

文章编号: 1674-8085(2018)02-0023-07

# 催化 $\text{H}_2\text{O}_2$ 氧化吖啶黄固体基质室温磷光法测定痕量秋水仙碱

\*孙莉娜, 林常青, 郑志勇

(漳州职业技术学院食品工程学院, 福建, 漳州 363000)

**摘要:** 基于秋水仙碱(COL)能催化过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )氧化吖啶黄(AY)的反应, 导致AY的室温磷光信号(RTP)剧烈猝灭, 据此建立了超灵敏催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化 AY 固体基质室温磷光法(SS-RTP)测定 COL 的新方法。此方法的量化限(LOQ)为  $0.12 \text{ fg/斑}$  (对应浓度为  $3.1 \times 10^{-13} \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 灵敏度高、简便、快捷、准确。用于血清中 COL 的测定, 结果与 UPLC-MS/MS 相吻合。同时测定了动力学常数, 其活化能(E)为  $40.53 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 速度反应常数(k)为  $3.97 \times 10^{-4} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

**关键词:** 秋水仙碱; 叭啶黄; 过氧化氢; 磷光猝灭法

中图分类号: O 614.4

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2018.02.005

## ULTRA-SENSITIVE SOLID SUBSTRATE-ROOM TEMPERATURE PHOSPHORIMETRY FOR COLCHICINE DETECTION BASED ON ITS CATALYTIC EFFECT ON $\text{H}_2\text{O}_2$ OXIDIZE ACRIDINE YELLOW

\*SUN Li-na, LIN CHANG-qing, ZHENG Zhi-yong

(College of Food Engineering, Zhangzhou Institute of Technology, Zhangzhou, Fujian 363000, China)

**Abstract:** A new solid substrate-room temperature phosphorimetry (SS-RTP) for colchicine (COL) detection has been established based on its strong catalytic effect on  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidize acridine yellow(AY), which caused the room temperature phosphorimetry (RTP) of AY to quench sharply. This high sensitive (limit of quantification (LOQ):  $3.1 \times 10^{-13} \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), accurate and selective SS-RTP has been successfully applied in the COL detection in the human serum and tea samples with the results agreeing well with high performance liquid chromatography (HPLC), the results were coincident with those of ultra fast high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method. The activation energy and the reaction rate constant of catalytic reaction were  $40.53 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  and  $3.97 \times 10^{-4} \cdot \text{s}^{-1}$ , respectively.

**Key words:** colchicines; acridine yellow; hydrogen peroxide; phosphor quenching

秋水仙碱(Colchicine, COL)不仅能用于治疗痛风及某些恶性肿瘤<sup>[1]</sup>, 而且可预防与治疗家族性地中海热、肾脏、某些皮肤病及纤维化性疾病等<sup>[2]</sup>, 显示了较好的应用前景。医学报告显示, 对于成年人来说, 超过  $0.8 \text{ mg/kg}$  的 COL 通常是致命的, 研究

报告口服药物秋水仙碱最低的致命剂量是  $7\sim26 \text{ mg}$ <sup>[3-4]</sup>。显然, COL 与人体疾病密切相关, 在临幊上具有重要的应用价值。

近年来, COL 的测定有荧光法(检出限(LD)是  $1.5 \times 10^{-8} \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )<sup>[5]</sup>、HPLC/MS<sup>[6]</sup>、HPLC 法<sup>[7]</sup>、超

收稿日期: 2017-12-26; 修改日期: 2018-02-16

作者简介: \*孙莉娜(1978-), 女, 福建东山人, 讲师, 硕士, 主要从事环境科学检测、食品安全检测等分析化学研究(E-mail:41573105@qq.com);  
林常青(1963-), 男, 福建龙海人, 教授, 主要从事分析化学研究(E-mail:1543845385@qq.com);  
郑志勇(1970-), 男, 福建漳州人, 副教授, 主要从事分析化学研究(E-mail:648603824@qq.com).

高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS) (LD 为  $5.0 \times 10^{-11} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )<sup>[8]</sup>、伏安法<sup>[9]</sup>和薄层色谱法<sup>[10]</sup>等。然而,这些检测方法中有的需要使用有毒有害的有机溶剂,有的由于设备昂贵,且操作繁琐、分析成本较高而不利于推广应用<sup>[11]</sup>。如:HPLC/MS、HPLC 需用有毒有害的有机溶剂萃取,操作繁琐;伏安法、薄层色谱法与荧光法等的 LD 高,灵敏度低,在药代动力学研究中难以满足对 COL 检测的需要<sup>[8]</sup>;虽然 UPLC-MS/MS 灵敏度高,但使用的仪器昂贵,分析成本高,应用范围有限。因此,探索一种高灵敏度、简易、快速、低成本的检测 COL 新方法是极其有意义和价值的。由于固体基质室温磷光法 (SS-RTP) 比常见的荧光或磷光检测手段更具有 Stokes 位移大、容易减少或消除本底荧光和散射干扰、发光寿命长、检测的选择性更好等优点,人们开发了一系列的 SS-RTP 用于有机分子<sup>[12-14]</sup>、生物活性物质<sup>[15-20]</sup>和有毒离子<sup>[21-22]</sup>等检测,显示了 SS-RTP 的潜在应用前景。

