

锰(II)-胡椒碱-溴化十六烷基三甲基胺三元体系的荧光特性及应用

领 小, 博日吉汗格日勒图*, 周海军, 那日苏

内蒙古大学高分子化学及蒙药研究所, 内蒙古 呼和浩特 010021

摘 要 研究了金属离子存在下胡椒碱在胶束体系中的荧光特性及实验条件对荧光强度的影响。结果表明: 胡椒碱本身具有较弱的内源性荧光, 在 pH 8.77 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液中, 加入锰离子和阳离子表面活性剂溴化十六烷基三甲基胺对胡椒碱的荧光具有增敏、增稳作用。据此建立了在锰(II)-胡椒碱-溴化十六烷基三甲基胺三元体系中测定胡椒碱的荧光分析新方法。最佳测试条件是锰离子浓度 $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 溴化十六烷基三甲基胺浓度 $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 用 1 cm 石英荧光比色皿在最大激发波长 352 nm, 最大发射波长 452 nm 处测定其荧光强度。胡椒碱的质量浓度在 $2.02 \sim 10.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, 与其荧光强度呈良好的线性关系, 相关系数为 0.998 5, 检出限为 $0.060 2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 方法的相对标准偏差为 1.10%。该方法应用于蒙药草茛中胡椒碱的测定, 其回收率为 97.6%~102.0%, 结果令人满意。

关键词 胡椒碱; 锰; 溴化十六烷基三甲基胺; 荧光光谱

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)01-0188-04

引 言

胡椒碱(Piperine), 化学名为 (2E,4E)-N-[5-(3',4'-亚甲二氧苯基)-2,4-戊二烯酰]哌啶, 是传统蒙药草茛和胡椒等胡椒科植物的主要活性成分。胡椒碱在镇痛、镇静、抗炎、抗惊厥、杀虫、抗癌等多方面存在活性^[1]。目前测定胡椒碱的主要方法有高效液相色谱法^[2-7]、极谱法^[8, 9]、磷酸三丁酯修饰电极电化学检测^[10]和薄层扫描法^[11, 12]等。荧光法以其灵敏度高、选择性好、重现性好、检测极限低等优点受到药物分析者的青睐^[13-15]。近年来, 随着荧光药物分析的发展, 其应用范围日益扩大, 被广泛用于天然药物的分析^[16, 17]。但迄今为止, 尚未见到胡椒碱荧光分析的文献报道。本文对胡椒碱的荧光分析法进行了研究, 建立了灵敏、高效的荧光检测新方法。该方法操作简便、检出限低。用于实际样品分析, 结果满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

RF-5300PC 型荧光光谱仪(日本岛津), pH S-3C 型酸度计(上海第一分析仪器厂)。胡椒碱标准溶液: 称取一定量的胡椒碱标准品(北京中国药品生物制品检定所提供), 加适量 95%乙醇溶解, 配制成 $101 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 储备液, 存放于 4 °C 的

冰箱中备用。

Mn^{2+} 标准溶液: 按常规方法配制成 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准储备液备用。 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液: $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ 的溶液, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Na_2HPO_4 溶液调至 pH 8.77。

溴化十六烷基三甲基胺(cetyltrimethylammonium bromide, CTMAB)溶液: 称取一定量的 CTMAB 配制成 $1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水溶液。

所用试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

在 10 mL 比色管中, 依次加入一定量的胡椒碱标准溶液, $2.5 \text{ mL } 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 锰离子溶液, $0.5 \text{ mL } 1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CTMAB 溶液, $0.5 \text{ mL } \text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液, 然后用 95%乙醇稀释定容, 摇匀并放置 20 min。在最大激发波长 352 nm, 最大发射波长 452 nm 处, 用 1 cm 的石英荧光比色皿测定体系的荧光强度, 激发及发射狭缝宽度均为 5 nm。

2 结果与讨论

2.1 荧光光谱

胡椒碱的 95%乙醇溶液在激发波长 354 nm 下发射波长

收稿日期: 2007-09-06, 修订日期: 2007-12-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(30160103)资助

作者简介: 领 小, 1971 年生, 内蒙古大学高分子化学及蒙药研究所博士研究生 e-mail: lingxiaobao@126.com

* 通讯联系人 e-mail: borjihan@imu.edu.cn

为 437 nm 的荧光, 但荧光弱且不稳定。加入锰离子以后由于形成的 Mn(II)-胡椒碱二元配合物在激发波长 353 nm 时发射波长为 447 nm 的荧光有所增强。在表面活性剂 CTMAB 存在下, 其体系的激发波长蓝移至 352 nm, 而发射波长红移至 452 nm, 荧光强度得到提高且稳定(见图 1)。本文分别选用了 352 和 452 nm 为激发波长和发射波长进行荧光测定。

