

分子印迹流动注射化学发光法测定紫草中紫草素

贾宝秀*, 李玉琴, 刘彩红, 李珂
泰山医学院药学院, 山东 泰安 271016

摘要: 目的 建立分子印迹流动注射化学发光法定量分析紫草素的新方法。方法 在酸性条件下, 紫草素对高锰酸钾-甲醛体系发光反应具有明显的增敏作用, 以甲基丙烯酸为功能单体、乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂合成紫草素的分子印迹聚合物, 并将其作为分子识别物质, 利用紫草素-高锰酸钾-甲醛化学发光体系, 结合流动注射化学发光分析技术, 建立测定紫草素的分子印迹流动注射化学发光分析方法。结果 体系的化学发光强度与紫草素质量浓度呈线性关系, 其标准曲线为 $Y=43.2X+12.68$, $r=0.9993$, 线性范围为 $1.20\sim 80.0\ \mu\text{g/mL}$, 检出限为 $0.36\ \mu\text{g/mL}$ 。结论 利用分子印迹流动注射化学发光分析法测定紫草中的紫草素简便、快速、准确。

关键词: 紫草; 紫草素; 分子印迹聚合物; 流动注射化学发光; 增敏作用

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)12-2545-04

Determination of shikonin in *Arnebia euchroma* by molecular imprinting-flow injection chemiluminescence method

JIA Bao-xiu, LI Yu-qin, LIU Cai-hong, LI Ke
School of Pharmacy, Taishan Medical University, Tai'an 271016, China

Key words: *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst.; shikonin; molecular imprinting polymer; flow injection chemiluminescence; sensitizing effect

紫草 *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. 为紫草科多年生草本植物的干燥根, 主要分布于新疆、西藏、云南、贵州、东北等地^[1]。紫草的主要成分有两大类, 一类为脂溶性的萘醌类化合物, 主要包括紫草素、乙酰紫草素、2, 3-二甲基戊烯酰草素等多种紫草素及其衍生物; 另一类为水溶性成分, 如紫草多糖等。紫草具有活血、凉血、清热解毒、利尿、抗炎杀菌、诱导多种肿瘤细胞凋亡^[2]等功能。主治血热毒盛、疹出不畅、黄疸、丹毒、大便温闭等症。紫草中紫草素的测定常采用紫外分光光度法^[3]、薄层扫描法^[4]、毛细管电泳法^[5]及高效液相色谱法^[6-8]等, 其中紫外分光光度法常需配合一些辅助手段, 过程复杂; 薄层扫描法操作程序过多, 影响因素不易消除; HPLC 分析时间长、试剂成本高、样品处理较繁琐。因此, 建立一种快速、简便、灵敏度高、选择性好的测定紫草素的新方法具有重要的意义。

化学发光 (CL) 分析法是一种分子发光光谱分析法, 具有较高的灵敏度和较宽的线性范围, 所用

仪器简单低廉, 但选择性差限制了其应用。分子印迹技术 (molecular imprinting technique, MIT) 是近年来发展的高效分离技术, 它模拟了生物学上抗体抗原的特异选择性, 在中药功能因子分离中已有应用^[9]。近年来将化学发光与分子印迹技术结合^[10-11], 形成了高选择性、高灵敏度的测定方法。本实验合成了紫草素的分子印迹聚合物 (MIP), 并制备了在线富集发光流通池, 建立了紫草素-高锰酸钾-甲醛体系的分子印迹化学发光分析法, 对紫草中紫草素进行测定, 方法准确可靠。

1 材料与仪器

紫草素对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110769-200204); 紫草药材 (济南药业集团有限责任公司中药饮片厂, 批号 (20070305、20070507)); α -甲基丙烯酸 (MAA) (天津市永大化学试剂开发中心), 乙二醇二甲基丙烯酸酯 (EGDMA) 由本实验室自制, 乙二醇 (上海化学试剂总厂第三分厂), 对苯二酚 (天津市大茂化学试剂厂), 对甲

收稿日期: 2011-02-12

*通讯作者 贾宝秀 E-mail: jiabaoxiu@163.com.