实验研究发现,以  $\text{Pb}^{2+}$  为微扰剂时,吖啶黄 (AY) 在聚酰胺素膜(PAM)固体基质上发射强而稳定的室温磷光信号(RTP)信号。在 100℃ 反应 10 min 条件下, COL 可催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化 AY 的反应,导致 AY 的 RTP 信号猝灭,且  $\Delta I_p$  值与 COL 含量呈线性关系,据此提出了催化 SS-RTP 法测定痕量 COL 的新方法。该方法的 LD 为  $0.037 \text{ fg} \cdot \text{spot}^{-1}$  (样品量为  $0.40 \mu\text{L}$ /斑,对应浓度为  $9.3 \times 10^{-14} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),比已报道的方法的检出限 ( $5.0 \times 10^{-11} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )<sup>[8]</sup>低,这种灵敏、准确、重现性与选择性好的 SS-RTP 鲜见文献报道,更适用于人血清中痕量秋水仙碱的分析。这种新方法的建立和应用的研究,将有利于推动 COL 检测技术的进一步发展。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器及试剂

LS-55型荧光分光光度计 (Perkin Elmer公司),其仪器参数分别为:延迟时间0.1 ms,门控时间2.0 ms,循环时间20 ms,积分值1,激发狭缝10 nm,发射狭缝10 nm,扫描速度 1500 nm/min;固体前表面处理器 (Perkin Elmer公司); 0.50  $\mu\text{L}$  平头微量注射器

(上海医用激光仪器厂); AE240型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

COL 工作液(先配成  $10.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  COL 的储备液,临用时逐级稀释成  $1.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $100.0 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $10.0 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 COL 溶液作为工作液)、 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  吖啶黄(AY)、2% (w/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液、 $1.00 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Pb}^{2+}$  溶液、三次石英亚沸蒸馏水。其中除 COL 试剂为基准试剂以外,其它试剂均为分析纯。

定量滤纸(购买杭州新华纸业有限公司)。聚酰胺膜(PAM)、硝酸纤维素膜 (NCM)、醋酸纤维素膜 (ACM) (均购买路桥四甲生化塑料厂)。滤纸均先剪切成  $\Phi = 1.5 \text{ cm}$  圆片,压痕 ( $\Phi = 4.0 \text{ mm}$ ),以备用。

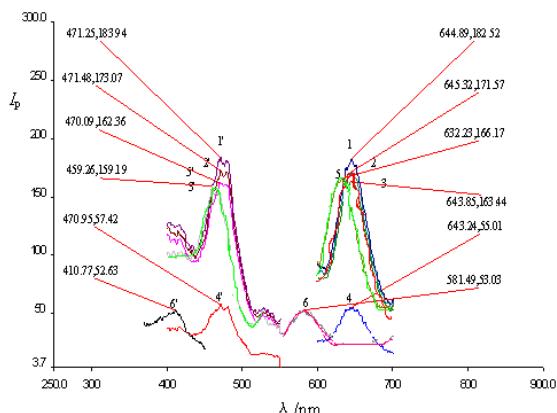
### 1.2 实验方法

往 25 mL 比色管中加入适量 COL、 $1.00 \text{ mL}$  AY、 $4.00 \text{ mL}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ,用蒸馏水定容,摇匀。于 100 ℃ 下反应 10 min,流水冷却 5 min。将 PAM 放入  $1.00 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Pb}^{2+}$  溶液中浸泡 10 s 后,在  $(90 \pm 1)^\circ\text{C}$  温度下干燥 2 min,再用 0.50  $\mu\text{L}$  规格的平头微量注射器悬空点样 0.40  $\mu\text{L}$ ,继续在  $(90 \pm 1)^\circ\text{C}$  温度下干燥 2 min,同时作试剂空白试验。在 442 nm 和 507 nm 处测定试剂空白(无秋水仙碱时)的磷光信号  $I_{p0}$  与催化反应试液的磷光信号  $I_p$  值,求出  $\Delta I_p = (I_{p0} - I_p)$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 磷光光谱

扫描 COL- $\text{H}_2\text{O}_2$ -AY 体系磷光光谱(图 1)可知,用 PAM 作固体基质,且在  $\text{Pb}^{2+}$  的微扰下,AY 会发射出强而稳定的 RTP 信号 ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 471.2/644.9 \text{ nm}$ ,  $I_p = 182.5$ , 曲线 1.1'); 当  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在时,AY 的 RTP 发生猝灭 ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 71.5/645.3 \text{ nm}$ ,  $I_p = 171.6$ , 曲线 2.2'); 往 AY-  $\text{H}_2\text{O}_2$  体系中添加 1000.0 pg COL 溶液时,AY 的 RTP 发生剧烈猝灭 ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 471.0/643.2 \text{ nm}$ ,  $I_p = 55.0$ , 曲线 4.4'),其  $\Delta I_p = 116.6$ ,比非催化反应体系的  $\Delta I_p$  (10.9) 大 10.7 倍,且  $\Delta I_p$  与 COL 的含量存在着线性关系,为催化 SSRTSP 测定 COL 含量提供了可能性。



