

同多钨酸-阿米卡星相互作用的 共振瑞利散射光谱及其分析应用

胡小莉* 安兰香 刘绍璞 刘忠芳 宋彦琪

(西南大学化学化工学院, 发光与实时分析教育部重点实验室(西南大学) 重庆 400715)

摘 要 在 pH 值为 0.65 ~ 1.10 的 HCl-NaAc 缓冲溶液中, 同多钨酸(IPT)与阿米卡星(AMK)形成离子缔合物, 能引起共振瑞利散射(RRS)显著增强, 并产生新的 RRS 光谱, 其最大散射峰位于 340 nm, AMK 质量浓度在 1.0×10^{-9} ~ 8.0×10^{-8} g/mL 范围内与散射增强程度呈线性关系。建立了测定 AMK 的 RRS 新方法, 检出限(3σ)为 0.4×10^{-9} g/mL。考察了体系的 RRS 和吸收光谱特征, 优化了测定条件, 考察了常见共存物质的干扰, 方法具有良好的选择性。用于人血清中 AMK 的测定, 结果满意。讨论了离子缔合反应和 RRS 增强机理。

关键词 阿米卡星, 同多钨酸, 共振瑞利散射, 测定

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2009)05-0588-05

阿米卡星为半合成的氨基糖苷类抗生素, 抗菌谱广, 主要用于治疗需氧革兰阴性杆菌引起的疾病, 但存在一定的耳肾毒性以及对神经和消化系统的过敏反应^[1]。为保证用药安全, 建立一种准确的检测方法是十分重要的。目前, 阿米卡星的测定方法主要有微生物法^[2]、分光光度法^[3]、荧光法^[4]、化学发光法^[5]、HPLC 法^[6]、毛细管电泳法^[7]、色-质联用法^[8]及共振瑞利散射和共振非线性散射法^[9]等。其中, 微生物法繁琐费时, 色-质联用法仪器昂贵, HPLC 和毛细管电泳法的检出限通常在几十到几千 ng 之间, 不能完全满足临床痕量分析的要求。所以需要开发新的灵敏、简便、快速的测定方法。本文在 pH 值为 0.65 ~ 1.10 的酸性介质中, 通过同多钨酸(IPT)与阿米卡星(AMK)相互作用, 可引起体系的 RRS 急剧增强, 且最大 RRS 位于 340 nm 处, 在一定范围内, 散射强度(ΔI)与 AMK 浓度成正比, 由此建立了测定痕量 AMK 的新方法。方法具有很高的灵敏度, 检出限(3σ)达 0.4×10^{-9} g/mL, 远低于文献^[4-7, 8]报道的多种方法。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

F-2500 型荧光分光光度计(日立公司, 日本); UV-8500 型紫外-可见分光光度计(上海天美公司); PHS-3C 型精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司)。

硫酸阿米卡星(Amikacin Sulphate, AMK; 中国药品生物制品检定所); 储备溶液质量浓度 10.0×10^{-6} g/mL; 工作液质量浓度 1.0×10^{-6} g/mL; 钨酸钠(重庆北碚化学试剂厂), 储备溶液浓度 20.0 mmol/L, 工作溶液浓度 1.0 mmol/L。

pH = 0.8 的 HCl-NaAc 缓冲溶液, 用 90 mL 1.0 mol/L HCl, 50 mL 1.0 mol/L NaAc 和 110 mL 水混合配制。

所用试剂均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水。

1.2 测定方法

在 10.0 mL 比色管中依次加入 1.0 mmol/L 的钨酸钠溶液 1.00 mL, pH = 0.8 的 HCl-NaAc 缓冲液

2008-04-21 收稿, 2008-06-19 修回

国家自然科学基金(20475045)、重庆市重点实验室(西南大学)(CSTC, 2006CA8006)和重庆市科委自然科学基金计划(CSTC, 2007BB1359)资助项目