2.2 体系荧光强度的影响因素

2.2.1 pH 的影响

改变溶液的 pH 值将会影响到金属离子与配体所生成的发光配合物的稳定性和组成, 从而影响到它们的荧光性质^[18]。以 Tris-HCl 和 NH₃-NH₄Cl 缓冲溶液控制溶液的 pH 值试验

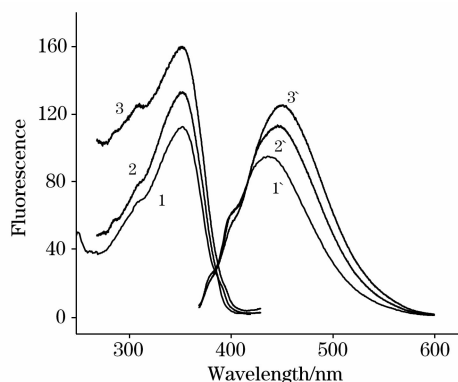


Fig. 1 Excitation spectra and emission spectra

1,1': Piperine; 2,2': Mn-piperine; 3,3': Mn-piperine-CTMAB

了酸碱度对 Mn-胡椒碱-CTMAB 体系的荧光强度。实验结果表明溶液在弱碱性条件下荧光较强, 在 pH 为 8.42~8.90 时达到最大值。在该 pH 范围之内选择了 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, Tris-HCl 和 Na₂B₄O₇-HCl 等几种不同的缓冲溶液。使用 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲溶液, 当 pH 值在 8.77, 其用量为 0.5 mL 时荧光强度达到最大且稳定, 本文选择 0.5 mL pH 8.77 的 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲溶液来控制溶液的 pH 值。

2.2.2 金属离子的选择

本文分别考察了锰、锌、铝、镁、铜、铁和钙等金属离子对胡椒碱荧光性质的影响, 结果见表 1。除了 Fe³⁺ 离子对胡椒碱的荧光起猝灭作用以外, 其他 Mn²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Al³⁺, Cu²⁺ 和 Ca²⁺ 等金属离子均能不同程度的增强胡椒碱的荧光, 其中 Mn²⁺ 离子对胡椒碱荧光的增敏最大。Mn²⁺ 离子浓度在 1×10⁻³ mol·L⁻¹ 时, 其用量在 2.2~2.5 mL 时荧光强度最大且稳定, 故选择浓度为 1×10⁻³ mol·L⁻¹ 的 Mn²⁺ 2.5 mL。

2.2.3 表面活性剂的选择与用量

分别试验了相同浓度(1×10⁻² mol·L⁻¹)的十二烷基硫酸钠(SDS)、十二烷基苯磺酸钠(DSS)、CTMAB、OP-10、曲拉通 X-100(TritonX-100)和吐温-20 等表面活性剂对体系荧光强度的影响, 结果见表 2。阳离子表面活性剂 CTMAB 有显著的增敏、增稳作用, 其用量为 0.5 mL 时荧光强度最强且稳定。实验选用浓度为 1×10⁻² mol·L⁻¹ 的 CTMAB 0.5 mL。

Table 1 Effect of metal ions

金属离子	95%乙醇	Mn ²⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Al ³⁺	Zn ²⁺	Cu ²⁺	Fe ³⁺
强度	95.14	103.68	101.39	101.41	99.81	97.17	95.56	2.64

Table 2 Effect of surfactants

表面活性剂	95%乙醇	SDS	DSS	CTMAB	Triton X-100	吐温-20	OP-10
强度	100.35	108.47	100.46	125.49	103.39	108.29	104.12

2.2.4 体系的稳定性

为了考察放置时间对体系荧光强度的影响, 室温下溶液配好之后每隔 10 min 进行测定, 结果表明放置时间对体系荧光强度影响很小, 当放置 20 min 后, 荧光强度达到最大值且保持稳定, 在 2 h 之内体系的荧光强度基本保持不变。

