

Resonance Rayleigh Scattering Method for Determining Potassium Dehydroandrographolide Succinate with Some Acid Dyes

Yi Jian¹, Lianhui Chen^{2*}

¹Department of Physics, North Sichuan Medical College, Nanchong

²Department of Chemistry, North Sichuan Medical College, Nanchong

Email: clh-51@163.com

Received: Aug. 24th, 2011; revised Sep. 28th, 2011; accepted Sep. 29th, 2011.

Abstract: In pH 4.5 buffer solution, some acid dyes like Evens blue (EB), pontamine blue (PB) and methyl violet (MV) react rapidly with potassium dehydroandrographolide succinate (PDS) to form complexes, which result in great enhancement of resonance Rayleigh scattering(RRS) and a new RRS spectrum. The maximum RRS peak is near 720 nm. RRS intensities are proportional to the concentration of PDS in the range of 25 mg·L⁻¹ - 900 mg·L⁻¹, 35 mg·L⁻¹ - 950 mg·L⁻¹ and 2 mg·L⁻¹ - 52 mg·L⁻¹ separately. The method has high sensitivity and the detect limit for PRS are 18.5 ng·L⁻¹, 32.1 ng·L⁻¹ and 28.9 ng·L⁻¹ separately. The method has been used for the determination of total amounts of PRS in samples with satisfactory results.

Keywords: Resonance Rayleigh Scattering Method; Potassium Dehydroandrographolide Succinate; Determination; Dye

几种酸性染料共振瑞利散射法测定穿琥宁

简 易¹, 陈莲惠^{2*}

¹川北医学院物理教研室, 南充

²川北医学院化学教研室, 南充

Email: clh-51@163.com

收稿日期: 2011年8月24日; 修回日期: 2011年9月28日; 录用日期: 2011年9月29日

摘 要: 在 pH 4.5 的酸性溶液中, 穿琥宁和伊文思蓝、溴胺天蓝、甲基紫等酸性染料结合, 导致 RRS 增强, 并产生新的 RRS 光谱, 其最大峰位于 720 nm 附近。在 25 mg·L⁻¹~900 mg·L⁻¹、35 mg·L⁻¹~950 mg·L⁻¹、2 mg·L⁻¹~52 mg·L⁻¹ 浓度范围内, RRS 增强与穿琥宁的浓度成正比。方法具有高灵敏度, 其检出限分别为 18.5 ng·L⁻¹、32.1 ng·L⁻¹ 和 28.9 ng·mL⁻¹。将该方法用于穿琥宁注射液中穿琥宁含量的测定, 结果较满意。

关键词: 共振瑞利散射法; 穿琥宁; 测定; 染料

1. 引言

穿琥宁(potassium dehydroandrographolide succinate, PDS)是临床上治疗感冒及病毒引起的急性上呼吸道感染、流感与流感病毒引起的急性上呼吸道感染、急性支气管炎、小儿支气管肺炎的常用药物。目前测定 PDS 的常用方法有比色法^[1]、紫外分光光度法^[2]、高效液相

色谱法、反相高效液相色谱法和薄层色谱法^[3]。但由于 PDS 为酯类结构, 在水中易水解、氧化、异构化和树脂化, 且降解物均有紫外吸收, 多种降解物在 251 nm 波长处有吸收而干扰, 影响了比色法和紫外分光光度法的应用; 而高效液相色谱法或反相高效液相色谱法所使用的仪器较昂贵; 薄层色谱法灵敏度较低。

近年来, 共振瑞利散射法(resonance Rayleigh scattering, RRS)作为一种新的分析技术得到了迅速发展

*: 通讯作者。

展, 它具有很高的灵敏度, 比发展较为成熟的紫外分光光度法高出约 3 个数量级, 检出限可达到 ng/mL, 并具有较高的选择性; RRS 法可以使用普通光源, 用一般的荧光光度计可获得完整的 RRS 光谱; 相对 HPLC 等仪器更经济; 不同种类、不同结构的物质经化学修饰后可以得到不同的 RRS 光谱, 因而可以为研究药物分子结构、存在形态和反应特性提供更丰富的信息。这些优点使这一技术在国内国外的研究和应用得到迅速的发展, 在核酸、蛋白质、多糖和某些药物的研究上已取得明显成效。国外侧重研究生色团聚集作用导致 RRS 增加, 并用于核酸、蛋白质等生物大分子的表征与测定^[4], 我国与国外几乎同时进行这一领域的研究^[5,6]。RRS 在药物分析中的应用也日益受到关注^[7-9]。本文将 RRS 技术用于 PDS 的定量分析, 重点研究了在酸性介质中, 依文思蓝等染料与穿琥宁反应产物的 RRS 光谱特征、影响因素、适宜的反应条件及分析特性; 并用 RRS 技术法测定注射用穿琥宁中的穿琥宁, 获得了较为满意的结果。

