

文章编号: 1000-5471(2008)02-0054-05

丽春红 S 共振瑞利散射法测定硫酸小诺霉素^①

胡庆红, 张阳勇, 江波

遵义医学院 药理学系, 贵州 遵义 563003

摘要: 在弱酸性条件下, 硫酸小诺霉素和丽春红 S 各自的共振瑞利散射十分微弱, 两者相互作用后形成缔合物, 导致体系的共振瑞利散射急剧增强, 在 597 nm 产生最大散射峰. 研究了硫酸小诺霉素与丽春红 S 体系的共振瑞利散射光谱和吸收光谱特征、反应的适宜条件和共存物质的影响. 实验结果表明, 硫酸小诺霉素的浓度在 0~7.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与散射强度(ΔI_{RRS})呈良好的线性关系, 其回归方程为 $\Delta I = 2.038 + 9.766c$, 相关系数 0.999 2, 检出限为 2.66 ng/mL . 本法简便、准确、灵敏、选择性和重现性好, 已用于硫酸小诺霉素注射液和动物血清中硫酸小诺霉素的测定, 结果满意.

关键词: 共振瑞利散射; 硫酸小诺霉素; 丽春红 S

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

硫酸小诺霉素(Micronomicin Sulfate, MIC)为氨基糖甙类抗生素, 对革兰阴性菌和阳性菌有广谱抗菌作用, 特别对革兰阴性菌如大肠杆菌、痢疾杆菌、沙雷菌及绿脓杆菌等有强大抗菌活性, 常用于革兰阴性杆菌所致的各种感染. 以其高效、廉价在临床占有重要地位. 但其毒副作用在一定程度上限制了其临床应用, 因此对其含量的测定具有重要意义. 目前, 测定其含量的方法主要有中国药典微生物法^[1]、薄层扫描法^[2]、高效液相色谱法^[3]、分光光度法^[4]、衍生化荧光法^[5]、间接原子吸收法^[6]、流动注射化学发光法^[7]. 微生物法繁冗费时、费用高, 不适于快速检测.

共振瑞利散射(Resonance Rayleigh scattering, RRS)技术因灵敏度高、快速、操作简便等特点已成为一种重要的分析技术, 近年来已被成功用于核酸^[8,9]、蛋白质^[10,11]、无机离子^[12]、纳米粒子^[13,14]、免疫^[15]、药物^[16,17]等的分析应用, 但用于 MIC 的分析应用未见报道. 本文研究了丽春红 S(Ponceau S, PS)和 MIC 相互作用产生的 RRS 光谱和吸收光谱特征、反应的适宜条件和主要影响因素等. 据此建立了 MIC 的 RRS 测定方法, 已用于硫酸小诺霉素注射液和动物血清中硫酸小诺霉素的测定.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Carg Eclipse 荧光分光光度计(澳大利亚, VARIAN 公司); U-3010 紫外分光光度计(日本, 日立公司); 硫酸小诺霉素(中国药品生物制品检定所): 配制成 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准工作溶液; 丽春红 S(上海, 上海化工试剂公司): 120 mg/L ; B-R(Britton-Robinson)缓冲液: 0.04 mol/L H_3PO_4 , H_3BO_3 和 HAc 与 0.2 mol/L NaOH 溶液按一定比例混合配制成不同 pH 的缓冲液, 用酸度计进行校正 pH. 水为二次蒸馏水.

① 收稿日期: 2007-06-15

作者简介: 胡庆红(1963-), 男, 贵州遵义人, 副教授, 主要从事分子光谱分析的研究.