苯磺酸(天津市巴斯夫化工有限公司), 偶氮二异丁腈(AIBN, 天津市博迪化工有限公司)。所用试剂均为分析纯。

IFFM—E 型流动注射化学发光分析仪(西安瑞迈电子科技有限公司), 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)。Avater370 型傅里叶变换红外分光光度计(美国热电设备公司); UV—2450PC 型紫外可见分光光度计(日本岛津设备公司)。

2 方法

2.1 MIP 的合成

称取 0.5 mmol 模板分子紫草素和 4 mmol 的功能单体 MAA 溶于 3.0 mL 甲苯中, 超声, 静置 3 h, 使模板分子与功能单体充分作用, 加入 8 mmol 交联剂 EGDMA 和 28.0 mg 引发剂 AIBN, 超声, 充氮气 10 min 后立即密封。将其置于 60 °C 恒温水浴锅中 60 h, 得到紫色固体聚合物。将固体聚合物取出, 真空干燥, 研磨, 过 200 目筛, 得到粒径 76 μm 左右的分子印迹聚合物颗粒。然后加入甲醇-乙酸(4:1) 溶液洗脱, 超声, 静置, 上清液离心后于紫外分光光度计检测, 反复洗涤直至无模板分子检出为止。真空干燥至恒定质量, 得到分子印迹聚合物(MIP)。空白聚合物(NMIP)的制备步骤, 除不加模板分子外, 与上述操作相同。

2.2 微型 MIP 柱的制备

向玻璃柱(16 mm×3 mm)内填充 MIP 颗粒, 两端用玻璃棉堵住, 防止流失并保持畅通, 将此 MIP 柱连接在流路中, 置于光电倍增管前。高锰酸钾和甲醛盐酸溶液合并流通过 MIP 柱与柱中的紫草素发生化学发光反应, 产生发光信号, 直到发光信号趋于稳定不再变化, 此时柱中的紫草素被洗干净, 用水洗去柱中的残留物质以备用。

2.3 MIP 的静态结合试验

精密称取 MIP 或 NMIP 40.0 mg 放入 10 mL 试管中, 加入 5.0 mL 已知浓度的紫草素溶液, 置于 25 °C 恒温培养振荡器中, 室温下振荡 8 h, 滤膜滤过, 滤液用紫外分光光度法测定紫草素的平衡浓度, 根据吸附前后溶液中紫草素的浓度变化, 计算聚合物的吸附量(Q), 平行测定 3 次, 取平均值。

2.4 干扰试验

在选择试验条件下, 分析在 20.0 μg/mL 的紫草素溶液存在下, 分别采用分子印迹聚合物和未采用分子印迹聚合物时常见物质的干扰情况, 以加入

干扰物前后发光强度的相对误差小于±5%作为不干扰的标准, 以共存物质对本体系不产生干扰的最大允许质量与被测物的质量比值为干扰倍数, 干扰倍数越大, 说明方法选择性越好。结果见表 1。可以看出, 使用 MIP 与未用 MIP 相比, 方法的选择性得到了较大的提高。

表 1 在有 MIP 两种情况下共存物质对紫草素的干扰
Table 1 Interference of coexisting substances on shikonin with MIP or without MIP

共存物质	干扰倍数	
	有 MIP	无 MIP
K ⁺ 、Na ⁺ 、Cl ⁻	1 500	1 200
Ca ²⁺ 、Mg ²⁺ 、Fe ³⁺	1 000	500
淀粉	800	600
蔗糖	500	200
色氨酸, 甘氨酸, 酪氨酸	100	5

3 结果与讨论

3.1 MIP 的结合特性

利用静态结合试验, 来考察 MIP 对紫草素吸附特性。根据其对于不同初始浓度紫草素水溶液的 Q 值, 绘制吸附等温线, 见图 1。

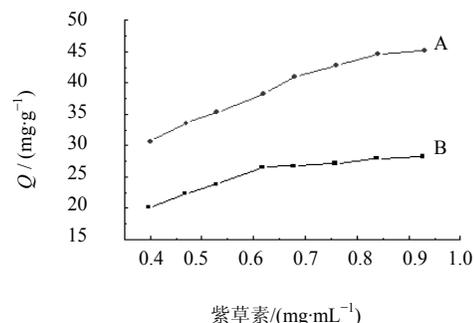


图 1 MIP (A) 和 NMIP (B) 对紫草素的等温吸附曲线
Fig. 1 Isothermal adsorption curves of MIP (A) and NMIP (B)

可以看出, 随着紫草素质量浓度的逐渐升高, MIP 和 NMIP 对紫草素的吸附量都呈增大趋势, 但在所考察的质量浓度范围内, MIP 的吸附量明显大于 NMIP, 且随紫草素质量浓度的增大, 二者吸附量的差别也增大。说明 NMIP 对紫草素的吸附主要是非特异性吸附, 其吸附能力相对较弱; 而 MIP 包含有功能基固定排列的空穴, 其大小和结构与模板分子相互补, 这种空穴对印迹分子紫草素具有“记忆”功能, 因而 MIP 对紫草素的吸附能力强。