2. 实验部分

2.1. 仪器与试剂

Hitachi F-2500 型荧光分光光度计, 测定参数: 狭缝宽度 10 nm, 光电倍增管(PMT)负电压为 400 V; PHS-4C⁺酸度计(成都市方舟科技开发公司)。

依文思蓝(EB, 中国上海标本模型厂)水溶液: 0.01%, 甲基紫(MV, Fluka 进口分装)水溶液: 0.01%, 溴胺天蓝(PB, 中国上海标本模型厂)水溶液: 0.01%, 穿琥宁注射液(成都天台山制药有限公司), 嘉比妥因[注射用穿琥宁, 巴里莫尔制药(通化)有限公司], 脱水穿心莲内酯琥珀酸半酯对照品(成都天台山制药有限公司提供, 经峰面积归一化法测得含量为 99.63%); 冰箱保存, 在使用时稀释到 $160 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; HAc-NaAc 缓冲溶液(pH = 4.5)。所用试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

2.2. 实验方法

于 10 mL 比色管中依次准确加入 2.0 mL pH 4.5 的 Britton-Robinson 缓冲溶液、适量对照品溶液和 1.0 mL 0.01% 的 EB(或 PB、MV)溶液, 以二次蒸馏水稀释到刻度并摇匀; 放置 15 min 后, 将溶液于荧光光度计

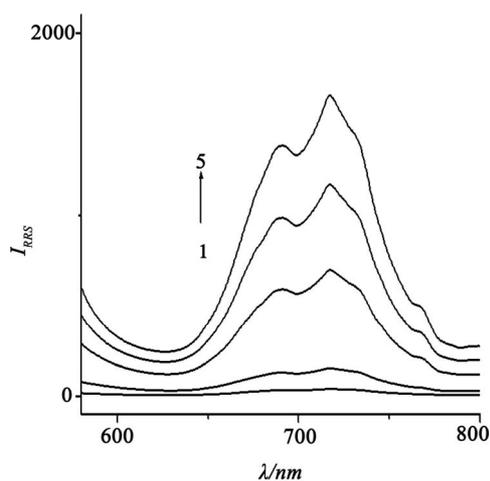
上以 $\lambda_{\text{em}} = \lambda_{\text{ex}}$ 方式进行同步扫描, 可得共振瑞利散射光谱, 然后于峰值处测定产物溶液的散射光强度 I_{RRS} 和试剂空白的散射强度 I_{RRS}^0 , $\Delta I_{\text{RRS}} = I_{\text{RRS}} - I_{\text{RRS}}^0$ 。

3. 结果与讨论

3.1. 共振瑞利散射光谱

分别对 PDS、PDS 和 EB 的结合产物进行同步扫描, 得到 RRS 光谱, 见图 1。

从图 1 我们可以看出: EB 和 PDS 本身的 RRS 都比较微弱; 当 EB 与 PDS 发生反应生产缔合物时, 引起了溶液 RRS 发生剧烈变化, 在 650~760 nm 这一范围内溶液的 RRS 急剧提高, 最大 RRS 峰位于 717 nm, 在 690 nm 处还有一肩峰, 但由于 717 nm 处的峰强度最大, 相比空白值较小, 故选择 717 nm 处的散射峰作为测定峰。同样, 对 PDS、PDS 和 PB 的结合产物进行同步扫描, 得到 RRS 光谱, 图谱显示与 EB 和 PDS 反应结果惊人的相似: PB 本身的 RRS 也很微弱, 但当 PB 与穿琥宁发生反应生产缔合物时, 引起了溶液 RRS 发生剧烈变化, 在 650~760 nm 这一范围内溶液的 RRS 急剧提高, 最大 RRS 峰位于 717.5 nm, 在 686 nm 处有一肩峰, 但由于 717.5 nm 处的峰强度最大, 相比空白值较小, 故选择 717.5 nm 处的散射峰作为测定峰。只是 EB 和 PB 与 PDS 反应后, RRS 强度稍微有些不同, 但它们的 RRS 最高峰、肩峰都很相似, 且出现在很相似的波长范围。