1.2 实验方法

在 10 mL 具塞的比色管中,分别加入 1.0 mL, pH=4.10 的 B-R 缓冲溶液, 2.5 mL 的丽春红 S 溶液,混合均匀后加入一定量的 MIC 溶液,用蒸馏水定容至 10 mL,摇匀,放置 20 min 后,将溶液于荧光分光光度仪上以 $\lambda_{em}=\lambda_{ex}$, 进行同步扫描得到共振散射光谱,测定电压 400 V,激发和发射狭缝均为 5.0 nm. 在共振散射峰 $\lambda_{em}=\lambda_{ex}=597.05$ nm 处测定体系的散射光强度 I_{RS} 和试剂空白 I_0 , 计算 $\Delta I=I_{RS}-I_0$.

2 结果与讨论

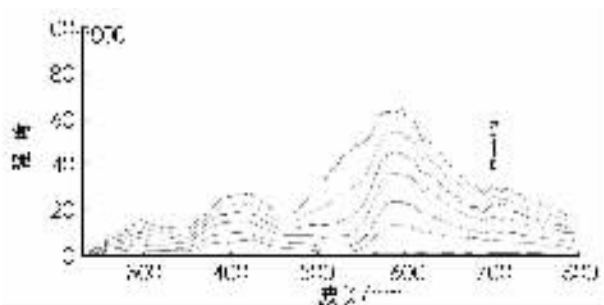
2.1 共振散射光谱及吸收光谱

2.1.1 共振散射光谱

在 pH=4.10 的 B-R 缓冲溶液中,硫酸小诺霉素氨基质子化后以阳离子形式存在;丽春红 S 的多个磺酸基上的钠离子离解后,以阴离子状态存在. 它们通过静电引力、疏水作用力形成较大粒径的离子缔合物. 然后以 $\lambda_{ex}=\lambda_{em}$ 方式分别对试剂空白和离子缔合物溶液进行同步扫描,得到 RRS 光谱(图 1). 由图 1 可知,试剂空白所产生的 RRS 散射信号很低,离子缔合物在 597.05 nm 处产生强烈的散射峰.

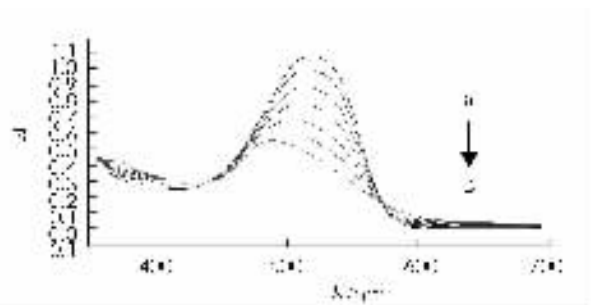
2.1.2 吸收光谱

丽春红 S 是一种酸性双偶氮染料,在 pH=4.10 的 B-R 缓冲溶液中 460~573 nm 处有较强的分子吸收,显红色,其吸收峰位于 520 nm. 丽春红 S 与 MIC 混合后,随 MIC 浓度的增加,体系在 438~573 nm 处的吸收减弱,而在 357~438 nm 和 573~622 nm 都有不同程度的增强(图 2),在 438 nm 和 573 nm 处出现两个等吸收点.



pH=4.10, $c(\text{PS})$: 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $c(\text{MIC})/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
a→g: 0; 1.2; 2.4; 3.6; 4.8; 6.0; 7.2

图 1 PS-MIC 体系的共振散射光谱



a→g: pH=4.10, $c(\text{PS})$: 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $c(\text{MIC})/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
0; 1.2; 2.4; 3.6; 4.8; 6.0; 7.2

