溶液中体系的 $\Delta A$  最大。本实验用pH 值为7.0 的三酸缓冲溶液,实验得知最佳用量为2 mL。

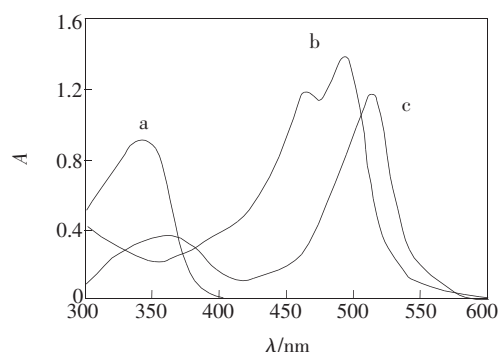


图1 溶液的吸光度。(a)萆苈宁;(b)邻硝基苯基荧光酮;(c)邻硝基苯基荧光酮-萆苈宁络合物。

Fig. 1 Absorbances of the solutions. (a) Piperlonguminine; (b) *o*-nitrophenyl fluorine; (c) the mixture of piperlonguminine and *o*-nitrophenyl fluorine.

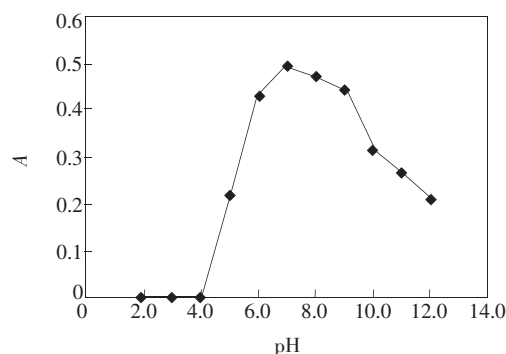


图2 酸度对体系的影响

Fig. 2 Effects of acidity on the reaction

### 3.3 *o*-NPF 溶液的用量

在酸度条件确定后,实验了*o*-NPF 溶液用量对体系灵敏度的影响,结果表明:当*o*-NPF 溶液用量为1.5~3 mL 时, $\Delta A$  最大且保持稳定;当*o*-NPF 用量小于1.5 mL 时,体系反应不完全,显色程度随*o*-NPF 用量的增大而增大;当*o*-NPF 用量过大时, $\Delta A$  变小,有可能是*o*-NPF 相互缔合,使得萆苈宁不能与*o*-NPF 充分接触。实验选择*o*-NPF 的用量为2 mL。

### 3.4 表面活性剂的影响

分别研究了 CTMAB、CPB、Zeph、AES、AGS、

FAS、乳化剂 OP、Tritonx-100、吐温-80 等表面活性剂及  $\beta$  环糊精对体系灵敏度的影响,未发现有明显的增敏作用,故实验中未加入任何表面活性剂。

### 3.5 试剂加入顺序的影响

在确定试剂浓度、酸度条件下,考察不同的加入试剂次序对反应体系灵敏度的影响。实验表明:不同的试剂加入顺序对测定结果是有影响的,当加入次序为 BR 缓冲溶液、*o*-NPF 溶液、萘苳宁时,体系的  $\Delta A$  最大。

### 3.6 稳定性及温度的影响

分别实验了不同温度(10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90  $^{\circ}\text{C}$ ) 及不同反应时间对体系的影响。

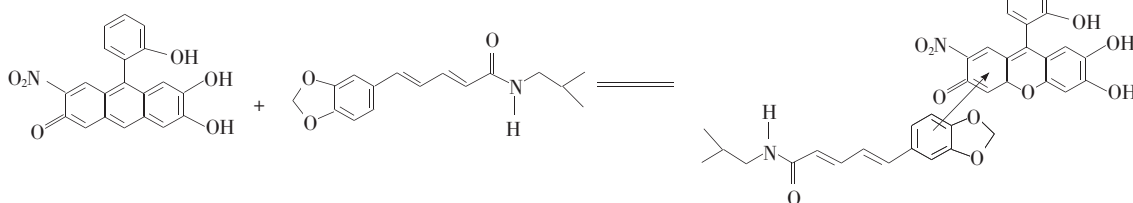


图 3 荷移反应机理

Fig. 3 Mechanism of charge transfer reaction

### 3.8 离子强度的影响

在最佳实验条件下,考察了不同量的 NaCl 对  $\Delta A$  值的影响。结果表明,当体系中 NaCl 的质量浓度小于 0.337 5 mg/mL 时,体系的  $\Delta A$  基本不变;大于 0.337 5 mg/mL 时,体系的  $\Delta A$  显著下降。这是因为  $\text{Cl}^-$  是以静电引力的方式与萘苳宁中带正电荷的氮原子相互作用, $\text{Cl}^-$  的存在可减弱 *o*-NPF 溶液与萘苳宁的结合作用,使体系的  $\Delta A$  降低。

### 3.9 干扰离子的影响

在最佳实验条件下,实验了体内氨基酸、糖类、蛋白质、DNA 及常见的金属离子等对体系吸光度的影响,在测定误差不超过  $\pm 5\%$  的范围内,其最大倍数分别为:L-丙氨酸(158),L-赖氨酸(135),L-亮氨酸(76),L-色氨酸(54),L-组氨酸(48),L-酪氨酸(39),L-谷氨酸(35),L-苯丙氨酸(18),L-脯氨酸(15),BSA(3.67),DNA(14.45),

