

以碘 - RB 缔合物为荧光探针的药剂中 青霉素含量的检测

张爱菊, 戴兴德, 张小林*

(甘肃医学院 公共课教学部, 甘肃 平凉 744000)

摘要: 碘(I_3^-)对罗丹明 B(RB)具有荧光猝灭作用, 可使 RB 的荧光信号强度减弱甚至消失, 而青霉素碱性水解产物青霉噻唑酸可将 I_3^- 还原为 I^- , 使体系荧光信号再现, 据此建立了以 RB - I_3^- 缔合物为荧光探针测定药剂中青霉素含量的新方法。在激发波长 365 nm, 发射波长 580 nm 条件下进行了青霉素的荧光测定。结果表明, 在 0 ~ 6 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 青霉素浓度与荧光强度变化值呈良好的线性关系, 检出限为 1.88×10^{-9} mol/L。方法的加标回收率为 97.0% ~ 106%, 相对标准偏差($n=6$)为 2.6% ~ 3.1%。该方法简便快速、准确可靠、灵敏度高, 可用于药剂中青霉素的含量分析。

关键词: 罗丹明 B(RB); 碘; 青霉素; 荧光猝灭

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2019)09-1132-04

Detection of Penicillin in Medicine Using a Fluorescent Probe Based on Iodine - Rhodamine B Associate

ZHANG Ai-ju, DAI Xing-de, ZHANG Xiao-lin*

(Public Course Teaching Department, Gansu Medical College, Pingliang 744000, China)

Abstract: A fluorescent probe for the detection of penicillin in medicaments was fabricated with iodine - rhodamine B (RB) associate, as the fluorescence signal intensity of RB would be weakened by iodine (I_3^-) solution or even disappear, while penicillin alkaline hydrolysis product penicillium thiazole could reduce I_3^- to I^- , making the system fluorescent signal reappear. The fluorescent probe was applied in the determination of penicillin in medicaments at an excitation wavelength of 365 nm and an emission wavelength of 580 nm. Results showed that there was a good linear relationship between fluorescence intensity change and penicillin concentration in the range of 0 - 6 $\mu\text{mol/L}$ with a limit of detection (LOD) of 1.88×10^{-9} mol/L. The recoveries were in the range of 97.0% - 106% with relative standard deviations ($n=6$) of 2.6% - 3.1%. The proposed method was simple, rapid, accurate and reliable, and could be used for the analysis of penicillin in medicaments.

Key words: rhodamine B; iodine; penicillin; fluorescence quenching

青霉素 (Penicillin) 是最早发现的一种抗生素, 也是临床应用最广泛的抗生素, 其测定方法有滴定法^[1]、微生物法^[2]、羟胺法^[3]、指示电极法^[4]等。然而上述方法在测定时均因共存物质有干扰, 很难做到痕量分析。高效液相色谱法^[5]凭借其准确度高、专属性强的特点广泛用于牛奶中青霉素的测定, 但是该方法仪器较为大型笨重, 前期样品处理过程复杂, 并且检测非常耗时。

罗丹明 B (Rhodamine B, RB) 具有荧光特性, I_3^- 离子可通过静电引力与 RB 的阳离子形成离子缔合物, 并使其荧光猝灭。基于碘化钾的还原性对 RB 进行荧光猝灭的研究已有文献报道^[6-12], 但尚未见利用 RB - I_3^- 体系荧光恢复进行还原性药物分析的报道。本研究发现, 弱酸性条件下, I_3^- 和 RB 混合的瞬间即可形成 RB - I_3^- 缔合物使 RB 发生荧光猝灭现象, 但若在 RB - I_3^- 缔合物形成前使青霉素碱性水解物青霉噻唑酸 (PNC) 先与碘反应, 将 I_3^- 还原为 I^- , 可使溶液重新发出荧光, 其荧光强度与青霉素浓度在一定范围内呈线性关系, 据此建立了一种全新的青霉素的荧光测定方法。本研究基于简单的

氧化还原和缔合反应原理, 在不需催化、加热及长时间等待的情况下实现了青霉素的快速测定, 其过程不受样品浑浊度和色度影响, 准确度高且检出限低。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

930N 荧光分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); 分析天平(0.1 mg, 上海天平仪器厂); pH S-3C 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂)。

RB(固体, 天津市致远化学试剂有限公司), 青霉素 G 钾(美国 Sigma 公司), 单质碘、醋酸、浓盐酸(天津市盛奥化学试剂有限公司), 氢氧化钠、醋酸钠(天津市百世化工有限公司), 碘化钾(上海银典化工有限公司), 各种金属离子水溶液(Al^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+})均由其相应的硝酸盐或盐酸盐(天津市盛奥化学试剂有限公司)制得, 乳糖、淀粉、糊精(天津大茂化学试剂厂), 硬脂酸(天津北辰方正试剂厂), 抗坏血酸(成都金山化学试剂有限公司)。所用试剂均为分析纯, 水为二次蒸馏水。