3.2 化学发光分析条件的优化

3.2.1 反应介质及其浓度的选择 以 1.0 mol/L 的硫酸、硝酸、磷酸、盐酸、多聚磷酸分别为反应介

质, 测定高锰酸钾-甲醛-紫草素体系的化学发光强度。结果表明, 在盐酸介质中化学发光信号最强, 所以选取盐酸为反应介质, 并且化学发光强度随盐酸浓度的增大而先增大后减小, 当盐酸为 1.8 mol/L 时, 发光信号趋于平稳且信噪比最大。因此选择盐酸浓度为 1.8 mol/L。

3.2.2 高锰酸钾浓度的选择 高锰酸钾在此化学发光反应中是氧化剂, 影响反应的化学发光强度。在紫草素为 20 μg/mL, 盐酸浓度为 1.8 mol/L, 甲醛体积分数为 10.0% 条件下, 本试验考察了 $5.0 \times 10^{-5} \sim 4.0 \times 10^{-4}$ mol/L 高锰酸钾对发光强度的影响, 结果见图 2。高锰酸钾为 3.0×10^{-4} mol/L 时, 发光强度最大。

3.2.3 甲醛体积分数的选择 甲醛作为增敏剂可以增强化学发光强度, 提高方法的灵敏度。在紫草素为 20 μg/mL, 盐酸浓度为 1.8 mol/L, 高锰酸钾为 3.0×10^{-4} mol/L 条件下, 考察 2%~15% 不同体积分数的甲醛溶液对发光强度的影响。结果见图 3, 随着甲醛体积分数的增大发光强度增大, 当其体积分

数为 10% 时, 化学发光强度得到最大值, 继续增大时, 化学发光强度减小, 因而本实验选用 10% 甲醛溶液。

3.2.4 吸附时间的选择 吸附时间是指标准溶液或样品溶液流过 MIP 柱的时间。吸附时间决定着紫草素吸附在 MIP 柱上的量, 既影响测定的灵敏度, 又影响测定的线性范围。考察了吸附时间在 10~120 s 对化学发光强度的影响。对于 20.0 μg/mL 的紫草素溶液, 随着吸附时间的增加发光强度逐渐增大, 在 50 s 时, 吸附基本达到平衡。因此, 选择的吸附时间为 50 s。

3.2.5 化学发光反应时间的选择 化学发光试剂流过 MIP 柱时, 与吸附在柱上的紫草素发生反应, 产生增强的化学发光。当发光强度回到基线时, 表明 MIP 柱上的紫草素已被反应完全, 完成这样一个发光过程需要 40 s。所以, 选择化学发光反应时间为 40 s。

3.2.6 最佳化学反应条件的确定 通过对化学反应条件的优化, 最终确定的反应条件为盐酸 1.8 mol/L, 高锰酸钾 3.0×10^{-4} mol/L, 甲醛体积分数为 10%, 吸附时间 50 s, 化学发光反应时间为 40 s。

3.3 对照品溶液的制备

称取紫草素对照品 5.0 mg, 加适量乙醇溶解后定容于 10 mL 量瓶中, 得 500 mg/L 的对照品储备溶液, 4 °C 保存, 临用时稀释成各质量浓度的对照品溶液。

3.4 供试品溶液的制备

将干燥紫草药材用粉碎, 过 30 mm 孔径筛, 精确称取紫草药材粉末 0.50 g, 置 50 mL 锥形瓶中, 加乙醇 30 mL, 超声提取 30 min, 振摇后静置冷却 10 min, 滤过, 滤渣加 20 mL 乙醇, 超声提取 20 min, 合并乙醇滤液并定容至 50 mL, 置水浴蒸干, 残渣用乙醇溶解并定容至 20 mL, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过后即得供试品溶液。

3.5 标准曲线的绘制

在“3.2.6”项选定的最佳实验条件下, 对 2.0、10.0、20.0、30.0、40.0、60.0、80.0 μg/mL 紫草素溶液的发光强度进行测定, 绘制标准曲线。结果表明, 体系的化学发光强度与其质量浓度呈线性关系, 以相对化学发光强度 (Y) 为纵坐标, 紫草素的质量浓度为横坐标 (X), 绘制其标准曲线为 $Y = 43.2 X + 12.68$, $r = 0.999 3$ 。线性范围为 1.20~80.0 μg/mL, 检出限为 0.36 μg/mL。

