

共振散射光谱法测定痕量的美他环素^①

江波^② 蒋章勇 胡庆红

(遵义医学院药理学系 贵州省遵义市大连路 201 号 563003)

摘要 在 pH 为 11.82 的 B-R 缓冲溶液中, 美他环素与溴化十六烷基吡啶反应形成离子缔合物, 导致体系的共振散射强度急剧增强, 并在 300nm、429nm 处产生两个新的散射峰。研究了体系的光谱特征、反应的适宜条件和共存物质的影响。在最强散射波长 429nm 处, 美他环素的浓度在 0.02—12.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与体系的散射强度呈现良好的线性关系, 其回归方程为 $\Delta I_{429\text{nm}} = 8.845C + 1.600(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$, $r = 0.9969$, 检出限为 7.5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (3 σ), 据此, 建立了一种测定痕量美他环素的共振散射光谱法。该方法操作简便、灵敏度高, 已用于美他环素胶囊和片剂的快速检测, 结果满意。

关键词 共振散射; 美他环素; 溴化十六烷基吡啶

中图分类号: O657.32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2009)04-1015-05

1 前言

美他环素为半合成四环素类抗菌药物, 具有广谱抗菌活性, 抗菌能力比四环素强, 对耐四环素的耐药菌株敏感。其定量分析主要有高效液相色谱法^[1]、紫外光度法^[2]和荧光光度法^[3]等。紫外光度法操作简便, 灵敏度不够高; 荧光法灵敏度高, 背景干扰较大; 色谱法灵敏, 特异性高, 操作烦琐、费时、分析成本高。自从 1993 年 Pastermack 等人首次将共振散射 (Resonance scattering, RS) 技术用于卟啉类化合物在核酸上聚集的研究后, 该技术在分析化学中的应用有了突飞猛进的发展, 已用于生物大分子^[4-6]、无机离子^[7]、药物^[8,9]和免疫^[10]等。本文研究发现阳离子表面活性剂溴化十六烷基吡啶与美他环素反应的产物导致体系的散射强度急剧增强, 且在一定条件下美他环素浓度与体系的散射增强有良好的线性关系, 据此, 建立了一种测定痕量美他环素的共振散射新方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

仪器: Cary Eclipse 荧光光度计(美国瓦里安公司); TU-1901S 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

试剂: 美他环素标准品 (Metacycline, MTC, 中国生物制品检定所, 批号: 130499-200101), 配制成 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液, 置冰箱 4℃ 保存, 使用时用稀释成 20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 工作液; 盐酸美他环素胶囊(大同长兴制药有限公司, 批号: 0804101); 盐酸美他环素片(江苏平光制药有限责任公司, 批号: 0804111); 溴化十六烷基吡啶 (Cetylpyridinium bromide, CPB, 国药集团化学试剂有限公司), 配

① 国家自然科学基金(批准号: 20762017)资助

② 联系人, 手机: (0) 13096785399; E-mail: jiangbo631228@163.com

作者简介: 江波(1963—), 女, 贵州省遵义市人, 副教授, 主要研究方向分子光谱。

收稿日期: 2009-04-13; 接受日期: 2009-04-22

制成 $200\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的工作液; 配制不同 pH 值 Britton-Robinson (B-R) 的缓冲溶液, 其他试剂均为分析纯。实验用水均为超纯水。

2.2 实验方法

在 10mL 的比色管中, 依次加入 pH 11.82 的 B-R 缓冲溶液 1.0mL、 $200\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ CPB 溶液 1.0 mL、一定量的 MTC 标准品溶液, 用水稀释至刻度, 混匀。反应 15min 后在荧光分光光度计上以 $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$ 同步扫描得到共振散射光谱, 在最强散射波长 429nm 处测定散射强度 I , 以不加 MTC 为试剂空白 I_0 , 计算 ΔI 值 ($\Delta I = I - I_0$)。

3 结果与讨论

3.1 共振散射光谱和吸收光谱

共振散射光谱图 1 表明, 在 pH 11.82 的 B-R 缓冲溶液中, CPB 和 MTC 各自的 RS 强度都很弱, 当两者相互作用形成离子缔合物后, 体系的 RS 强度急剧增强, 并在 300nm 和 429nm 处产生两个新的散射峰, 最强散射峰为 429nm, 位于其吸收带(图 2)。

在弱酸性溶液中, MTC 分子酰胺键水解成羧基负离子, 酚羟基也离解为酚氧负离子, MTC 负离子与 CPB 中的吡啶环上 N 正离子通过静电作用、疏水作用等结合形成离子缔合物, 导致缔合微粒疏水性增加, 形成固-液界面; 同时, 由于正、负离子间的相互制约增加了分子的平面性和刚性, 使体系的共振散射效应增强^[11, 12]。

