

流动注射化学发光法测定青霉素^①

张立科^② 杨凤岭 卢霞 范顺利^a

(许昌学院化学化工学院 河南省许昌市八一路88号 461000)

^a(河南师范大学化学与环境科学学院河南省环境污染控制重点实验室 河南省新乡市 453007)

摘要 荧光素钠和表面活性剂十二烷基磺酸钠混合溶液在酸性介质中对高锰酸钾-青霉素的发光反应有增敏作用,实验建立了一种流动注射化学发光快速测定青霉素的新方法。化学发光信号 ΔI 与青霉素的质量浓度在 $20.00\text{--}100.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内呈线性关系, $r=0.9993$,方法的检出限为 $0.40\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{RSD}(n=11)$ 为 0.60% ,回收率在 $99.2\%\text{--}101.0\%$ 之间。对不同产地、不同批号的注射用青霉素钠含量的测定结果,符合中国药典方法的要求。

关键词 化学发光;药物分析;高锰酸钾;青霉素

中图分类号:O657.39

文献标识码:B

文章编号:1004-8138(2009)05-1320-05

1 前言

青霉素(Benzylpenicillin)是一种抗感染能力较强的 β -内酰胺类抗生素药物,主要用于治疗敏感细菌所致的呼吸道感染、消化道感染、尿路感染、脑膜炎等。目前主要测定方法有汞量法^[1]、荧光法^[2]、原子吸收法^[3]、库仑分析法^[4]、电化学免疫测定^[5]、酸碱滴定法^[6]、汞量电位滴定法^[7]、液体色谱-质谱联用法(LC-MS)^[8]、高效液相色谱法(HPLC)^[9]等。中国药典的汞量法较为常用,青霉素碱性降解物与 Hg^{2+} 进行络合,测定涉及有毒性的汞盐,且水解时间需精确控制。HPLC、LC-MS等方法虽灵敏度高、精密度好,但操作十分复杂,分析成本昂贵,而且检测灵敏度也依赖柱后检测技术。而流动注射化学发光法测定药品中青霉素的方法鲜见报道。试验发现酸性介质中青霉素与高锰酸钾反应可产生化学发光,荧光素钠和表面活性剂十二烷基磺酸钠混合溶液能显著增强发光信号,据此建立了流动注射化学发光快速测定青霉素的新方法,分析速度快、仪器简单、重现性好。对注射用青霉素测定,结果符合中国药典方法要求。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

仪器:LUM-F 流动注射发光测量仪(中国科学院生态环境研究中心/北京卓立汉光仪器有限公司);电子天平[奥豪斯 Adventurer 通用型天平 Ohaus AdventurerTM,奥豪斯仪器(上海)有限公司];纯水机(18.3M $\Omega\cdot\text{cm}$,Easy PureTM LF Barnstead Iowa USA);LUM-2000 色谱工作站。

试剂:青霉素(SigmaP3032);十二烷基磺酸钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);注射用

^① 河南省教育厅自然科学研究资助计划项目(No. 2009A150026);许昌学院科研基金计划预研项目(No. 2008068)

^② 联系人, E-mail: zhanglk@xcu.edu.cn

作者简介:张立科(1979—),男,河南省舞阳县人,讲师,硕士,研究方向:环境分析。

收稿日期:2009-04-19;接受日期:2009-05-05

青霉素钠(华北制药股份有限公司);8-羟基喹啉(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);高锰酸钾;多聚磷酸;荧光素钠(中国医药上海试剂公司)。

硫酸、硝酸、盐酸、磷酸等溶液用时临时按体积比配制;多聚磷酸为粘稠状液体,按质量标准配制,最后转换为物质的量浓度;试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

标准样品溶液:取青霉素标准品 10mg(精确至 0.0001g)。用蒸馏水溶解,于 1000mL 量瓶中定容,配成浓度为 $1.0 \times 10^{-2} \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准品溶液,避光,置于冰箱 4℃ 以下保存;样品溶液制取:注射用青霉素钠无菌粉末 10mg,准确称取(精确至 0.0001g)。用 1000mL 蒸馏水溶解、搅拌、过滤。即得浓度为 $1.0 \times 10^{-2} \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品溶液。

2.2 测定方法

流动注射化学发光测定的流路如图 1 所示,荧光素钠溶液与十二烷基磺酸钠溶液在线混合为载液,硫酸溶液和高锰酸钾溶液混合后直接进入流通池,样品通过进样阀注入载液中,实验参数由 LUM-F 流动注射发光测量仪设定。相对发光强度与青霉素浓度成正比。