1: EB 溶液: $1.23 \times 10^{-5} \text{ mmol/mL}$ 2: PDS 溶液: $8.14 \times 10^{-5} \text{ mmol/mL}$ 3-5: EB-PDS 溶液: c_{PDS} 分别是 8.14, 10.8, $13.6 \times 10^{-5} \text{ mmol/mL}$

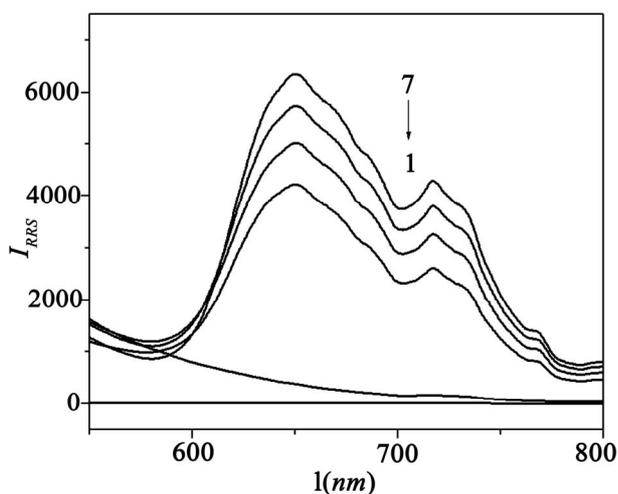
Figure 1. RRS spectra of EB-PDS system
图 1. RRS 光谱(pH 4.5)

图 2 是 MV 和 PDS 反应前后的 RRS 光谱图，从图上可以看出，无论是峰形、峰值，还是最高峰出现的波长，都有很大的区别。MV 与 PDS 发生反应生产缔合物时，在 618~768 nm 这一较宽范围内溶液的 RRS 急剧提高，最大 RRS 峰位于 650 nm，MV-PDS 体系在 718 nm 处有一个强度稍弱的散射峰。

EB 和 PB 与穿琥宁反应后，它们的最大峰和次级峰峰形和位置相似，可以从图 3 和图 4 的结构式得到解释：EB 和 PB 的结构式相当接近，只相差了 2 个氧原子，它们的主要基团都相同，属于双偶氮的萘二磺酸钠盐染料，而且基团之间的连接方式也很相似，所以当它们和穿琥宁反应时，反应条件和反应部位相似，反应产物的结构也很相似，在荧光光度计上同步扫描得到的 RRS 谱图的相似度高。但 MV 的结构(图 5)和前述 2 个染料有很大区别，因此几种染料阴离子和穿琥宁反应得到的缔合物所产生的 RRS 谱图有较大差异。

3.2. 试验条件选择

分别测定了酸度、增溶剂、PDS 浓度和共存物质等对三种反应体系的 RRS 强度的影响，测定结果显示都很相似：在一定波长范围内穿琥宁溶液本身的 I_{RRS} 十分微弱，且受溶液酸度影响较小，但混合溶液体系受酸度影响较大；而且当溶液酸度大致 pH 3.0~6.0 时，体系的散射值达到最大且稳定。故本文对各体系



1: MV 溶液: 1.23×10^{-5} mmol/mL, 2: PDS 溶液: 1.36×10^{-5} mmol/mL, 3~6: MV-PDS 溶液: c_{PDS} 分别是 5.42, 8.14, 10.8, 13.6×10^{-5} mmol/mL

Figure 2. RRS spectra of MV-PDS system
图 2. RRS 光谱 (pH 4.5)