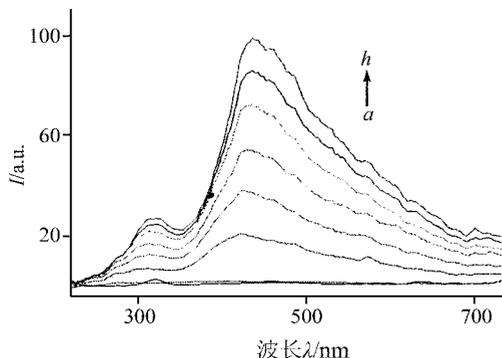


图 1 MTC-CPB 的 RS 光谱

a— $C_{\text{MTC}} = 6.0\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;
 b— $C_{\text{CPB}} = 20\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;
 c—h— $C_{\text{MTC}} = 2, 4, 6, 8, 10, 12(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$,
 $C_{\text{CPB}} = 20\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

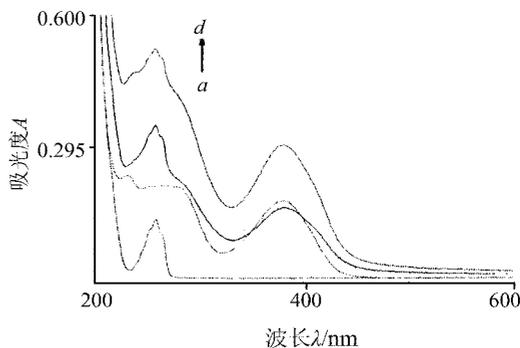


图 2 MTC-CPB 的吸收光谱

a— $C_{\text{CPB}} = 20\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; b— $C_{\text{MTC}} = 6.0\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;
 c—d— $C_{\text{CPB}} = 20\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $C_{\text{MTC}} = 6, 12(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 。

3.2 反应条件的影响

3.2.1 溶液酸度和溴化十六烷基吡啶用量的影响

不同 pH 值的 B-R 缓冲溶液对体系散射强度的影响结果表明, pH 在 11.70—11.92 范围、用量为 0.8—1.4mL 时体系的灵敏度较高, 且 ΔI 稳定。故选择 1.0mL pH 为 11.82 的 B-R 缓冲溶液。

试验了浓度为 12.0—80.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ CPB 的影响, CPB 在 16.0—28.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内体系的散射强度值较大且稳定。当高于 28.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, ΔI 逐渐降低。故选择 CPB 的浓度为 20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.2.2 体系的稳定性与精密度

室温下 MTC 与 CPB 在 10min 内反应完全,体系的散射强度趋于稳定,4h 内 ΔI 基本不变,本实验选择反应 15min 后开始测定。

按实验方法对浓度为 1.0、6.0、10.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTC 溶液分别进行 11 次平行测定, RSD 分别为 2.1%、1.7%、1.6%。

3.3 离子缔合物的组成

以等摩尔比连续变化法测定了离子缔合物的组成,结果为 $n(\text{MTC}) : n(\text{CPB}) = 1 : 2$, 即 MTC 与 CPB 结合形成 $[\text{MTC}(\text{CPB})_2]_n$ 缔合物。

3.4 共存物质的影响

在 10mL 比色管中,当 MTC 含量为 10 μg 、测定误差为 $\pm 5\%$ 时,共存物的允许量(以 μg 计)分别为:枸橼酸钠(700),硫酸铜(50),硫酸镁(260),D-果糖(3800),硫酸锌(300),氯化钙(60),碘化钾(1600),氯化铝(1400),L-天冬氨酸(3500),牛血清白蛋白(1.2),人血清白蛋白(0.8),r-球蛋白(2),L-谷氨酸(800),尿素(3000),肝素(100),硫酸小诺霉素(2500),盐酸普鲁卡因(4000),硫酸阿托品(550),氯化钡、烟酸(200),硼酸、妥布霉素(500),碳酸钠、草酸钠、葡萄糖、甘油、西米替丁、维生素 C、D-木糖、蔗糖(高于 5000,未做上限试验)。实验结果表明,常见化合物基本不干扰测定。

3.5 离子强度的影响

实验中以加入氯化钠和硫酸钠进行离子强度实验。结果表明,当硫酸钠的浓度小于 0.30 mol/mL 时,对体系 RS 强度影响较小,高于 0.30 mol/mL 后,随着硫酸钠浓度的增大,RS 强度大大减弱。而氯化钠的浓度要高于 0.25 mol/mL 后,才对 RS 强度有较小的增敏作用。这说明了较高浓度的 SO_4^{2-} 比 Cl^- 更容易与 CPB 发生竞争性结合,导致 CPB 与 MTC 形成离子缔合物减少,因此,体系的 RS 强度降低更明显。在实际操作中,应注意控制离子强度,避免高浓度电解质的加入。