图 2 PS-MIC 离子缔合物的吸收光谱

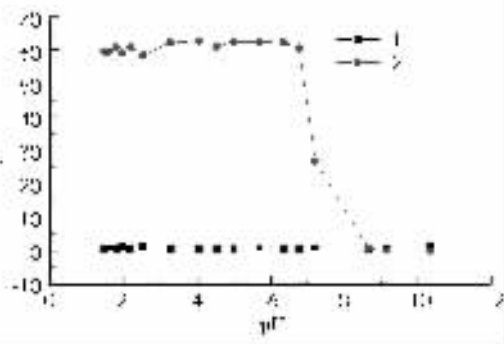
2.1 适宜的反应条件

2.2.1 溶液的酸度影响

试验了不同 pH 值的 B-R 缓冲溶液对缔合物散射光强度的影响,实验结果如图 3 表明: pH1.8~6.8 范围内结合产物的 ΔI_{RRS} 最大且试剂空白 I_0 值较小;且实验表明缓冲液的用量对体系的 RRS 强度影响不大,取 0.75~3.0 mL 时体系的散射强度最大且保持稳定,本法取 pH=4.10 的 B-R 缓冲溶液 1.0 mL. 当 pH>6.8 时,由于 MIC 质子化的程度降低,而使它的正电荷降低,不利于离子缔合反应,使得 ΔI_{RRS} 迅速减少.

2.2.2 丽春红 S 浓度的影响

实验考察了丽春红 S 浓度对体系 ΔI_{RRS} 的影响,结果表明浓度在 18~48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内体系 ΔI 较大且稳定,本实验选用了 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的丽春红 S 溶液.



1. PS: $c(\text{PS})=30 \mu\text{g}/\text{mL}$;

2. PS: $c(\text{PS})=30 \mu\text{g}/\text{mL}$, MIC: $c(\text{MIC})=6.0 \mu\text{g}/\text{mL}$

图 3 pH 的影响

2.2.3 离子强度的影响

试验了离子强度(以 NaCl 计)对 ΔI_{RRS} 的影响. 当少量 NaCl 存在时, 对 ΔI_{RRS} 的影响不大; NaCl 用量增大到一定程度时, ΔI_{RRS} 也增大, 可能的原因是 NaCl 的存在使离子缔合物的结合力下降, 界面能增大, 散射增强^[13,18]; NaCl 大量存在时会破坏离子缔合物的形成, 使 ΔI_{RRS} 大大降低.

2.2.4 反应时间及散射增强的稳定性

实验表明, 在室温下, 10 min 后反应完全, ΔI_{RRS} 散射值保持稳定的时间可达 4 h 以上, 故本实验选用 20 min.

2.2.5 试剂加入顺序的影响

按 MIC-丽春红 S-缓冲液的顺序加入试剂, 则 ΔI_{RRS} 值强度较低; 按缓冲液-丽春红 S-MIC 的顺序加入试剂和按缓冲液-MIC-丽春红 S 的顺序加入试剂的 ΔI_{RRS} 值强度大且稳定. 这是因为 MIC 和丽春红 S 在弱酸性的环境中有利于形成离子缔合物的原故. 本实验选用的是缓冲液-丽春红 S-MIC 的顺序加入试剂.

2.2.6 有机溶剂的影响

实验分别加入 0.3 mol/L 无水乙醇, 0.27 mol/L 丙酮, 0.1 mol/L 甲醇溶液时, 对 ΔI_{RRS} 值影响不大.

2.3 共存物质的影响

考察了一些常见的金属离子、氨基酸、糖类和普通药品对 MIC 测定的影响, 结果见表 1.

表 1 共存物质的影响

共存物质	浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	相对误差/%	共存物质	浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	相对误差/%
NaCl	2 800	+7.80	L-精氨酸	240	+1.01
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	160	-4.67	L-缬氨酸	189	+0.81
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	40	+2.95	氨基乙酸	597	+0.45
BaCl_2	159	+3.65	尿 素	986	+1.01
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	171	+5.14	抗坏血酸	1 468	+2.83
AlCl_3	62	+4.50	茶 碱	261	+5.67
Na_2SO_4	2 820	+7.88	磷霉素钠	208	-1.26
Na_2HPO_4	1 836	+4.45	环磷酰胺	210	+0.93
葡萄糖	239	-3.21	法莫替丁	36	+1.80
蔗 糖	1 224	+0.98	西咪替丁	540	+6.81
D-果糖	710	+1.41	阿奇霉素	60	-2.10
D-木糖	202	-1.04	普罗碘胺	432	+6.58
L-谷氨酸	300	+0.50	普鲁卡因	84	+1.13
L-天冬酸	540	+2.70	甘 油	13500	-2.50

注: $c=6.0 \mu\text{g}/\text{mL}$.