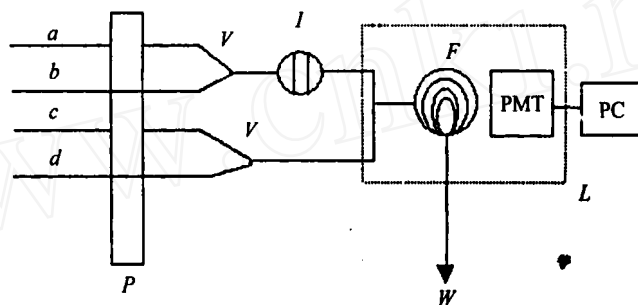


图 1 测定青霉素的化学发光流路图

P——蠕动泵;L——化学发光检测器;F——流通池;W——废液;I——进样阀;V——三通;
PMT——光电倍增管;PC——电子计算机;a——荧光素钠溶液;b——含十二烷基磺酸钠溶液;
c——高锰酸钾溶液;d——硫酸溶液。

3 结果与讨论

3.1 高锰酸钾浓度对化学发光强度的影响

在 $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内,考察了高锰酸钾浓度对反应的发光强度影响。随着高锰酸钾浓度的增大,发光强度逐渐增强,当高锰酸钾浓度为 $1.0 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时发光强度达到最大,继续增大高锰酸钾浓度,发光强度又逐渐降低,这是由于高锰酸钾本身的吸光作用所致。如图 2 所示,实验选用高锰酸钾浓度为 $1.0 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

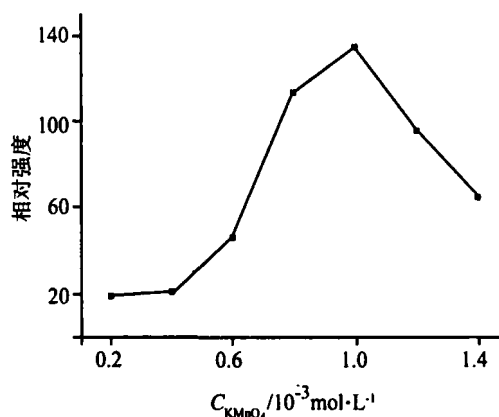


图 2 高锰酸钾浓度对化学发光信号的影响

3.2 反应介质对化学发光强度的影响

高锰酸钾氧化发光反应一般在酸性条件下发生,考察浓度均为 $1.0 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸、硝酸、硫酸、磷酸、多聚磷酸的发光信号,结果表明(表 1)体系在硫酸介质中发光信号最强且稳定。进一步考察硫酸浓度 ($0.20 \sim 1.2 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对发光的影响,如图 3 所示,发现硫酸浓度为 $0.8 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,发光信号最强,故选择发光反应的介质为 $1.0 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸。

表 1 不同酸性介质下物质发光强度比较

酸性介质($c=1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	相对发光强度
无	3
盐酸(HCl)	15
磷酸(H_3PO_4)	8
硫酸(H_2SO_4)	28
硝酸(HNO_3)	9
多聚磷酸($\text{H}_5\text{P}_4\text{O}_{13}$)	12

3.3 化学发光增敏剂的选择

在化学发光反应中加入荧光物质及表面活性剂后,能增强能量转移型化学发光反应的发光强度^[10]。考察了荧光素钠、罗丹明 B、曲拉通 X-100、 β -环糊精、硫代乙酰胺、十二烷基磺酸钠等物质对该反应的增敏作用,发现(表 2)荧光素钠(含十二烷基磺酸钠)增敏效果较显著,而其他试剂没有或仅呈现微弱增敏作用。荧光素钠增敏时信噪比低。其增敏机理可能与其氧化中间活性体对高锰酸钾氧化青霉素发光反应的协同作用相关。进一步研究荧光素钠浓度对化学发光反应的影响,如图 4 所示, $3.0\times 10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的荧光素钠增敏效果最佳。

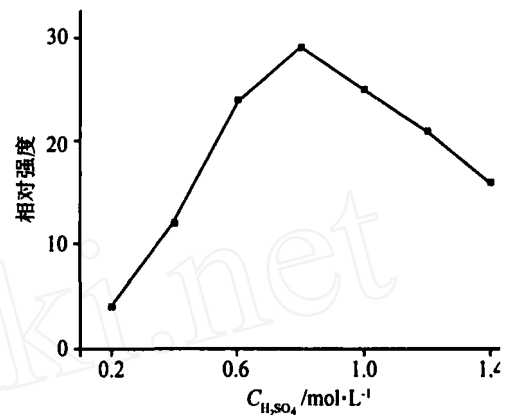


图 3 硫酸浓度对化学发光信号的影响

表 2 增敏剂对化学发光强度的影响

增敏物质	浓度	相对发光强度
无		4
甲酸	1.0mol/L	26
β -环糊精	5%	18
荧光素钠	$1\times 10^{-4}\text{mol/L}$	122
罗丹明 B	$1\times 10^{-2}\text{mol/L}$	15
曲拉通 X-100	0.5%	18
硫代乙酰胺	1.0mol/L	8
十二烷基磺酸钠	$1\times 10^{-4}\text{mol/L}$	19
十二烷基磺酸钠+荧光素钠	1:1 体积混合	172