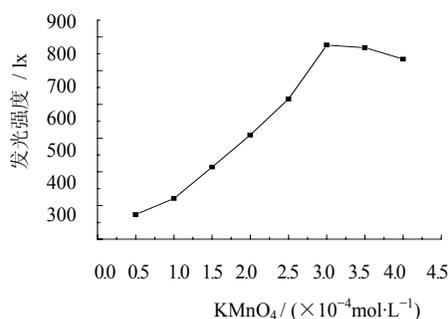


图 2 高锰酸钾浓度对化学发光体系的影响
Fig. 2 Effect of KMnO₄ concentrations on chemiluminescence

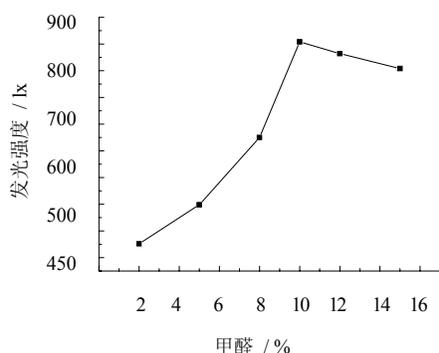


图 3 甲醛体积分数对化学发光体系的影响
Fig. 3 Effect of HCHO concentration on chemiluminescence

3.6 精密度试验

对 20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的紫草素溶液进行分析, 6 次平行测定紫草素发光强度的 RSD 值为 2.8%。

3.7 重现性试验

精密称取批号为 20070305 的样品 6 份, 按供试品溶液制备方法制备样品, 测定, 计算紫草素的平均质量分数为 1.65%, RSD 为 2.6%, 说明该方法的重现性良好。

3.8 稳定性试验

精密量取适量批号为 20070305 的供试品溶液, 分别于制备后 0、1、2、4、8、12、24 h 测定, 记录发光信号, 计算其 RSD 为 3.2%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.9 加样回收率试验

精确称取紫草药材(批号 20070305)粉末 0.50 g, 置 50 mL 锥形瓶中, 加乙醇 30 mL, 超声提取 30 min, 振摇后静置冷却 10 min, 滤过, 滤渣加 20 mL 乙醇, 超声提取 20 min, 合并乙醇滤液并定容至 50 mL, 置水浴蒸干, 残渣用乙醇溶解并定容至 20 mL, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后即得供试品溶液, 依本法测定其浓度, 分别稀释成 20.87、41.75、35.50 $\mu\text{g/mL}$ 的样品溶液, 依次加入 20.00、30.00、35.00 $\mu\text{g/mL}$ 已知质量浓度的紫草素对照品溶液, 每个浓度平行测定 3 次, 计算其平均值, 得到回收率为 96.1%。

3.10 样品测定

精密量取供试品溶液适量, 进行分析, 根据回归方程计算出 2 批药材中紫草素的量, 分别为 1.67% 和 1.42%。采用高效液相色谱法^[7]测定, 分别为 1.64% 和 1.45%。两种方法测定结果基本一致。

4 结论

本实验合成了紫草素的分子印迹聚合物, 并

制备了在线富集发光流通池, 建立了紫草素-高锰酸钾-甲醛体系的分子印迹化学发光分析法, 对紫草中紫草素进行测定。该方法灵敏度高, 重现性好, 样品处理及仪器操作简便, 试剂用量少, 以分子印迹聚合物为分子识别物质, 提高了化学发光法的选择性, 与中高效液相色谱法相比, 此法具有简便、快速、准确等优点, 可实现对中药及其制剂中紫草素的快速测定。

参考文献

- [1] 葛 锋, 王晓东, 王玉春. 药用紫草的研究进展 [J]. 中草药, 2003, 34(9): 附 6-附 10.
- [2] 吴 振, 吴立君, 田代真一, 等. 紫草素通过线粒体途径诱导 A375-S2 细胞凋亡 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(12): 1173-1177.
- [3] 陈发奎. 常用中草药有效成份含量测定 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998.
- [4] 罗淑荣, 李 彤. 组织培养紫草中萘醌的测定 [J]. 药学学报, 1991, 26(12): 953-955.
- [5] 李全文, 陈缙光, 周 颢, 等. 毛细管电泳法测定紫草中的紫草素 [J]. 分析化学, 2006, 34(7): 991-994.
- [6] 施玉峰, 谢明勇, 梁瑞红, 等. 反相高效液相色谱法测定紫草素衍生物 [J]. 色谱, 2005, 23(2): 209.
- [7] 孟宪生, 沙 明, 曹爱民, 等. HPLC 法测定紫草及其制剂紫金油中紫草素的含量 [J]. 中草药, 2003, 34(7): 615-616.
- [8] 姜 林, 李晓瑾, 贾晓光. 新疆紫草 HPLC 指纹图谱的研究 [J]. 中成药, 2005, 27(11): 1241-1244.
- [9] 郭利飞, 宋承成, 陈永强, 等. 分子印迹技术分离中草药功能因子的研究与应用 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(6): 1055-1062.
- [10] 何云华, 吕九如, 张红鸽, 等. 分子印迹-化学发光分析法测定安乃近 [J]. 高等学校化学学报, 2005, 26(4): 642-646.
- [11] 刘永明, 刘振波, 徐淑周. 分子印迹-后化学发光法测定盐酸环丙沙星 [J]. 分析试验室, 2009, 28(3): 47-50.