2.3 线性范围与检出限

按实验方法配制一系列含不同浓度的胡椒碱溶液, 测定其荧光强度。发现胡椒碱的质量浓度在 2.02~10.1 μg·mL⁻¹ 范围内, 与其荧光强度呈良好的线性关系。其线性回归方程为 $F=9.869c+23.482$, 式中 F 表示荧光强度, c 表示胡椒碱的质量浓度(μg·mL⁻¹)。线性相关系数为 $r=0.9985$, 说明荧光强度与相应的浓度线性显著相关。对空白对照液进行 11 次平行测定, 根据公式 $c_L=3S/k$ (S 为空白溶液的标准偏差, k 为工作曲线斜率), 计算出此方法的检出限为 0.060 2 μg·mL⁻¹。

2.4 精密度试验

按照实验方法对 8.08 μg·mL⁻¹ 胡椒碱溶液平行测定 11 次, 相对标准偏差为 1.10%, 表明方法的精密度良好。

2.5 干扰试验

在最佳条件下, 测定荧光强度相对误差在 ±5% 范围内, 以下常见金属离子不干扰测定的最大倍数为(与胡椒碱摩尔浓度比): Cu²⁺ (5), Ca²⁺ (2.7), Mg²⁺ (2), Zn²⁺ (5), K⁺ (50), Fe³⁺ (0.1), Al³⁺ (2.1)。K⁺ 和 Fe³⁺ 在浓度较高时, 对体系的荧光有猝灭作用, 空白试剂在测定波长处无干扰。

2.6 配合物组成的测定

采用摩尔比法, 对 Mn(II)-胡椒碱配合物的配位数进行了测定。胡椒碱的紫外最大吸收波长为 343 nm^[19], 而以 Mn²⁺ 形成配合物后其紫外最大吸收波长蓝移至 341.5 nm。以胡椒碱标准溶液 101 μg·mL⁻¹ (摩尔浓度为 3.54×10⁻⁴ mol·L⁻¹) 为标准, 准确称取一定量的金属离子锰配制成 3.54×10⁻⁴ mol·L⁻¹ 浓度的溶液。固定金属离子的浓度, 改变胡椒碱的用量, 测定这一系列溶液的紫外最大吸收波长

341.5 nm 处的吸光度。以吸光度 A 为纵坐标、胡椒碱的浓度 c_L 和 Mn^{2+} 的浓度 c_R 之比 c_L/c_R 为横坐标作图, 从转折点得到胡椒碱的配位比为 1 : 3, 结果见图 2。

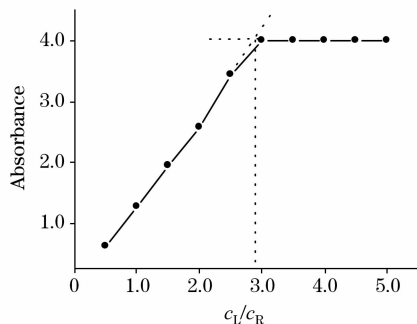


Fig. 2 Relationship between A and c_L/c_R

2.7 样品测定及回收率试验

2.7.1 样品溶液的制备和测定

精密称取粉碎的荜茇 0.500 g, 加 30 mL 95%乙醇加热回流提取 1 h, 过滤, 用 95%乙醇定容到 50 mL。吸取样品 2 mL 稀释到 25 mL。再准确移取此溶液 1 mL, 按实验方法测

定其荧光强度, 并对样品溶液进行平行测定 5 次, 以胡椒碱作对照, 按回归方程计算, 并最后换算得到荜茇中胡椒碱的含量(见表 3)。

Table 3 Determination result ($n=5$)

名称	测定含量/%	平均含量 /%	RSD /%
荜茇	5.38, 5.53, 5.66, 5.38, 5.48	5.49	2.13

2.7.2 回收率测定

为了验证试验的准确性, 在样品溶液中加入胡椒碱对照品后计算回收率, 其结果见表 4。其回收率在 97.6%~102.0%范围, 实验结果准确, 说明本方法可行。

Table 4 Recovery result ($n=3$)

样品编号	原含量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	加入量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测定值 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率 / %
1	4.492	2.02	6.354	97.6
2	4.492	2.02	6.641	102.0
3	4.492	2.02	6.490	99.7

