

阿西美辛在高锰酸钾-亚硫酸钠体系中的流动注射化学发光分析

张志洁, 壮亚峰, 鞠焜先*

(南京大学 分析科学研究所 生命分析化学教育部重点实验室, 江苏 南京 210093)

摘要: 目的 研究阿西美辛对高锰酸钾-亚硫酸钠化学发光体系的增敏作用, 建立阿西美辛的简便、快速测定新方法。方法 利用阿西美辛对高锰酸钾-亚硫酸钠化学发光体系的增敏作用, 结合流动注射技术对其含量进行定量测定。结果 在 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4 - 5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \text{ KMnO}_4 - 4.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_3$ 体系中, 化学发光强度与阿西美辛浓度在 $1.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 呈线性关系, 在 3 倍信噪比, 阿西美辛的检出限为 $6.9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, 对 $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 阿西美辛测定获得满意结果。结论 该方法快速、简便、准确度高、灵敏度高、选择性好, 对临床医学研究具有实际意义。

关键词: 阿西美辛; 增敏作用; 流动注射; 化学发光

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2004)10 - 0925 - 04

Flow injection chemiluminescent detection of acemetacin in $\text{KMnO}_4 - \text{Na}_2\text{SO}_3$ system

ZHANG Zhi-jie, ZHUANG Ya-feng, JU Huang-xian*

(State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Institute of Analytical Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: **Aim** To study the sensitizing effect of acemetacin (ACE) on the weak chemiluminescent (CL) reaction of KMnO_4 with sulfite and establish a fast and convenient method for CL detection of ACE. **Methods** Using the sensitizing effect of ACE on $\text{KMnO}_4 - \text{Na}_2\text{SO}_3$ system and flow injection technique to determine the concentration of ACE. **Results** Under optimal conditions, the CL intensity of $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4 - 5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \text{ KMnO}_4 - 4.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_3$ was proportional to the concentration of ACE ranging from 1.0×10^{-7} to $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. The detection limit of ACE was $6.9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ at 3. Satisfactory results were obtained for determination of ACE at $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. **Conclusion** The present method showed good precision, high sensitivity and selectivity and could be used for fast and convenient detection of ACE. It would be of significance to the clinical and pharmacological study of acemetacin.

Key words: acemetacin; sensitizing effect; flow injection; chemiluminescence

阿西美辛 [1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1-indole-3-acetic acid, acemetacin, ACE] 作为新

型非甾体消炎镇痛药, 临床上用于治疗风湿性关节炎、手术后疼痛与感染。由于良好的疗效和较少的副反应, 近年来阿西美辛的临床应用受到人们的青睐。为进行 ACE 的检测、监测和开展其药代动力学、疗效与药理学研究, 迫切需要发展灵敏、快速的分析方法。目前, 测定阿西美辛的方法主要有紫外光谱法^[1]、高效液相色谱法^[2-4]、极谱法^[5]、溶出伏安法^[6]和近红外 FT-拉曼光谱法^[7]等。迄今已报道的方法可以检测 $1.97 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 的

收稿日期: 2004-02-12.

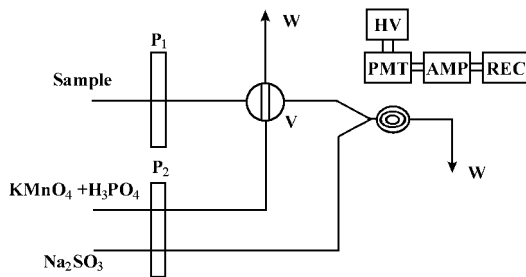
基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目 (20325518); 国家自然科学基金资助项目 (20275017); 江苏省社会发展基金资助项目 (BS2001063); 教育部优秀青年教师资助计划 (2000028403) 资助项目。

通讯作者 Tel / Fax: 86 - 25 - 83593593,
E-mail: hxju@nju.edu.cn

阿西美辛^[6]。化学发光分析法具有灵敏度高、仪器简单等特点,尚未用于阿西美辛及其相关化合物的检测。本文建立了高锰酸钾-亚硫酸钠-阿西美辛化学发光体系,结合流动注射技术实现了阿西美辛的化学发光分析。该方法具有快速、简便、准确的优点,可以对 $1.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 的阿西美辛进行选择测定,对临床医学研究可能具有实际意义。

材料和方法

仪器 化学发光分析用 IFFMD 型流动注射发光分析仪(西安瑞迈电子有限公司)进行。化学发光光谱由一系列干涉滤光片在 IFFMD 上通过静态方法得到。由于各个滤光片的透光性不同,滤光片经过生产厂家的校正。文中给出的光谱数据均为校正后的结果。荧光光谱用 RF-5301PC 型荧光光谱仪获得。流动注射化学发光检测装置如图 1 所示。