通讯联系人: 胡小莉, 女, 硕士, 教授; E-mail: xiaoliu@swu.edu.cn; 研究方向: 分子光谱分析

1.0 mL, 适量样品溶液, 用水稀释至刻度, 摇匀, 于荧光分光光度计上以 $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$ 方式进行同步扫描, 然后在最大散射波长处测定样品和试剂空白的散射强度 I_{RRS} 及 I_0 , $\Delta I = I_{\text{RRS}} - I_0$ 。

2 结果与讨论

2.1 共振瑞利散射光谱

图 1 为 IPT-AMK 体系的 RRS 光谱。由图 1A 可见, 单独的 IPT 或 AMK 的 RRS 强度很弱, 但二者的混合溶液则具有很强的 RRS 光谱, 最大散射峰位于 340 nm 处。图 1B 为不同浓度 AMK 的 IPT-AMK 体系的 RRS 光谱。从图 1B 可见, 在最大散射波长处, RRS 强度与 AMK 浓度呈良好线性关系。因此, RRS 法可用于 AMK 的定量测定。

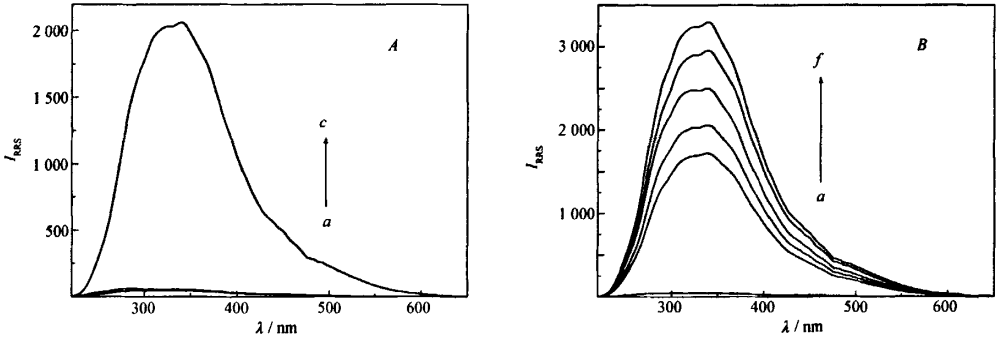


图 1 散射光谱

Fig. 1 RRS spectra of IPT-AMK systems

A. a. IPT; b. AMK; c. IPT-AMK; $c(\text{Na}_2\text{WO}_4) = 0.1 \text{ mmol/L}$; $c(\text{AMK}) = 0.05 \times 10^{-6} \text{ g/mL}$; $\text{pH} = 0.8$;
B. a. IPT; b-f. IPT-AMK; $10^6 c(\text{AMK})/(\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$: b. 0.04; c. 0.05; d. 0.06; e. 0.07; f. 0.08; $c(\text{Na}_2\text{WO}_4) = 0.1 \text{ mmol/L}$; $\text{pH} = 0.8$

2.2 吸收光谱

AMK、IPT 及其混合溶液吸收光谱如图 2。图中可见, IPT 在近紫外区有一定的吸收, 而 AMK 的吸收非常弱, 二者的混合溶液的吸收光谱基本不变, 吸光度略升高, 最大吸收波长 (λ_{max}) 293 nm。计算出摩尔吸光系数 (ϵ_{max}) 仅为 $2.20 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。表明该反应虽可用于分光光度法测定 AMK, 但灵敏度太低。

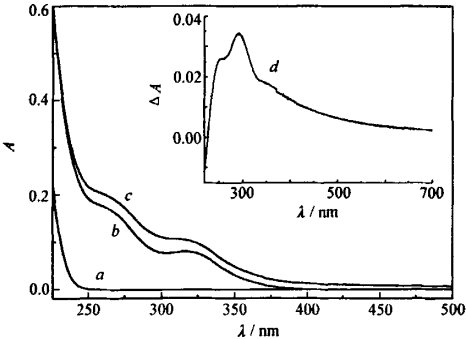


图 2 吸收光谱

Fig. 2 Absorption spectra

a. AMK (against water); b. IPT (against water);
c. IPT-AMK (against water); d. IPT-AMK (against reagent blank);
 $c(\text{Na}_2\text{WO}_4) = 0.1 \text{ mmol/L}$;
 $c(\text{AMK}) = 0.05 \times 10^{-6} \text{ g/mL}$; $\text{pH} = 0.8$