3.4 流速及管路设计的影响

载液流速及管路设计对化学发光强度也有影响,管路均采用内径 0.8mm 的硅橡胶管,各管路流速均为 $1.0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,在高锰酸钾与硫酸载液流路中设置一段混合管,使其进入流通池之前充分反应(产生足量的活性中间体),混合管长度 150mm。

3.5 精密度和检出限

在确定的优化条件下,青霉素质量浓度与发光强度有良好线性关系,青霉素的线性范围为 $20.00\text{—}100.00\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,线性方程为 $\Delta I=253.2C-15.4$ (相关系数 $r=0.9993$)。对 $50.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 青霉素标准品溶液进行了 11 次平行测定,相对发光强度值的

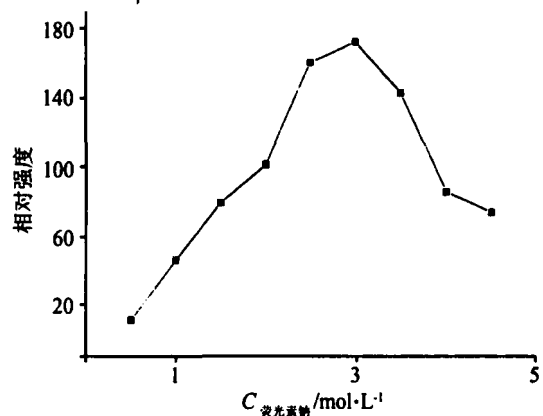


图 4 荧光素钠(含十二烷基磺酸钠)浓度对化学发光信号的影响

RSD 为 0.60%;根据 IUPAC 的建议,计算得方法的检出限为 $0.4\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.6 干扰实验

试验了常见药物辅助剂对化学发光的影响,以加入离子或辅助剂对体系发光强度的影响不超过 $\pm 5\%$ 为限。对于 $50.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素,结果表明:500 倍的淀粉、乳糖、糊精、葡萄糖;1000 倍的半乳糖、蔗糖、麦芽糖、果糖;1000 倍的硬脂酸镁;1000 倍的 Na^+ 、 K^+ 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cl^- 均不产生干扰。

3.7 样品分析

对不同批号的注射用青霉素钠含量进行了测定,结果如表 3 所示(表中数据为 5 次测定结果的平均值)。青霉素钠水解对测定结果无影响。可对注射用青霉素钠含量进行快速、准确地分析,回收率在 99.2%—101.0% 之间,符合中国药典的方法要求,与药典方法测得值基本一致。方法简便、灵敏、经济、安全。

表 3 注射用青霉素钠测定结果

样品批号	本法			药典方法(%)
	含量(%)	RSD(%)	回收率(%)	
A991249	99.2	0.054	101.0	98.9
B03030621	97.9	0.061	99.2	98.0
C03021622	95.4	0.076	93.4	91.2
D980703	98.0	0.053	98.9	97.3
B03030221	99.5	0.087	93.9	94.5
C0512307	97.6	0.065	92.5	93.9

注:括号内为 RSD 值

参考文献

- [1] 卫生部药典委员会编. 中国药典 1990 年版[M]. 第 2 部. 北京:化学工业出版社,1990. 270—271.
- [2] 潘祖亭,颜承农,王润涛. 金属离子催化 β -内酰胺类抗生素水解的荧光光谱研究[J]. 分析试验室,2001,20(4):1.
- [3] 王尚芝,关翠林,任玉荣. 火焰原子吸收光谱法间接测定青霉素 V 钾[J]. 化学分析计量,2004,13(4):24.
- [4] 梁述忠. 恒电流库仑分析法测定青霉素 G 钠盐含量[J]. 理化检验(化学分册),2005,41(12):914.
- [5] 武海,杨维春,马洁. 电化学免疫传感器测定牛奶中的青霉素[J]. 化学通报,2008,75(5):394.
- [6] 张浩,唐春玲. 水难溶的青霉素钠复盐测定[J]. 中国抗生素杂志,1994,19(2):134.
- [7] 苏茵,徐育川. 汞量电位法测定青霉素钾、钠含量时水解时间的探讨[J]. 中国现代应用药学杂志,2001,18(5):385.
- [8] 范莹莹,其鲁,杨树民. 高效液相色谱-质谱联用法检测猪肉中 5 种青霉素的残留量[J]. 分析化学,2007,26(12):76.
- [9] 卫生部药典委员会编. 中国药典 1995 年版[M]. 北京:化学工业出版社,1995. 347—348.
- [10] 林金明. 化学发光基础理论与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2004. 54.