P₁ and P₂: Peristaltic pump; V: Six-way injection valve; F: Flow cell; W: Waste solution; HV: High voltage; PMT: Photomultiplier tube; Rec: Recorder; AMP: Amplifier

Figure 1 Schematic diagram of the chemiluminescent flow injection analysis (CL-HLA) system for the determination of papaverine

药品与试剂 阿西美辛由江苏省药检所提供,配制成 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 储备液。高锰酸钾 (0.01 mol L^{-1})、亚硫酸钠 (0.01 mol L^{-1})、硫酸、盐酸、硝酸等试剂均为分析纯,水为二次去离子水。

实验方法 将酸性高锰酸钾和亚硫酸钠溶液分别泵入流路中,直到形成稳定的基线。将阿西美辛溶液 $30 \mu\text{L}$ 注入酸性高锰酸钾溶液的流路中并记录发光信号。进样的频率为 90 h^{-1} ,进样时间为 20 s 。取一定量阿西美辛储备液,稀释成各数量级浓度的工作液,进行化学发光测定,测其峰高,绘制工作曲线。静态测量方法用于记录化学发光动力学曲线。

结果与讨论

1 发光过程的动力学特征

化学发光反应的速率是化学发光体系的重要特征,也是设计流动注射系统的主要参数。图 2 为静态注射法记录的高锰酸钾-亚硫酸钠-阿西美辛体系的动力学曲线。显而易见,这一体系的发光是一快速过程,加入亚硫酸钠于高锰酸钾-阿西美辛溶液后,即观测到化学发光信号。从发光开始到发光强度达到最大值所用的时间小于 0.03 s ,并在 0.1 s 内完成整个发光过程。当阿西美辛不存在时,加入亚硫酸钠产生的化学发光信号比其存在时低 2.7 倍,且动力学过程更慢。这一特征为建立流动注射化学发光快速测定阿西美辛的方法奠定了基础。

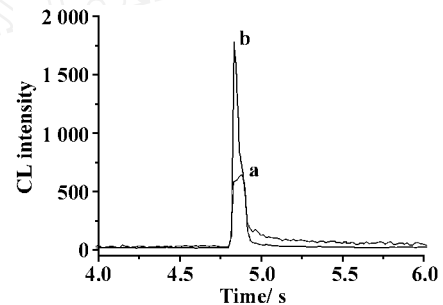


Figure 2 Time course of CL emission of $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \text{ KMnO}_4 - 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ (a) and a + $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ ACE}$ (b) upon addition of $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_3$

2 阿西美辛对高锰酸钾-亚硫酸钠发光反应的增敏作用

高锰酸钾-亚硫酸钠体系是一经典的弱化学发光体系,由于一些物质对这一发光体系的增敏作用,它已在化学发光分析中得到广泛应用^[8-10]。图 3 为加入阿西美辛前后这一体系的化学发光光谱图,最大发光波长为 535 nm 。加入阿西美辛后,这一体系化学发光光谱的轮廓基本不变,发光光强度增大,在 535 nm 处, $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 阿西美辛的加入使发光强度增加 2.7 倍。可见,阿西美辛对高锰酸钾-亚硫酸钠发光反应具有增敏作用。这一作用可用于阿西美辛的定量测定。

3 检测条件的优化

当阿西美辛用作增敏剂时,高锰酸钾与亚硫酸钠之间的弱化学发光反应的发光强度明显增强,而且发光强度与阿西美辛的浓度成比例。为获得较高的检测灵敏度及较宽的检测范围,对实验条件进行了优化。

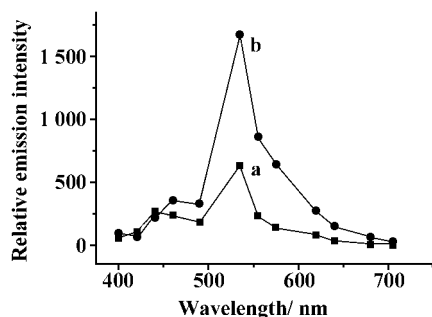


Figure 3 CL spectra of $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \text{ KMnO}_4 + 4.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_3 + 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ (a) and (a) + $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ ACE}$ (b)