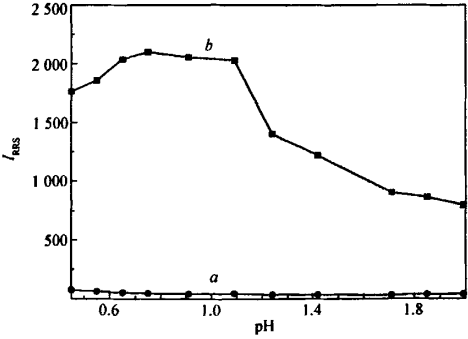


图 3 酸度的影响

Fig. 3 Effect of acidity on I_{RRS}

$c(\text{Na}_2\text{WO}_4) = 0.1 \text{ mmol/L}$;
 $c(\text{AMK}) = 0.05 \times 10^{-6} \text{ g/mL}$;
a. IPT; b. IPT-AMK

2.3 测定条件的确定

2.3.1 溶液酸度 不同酸度 HCl-NaAc 溶液中 IPT-AMK 结合产物 RRS 强度的变化如图 3。图中可见,最大光散强度的 pH 值为 0.65 ~ 1.10, 酸度过高或过低均不利于离子缔合物的生成。故选用 pH = 0.8 的 HCl-NaAc 缓冲溶液。

2.3.2 Na_2WO_4 用量 Na_2WO_4 浓度对于 IPT-AMK 体系的 RRS 强度有影响, 适宜的 Na_2WO_4 浓度为 0.1 ~ 0.3 mmol/L。当 Na_2WO_4 浓度较低时, 离子缔合反应不完全, ΔI_{RRS} 偏低, 当 Na_2WO_4 浓度过高时, ΔI_{RRS} 也会降低, 故确定 Na_2WO_4 浓度为 0.1 mmol/L。

2.3.3 离子强度 考察了加入 NaCl 对 IPT-AMK 体系光散射强度 (ΔI_{RRS}) 的影响 (图 4)。可以看出, 单独 IPT 的光散射强度基本不受电解质 NaCl 浓度影响。当 NaCl 浓度小于 0.10 mol/L 时, 也基本不影响 IPT-AMK 缔合物的 RRS 光强度。当 NaCl 浓度大于 0.10 mol/L 时, 缔合产物的 ΔI_{RRS} 迅速下降。这是由于高浓度的 Na^+ 、 Cl^- 对同多钨酸根阴离子和 AMK 质子化阳离子之间产生竞争作用, 削弱了 IPT 和 AMK 之间缔合作用, 导致体系光散射强度降低。因此, 测定体系中应尽量降低其他盐类的浓度。

2.4 IPT-AMK 之间缔合反应与 I_{RRS} 增强机制

钨酸根阴离子在酸性溶液中能聚合成一系列的同多酸阴离子^[10]。当 $[\text{H}^+]/[\text{WO}_4^{2-}] \geq 1.67$ 时, 钨酸根主要以 $[\text{W}_6\text{O}_{19}]^{2-}$ 存在。本实验的 pH 值为 0.65 ~ 1.10, Na_2WO_4 浓度为 0.1 ~ 0.3 mmol/L, 因此 $[\text{H}^+]/[\text{WO}_4^{2-}] > 1.67$, 溶液中钨酸根主要以 $[\text{W}_6\text{O}_{19}]^{2-}$ 存在。而 AMK 在该介质中会质子化为正 2 价阳离子 (AMK^{2+})^[9]。经用等摩尔连续变化或摩尔比法测定离子缔合物组成为 Na_2WO_4 与 AMK 的比为 6:1, 即 1 个 $[\text{W}_6\text{O}_{19}]^{2-}$ 可结合 1 个 AMK^{2+} 。二者靠静电引力和疏水作用力结合形成电中性的离子缔合物:

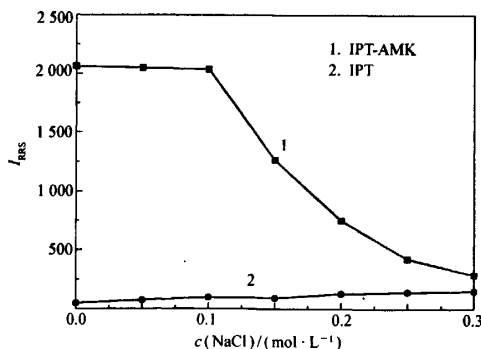
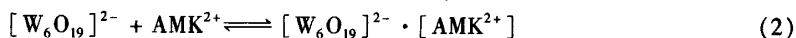
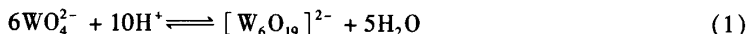


图 4 离子强度的影响

Fig. 4 Effect of ionic strength on I_{RRS}

$c(\text{Na}_2\text{WO}_4) = 0.1 \text{ mmol/L}$;

$c(\text{AMK}) = 0.05 \times 10^{-6} \text{ g/mL}$; pH = 0.8

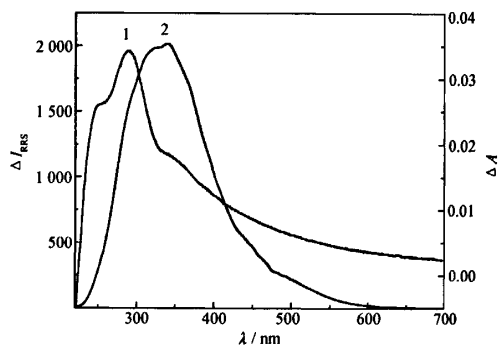


图 5 吸收光谱和 RRS 光谱的比较

Fig. 5 Comparison of absorption and RRS spectra for IPT-AMK system

1. Absorption spectrum; 2. RRS spectrum

形成离子缔合物后, 溶液的光散射强度显著提高是由于 IPT-AMK 离子缔合物的瑞利散射位于其吸收带中 (见图 5), 因此满足共振增强瑞利散射条件^[11]; IPT 与 AMK 形成缔合物后分子量增大, 分子量 M 从 587 增加至 1 995。按 $I = kI_0Mc$ ^[12] 式, 分子量增加会提高光散射强度 I 。

因共振瑞利散射强度与分子的摩尔吸光系数 (ε) 相关, 摩尔吸光系数越大, 共振瑞利散射愈强^[13]。因在 $\lambda_{\text{max}} = 293 \text{ nm}$ 处, AMK 无光吸收, IPT 的摩尔吸光系数 (ε_{max}) 为 $4.8 \times 10^3 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$, IPT-AMK 离子缔合物的摩尔吸光系数 (ε_{max}) 为 $2.20 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。因此, 形成离子缔合物可使光散射强度提高。

2.5 对 AMK 分析测定

2.5.1 ΔI_{RRS} 与 AMK 浓度的线性关系 在优化的反应条件下, 测定了 340 nm 处不同浓度 AMK 与 IPT

形成复合物的 ΔI_{RRS} ,并对 AMK 浓度作线性回归。得到标准曲线的回归方程为 $\Delta I_{\text{RRS}} = 39.4 + 40\ 300c$ (10^{-6} g/mL),线性范围为 $0.001 \times 10^{-6} \sim 0.08 \times 10^{-6}\text{ g/mL}$,相关系数 $r = 0.998\ 6$,检出限(3σ)为 $0.4 \times 10^{-9}\text{ g/mL}$ 。方法的灵敏度分别比毛细管电泳法高 $1\ 250$ 倍^[7],比 HPLC 法高 170 倍^[6],比化学发光法高 200 倍^[5],比荧光法高 50 倍^[4]。因此,RRS 法特别适用于痕量 AMK 的测定。

2.5.2 体系中共存物质对 AMK 测定的影响 在最佳的实验条件下,考察了 AMK 质量浓度为 $0.05 \times 10^{-6}\text{ g/mL}$ 下 20 余种物质对于测定 AMK 的影响,结果列于表 1。从表中可看出,常见无机化合物、尿素、淀粉、氨基酸及糖类的允许倍量较大,方法具有较好的选择性。