1.2 标准溶液的配制

RB 标准溶液: 准确称取 0.119 8 g RB 固体, 加水溶解并稀释定容至 250 mL, 配成浓度为 1.00×10^{-3} mol/L 的标准溶液, 作为储备液, 使用时稀释至 1.00×10^{-4} mol/L。

青霉素标准溶液(1.00×10^{-4} mol/L): 准确称取青霉素 G 钾 1.000 0 g, 加水溶解稀释定容至 100 mL, 配成浓度为 2.76×10^{-2} mol/L 的标准溶液, 作为储备液, 使用时稀释至 1.00×10^{-4} mol/L。

碘标准溶液^[13](I_3^- , 1.00×10^{-3} mol/L)。

1.3 实验方法

在 50 mL 容量瓶中, 加入青霉素样品液(<0.05 mol/L) 1.00 mL 和 1.0 mol/L 氢氧化钠 1.00 mL, 振荡反应 30 min, 加 1 mol/L 盐酸 1.00 mL、 1.00×10^{-3} mol/L 碘标准溶液 2.00 mL, 继续反应 20 min, 依次加入 1.00×10^{-4} mol/L RB 5.00 mL, 0.1 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲溶液(pH 4.5) 5.00 mL, 蒸馏水定容, 静置 10 min 后, 以 365 nm 作激发波长, 580 nm 作发射波长, 1.0×10^{-6} mol/L RB 作为灵敏度调试液, 测定荧光强度 I_F 。同时完成空白试验 I_{F0} 测定, 根据 ΔI_F ($\Delta I_F = I_F - I_{F0}$) 确定青霉素含量。

2 结果与讨论

2.1 荧光光谱

考察了 RB、RB + I_3^- 和 PNC + I_3^- + RB 体系的荧光光谱, 见图 1。结果表明, 当 $\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm 时, RB 在 580 nm 处有一最大荧光峰(曲线 a), 加入 I_3^- 后, 荧光猝灭, 强度降至原来的 1/4, 但峰位未发生改变(曲线 b), 说明 RB 和 I_3^- 发生了缔合; PNC 与 I_3^- 反应后再加 RB, 荧光得以恢复(曲线 c)。

2.2 RB 用量的影响

RB 的荧光特性与其浓度密切相关^[14], 当 $c(\text{RB}) \geq 1.5 \times 10^{-5}$ mol/L 时, RB 可形成二聚体或多聚体, 其激发和发射波长红移, 自熄灭作用增强, 线性度消失。为了保证样品测定有足够宽的线性范围和更低的检出限, 将 1.0×10^{-4} mol/L RB 溶液的加入量定为 5.00 mL, 确保 PNC + I_3^- + RB 体系中 RB 的浓度为 1.0×10^{-5} mol/L。

2.3 碘液用量

在 RB + I_3^- 体系中, 考察了碘液用量对 RB 荧光猝灭的影响。结果表明, 随着碘液量的增加, RB 的荧光强度逐渐降低, 在 0~2.0 mL 碘液用量范围内, 线性度较好。当碘液加入量增加到 4.0 mL 时, RB 的荧光强度开始呈现平缓趋势, 当碘液增加到 6.0 mL 时, RB 的荧光强度趋于稳定。为了得到较为

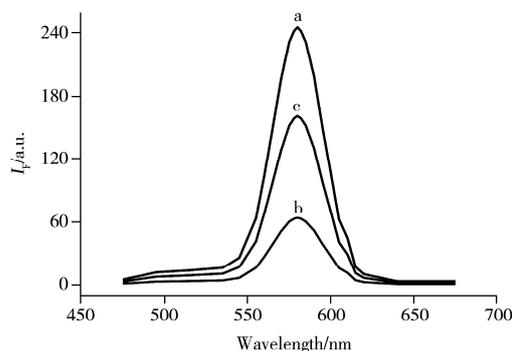


图1 不同体系的荧光光谱

Fig. 1 Fluorescence spectra of different systems
a. RB, b. RB + I_3^- , c. PNC + I_3^- + RB; $c(\text{RB}) = 1.0 \times 10^{-5}$ mol/L, $c(\text{I}_3^-) = 4.0 \times 10^{-5}$ mol/L, $c(\text{PNC}) = 3.0 \times 10^{-6}$ mol/L; pH 4.5