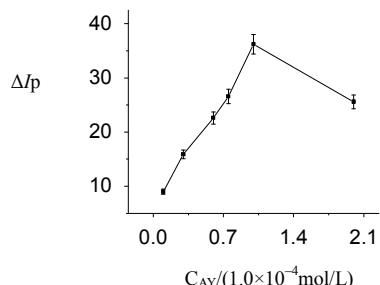
(1.1~6.6 为激发光谱, 1.1'~6.6' 为发射光谱; 其中 1.1'. 6.6'+1.00 mL AY、2.2'. 1.1'+4.00 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、3.3'. 2.2'+10.0 pg COL、4.4'. 2.2'+1000.0 pg COL、5.5'. 1.1'+1000.0 pg COL 和 6.6'. PAM 的  $\lambda_{ex}^{max}$  分别为 644.9, 645.3, 643.8, 643.2, 632.2 和 581.5,  $I_p$  值依次为 182.5, 171.6, 163.4, 55.0, 166.2 和 53.0, 与  $I_p$  对应的 RSDs(%) 分别为 1.2, 1.6, 1.9, 3.5, 1.5 和 3.8)

图 1 COL-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-AY 磷光光谱

Fig.1 COL-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-AY phosphorescence spectrum

## 2.2 表观活化能(Ea)和速率常数(k)的测定

为了证明 COL 催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化 AY 的反应可能, 在最佳条件下考察了催化反应的表观活化能(Ea)和



当 AY 浓度分别为 0, 0.1, 0.3, 0.75, 1.0, 2.0 ( $\times 10^{-4}$ ) 时, 体系  $\Delta I_p$  依次为 9.0, 15.9, 22.6, 28.6, 36.2, 25.6

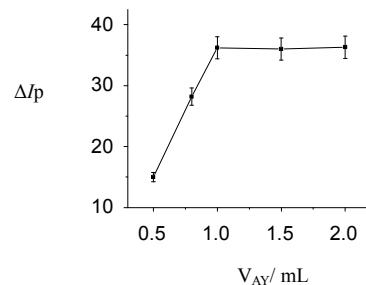
图 2 AY 浓度对  $\Delta I_p$  的影响

Fig.2 The influence of AY concentration on  $\Delta I_p$

速率常数(k)。针对 4.8 fg·spot<sup>-1</sup> 的 COL 溶液, 进行反应温度与反应时间对体系  $\Delta I_p$  值的影响情况的探讨, 结果显示: 当 t = 10 min 时, 反应温度在 60~100 (°C) 范围内与  $-\log[\log I_{p0}/I_p]$  成正比, 其回归方程为  $-\log[\log I_{p0}/I_p] = 1.819 \times (1/T) \times 1000 - 3.903$ , r = 0.9966。当 T = 100°C 时  $\Delta I_p$  最大, 且表观活化能 E = 40.53 kJ·mol<sup>-1</sup>; 当 T=100°C 时, 反应时间在 4~10 (min) 范围内能与  $\ln I_{p0}/I_p$  成线性关系, 且呈一级反应关系, 该回归方程为  $\ln I_{p0}/I_p = -0.0732 + 0.0306 t$  (min), r = 0.9975。其中 10 min 时  $\Delta I_p$  最大, 此时速率常数 k =  $3.97 \times 10^{-4}$  s<sup>-1</sup>, 这些都说明了 COL 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化 AY 是有催化效应。

## 2.3 测定条件的选择

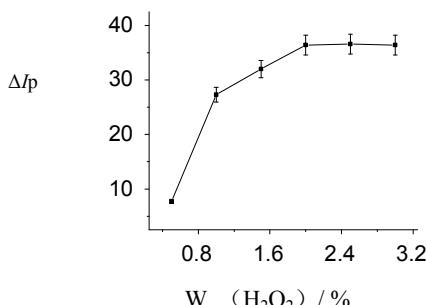
对体系中 4.8 fg·spot<sup>-1</sup> 的 COL 溶液, 分别探讨各种试剂的浓度与用量、氧化剂、固体基质、离子微扰剂、反应酸度、反应温度和时间、通或不通干燥的 N<sub>2</sub> 和放置时间等条件对体系  $\Delta I_p$  的影响, 结果如图 2~12 所示。



当 AY 用量分别为 0.00, 0.50, 0.80, 1.00, 1.50, 2.00 (mL) 时, 体系  $\Delta I_p$  依次为 15.0, 28.2, 36.2, 36.0, 36.3, 36.1

图 3 AY 用量对  $\Delta I_p$  的影响

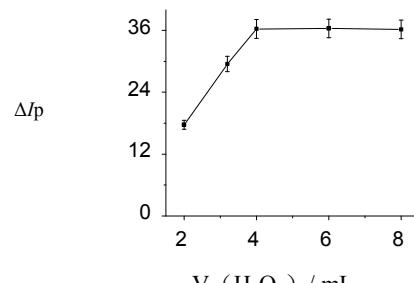
Fig.3 The influence of AY amount on  $\Delta I_p$