2.4 标准曲线及缔合反应的组成比

按照实验方法, 试验不同浓度的硫酸小诺霉素与丽春红 S 作用的结合产物的 ΔI_{RRS} 值, 并绘制标准曲线, 得到线性方程 $\Delta I=2.038+9.766 c$, 相关系数 0.999 2, 线性范围 0~7.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 检出限(3σ) 2.66 ng/mL. 以摩尔比法得到硫酸小诺霉素与丽春红 S 的摩尔比为 1:3.88.

从吸收光谱(图 2)来看, 可用分光光度计以褪色法来测定硫酸小诺霉素, 分光褪色法(波长 531 nm)得到的硫酸小诺霉素与丽春红 S 的摩尔比为 1:3.71.

3 分析应用

3.1 市售硫酸小诺霉素分析

取不同批号的硫酸小诺霉素注射液样品各 1 支(2 mL)配成 250 mL 溶液, 取 1 mL 稀至 100 mL, 摇匀, 各取上述溶液 2.5 mL 分析, 结果见表 2. 将批号为 H42022061 的样品与分光光度法^[19]对比, 测定结果为 6.25 mg/mL, 表明两法测定结果一致.

表 2 硫酸小诺霉素注射液的含量测定结果

样品批号	标示量/(mg · mL ⁻¹)	测定值/(mg · mL ⁻¹)	相对标准误差/%(n=5)
H10910020	6.0	6.01	0.57
H32022776	6.0	5.76	2.21
H20043678	6.0	5.89	2.11
H42022061	6.0	6.18	2.03

3.2 血清样品中的硫酸小诺霉素测定结果

各取 2 份小白兔血清样品 2.0 mL, 每份加入 2.0 mol/L 三氯乙酸 0.5 mL, 混合后 3 000 r/min 离心分离 10 min, 使血清中的蛋白沉淀完全^[20], 取上层清液 1.0 mL, 按照实验方法进行测定, 用二次蒸馏水定容至 10 mL, 摇匀, 每种浓度平行测定 5 份, 结果见表 3.

表 3 血清样品中硫酸小诺霉素测定

样 品	MIC 加入量/(μg · mL ⁻¹)	测定量/(μg · mL ⁻¹)	相对标准误差/%(n=5)	回收率/%
1	6.0	6.02	1.43	100.3
2	3.0	2.91	1.34	97.0