表 1 共存物质的影响
Table 1 Effects of coexistent substances($c(\text{AMK}) = 0.05 \times 10^{-6}\text{ g/mL}$)

Foreign substance	$10^6 c(\text{substance})/(\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	Relative deviation/%	Foreign substance	$10^6 c(\text{substance})/(\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	Relative deviation/%
$\text{Na}^+, \text{SO}_4^{2-}$	1 700	0.5	$\text{Al}^{3+}, \text{Cl}^-$	10	3.7
$\text{Na}^+, \text{PO}_4^{3-}$	150	2.8	starch	62	1.7
K^+, Cl^-	650	4.5	lactose	1 024	2.5
K^+, Br^-	1 190	3.4	sucrose	1 000	-0.9
$\text{NH}_4^+, \text{Cl}^-$	250	3.2	maltose	1 000	1.4
$\text{Ca}^{2+}, \text{Cl}^-$	50	-3.1	glucose	800	-3.1
$\text{Mg}^{2+}, \text{SO}_4^{2-}$	30	4.3	DNA	30	-2.2
$\text{Mn}^{2+}, \text{SO}_4^{2-}$	132	4.5	HSA	15	3.2
$\text{Zn}^{2+}, \text{Ac}^-$	2 000	-2.5	phenylalanine	100	0.6
$\text{Cu}^{2+}, \text{SO}_4^{2-}$	600	4.8	glycin	100	4.7
$\text{Fe}^{2+}, \text{SO}_4^{2-}$	80	3.6	D-tryptophan	500	-3.7
$\text{Fe}^{3+}, \text{NO}_3^-$	50	4.1	urea	1 000	-3.9

2.5.3 人血清中 AMK 的测定 10 份健康人血清样品各取 1.00 mL,每份加入一定量的 AMK 标准溶液和适量 2.0 mol/L 三氯乙酸,混合后,以 3 500 r/min 离心分离 5 min,使血清中的蛋白质沉淀完全。移出全部上层清液,并用少量水洗涤沉淀 3 次,将洗涤液与上清液合并,定容至 50.0 mL 作待测液。取待测液 1.00 mL 依次加入 0.1 mmol/L 的钨酸钠溶液 1.00 mL,pH=0.8 的 HCl-NaAc 缓冲液 1.00 mL,加水定容至 10.0 mL,摇匀,测定 AMK 的浓度,每种浓度平行测定 5 份,同时以不加 AMK 的血清样品作空白,结果见表 2。表 2 结果显示,在阿米卡星的有效血药浓度范围($15 \times 10^{-6} \sim 25 \times 10^{-6}\text{ g/mL}$)^[14]内,本法可准确地测定血清中的 AMK 浓度。方法具有较好的重复性,对于人血清样品中 AMK 的 5 次测定值的相对标准偏差为 3.6%~5.5%,加标回收率为 94.7%~105.0%。方法简便灵敏,适合临床血液 AMK 的测定。

表 2 血清样品中 AMK 的测定结果
Table 2 Results for the determination of AMK in human serum samples

Human serum sample	$10^6 c(\text{Found})^a/(\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})(n=5)$	$10^6 c(\text{Added})/(\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$10^6 c(\text{Found})/(\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})(n=5)$	Recovery/(%) ($n=5$)	RSD/(%) ($n=5$)
1	ND	10.0	10.5	105.0	4.1
2	ND	15.0	14.2	94.7	3.6
3	ND	20.0	19.1	95.5	5.5
4	ND	25.0	25.6	102.4	4.0

ND:no detection. a. without AMK

参 考 文 献

1 Compilation Committee of Iatric Big Full of China,Edr(中国药物大全编委会编). Iatric Big Full of China,Western Medicine Book,2nd Edn(中国药物大全,西药卷,第二版)[M]. Beijing(北京):People's Health Press(人民卫生出版社),1997:360

2 Editorial Committee of the Pharmacopoeia of People's Republic of China,Edr(中华人民共和国卫生部药典委员会编). The Pharmacopoeia of People's Republic of China (The Edition of 2000,Part II)(中华人民共和国药典,2000 版,二