Determination of Benzylpenicillin by Chemiluminescence Flow Injection Based on a Fluorescein Sensitized Potassium Permanganate

ZHANG Li-Ke YANG Feng-Ling LU Xia FAN Shun-Li^a

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Xuchang University, Xuchang, Henan 461000, P. R. China)

^a(Henan Key Laboratory for Environmental Pollution Control, College of Chemistry and Environmental Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, P. R. China)

Abstract Based on the micelle synergism mechanism, a chemiluminescence (CL) flow system for the determination of benzylpenicillin was described. The CL signal generated from the reaction of potassium permanganate with benzylpenicillin in acidic solution was very weak, while the interfusion of fluorescein resulted in a highly chemiluminescent intensity. The proposed procedure allows quantitation of benzylpenicillin in the range $20.0\text{--}100.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ with correlation coefficients 0.9993 ($n=5$). The detection limit was $0.40\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and RSD of 0.60% ($n=11$) at $50.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ benzylpenicillin. The benzylpenicillin in different injections was measured with fine recoveries ranging from 99.2% to 101.0%. This method has been applied to the determination of benzylpenicillin in injections. The results agree well with the standard of Chinese pharmacopoeia method.

Key words Chemiluminescence; Pharmacal Analysis; Potassium Permanganate; Benzylpenicillin

穷酸的西南联大与 3 位诺贝尔奖得主 ——真正意义上的世界一流大学

西南联大的历史,前后不过 8 年半(1937 年 9 月至 1946 年 5 月)。当年的物质条件可够穷酸的:学生宿舍无一砖一瓦,全是夯黄土为墙,堆茅草为顶,窗户没有一块玻璃,仅有几根树枝聊以象征。绝大多数师生经常是食不果腹,衣不蔽体,不时还要在敌机轰炸下逃生。在校学生不超过 2000。可是当年的西南联大,在三不管的地方,坚守大学理想,主张“教授是大学的灵魂”,实行“不妄用一钱,不妄用一人”,教师为爱国而教,学生为救国而学,吃红薯干,点桐油灯,以苦为乐,励精图治,弦歌不辍,为人师表,一身正气,人格独立,不党不官,沉潜专注,甘于寂寞。一言以蔽之,“五·四”运动所倡导的“科学和民主”精神之传承与发扬光大也!因此,培养出 3 位诺贝尔奖得主——杨振宁和李政道,另一位则是朱棣文(其父朱汝瑾是联大助教,其姑朱汝华是教授——曾昭抡的得意门生)。

拥有一流的教授阵容;运行一套科学高效的学校管理制度;推行一种通才教育的培养目标;有一位深孚众望的校长——这些因素奠定了西南联大堪称世界一流大学的基础。

西南联大身后的三校(北大、清华和南开),当今在校学生总数当在 60000—70000 之间,相当于当年的 30 多倍,三校校园内高楼大厦林立,与当年西南联大的茅屋草舍相比,真是天壤之别。所耗费的资金当在西南联大的数百倍以上。三校的年寿,从 1950 年算起,已有 59 年,若从改革开放算起,亦有 30 年,为当年西南联大寿命的 4 倍至 5 倍。以人力、财力和时间来看,都是当年西南联大无法望其项背的。以如此优越的条件和实力,却又无 1 人获得诺贝尔奖,其故安在!?

清华大学 1 位教授在美国访问时发现,世界一流的哈佛大学大门,却是十分古旧俭朴的;拱型的门洞是用红砖砌的,中间是铁制的大门,门框上面是三角形的尖顶。两边的围墙也是红砖砌的,中间是陈旧的铁制护栏。但是而今中国学校的大门,甭说大学,就是一些重点中学的校门,也比哈佛大学的壮观。在一些国人看来,似乎要成为世界一流大学、一流中学就在于校门以及办公大楼的气派和壮观!?

我国是世界最大的发展中国家(最大的穷国),美国是世界最大的发达国家(最大的富国)。这位清华大学教授还看到在这世界最大的富国中,名牌大学的办公大楼和办公家具仍是俭朴的;楼房大多是 3 层的,上个世纪的转盘电话和用过多年的木制家具还在使用。而在我们这个世界最大的穷国中的某些名牌大学,转盘电话和古朴的木制家具早已(淘汰)不见踪影!仿佛这些“过时”的东西,与名牌大学的“身份”太不相称了吧!

清华大学前校长梅贻琦说过:“大学者,非谓有大楼之谓也,有大师之谓也”。靠浮华的“形象工程”能建成世界一流名牌大学吗?

(本刊摘编自《随笔》杂志 2008 年第 2 期何兆武《关于诺贝尔奖情节》等文)