分别考察以 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ 磷酸、硫酸、盐酸、硝酸、多聚磷酸和醋酸为反应介质的发光强度,在这些介质中, $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \text{ KMnO}_4 - 4.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_3 - 2.5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ ACE}$ 的相对发光强度分别为 1 800, 1 150, 1 600, 850, 1 580 和 1 400。磷酸介质中发光强度最高,故选用磷酸进行以下实验。

当磷酸浓度在 $0 - 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, 化学发光信号随浓度增加而增加。磷酸浓度大于 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ 时, 化学发光信号降低, 可能是高浓度的 H^+ 抑制了该化学发光反应。因此, 本体系选用磷酸的浓度为 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ 。

在其他条件不变, 高锰酸钾浓度为 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 时, 可获得最大的相对化学发光强度。当高锰酸钾浓度大于这一数值时, 由于高锰酸钾本身颜色加深, 产生内滤效应使化学发光强度降低, 所以选择高锰酸钾浓度为 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 。

亚硫酸钠浓度也影响化学发光的强度。在亚硫酸钠浓度为 $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 时, 可获得最大的相对化学发光强度, 所以选择这一浓度进行阿西美辛的测定。

4 校准曲线、精密度和检出限

在选定的最佳实验条件下, 化学发光强度 (I) 与阿西美辛浓度 (C) 在 $1.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 呈良好的线性关系, 回归方程为 $I = 6.31 \times 10^{-4} + 4.62 \times 10^{-4} C (\text{mol L}^{-1})$ 。相关系数为 0.993 9。对浓度为 $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 阿西美辛进行 15 次平行测定, 相对标准偏差为 3.6%。在 3 倍信噪比, 计算得出该方法的检出限为 $6.9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ 。

5 干扰实验

试验了阿西美辛药品和生物样品中常见物质对阿西美辛测定的影响。当测定组分浓度为 $2.5 \times$

$10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, 以相对误差小于 10.0% 为允许量时, 共存物质葡萄糖和维生素 C 的允许限度为 10 倍; La^{3+} 为 50 倍; Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , K^+ 和 Na^+ 为 100 倍; Cr^{3+} , Co^{2+} , Cd^{2+} 和 Sn^{4+} 为 200 倍。因此本方法可用于药物中阿西美辛的检测而不受共存离子的干扰, 具有较好的选择性。阿西美辛在生物体内可转化为吲哚美辛。同浓度的吲哚美辛对阿西美辛的测定有干扰, 故该化学发光分析法对阿西美辛的药理学研究不适用。

6 样品分析

用合成样品进行阿西美辛的分析以验证方法的可靠性。合成样品溶液含 3 种不同浓度的阿西美辛与 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$ 和 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 葡萄糖。结果见表 1, 3 份合成样品测定的相对标准偏差小于 1.0%, 回收率为 97% - 102%。

Table 1 Analytical results of ACE in synthetic samples

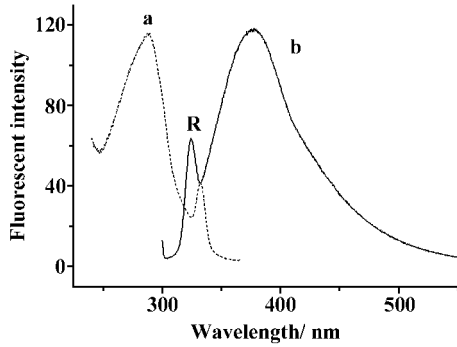
Sample	Added / mol L ⁻¹ ($\times 10^{-6}$)	Found ^a / mol L ⁻¹ ($\times 10^{-6}$)	RSD/ %	Recovery/ %
1	2.00	1.97	0.7	98.7
2	4.00	3.89	0.6	97.3
3	6.00	6.06	0.7	101

^aAverage of determination for three times

7 讨论

高锰酸钾-亚硫酸钠体系的化学发光机制已有报道^[8-10]。本文对高锰酸钾-亚硫酸钠-阿西美辛体系的发光机制进行讨论。

阿西美辛是荧光物质, 荧光光谱如图 4 所示, 由发射曲线 (b) 可知其最大荧光发射波长为 375 nm, R 为瑞利散射曲线。在酸性介质中, 最大荧光发射波长蓝移至 362 nm, 同时荧光强度减弱, 如图 5 所示。加入高锰酸钾后, 随着反应时间的增加, 阿西美辛被酸性高锰酸钾缓慢地氧化, 在 362 nm 处的荧光强度减弱, 同时在 430 nm 处出现了一个新的荧光发射峰, 该峰的强度随 362 nm 处荧光强度的减弱而增加。酸性高锰酸钾或 Mn^{2+} 体系中无此现象, 在磷酸介质中 Mn^{2+} 的荧光光谱的最大发射波长为 330 nm^[11]。可推测 430 nm 处的荧光发射是由阿西美辛的氧化产物引起的。