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 718.
- [2] 蔡美明, 马新荣. 薄层扫描法测定国产硫酸小诺霉素中小诺霉素组分含量 [J]. 现代应用药学, 1994, 11(5): 42 - 43.
- [3] 林健平. 高效液相色谱法分离及测定硫酸小诺霉素含量 [J]. 海峡药学, 1998, 10(1): 29 - 31.
- [4] 江 虹, 刘绍璞, 胡小莉, 等. 依文思蓝-氨基糖苷类抗生素的显色反应及其分析应用 [J]. 分析化学, 2003, 31(9): 1053 - 1057.
- [5] 李 忻, 于倩. 衍生化荧光分光光度法测定硫酸小诺霉素含量 [J]. 中国医药研究, 2004, 2(2): 54 - 55.
- [6] 郎惠云, 杨 光, 谢志海. 间接原子吸收法测定硫酸小诺霉素 [J]. 西北大学学报, 2003, 33(4): 431 - 434.
- [7] 罗万芬, 章竹君, 王周平, 等. 流动注射化学发光测定硫酸小诺霉素及其机理探讨 [J]. 分析科学学报, 2004, 20(3): 248 - 250.
- [8] 刘绍璞, 胡小莉, 龙秀芬, 等. 核酸-某些碱性三苯甲烷染料体系的 RRS 及其分析应用 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2001, 26(2): 164 - 169.
- [9] Cheng Zhi Huang, Yuan Fang Li, Xin Hua Huang, et al. Interactions of Janus Green B with double stranded DNA and the detection of DNA based on the measurement of enhanced resonance light scattering [J]. Analyst, 2000, 125: 1267 - 1272.
- [10] 赵小辉, 黄承志. 依思明蓝与牛血清白蛋白作用的共振光散射研究 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2006, (31) 3: 70 - 75.
- [11] Liu S P, Yang R, Liu Q. Resonance Rayleigh Scattering Method for the Determination of Proteins with Orange G [J]. Analytical Science. 2001, 17(2): 243 - 247.
- [12] 刘绍璞, 周光明, 刘忠芳, 等. 共振瑞利散射法测定硫氰酸盐-碱性三苯甲烷染料体系中的痕量钼 [J]. 高等学校化学学报. 1998, 19: 1040 - 1044.
- [13] 蒋治良, 钟福新, 李廷盛, 等. 绿色银纳米粒子的共振散射光谱研究 [J]. 化学学报, 2001, 59(3): 438 - 441.
- [14] Jiang Z L, Liu Q Y, Liu S P. Resonance Scattering Spectral Analysis of Chlorides Based on the Formation of (AgCl)_n (Ag)_s Nanoparticle [J]. Spectrochim Acta, Part A, 2002, 58: 2759 - 2764.
- [15] 邓俊耀, 孙双娇, 蒋治良, 等. 免疫球蛋白 G 的免疫共振散射光谱分析 [J]. 光谱学与光谱分析, 2006, (26)8: 1487 - 1489.
- [16] 刘绍璞, 胡小莉, 刘忠芳. 刚果红-阿米卡星体系的共振 Rayleigh 散射和共振非线性散射光谱及其分析应用 [J]. 中国科学 B 辑. 2006, 36(4): 317 - 325.
- [17] 王 齐, 刘忠芳, 刘绍璞, 等. 硫化镉纳米微粒与某些氨基糖苷类抗生素相互作用的共振瑞利散射光谱及其分析应用

[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2007, 29(7): 64—68.

[18] 蒋治良, 李 芳. 磷钼杂多酸—罗丹明 S 体系的共振散射光谱研究 [J]. 化学学报, 2000, 58(8): 1059—1062.

[19] 师永清, 吴福祥. 染料比色法测定硫酸小诺霉素的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 1997, 17(9): 405—406.

[20] 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程 [M]. 第 2 版. 南京: 东南大学出版社, 1997: 193.

Cattering Method for the Determination of Micronomicin Sulfate with Ponceau S

HU Qing-hong, ZHANG Yang-yong, JIANG Bo

Department of Pharmacology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China

Abstract: In weak acidity condition, resonance rayleigh scattering (RRS) peaks of micronomicin sulfate (MIC) and ponceau S (PS) were very weak. However, MIC reacts with PS to form association particles, which enhance the RRS intensity greatly. The strongest RRS peak is at 597 nm. In this paper, the RRS spectra and absorption spectra of MIC-PS system were investigated, and the optimal reactive condition and the effect of the foreign substances for the determination of MIC were also established. The resonance scattering intensity at 597 nm is linear to the MIC concentration in the range of 0 to 7.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, with a detection limit of 2.66 ng/mL. Its regression equation is $\Delta I_{\text{RS}} = 2.038 + 9.766c$, with a correlation coefficient of 0.999 2. This method is highly selective, rapid, simple and repeatable and has been applied to the determination of MIC in animal serum and micronomicin sulfate injection, with satisfactory results.

Key words: resonance rayleigh scattering; micronomicin sulfate; ponceau S

责任编辑 潘春燕