结果表明:在 10 ~ 40  $^{\circ}\text{C}$  范围内, $\Delta A$  随温度的变化不大;而高于 50  $^{\circ}\text{C}$  时,络合物的分解使  $\Delta A$  降低。反应 10 min 后,体系的吸光度达到最大且恒定,且 5 h 内基本保持不变。故实验中选择室温下放置 10 min 后,再测定溶液的吸光度。

### 3.7 络合物的组成和反应机理

分别采用摩尔比法和连续变化法,测得 *o*-NPF 与萘苳宁络合物的组成比为 1:1。根据文献[5]及反应物的结构推断,其反应机理如图 3 所示:*o*-NPF 是一个很强的平面型  $\pi$  电子受体,而萘苳宁分子中的氧杂环为较强的供电子体且空间位阻小,所以可以形成 1:1 型的 CT 络合物。

乳糖(384),葡萄糖(301),淀粉(90), $\text{Ca}^{2+}$ (38), $\text{K}^+$ (20), $\text{Mg}^{2+}$ (11), $\text{Zn}^{2+}$ (6.15), $\text{Al}^{3+}$ (2.2), $\text{Fe}^{3+}$ (1.8), $\text{Cu}^{2+}$ (1.1),糊精(362),尿素(176),抗坏血酸(8)。从上可见,本方法具有较好的选择性。

### 3.10 工作曲线与精密度

在所选实验条件下绘制工作曲线,并用  $\Delta A$  对相应的萘苳宁质量浓度作图,绘制标准曲线,结果表明:萘苳宁质量浓度为 0.054 6 ~ 10.92  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,与体系吸光度呈良好的线性关系,回归方程为: $A = 0.2011\rho + 0.1214$  ( $\rho$ :  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),相关系数为  $r = 0.9998$ 。对质量浓度为 2.74  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的萘苳宁溶液进行了 11 次平行测定,相对标准偏差 RSD 为 0.90%,表明本方法的精密度良好。

### 3.11 样品测定

取血清和健康人的尿样适量,各加入 1% 的

表 1 尿样和血样中萘苳宁的测定结果

Table 1 Determination results of piperlonguminine in urine and serum samples

样品	加入量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	测得值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	平均值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	回收率
尿样	0.554 6	0.555 4, 0.553 4, 0.554 4	0.554 4	99.9%
	2.773 3	2.774 7, 2.771 3, 2.773 7	2.773 2	99.9%
	8.319 9	8.297 4, 8.293 1, 8.302 3	8.297 6	99.7%
血样	0.554 6	0.554 9, 0.555 3, 0.556 1	0.555 4	99.9%
	2.773 3	2.774 6, 2.773 9, 2.774 1	2.774 2	100.0%
	8.319 9	8.323 4, 8.331 2, 8.311 2	8.321 9	100.0%

三氯乙酸 10 mL,摇匀,转速为 3 000 r/min,使其中的蛋白质沉淀完全。取上层清液,之后将尿样稀释 10 倍,将血清稀释 100 倍,按照实验方法直接测定萆苈宁(未检出)并进行加标回收,结果见表 1。

#### 4 结 论

建立了一种测定萆苈宁的方便而快捷的荷移

分光光度法。在 pH 值为 7.00 的缓冲溶液中,邻硝基苯基荧光酮与萆苈宁反应生成荷移产物,该产物在 515 nm 处有最大吸收。实验结果表明,本方法具有反应体系灵敏、线性范围宽、选择性高等优点。利用本方法对生物样品中的萆苈宁进行了加标回收,回收率为 99.8% ~ 100.9%,RSD 为 0.90%。本文所建立的萆苈宁测定方法对临床应用与研究具有非常重要的作用。

#### 参 考 文 献:

- [ 1 ] Ma Chunjie, Borjihan Gerelu, Hurilebagen, *et al.* Antiatherogenic effect of piperlonguminine on experimental atherosclerosis in rabbits [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica* (中国中药杂志), 2008, 33(4):436-440 (in Chinese).
- [ 2 ] Du Licheng, He Ping, Li Xiaohong, *et al.* Determination of neodymium using fluorimetric liquid method [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2010, 31(6):936-941 (in Chinese).
- [ 3 ] Ling Xiao, Borjihan Gerelu, Zhou Haijun, *et al.* Fluorescence characteristics and analytical application of Mn( II)-piperine-cetyltrimethylammonium bromide ternary system [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis* (光谱学与光谱分析), 2009, 1(3):188-190 (in Chinese).
- [ 4 ] Xue Yonglin, Gao Ling, Pen Shouxin. Determination based on chemometricspectral geminated vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>6</sub> [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2011, 32(10):1081-1087 (in Chinese).
- [ 5 ] Pandeewaran M, Elango K P. Spectroscopic studies on the interaction of cimetidine drug with biologically significant and acceptors [J]. *Spectrochimica Acta Part A*, 2010, 75:1462-1469.