R: Rayleigh scattering

Figure 4 Fluorescence excitation (a) and emission (b) spectra of $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ACE

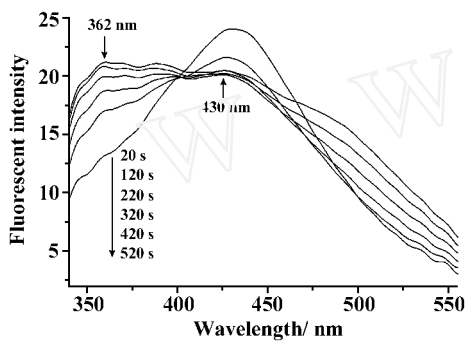
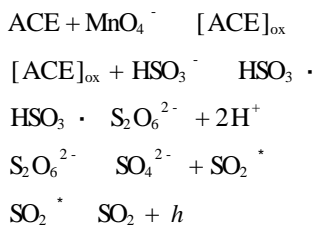


Figure 5 Effect of the reaction time on fluorescent spectrum of $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \text{ KMnO}_4 - 2.3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ ACE} - 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$

高锰酸钾氧化亚硫酸钠的化学发光在 400 - 705 nm, 化学发光的最大发光波长为 535 nm(图 3)。阿西美辛的加入使发光光强度增大, 化学发光光谱的轮廓基本不变, 同时化学发光光谱与阿西美辛及其氧化产物的荧光光谱明显不同, 因此阿西美辛没有参加最终的化学发光步骤。根据文献[9, 12]所报道的化学发光光谱, 可以推断高锰酸钾-亚硫酸钠-阿西美辛体系的发光体为激发态的二氧化硫, 整个机理可以表示为:



References :

- [1] Markovic S, Banjanin V. UV spectrophotometric determination of acemetacin [J]. *Arh Fam*, 1986, **36** (3) : 113 - 117.
- [2] Sch9 Inhammer G, Dell HD, Doersing K, et al. Quantitative determination of acemetacin and metabocite indometacin in blood and plasma by column liquid chromatography [J]. *J Chromatogr*, 1986, **375** (2) :331 - 338.
- [3] Hirai T, Matsumoto S, Kishi I. Simultaneous analysis of several non-steroidal anti-inflammatory drugs in human urine by high-performance liquid chromatography with normal solid-phase extraction [J]. *J Chromatogr B*, 1997, **692** (2) :375 - 388.
- [4] Escuder-Glabert L, Martir-Biosca Y, Sagrado S, et al. Quality control of pharmaceuticals containing non-steroidal anti-inflammatory drugs by micellar liquid chromatography [J]. *Chromatographia*, 2002, **55** (5 - 6) :283 - 288.
- [5] Lopez PJ, Arcos J, et al. Electrochemical behavior of acemetacin [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1988, **6** (6 - 8) :963 - 968.
- [6] Reguera C, Arcos MJ, Ortiz MC. An optimization procedure for determination of indomethacin and acemethacin by differential pulse adsorptive stripping voltammetry. Application on urine samples [J]. *Talanta*, 1998, **46** (6) : 1493 - 1505.
- [7] Auer ME, Griesser UJ, Sawatzki J. Qualitative and quantitative study of polymorphic forms in drug formulations by near infrared FT-Raman spectroscopy [J]. *J Mol Struct*, 2003, **661** (3) :307 - 317.
- [8] Hindson BJ, Barnett NW. Analytical applications of acidic potassium permanganate as a chemiluminescence reagent [J]. *Anal Chim Acta*, 2001, **445** (1) :1 - 19.
- [9] Meixner F, Jaeschke W. Chemilumineszenzverfahren zum Nachweis von Schwefeldioxid im ppt-Bereich [J]. *Fresenius Z Anal Chem*, 1984, **317** (3/4) :343 - 344.
- [10] Zhuang YF, Zhang SC, Yu JS, et al. Flow injection determination of papaverine based on its sensitizing effect on the chemiluminescence reaction of permanganate-sulfite [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2003, **375** (2) :281 - 286.
- [11] Abbott RW, Townshend A, Gil R. Determination of morphine by flow injection analysis with chemiluminescence detection [J]. *Analyst*, 1986, **111** (6) :635 - 640.
- [12] Psarellis IM, Deftereos NT, Sarantonis EG, et al. Flow-injection chemiluminometric determination of some bile acids [J]. *Anal Chim Acta*, 1994, **294** (1) :27 - 34.