参 考 文 献

- [1] WEI Kun, DOU De-qiang, PEI Yu-ping, et al(韦 琨, 窦德强, 裴玉萍, 等). China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志), 2002, 27(5): 328.
- [2] JIA Fu-qun, BAI Wei(贾福群, 白 炜). Chinese Traditional and Herbal Drugs(中草药), 2003, 34(6): 527.
- [3] LI Jian, LÜ Gui-bao(李 建, 吕归宝). Chinese Traditional and Herbal Drugs(中草药), 2003, 34(2): 139.
- [4] Waldemar Ternes, Edburga L Krause. Anal. Bioanal. Chem., 2002, 374: 155.
- [5] Verzele M, Qureshi S. Chromatographia, 1980, 13(4): 241.
- [6] XU Liang, XI Hai-shan, BI Kai-shun, et al(许 良, 席海山, 毕开顺, 等). Chinese Traditional Patent Medicine(中成药), 2006, 28(4): 603.
- [7] WEN Ai-ping, SU Rui-lin(温爱平, 苏瑞林). Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis(药物分析杂志), 2005, 25(12): 1466.
- [8] MENG Zhao-hui, WANG Zhen-hui, ZHOU Shu-ping(孟召辉, 汪振辉, 周漱萍). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 1994, 22(12): 1263.
- [9] HAN Wen-bin, ZHANG Ke-kai, LIANG Yun-ai(韩文彬, 张科凯, 梁云爱). Chinese Pharmaceutical Affairs(中国药事), 1996, 10(4): 267.
- [10] WANG Zhen-hui, ZHANG Qian-li, ZHOU Shu-ping(汪振辉, 张钱丽, 周漱萍). Analytical Laboratory(分析实验室), 1999, 18(3): 31.
- [11] WANG Tao, DU Heng-qing, WANG Cong(王 滔, 都恒青, 王 淙). Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies(中药新药与临床药理), 1998, 9(3): 178.
- [12] LIU Shuan-di, SHI Yan, MENG Gen-da-lai(刘拴娣, 石 岩, 孟根达来). Chinese Traditional Patent Medicine(中成药), 2000, 22(7): 475.
- [13] PAN Zu-ting, YU Jun-ping(潘祖亭, 余军平). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2004, 32(3): 338.
- [14] TONG Shang-lun, XIANG Guang-hong, LIU Wei-ping(童裳伦, 项光宏, 刘维屏). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(12): 2061.
- [15] AODENG Gao-wa, ZHANG Ying, FAN Hai-yan(敖登高娃, 张 莹, 樊海燕). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(8): 1530.
- [16] LIU Chun, ZHAO Hui-chun, JIN Lin-pei(刘 春, 赵慧春, 金林培). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 1999, 19(4): 569.
- [17] ZHANG Min, QIU Zhao-hui, CAO Yong, et al(张 敏, 邱朝晖, 曹 庸, 等). Lishizhen Medicine and Materia Medica Research(时珍国医国药), 2005, 16(3): 238.
- [18] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). Fluorescence Analysis Method(Third Edi-

tion)(荧光分析法, 第 3 版). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 2006. 55.

[19] The Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China(国家药典委员会编). Chinese Pharmacopoeia(中国药典). Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2000. 188.

Fluorescence Characteristics and Analytical Application of Mn(II)-Piperine-Cetyltrimethylammonium Bromide Ternary System

LING Xiao, BORJIHAN Ge-rel-tu*, ZHOU Hai-jun, NA Ri-su

Institute of Macromolecule Chemistry and Mongolian Medicine, Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China

Abstract The fluorescence characteristics of the complex of piperine with cation in micellar system were studied. At the same time, the influence of experimental condition on the fluorescence intensity was also studied. The experiments indicated that piperine had very low fluorescence signal itself. But in pH 8.77 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ buffer solution, both Mn(II) and cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide can enhance the fluorescence intensity and stability of piperine. Based on this, a sensitive method has been developed for the quantitative determination of piperine in Mn(II)-piperine-cetyltrimethylammonium bromide ternary system. Under the optimum conditions, there is a linear relationship between the enhancement of fluorescence intensity and the concentration of Mn(II). The optimal conditions are as follows: the concentration of Mn(II) is $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and the concentration of cetyltrimethylammonium bromide is $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The fluorescence intensity was determined by a 1 cm quartz cell with the excitation wavelength of 352 nm and the emission wavelength of 452 nm. The linear range of concentration of piperine was 2.02-10.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ with the relative coefficient of 0.998 5 and the detection limit of 0.060 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The relative standard deviation (RSD) was 1.10%. The proposed method has been successfully applied to the quantitative determination of piperine in the Mongolian medicine Piper longum L., and the recovery was within the range of 97.6%-102.0%. The results were very satisfactory.

Keywords Piperine; Manganese; Cetyltrimethylammonium bromide; Fluorescence spectra

(Received Sep. 6, 2007; accepted Dec. 16, 2007)

* Corresponding author