当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度分别为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0%, 时, 体系  $\Delta I_p$  依次为 7.7, 27.3, 32.0, 36.4, 36.6, 36.4

图 4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度对  $\Delta I_p$  的影响

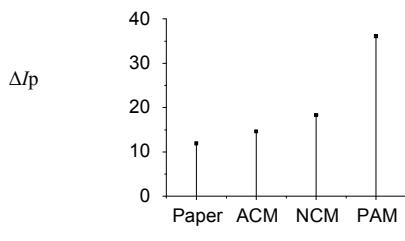
Fig.4 The influence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration on  $\Delta I_p$



当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 用量分别为 2.00, 3.20, 4.00, 6.00, 8.00 mL (mL) 时, 体系  $\Delta I_p$  依次为 15.0, 28.2, 36.2, 36.0, 36.3, 36.1

图 5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 用量对  $\Delta I_p$  的影响

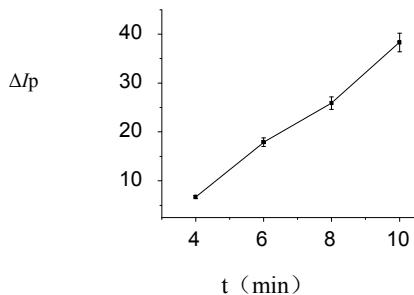
Fig.5 The influence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> amount on  $\Delta I_p$



当固体基质分别为滤纸, ACM, NCM PAM 时, 体系  $\Delta I_p$  依次 11.9, 14.6, 18.3, 36.1

图 6 固体基质对  $\Delta I_p$  的影响

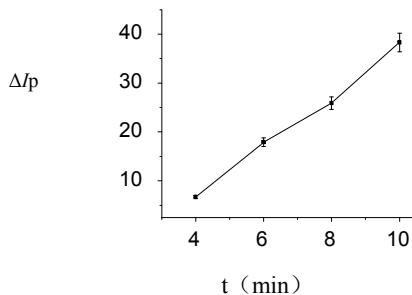
Fig.6 The influence of Solid substrate on  $\Delta I_p$



当重离子分别为  $Pb^{2+}$ ,  $I^-$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Ag^+$  时, 体系  $\Delta I_p$  依次为 36.3, 25.2, 18.9, 12.1

图 7 重离子对  $\Delta I_p$  的影响

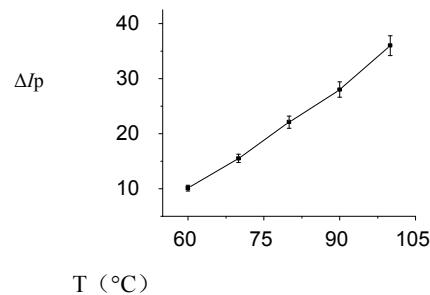
Fig.7 The influence of Heavy ion on  $\Delta I_p$



当反应时间为 4, 6, 8, 10 min 时, 体系  $\Delta I_p$  依次 8.7, 17.9, 25.9, 36.3

图 8 反应时间对  $\Delta I_p$  的影响

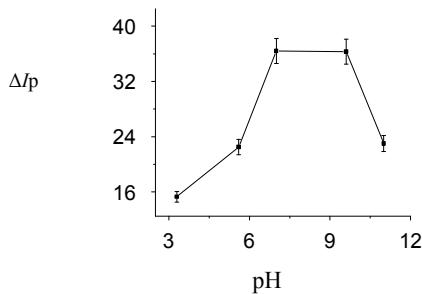
Fig.8 The influence of reaction time on  $\Delta I_p$



当反应温度分别为 60, 70, 80, 90, 100 °C 时, 体系  $\Delta I_p$  依次为 10.1, 15.5, 22.1, 28.0, 36.0

图 9 反应温度对  $\Delta I_p$  的影响

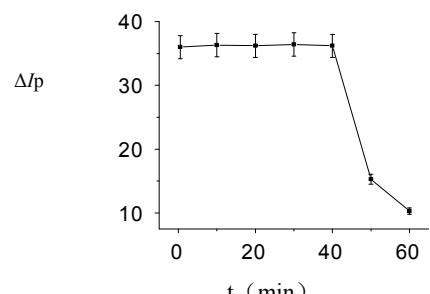
Fig.9 The influence of reaction temperature on  $\Delta I_p$



当 pH 值分别为 3.30, 5.60, 7.00, 9.60, 11.0 时, 体系  $\Delta I_p$  依次 15.3, 22.5, 36.4, 36.3, 23.0

图 10 pH 值对  $\Delta I_p$  的影响

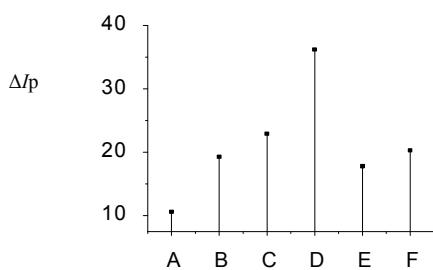
Fig.10 The influence of pH value on  $\Delta I_p$