3.6 校准曲线及方法灵敏度

在最佳反应条件下,按照实验方法测定了不同浓度 MTC 的散射强度,以 ΔI 对 MTC 浓度绘制校准曲线。结果表明,MTC 的浓度在 0.02—12.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与体系的 ΔI 值呈良好的线性关系,回归方程为 $\Delta I_{429\text{nm}} = 8.845C + 1.60 (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}, r = 0.9969)$,检出限 (3σ) 为 7.5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.7 分析应用

3.7.1 盐酸美他环素片剂及胶囊的测定

取 4 粒盐酸美他环素片剂(标示量为含 MTC 0.1g/粒),准确称量。研匀后称取总量的 1/20,用 0.01 mol $\cdot \text{mL}^{-1}$ HCl 溶解并稀释定容至 100mL,过滤。取滤液 10.0mL,用超纯水稀释定容至 100mL,制得含 MTC 约为 20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 供试品溶液(按照标示量换算);取 4 粒盐酸美他环素胶囊,去胶囊壳后按片剂方法处理配制成约为 20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 供试品。分别取盐酸美他环素片剂及胶囊供试品溶液各 2.5mL,按照实验方法测得样品中 MTC 的含量,测定值与高相液相色谱法^[1]进行对照,结果与本法一致(表 1)。

表 1 样品中美他环素的测定结果

样品	标示量 ($\text{g} \cdot \text{粒}^{-1}$)	本法测定值 ($\text{g} \cdot \text{粒}^{-1}$)	RSD (%)	HPLC 法测定值 ($\text{g} \cdot \text{粒}^{-1}$)	RSD (%)
片剂	0.1	0.0979	2.1	0.0989	1.5
胶囊	0.1	0.0997	1.4	0.1008	0.9

分别取 0.5、1.5、2.5 mL 的供试品溶液, 再加入相同体积的 $20.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTC 标准品, 按照实验方法进行回收实验, 结果见表 2。

表 2 样品中回收率测定

样品	供试品含量 (μg)	加入量 (μg)	回收量 (μg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
片剂	9.79	10.0	9.64	96.4	2.0
	29.37	30.0	30.89	103.0	1.8
	48.95	50.0	48.59	97.2	1.6
胶囊	9.97	10.0	9.97	99.7	2.7
	29.91	30.0	31.43	104.8	1.5
	49.85	50.0	48.50	97.0	2.1

3.7.2 人血清和尿样中美他环素回收率的测定

在 2.0 mL 正常人血清中加入 3.0 mL 乙腈, 离心 30 min ($4000 \text{r} / \text{min}$) 后取上清液 1.0 mL 稀释 10 倍。取 1.0 mL 稀释液, 再分别加入 2.0、6.0、10.0 μg 的 MTC 标准品, 按实验方法测定血清中 MTC 的含量, 计算出 MTC 的平均回收率为 101.9% ($n=6$, RSD=1.0%)。取正常人的新鲜尿液稀释 10 倍, 再取 0.5 mL 稀释液按照血清中回收率测定方法测得尿样中 MTC 的平均回收率为 101.5% ($n=6$, RSD=1.2%)。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典[S](二部), 北京: 化学工业出版社, 2005. 550.
- [2] 顾炳仁, 任雅明, 朱瑞英. 分光光度法测定盐酸甲烯土霉素及其制剂的含量[J]. 现代应用药学, 1994, 11(1): 41—42.
- [3] 敖登高娃, 张莹, 陶玉龙. 镁-美他环素胶束体系荧光特性及美他环素的测定[J]. 分析实验室, 2006, 25(2): 33—35.
- [4] Huang C Z, Lu W, Li Y F *et al.* On the Factors Affecting the Enhanced Resonance Light Scattering Signals of the Interactions Between Proteins and Multiply Negatively Charged Chromophores Using Water Blue as an Example[J]. *Anal. Chim. Acta.*, 2006, 556: 469—475.
- [5] 陈广德, 朵吉华. 共振光散射探针法测定壁画胶结材料中蛋白质含量[J]. 分析测试学报, 2005, 24(4): 6—9.
- [6] 夏忠瑜, 李原芳, 龙云飞. 光谱法研究 CT MAB 存在下荧光桃红 B 与 fsDNA 的相互作用及应用[J]. 分析测试学报, 2007, 26(6): 851—854.
- [7] Kang C Y, Xi D L, Zhou S M *et al.* A Novel and Selective Spectral Method for the Determination of Trace Chlorine in Water Basing on the Resonance Scattering Effect of Rhodamine B- Ag Association Nanoparticles[J]. *Talanta*, 2006, 68: 974—978.
- [8] 周尚, 季冬. 卤代荧光素与西布曲明相互作用的共振散射光谱特征及其分析应用[J]. 分析测试学报, 2008, 27(10): 1058—1061.
- [9] 刘江涛, 刘忠芳, 刘绍璞. 盐酸平阳霉素与核酸相互作用的共振 Rayleigh 散射光谱及其分析应用[J]. 中国科学 B 辑(化学), 2007, 37(2): 178—185.
- [10] 江波, 蒋治良. 抗凝血酶 III 的免疫共振散射光谱分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(5): 1145—1147.
- [11] 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: 化学, 2006, 36(4): 317—325.
- [12] 蒋治良. 纳米粒子与共振散射光谱学[M]. 桂林: 广西师范大学出版社, 2003. 100—102.