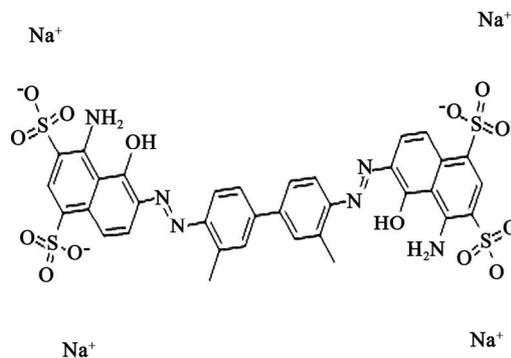


Figure 3. The structure of EB
图 3. EB 的结构式

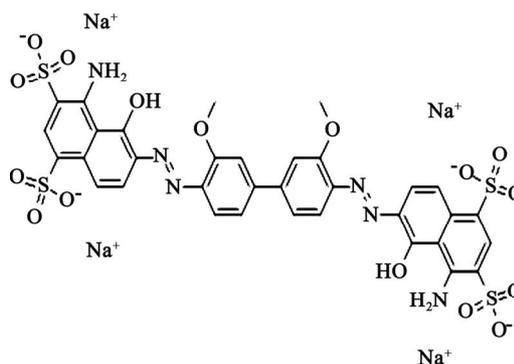


Figure 4. The structure of PB
图 4. PB 的结构式

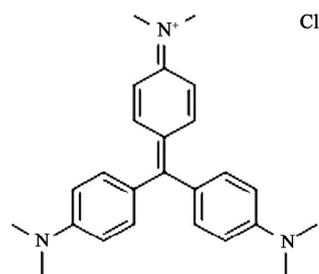


Figure 5. The structure of MV
图 5. MV 的结构式

采用的酸度条件为 pH 4.5，体系适宜的缓冲用量在 0.9~2.8 mL，本实验采用 2.0 mL；Triton X-100、OP 和 PVA 等增溶剂的加入对体系几乎没有影响，所以本实验不加入任何增溶剂或表面活性剂；PDS 的浓度对体系的 RRS 光谱轮廓几乎无影响，当穿琥宁在 $(19.6\sim 782) \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，体系的 ΔI_{RRS} 值较大而且呈线性；按实验方法考察了一些常见离子、糖类和氨基酸等共存物质对 EB-PDS 体系 RRS 的影响，结果表明：在 PDS 浓度为 $5.42 \times 10^{-5} \text{ mmol/mL}$ ，测定误差小于 $\pm 5\%$ 时，干扰物质的允许浓度如表 1 所示。从列表可知：

较大浓度的 NH_4^+ , Cl^- , K^+ , Br^- , K^+ , HCO_3^- 等大多数无机离子和一定量的氨基酸、糖类均不干扰, 而 Bi^{3+} , Re^{3+} , HPO_4^{2-} 和强力霉素等有一定干扰。可见, 该法具有较好的选择性, 可用于实际样品的测定。

3.3. 标准曲线

精密吸取脱水穿心莲内酯琥珀酸半酯对照品溶液 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 按照实验方法, 研究了 EB、PB、MV 与对照品的反应, 于最大散射波长处测定 ΔI_{RRS} 值, 以 ΔI_{RRS} 为纵坐标, 对照品浓度 $c(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ 为横坐标进行线性回归, 得回归方程和相关参数, 列于表 2。

3.4. 系列试验

3.4.1. 稳定性试验

室温下, EB、PB 和 MV 三种染料与穿琥宁反应的离子缔合物在 10 min 后可完全形成, 脱水穿心莲内

酯琥珀酸半酯对照品在测定中不稳定, 需要转换成单钾盐, 处理后体系 RRS 强度至少可以稳定 1.5 h。

3.4.2. 精密度试验

以 EB-穿琥宁体系为例, 精密吸取对照品溶液 3 mL, 按照实验方法于 717 nm 处连续测定 6 次, 其 ΔI_{RRS} 值的 RSD 为 0.69%。

3.4.3. 重复性试验

取标示量为 1.50 mg 的同一批样品 5 份, 以 EB-PDS 体系为例, 按实验方法平行操作, 测定每份样品中穿琥宁的含量, 测得样品的平均含量为 1.49 mg, 其 RSD = 1.6%。

3.4.4. 回收率试验

以 EB-穿琥宁体系为例, 精密吸取已知含量的同批样品 5 份, 精密加入一定量脱水穿心莲内酯琥珀酸半酯对照品, 按本文方法进行测定, 平均回收率为 97.3%, RSD 为 2.8%。

Table 1. Interference of foreign substances (c_{PDS} is $5.42 \times 10^{-5} \text{ mmol/mL}$)
表 1. 共存物质的影响 (PDS 浓度为 $5.42 \times 10^{-5} \text{ mmol/mL}$)

干扰物质	允许浓度/ $\times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$	干扰物质	允许浓度/ $\times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$	干扰物质	允许浓度/ $\times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$
NH_4^+ , Cl^-	1800	强力霉素	0.6	L-组氨酸	150
K^+ , Br^-	1540	Fe^{3+} , SO_4^{2-}	1	D,L-半胱氨酸	144
Ca^{2+} , Cl^-	1300	Na^+ , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	3.1	L-白氨酸	98
HCO_3^-	300	葡萄糖	32	L-酪氨酸	61
SDS	2.85	Ni^{2+} , Cl^-	12	D-苏氨酸	67
肝素钠	6	Pd^{2+} , NO_3^-	7.1	肌醇	12
抗坏血酸	138	Sb^{3+}	11	尿素	24
Bi^{3+}	0.4	D,L-天冬氨酸	60	Mn^{2+}	9.3
Re^{3+}	0.2	C-色氨酸	120	CO_3^{2-}	668
四环素	0.5	L-苏氨酸	110	K^+ , HPO_4^{2-}	0.15