准确的实验结果, 选择碘液用量为 2.0 mL。

2.4 pH 值的影响

由于 pH 值对 $\text{RB}^{[14]}$ 和 I_3^- 的存在形式有明显影响, 进而影响 RB 与 I_3^- 之间的缔合作用, 故就 pH 值对 $\text{PNC} + \text{I}_3^- + \text{RB}$ 体系荧光强度的影响做了进一步考察(图 2)。取 1.00×10^{-4} mol/L 青霉素标准溶液 1.50 mL, 其他条件不变, 定容时加入不同体积的 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH 溶液。结果发现, 随着 pH 值的增加, 游离态 RB 的羧基开始电离, 并且电离程度逐渐增大, 从而使得其吸电子能力逐渐减弱, 荧光强度逐渐增大; pH 4.0~8.0 时, 荧光强度基本保持恒定; 当体系的 pH 值大于 9.0 时, 缔合物中的 I_3^- 发生歧化, 体系荧光强度出现二次增大。故 pH 4.0~8.0 条件下, 更有利于 RB 和 I_3^- 的缔合, 所以本方法选择 pH 4.5 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液作缔合反应介质。同时考察了不同浓度(0.05、0.1、0.5 mol/L)缓冲溶液的缓冲性能, 结果表明, 0.1 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲溶液(pH 4.5)体系的稳定性、线性度最佳。

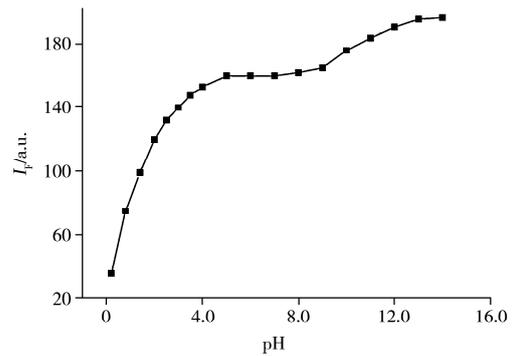


图 2 pH 值对 $\text{PNC} + \text{I}_3^- + \text{RB}$ 体系荧光强度的影响
Fig. 2 Effect of pH value on the fluorescence intensity of $\text{PNC} + \text{I}_3^- + \text{RB}$ system

2.5 反应温度与时间的优化

取 1.00×10^{-4} mol/L 青霉素标准溶液 1.50 mL, 考察了温度对 $\text{PNC} + \text{I}_3^- + \text{RB}$ 体系荧光强度的影响。结果表明: 当水浴温度超过 40 °C 时, 体系荧光强度与单一 RB 溶液荧光强度接近, 说明 I_3^- 受热挥发, 缔合物基本消失, RB 完全释放。故本实验在室温下进行。

取 1.00×10^{-4} mol/L 青霉素标准溶液 1.50 mL, 分别考察了青霉素水解反应、PNC 与 I_3^- 氧化反应以及 I_3^- 与 RB 缔合 3 个反应的时间对 $\text{PNC} + \text{I}_3^- + \text{RB}$ 体系荧光强度的影响(图 3)。结果表明, 随着青霉素水解时间的延长, PNC 还原 I_3^- 导致 I_3^- 浓度下降, $\text{PNC} + \text{I}_3^- + \text{RB}$ 体系荧光强度递增, 26 min 后达到恒定(曲线 a), 此时, 青霉素水解完全, 因此, 青霉素水解反应时间确定为 30 min; PNC 与 I_3^- 反应速度较快, 15 min 后 $\text{PNC} + \text{I}_3^- + \text{RB}$ 体系的荧光强度达到恒定(曲线 b), 故 PNC 与 I_3^- 的反应时间设定为 20 min; RB 加入后与 I_3^- 发生缔合反应, 导致 $\text{PNC} + \text{I}_3^- + \text{RB}$ 体系荧光强度递减(曲线 c), 8 min 后荧光强度降到最低, 故 RB 加入后静置时间确定为 10 min。

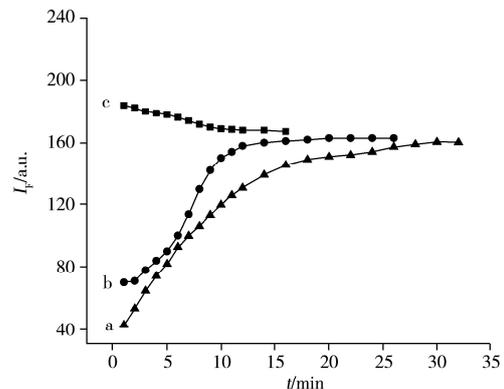


图 3 动力学曲线
Fig. 3 Kinetic curves
a. penicillin hydrolysis, b. fluorescence recovery, c. fluorescence quenching