Determination of Trace Metacycline by Resonance Scattering Spectrometry

JIANG Bo JIANG Zhang-Yong HU Qing-Hong

(Pharmacy Department, Zunyi Medical College, Guizhou, Zunyi 563003, P. R. China)

to form association particles, which enhanced resonance scattering (RS) signals greatly, and produce two new RS peak at 300nm and 429nm. The spectrum character of metacycline-cetylpyridinium bromide have been investigated. The optimum reaction conditions and the effect of the foreign substances for the determination of metacycline were also studied. The RS intensity is linear to the concentration of metacycline in the range of 0.02—12.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ at the strongest RS wavelength 429nm with a regress equation of $\Delta I_{429\text{nm}} = 8.845C + 1.600(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}, r = 0.9969)$ and the detection limit of 7.5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (3σ). A new RS resonance scatterin spectrum method was described for determination of trace Metacycline. The method has high sensitivity, good selectivity, simplicity, and was applied to determination of metacycline rapidity in gelatin capsule and tablets, with satisfactory results.

Key words Resonance Scattering; Metacycline; Cetylpyridinium Bromide

过期《光谱实验室》期刊免费赠送启事

本部尚有一些过期(2007及以前)的期刊,凡同行中有需要者均可免费赠送,但邮费(含包扎费和人工费)自付,每6本(不同期)为1个单元,约重2.0—2.5kg,收费(可用邮票支付)15元。

有意者来信告知收件人姓名及详细地址,同时将邮票放在信封中挂号寄来。

联系地址:北京市延庆石河营东街10号楼201室《光谱实验室》编辑部秦丽娟 何霜,邮政编码:102100,电话:(010)52513126,电子信箱(E-mail):gps@chinajournal.net.cn。

《光谱实验室》编辑部

廉价光谱分析资料讯息

1. 《光电光谱分析》,周开亿主编,4册,16开,1236页,《光谱实验室》编辑部增刊,每套110元。
2. 《数理统计在化学、光谱分析中的应用》,纳利莫夫著,余生等译,《光谱实验室》编辑部编,16开,396页,每册10元。
3. 《空心阴极放电及其应用》,周开亿主编,《真空科学与技术》杂志社出版,32开,798页,上下册,每套10元。
4. 《邮票上的光谱学和化学史》,周开亿等编,科学出版社1991年出版,16开,158页,附有67个国家和地区的彩色邮票(复印件,下同)176枚,每册10元。
5. 《邮票上的化学、光学和光谱学史》,周开亿主编,《光谱实验室》2006年第1期彩色抽印本(收藏本),16开,64页,附有77个国家和地区的彩色邮票314枚,每册30元。
6. 《邮票上的科学家——佼佼者之路》,周开亿主编,《光谱实验室》2007年第1期彩色抽印本(珍藏本),16开,196页,附有91个国家和地区的彩色邮票533枚,每册70元。
7. 《邮票上的杰出科学家》,周开亿主编,《光谱实验室》2008年第1期彩色抽印本(珍藏本),16开,240页,附有104个国家和地区的彩色邮票515枚,每册90元。
8. 爱国主义学习基地 刊上《陆达纪念馆》和刊上《卢嘉锡纪念馆》,周开亿主编,《光谱实验室》2009年第1期彩色抽印本(珍藏本),16开,116页,附有彩色照片59张,黑白照片41张,共100张,每册40元。

以上各书售价中均含普通印刷品邮费。

联系地址:北京市延庆石河营东街10号楼201室《光谱实验室》编辑部秦丽娟 何霜,邮政编码:102100,电话:(010)52513126,电子信箱(E-mail):gps@chinajournal.net.cn。

《光谱实验室》编辑部