当静置时间分别为 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min, 体系  $\Delta I_p$  依次为 36.0, 36.3, 36.2, 36.4, 36.1, 36.2, 15.3, 10.3

图 11 静置时间对  $\Delta I_p$  的影响

Fig.11 The influence of Incubation time on  $\Delta I_p$



当氧化剂分别为  $KClO_3$  (A),  $K_2S_2O_8$  (B),  $KIO_4$  (C),  $H_2O_2$  (D),  $NaIO_4$  (E) 和  $(NH_4)_2S_2O_8$  (F) 时, 体系  $\Delta I_p$  依次 10.6, 19.3, 22.9, 36.2, 17.8, 20.3

图 12 氧化剂对体系  $\Delta I_p$  的影响

Fig.12 The influence of Oxidant on  $\Delta I_p$

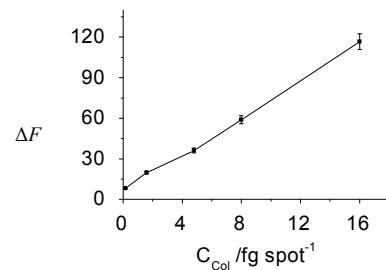


图 13 工作曲线的回归方程

Fig.13 The regression equation of the working curve

由图 2~12 得出以下规律:

(1) 随着 AY 浓度和用量的增加, 体系的  $\Delta I_p$  值逐渐增大, 当 AY 为  $1.0 \text{ mL} 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  时体系  $\Delta I_p$  值达到最大值。

(2) 虽然  $\text{KClO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 、 $\text{KIO}_4$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{NaIO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  作为氧化剂时体系  $\Delta I_p$  值较高, 但以  $\text{H}_2\text{O}_2$  的  $\Delta I_p$  最大, 可能是  $\text{H}_2\text{O}_2$  的氧化能力最大。随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度和用量的增加, 体系的  $\Delta I_p$  值逐渐增大。当  $\text{H}_2\text{O}_2$  为  $4.0 \text{ mL} 2.0\%$  时, 体系  $\Delta I_p$  值达到最大值; 当超过  $4.0 \text{ mL} 2.0\%$   $\text{H}_2\text{O}_2$  时体系的  $\Delta I_p$  值几乎不变。

(3) 在研究所考察的几种固体基质中, 相对于滤纸、NCM 和 ACM, PAM 发射磷光最强。可能是重原子  $\text{Pb}^{2+}$  溶液在 PAM 扩散较慢, 干燥时能迅速扩散的缘故<sup>[25]</sup>。

(4) 虽然  $\Gamma$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^+$  作为离子微扰剂时体系  $\Delta I_p$  值较高, 但以  $\text{Pb}^{2+}$  的  $\Delta I_p$  最大, 可能是由于  $\text{Pb}^{2+}$  是重金属离子, 其重原子效应很大程度提高了发光分子从  $S_1$  态  $\longrightarrow T_1$  态的跃迁几率, 才使体系的  $\Delta I_p$  值发生剧烈增强。研究表明: 随着  $\text{Pb}^{2+}$  浓度的增加, 体系  $\Delta I_p$  值增大;  $\text{Pb}^{2+}$  浓度为  $1.00 \text{ mol L}^{-1}$  时, 体系  $\Delta I_p$  值达到最大;  $\text{Pb}^{2+}$  浓度大于  $1.00 \text{ mol L}^{-1}$  时, 体系  $\Delta I_p$  值反而减少。可能是适度的重原子效应能增加 AY 从单线态向三线态跃迁几率而使磷光增强, 而过度的重原子效应使磷光增强猝灭的缘故<sup>[22]</sup>。

(5) 当 pH 在  $3.30\sim 7.00$  范围内, 随着 pH 的增加体系的  $\Delta I_p$  值线性增大; 当 pH 在  $7.00\sim 9.60$  范围内, 体系  $\Delta I_p$  最大且稳定。可能是在此 pH 值范围内 COL 的催化反应速率最大。

表 1 几种测定 COL 的方法比较

Table 1 Several methods for determining COL are compared

方法	线性范围( $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	工作曲线的回归方程	r	RSD(%)	LOD( $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	LOQ( $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
催化 SS-RTP	$4.0 \times 10^{-13}$ $4.0 \times 10^{-11}$	$\Delta I_p = 6.366 + 6.792 \text{ m}_{\text{Col}}/\text{fg} \cdot \text{spot}^{-1}$ , $S_b = 0.083, n = 7$	0.9986	1.2~3.9	$9.3 \times 10^{-14}$ ( $0.037 \text{ fg} \cdot \text{spot}^{-1}$ )	$3.1 \times 10^{-13}$ ( $0.12 \text{ fg} \cdot \text{spot}^{-1}$ )
荧光法 <sup>[5]</sup>	$2.0 \times 10^{-7}\sim 5.0 \times 10^{-6}$	$\Delta F = -27 + 398.8 C_{\text{Col}} (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	0.9987		$1.5 \times 10^{-8}$	
UPLC-MS/MS <sup>[8]</sup>	$1.0 \times 10^{-10}\sim 1.0 \times 10^{-6}$	$Y = -6.3971 + 0.0024x (\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	0.9974	3.3~3.8	$5.0 \times 10^{-11}$	