Table 2. Related parameters of the calibration graphs
表 2. 标准曲线及相关参数

染料	测定波长 (nm)	线性范围 (mg/L)	回归方程 ($n=6$) $c/\text{mg/L}$	检出限 (ng/mL)	相关系数 ($n=6$)
EB	717	25~900	$\Delta I_{\text{RRS}} = 57.9c - 1.8 \times 10^3$	18.5	0.9992
PB	717.5	35~950	$\Delta I_{\text{RRS}} = 70.7c - 3.3 \times 10^3$	32.1	0.9984
MV	650	2~52	$\Delta I_{\text{RRS}} = 728c + 2.4 \times 10^3$	28.9	0.9988

Table 3. Determination results of PDS in samples (n = 5)
表 3. 样品含量测定结果(n = 5)

编号	标示量/mg·mL ⁻¹	测得量/mg·mL ⁻¹	平均值/mg·mL ⁻¹	RSD/%
1	20.0	20.1,20.2,19.5,19.8,20.0	19.9	0.28
2	20.0	18.8,18.9,19.7,18.5,16.8	18.5	1.12
3	20.0	19.9,16.7,18.5,19.3,19.5	18.8	1.27
4	20.0	19.6,19.5,19.6,19.4,19.8	19.8	0.58
5	20.0	18.8,19.7,19.8,19.4,19.5	19.4	0.39
6	20.0	20.7,19.9,21.1,19.8,17.3	19.8	1.48

Table 4. Compare determination results of PDS by RRS with HPLC methods
表 4. RRS 法和 HPLC 法测定结果比较

样品	RRS 法		高效液相色谱法	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
1	98.6	2.5	99.7	2.1
2	92.1	3.3	101.3	3.2
3	99.7	3.9	98.5	2.9

4. 应用研究

以 EB-PDS 体系为例,分别精密吸取对照品溶液、穿琥宁注射液(成都天台山制药有限公司)和嘉比妥因[注射用穿琥宁,巴里莫尔制药(通化)有限公司]各 2 份,在确定的最佳条件下,按照实验方法对其含量平行测定 5 次,结果见表 3。

在确定的最佳条件下,以 EB-穿琥宁体系为例,按照实验方法,对 PDS 注射液(成都天台山制药有限公司)和嘉比妥因(注射用穿琥宁,巴里莫尔制药(通化)有限公司)进行加入一定量(每 100 mL 注射液中加入 160 ng·mL⁻¹ 的标准品溶液 3 mL)的标准穿琥宁溶液做回收实验,结果如表 4 所示。与药典高效液相色谱法测定该样品所测得的结果基本一致。

5. 致谢

特别感谢恩师刘绍璞先生传授给我 RRS 研究思想!感谢川北医学院各位领导 and 同仁提供的帮助。

参考文献 (References)

- [1] 中华人民共和国药典[Z]. 2005, 二部: 452.
- [2] 汪海波, 褚定侃. 紫外分光光度法测定穿琥宁注射液的含量[J]. 光谱实验室, 2003, 20(5): 747-748.
- [3] 中华人民共和国药典[Z]. 2000, 一部: 220.
- [4] R. F. Pasternack, P. J. Collings. Resonance light scattering: A new technique for studying chromophore aggregation. *Science*, 1995, 269(5226): 935-939.
- [5] 王亚婷, 赵凤林, 李克安等. 有机染料作为光散射探针在分析应用中的研究进展[J]. 高等学校化学学报, 2000, 21(10): 1491-1497.
- [6] S. P. Liu, Z. F. Liu. Studies on the resonant luminescence spectra of rhodamine dyes and their ion-association complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 1995, 51(9): 1497-1500.
- [7] 胡春梅, 王驰, 朱莉, 赵俊义, 陆巍. 共振瑞利散射法测定多柔比星脂质体中游离多柔比星的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(5): 718-722.
- [8] L. H. Chen, Y. Jian, H. Q. Luo, S. P. Liu and X. L. Hu. Determination of sodium hyaluronate with basic bisphenylnapthylmethane dyes by resonance Rayleigh scattering method. *Chinese Chemical Letters*, 2007, 18(9): 1099-1102.
- [9] L. Kong, Z. F. Liu, X. L. Hu and S. P. Liu. Absorption, fluorescence and resonance rayleigh scattering spectra of interaction of papain with calf thymus DNA. *Chinese Journal of Chemistry*, 2011, 29(4): 822-828.