- 部)[M]. Beijing(北京):Chemical Industry press(化学工业出版社),2000:312,860
- 3 Confino M,Bontchev P. *Mikrochim Acta*[J],1990,**3**(4-6):305
- 4 Sánchez-Martínez M L,Aguilar-Caballos M P,Gómez-Hens A. *J Pharm Biomed Anal*[J],2004,**34**:1 021
- 5 FANG Lu-Qiu(方卢秋),WANG Zhou-Ping(王周平),FU Zhi-Feng(付志锋),LUO Wan-Fen(罗万芬),ZHANG Zhu-Jun(章竹君). *J Southwest China Normal Univ(Nat Sci)*(西南师范大学学报(自然科学版))[J],2003,**28**(4):603
- 6 José F Ovalles,María del Rosario Brunetto,Máximo Galignani. *J Pharm Biomed Anal*[J],2005,**39**(1-2):294
- 7 Oguri S,Miki Y. *J Chromatogr B*[J],1996,**686**(2):205
- 8 Oertel R,Neumeister V,Kirch W. *J Chromatogr A*[J],2004,**1 058**:197
- 9 LIU Shao-Pu(刘绍璞),HU Xiao-Li(胡小莉),LIU Zhong-Fang(刘忠芳). *Science in China(Ser. B)*(中国科学(B辑))[J],2006,**36**(4):317
- 10 Edition of Chemical Engineering Cyclopedia Editorial Department(化工百科全书编辑委员会编),Chemical Engineering Cyclopedia(化工百科全书)[M],Vol. 16(16卷). Beijing(北京):Chemical Industry Press(化学工业出版社),1997:1 036
- 11 Anglister J,Steinberg I Z. *J Chem Phys*[J],1983,**78**(9):5 358
- 12 Edition of Editorial Board of Chinese Macropaedia(中国大百科全书编辑委员会),Chinese Macropaedia Biology (II)(中国大百科全书 生物学 II)[M]. Beijing(北京):Chinese Macropaedia Press(中国大百科全书出版社),1991:1 374
- 13 Anglister J,Steinberg I Z. *J Chem Phys*[J],1981,**74**(2):786
- 14 CHU Xiao-Man(储小曼),RUI Jian-Zhong(芮建中),ZHOU Yong-Gang(周永刚),DAI Yong-Jian(戴永健),CAI Wei-Min(蔡卫民),LING Shu-Sen(凌树森). *Acta Pharmaceutica Sinica*(药学报)[J],1996,**31**(12):881

Resonance Rayleigh Scattering Spectra of Interaction Between Isopoly Tungstic Acid-Amikacin and Its Analytical Application

HU Xiao-Li*, AN Lan-Xiang, LIU Shao-Pu, LIU Zhong-Fang, SONG Yan-Qi
(School of Chemistry and Chemical Engineering, MOE Key Laboratory of Luminescence
and Real-Time Analysis, Southwest University, Chongqing 400715)

Abstract In a pH 0.65 ~ 1.10 HCl-NaAc buffer solution, isopoly tungstic acid (IPT) was reacted with amikacin (AMK) to form an ion-association complex, which resulted in great enhancement of resonance Rayleigh scattering (RRS) and the appearance of a new RRS spectrum. The maximum scattering peak was located at 340 nm. The scattering intensity was proportional to the concentration of AMK in a range of $0.001 \times 10^{-6} \sim 0.08 \times 10^{-6}$ g/mL, based on which a new RRS method for the determination of AMK was established. The method exhibited a high sensitivity and the detection limit (3σ) was 0.4×10^{-9} g/mL. The RRS and absorption spectral characteristics and optimum reaction conditions of the system were discussed. Effects of coexisting substances were tested, and the results demonstrated that this method had a good selectivity. It was applied to the determination of AMK in human serum samples with satisfactory results. The reaction mechanism and reasons for RRS enhancement were discussed.

Keywords amikacin, isopoly tungstic acid, resonance Rayleigh scattering, determination