本方法的 LOD( $9.3 \times 10^{-14} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 按  $3\text{Sb}/k$  计算,  $\text{Sb} = 0.083, n = 11$ ) 比文献[8] ( $5.0 \times 10^{-11} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 低, 展现高的灵敏度。可能的原因: 一是 COL 催化反应对测量信号的放大效应; 二是重原子  $\text{Pb}^{2+}$  的重原

(6) 随着反应温度与时间的增加, 体系  $\Delta I_p$  值逐渐增大, 可能是 COL 的催化反应能力逐渐增大。当反应温度与时间分别为  $100^\circ\text{C}$ 、10 min 时, 体系  $\Delta I_p$  值最大, 显然, 此时 COL 的催化反应能力最强。

(7) 本实验研究发现在通入  $3\sim 25 \text{ min}$  干燥  $\text{N}_2$  的条件下, 体系是稳定的, 可能是氧气及湿度的影响被消除的缘故。然而, 不通干燥  $\text{N}_2$  时, 随着时间的增加, 体系  $\Delta I_p$  值逐渐减小, 表明了氧气及湿度可导致 RTP 猝灭, 故选择通干燥  $\text{N}_2$  时间为 6 min 最佳。

(8) RTP 发射的稳定性是实现催化 SS-RTP 测定痕量 COL 的关键。在最佳条件下, 放置时间在 40 min 内体系  $\Delta I_p$  值几乎不变, 重现性好。当放置时间超过 40 min, 体系的  $\Delta I_p$  值逐渐减少, 这可能与放置过程 AY 被潮解有关。

结果表明: 当用  $1.00 \text{ mL} 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  AY 和  $4.00 \text{ mL} 2.0\%$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\text{H}_2\text{O}_2$  为氧化剂)、PAM 为固体基质、 $\text{Pb}^{2+}$  为离子微扰剂、反应温度为  $100^\circ\text{C}$  和反应时间为 10 min、反应 pH 为 7.00、通干燥的  $\text{N}_2$  时间为 6 min、静置时间为 40 min 时, 体系的  $\Delta I_p$  值最大且稳定。此时体系的 pH = 7.00。

#### 2.4 工作曲线, 线性范围, 精密度与检出限

在最佳条件下, 体系的  $\Delta I_p$  与 COL 浓度含量呈线性关系(图 2), 此研究方法的工作曲线的回归方程、线性范围、相关系数(r)、RSD% (分别对 0.16 ( $\text{fg} \cdot \text{spot}^{-1}$ ) 和 16.0 ( $\text{fg} \cdot \text{spot}^{-1}$ ) 的 COL 溶液进行 7 次平行测定试验, 并计算其 RSD%)、LOD (对试剂空白进行 11 次的平行测定, 求得  $I_p$  平均值为 171.6, 以  $3\text{Sb}/k$  计算,  $\text{Sb} = 0.083$ )、limit of quantification (LOQ)(以  $10\text{Sb}/k$  计算)等与文献[5,8]方法比较于表 1。

子微扰效应, 提高了 AY 分子往三重态跃迁的几率, 使体系的  $\Delta I_p$  值剧烈变大。本方法不仅为超痕量 COL 的检测提供了新技术, 而且显示了催化反应对测量信号的放大效应是进一步提高 SS-RTP 灵敏度

的一种有效途径。

## 2.5 共存离子的影响

用本法分别测定  $12.0 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  COL、 $12.0 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$

$\text{COL} + X \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  共存离子(物), 当相对误差为 $\pm 5\%$ 时, 共存离子(物)的允许浓度与文献( $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{COL}=399 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}=0.4 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  COL<sup>[8]</sup>)比较于表 2。

表 2 共存离子(物)的影响  
Table 2 The effects of coexisting ions (objects)

共存离子(物)	SS-RTP			文献[8]方法 允许倍数
	最大允许浓度( $\text{ng mL}^{-1}$ )	允许倍数	Er (%)	
$\text{PO}_4^{3-}$	48.0	4000 (207.6)	3.2	1000
$\text{K}^+$	60.0	5000 (202.7)	0.75	1000
$\text{Na}^+$	42.0	3500 (197.7)	-1.7	1000
$\text{Cl}^-$	36.0	3000 (194.5)	-3.3	1000
$\text{SO}_4^{2-}$	39.6	3300 (204.8)	1.8	1000
$\text{Ca}^{2+}$	45.6	3800 (202.0)	0.40	1000
$\text{NH}_4^+$	54.0	4500 (201.3)	0.050	1000
$\text{Mg}^{2+}$	38.4	3200 (198.7)	-1.2	1000
Starch (淀粉)	42.0	3500 (196.9)	-2.1	500
Glucose (葡萄糖)	48.0	4000 (204.5)	1.6	500
$\text{Co}^{2+}$	5.16	430 (203.1)	0.94	100
Sucrose (蔗糖)	8.40	700 (201.9)	0.35	100
Fructose (果糖)	9.60	800 (198.7)	-1.2	100
$\text{Al}^{3+}$	0.600	50 (196.4)	-2.4	10
$\text{Zn}^{2+}$	0.420	35 (210.1)	4.4	10
$\text{CO}_3^{2-}$	0.276	23 (204.8)	1.8	5
$\text{Fe}^{3+}$	0.054	4.5 (200.7)	-0.25	1
$\text{Cu}^{2+}$	0.046	3.8 (199.8)	-0.70	1
Urea (尿素)	0.120	10 (197.2)	-2.0	1
Uric acid (尿酸)	0.108	9 (196.9)	-2.1	0.1

(分别对  $12.0 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  COL、 $12.0 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  COL+ $X \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  共存离子(物)平行测定 6 次, 并分别计算出相对误差)

由表 2 可知, 本方法比文献[8]方法的共存离子(物)允许存在浓度更高, 选择性更好, 体现了本方法的研究价值。

## 2.6 样品分析

6 名健康志愿者于给药前 12 h, 进清淡晚餐后, 禁食过夜, 于次日早晨空腹服用秋水仙碱片 2 片(1 mg), 用温开水 200 mL 送服。参照文献[8]方法, 两周后

分别自上肢静脉取血液 5.00 mL, 置肝素试管中, 以 3000 rpm 的转速离心 10 min, 取上层人血清水定容至 50 mL,  $-40^\circ\text{C}$  保存备用, 供测试。取 1.00 mL 试液, 按上述实验方法测定 COL 含量, 同步做加标回收实验, 所得数据再与 UPLC-MS/MS<sup>[8]</sup>进行比较, 结果列于表 3。本法与 UPLC-MS/MS 测定秋水仙碱含量的显著性差异分析列于表 4。

表 3 人血清中秋水仙碱含量的分析结果  
Table 3 The analysis results of the content of narcissus in human serum

样品	SS-RTP ( $n=6$ )			UPLC-MS/MS ( $n=5$ )			Er (%)
	平均值( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	加入量( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	回收量( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	回收率(%)	RSD(%)	平均值( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	
A	6.38	0.60	0.58	96.7	4.3	6.41	-0.47
B	7.20	0.70	0.69	98.6	2.7	7.25	-0.69
C	4.80	0.50	0.49	98.0	3.3	4.86	-1.2
D	6.93	0.70	0.69	98.0	2.6	6.89	-0.58
E	8.12	0.80	0.78	97.5	3.7	8.16	-0.49
F	9.02	0.90	0.88	97.8	2.5	9.06	-0.44

表 4 测定结果的显著性分析  
Table 4 A significant analysis of the results

样品	SS-RTP( $\text{ng ml}^{-1}$ ) ( $n = 6$ )		UPLC-MS/MS ( $\text{ng ml}^{-1}$ ) ( $n = 5$ )		统计分析		
	$\bar{X}_1$	$S_1$	$\bar{X}_2$	$S_2$	F	S	t
A	6.38	0.0306	6.41	0.0286	1.4	0.033	1.3
B	7.20	0.0532	7.25	0.0261	3.3	0.044	1.7
C	4.80	0.0605	4.86	0.0356	2.3	0.052	1.7
D	6.93	0.0418	6.89	0.0441	1.4	0.045	1.5
E	8.12	0.0691	8.16	0.0286	4.7	0.056	1.1
F	9.02	0.0460	9.06	0.0286	2.1	0.040	1.7

( $P = 90\%$ ,  $f = n_1 + n_2 - 2 = 9$ ,  $F_{0.90, 9} = 6.3$ ,  $t_{0.90, 9} = 1.8$ )

由表 3 和表 4 可见, 本方法用于人血清中 COL 含量的测定, 结果与 UPLC-MS/MS 相吻合, 回收率为 96.7%~98.6%, RSD 为 2.5%~4.3%, 具有较高的准确度和精密度。此外, 人血清样品的 F 值分别为 1.4、3.3、2.3、1.4、4.7 和 2.1, 表明  $S_1$  与  $S_2$  不存在显著性差异; 对应的 t 值分别为 1.3、1.7、1.7、1.5、1.1 和 1.7, 表明  $\bar{X}_1$  与  $\bar{X}_2$  不存在显著性差异。因此, 所设计的 SS-RTP 是灵敏的、准确的, 适用于人血清中 COL 的测定。

### 3 小结

本研究考察了催化 SS-RTP 的灵敏度、选择性和用于测定痕量 COL 的新方法的可行性, 同时, 探讨了催化反应的动力学常数。新方法灵敏、简便、快速、选择性好、准确度高, 用于人体血清中痕量 COL 的测定, 结果与 UPLC-MS/MS 相吻合。本研究推动了 COL 检测技术的研究进展。

### 参考文献:

- [1] Sahu R K, Jain A, Nayak S. Development and evaluation of transdermal patches of Colchicine [J]. Der Pharmacia Lettre, 2012, 4 (1): 330-343.
- [2] Syed F F, Mayosi B M. Pharmacotherapy: Colchicine for recurrent pericarditis [mdash] what's new in CORP-2 [J]. Nature Reviews Cardiology, 2014, 11(2): 376-378.
- [3] Finkelstein Y, Aks S. Colchicine poisoning: the dark side of an ancient drug [J]. Clin Toxicol, 2010, 48(5): 407-414.
- [4] Lin Z Y, Kuo C H, Wu D C, et al. Anticancer effects of clinically acceptable colchicine concentrations on human gastric cancer cell lines [J]. Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 2016, 32(2): 68-73.
- [5] Jiang S S, Liu Z F, Hu X L, et al. Fluorescence quenching method for the determination of colchicine with some aromatic amino acids as probes [J]. Acta Chimica Sinica, 2010, 68(22): 2325-2330.
- [6] Ng S W, Ching C K, Chan A Y W, et al. Simultaneous detection of 22 toxic plant alkaloids (aconitum alkaloids, solanaceous tropane alkaloids, sophora alkaloids, strychnos alkaloids and colchicine) in human urine and herbal samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B, 2013, 942(4): 63-69.
- [7] Hadad G M, Badr J M, El-Nahriy K, et al. Validated HPLC and HPTLC methods for simultaneous determination of colchicine and khellin in pharmaceutical formulations [J]. Journal of chromatographic science, 2013, 51(3): 258-265.
- [8] Li J L, Qiu Z W, Sun A L, et al. UPLC-MS/MS determination of colchicine in blood of poisoned sufferers [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2012, 22 (11): 2571-2573.
- [9] Wang F, Zhou J, Liu Y, et al. Electrochemical oxidation behavior of colchicine on a graphene oxide-Nafion composite film modified glassy carbon electrode [J]. Analyst, 2011, 136(19): 3943-3949.
- [10] Gandhi S, Deshpande P, Sengar M. High performance thin layer chromatographic determination of diclofenac sodium and thiocolchicoside in fixed dose combination [J]. IRJP, 2010, 1(1): 220-224.
- [11] 沈淑君. 核固红-亮绿双指示剂催化光度法测定痕量 Pb(II)[J]. 井冈山大学学报:自然科学版,2016,37(3): 30-34.

- [12] Wang H F, Wu Y Y, Yan X P. Room-temperature phosphorescent discrimination of catechol from resorcinol and hydroquinone based on sodium tripolyphosphate capped Mn-doped ZnS quantum dots [J]. *Analytical chemistry*, 2013, 85(3): 1920-1925.
- [13] Liu J M, Lin L P, Wang X X, et al. Highly sensitive detection of residual chlorpromazine hydrochloride with solid substrate room temperature phosphorimetry [J]. *Fluoresc*, 2012, 22(4): 1087-1094.
- [14] Liu J M, Lin L P, Wang X X, et al. A highly sensitive coupling technique for the determination of trace quercetin based on solid substrate room temperature phosphorimetry and poly (vinyl alcohol) complex imprinting [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 723(23): 76-82.
- [15] Kondrashina A V, Papkovsky D B, Dmitriev R I. Measurement of cell respiration and oxygenation in standard multichannel biochips using phosphorescent O<sub>2</sub>-sensitive probes[J]. *Analyst*, 2013, 138(17):4915- 4921.
- [16] Liu J M, Huang X M, Lin S Q, et al. Determination of trace gastrin and diagnosis of human diseases using Cd Te quantum dots labelled gastrin antibodies as phosphorescence sensors [J]. *Analyst*, 2011, 136(15): 3789-3796.
- [17] Cash K J, Clark H A. Phosphorescent nanosensors for in vivo tracking of histamine levels [J]. *Analytical chemistry*, 2013, 85(13): 6312-6318.
- [18] Liu J M, Huang X M, Cui M L, et al. Determination of trace human chorionic gonadotropin by using multiwall carbon nanotubes as phosphorescence labeling reagent [J]. *Analytical Biochemistry*, 2012, 431(18): 19-29.
- [19] Bi L, Dong X, Yu Y. Room-temperature phosphorescence sensor based on manganese doped zinc sulfide quantum dots for detection of urea[J]. *Journal of Luminescence*, 2014, 153(12): 356-360.
- [20] Liu J M, Li F M, Liu Z B, et al. 8-Quinolineboronic acid as a potential phosphorescent molecular switch for the determination of alpha-fetoprotein variant for the prediction of primary hepatocellular carcinoma [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 663(48): 184-189.
- [21] Liu J M, Wang H X, Lin L P, et al. Catalytic solid substrate-room-temperature phosphorimetry detection for trace cadmium with Cd<sup>2+</sup>-3.5-generation polyamidoamine dendrimer-Tween-80 complex [J]. *Luminescence*, 2012, 27(2): 346-351.
- [22] Huang Y Q, Cai P Y, Liu J M, et al. Ultra-sensitive phosphorescence sensor for the detection of trace As(V) based on the signal amplification effect of As(V) catalyzing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidize Cd Te -Cys-quantum dots[J]. *RSC Adv*, 2014, 4(1): 7410-7417.
- [23] Liu J M, Huang X M, Lin S Q, et al. Determination of trace gastrin and diagnosis of human diseases using Cd Te quantum dots labelled gastrin antibodies as phosphorescence sensors[J]. *Analyst*, 2011, 136(18): 789-3796.