2.6 试剂加入顺序的影响

考察了试剂加入顺序对体系荧光强度的影响, 结果发现, 按 $\text{PNC} + \text{I}_3^- + \text{RB}$ 顺序加入时体系最稳定, 且相对荧光强度最高, 说明 I_3^- 与 PNC, 缔合物 $\text{RB} - \text{I}_3^-$ 与 PNC 的反应速度有差异。 I_3^- 与 RB 形成的离子缔合物是疏水的, 在溶液中很快沉淀^[15], 无法与 PNC 完全反应。因此实验选择 $\text{PNC} + \text{I}_3^- + \text{RB}$ 的加入顺序。

2.7 干扰离子的影响

考察了药剂中经常使用的赋形剂和添加剂以及阳离子对测定的干扰。实验结果表明, 测定误差 $\leq \pm 5\%$ 时, 50 倍的乳糖、硬脂酸、淀粉、糊精及 100 倍的 Al^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 离子对测定结果无干扰, 但 Fe^{3+} 和抗坏血酸存在干扰。而常用药品附加成分和辅料中很少含有 Fe^{3+} , 故在此不予讨论; 抗坏血酸的干扰可通过加入氢氧化钠进行消除。

2.8 方法的工作曲线

取青霉素标准溶液 0.00 ~ 3.00 mL 作为测试液,在最佳条件下进行荧光测定,并绘制工作曲线。结果发现,青霉素浓度(c , $\mu\text{mol/L}$)在 0 ~ 6 $\mu\text{mol/L}$ 范围内与荧光强度变化值(ΔI_F)呈良好的线性关系,其线性方程为 $\Delta I_F = 31.96c + 3.794$, $r = 0.9969$ 。根据 IUPAC 规定,对空白溶液进行 11 次平行测定,计算标准偏差 S_b ,依据公式:检出限(LOD) = $3S_b/\text{slope}$,得到本方法的 LOD 为 1.88×10^{-9} mol/L。

2.9 实际样品的测定

准确称取不同批次注射用青霉素钠(哈药集团)固体 0.1 g,蒸馏水溶解并定容至 100 mL,再将溶液稀释 50 倍,取稀释液 1.00 mL,按实验方法进行测定,完成加标回收试验,并与高效液相色谱法对照。结果显示,本法准确度和灵敏度良好,加标回收率为 97.0% ~ 106%,相对标准偏差为 2.6% ~ 3.1%,且测定结果与高效液相色谱法基本一致,相对误差(RE) < 2.0%。结果见表 1。

表 1 实际样品中青霉素的测定($n = 6$)
Table 1 Determination of penicillin in actual samples($n = 6$)

Samples	Original($\mu\text{mol/L}$)	Added($\mu\text{mol/L}$)	Found($\mu\text{mol/L}$)	Recovery(%)	RSD(%)	HPLC($\mu\text{mol/L}$)	RE(%)
1	1.08	1.00	2.05	97.0	3.1	1.09	0.9
2	1.10	1.50	2.68	106	2.9	1.12	1.8
3	1.09	2.00	3.14	103	2.6	1.11	1.8

3 结 论

本文基于 RB - I₃ 荧光探针构建了荧光光度法测定青霉素含量的新体系。方法简单且具有较好的灵敏度和选择性,将其应用于药剂中青霉素的测定,结果满意。

参考文献:

- [1] Shi C, Li F R, Wang Y. *Shanxi Med. Staff Newspaper* (史岑, 李芙蓉, 王英. 山西职工医学报), **1996**, 6(3): 1-4.
- [2] Tai S Z, Wang X J. *Pharm. Clin. Res.* (郜顺章, 王晓晶. 药学与临床研究), **2015**, 23(3): 271-273.
- [3] Wu Z Q, Song L H, Wang Y. *Chin. J. Antibiot.* (吴芝清, 宋陆铎, 王英. 中国抗生素杂志), **1990**, 15(5): 363-368.
- [4] Fu W, Zhu J R. *Chem. Sens.* (傅文, 朱俊锐. 化学传感器), **2000**, 20(3): 60-62.
- [5] Wang D J, Yan C R, Xu C X. *Food Res. Dev.* (王多娇, 颜春荣, 徐春祥. 食品研究与开发), **2016**, 37(11): 156-159.
- [6] Kang C Y, Jiang Z L, Xi D L. *Spectrosc. Spectral Anal.* (康彩艳, 蒋治良, 奚旦立. 光谱学与光谱分析), **2007**, 27(2): 399-341.
- [7] Qiao Y C, Long D C, Sun Z Z, Zheng Y T, Chen L J, Wang H. *Chem. Sens.* (乔玉春, 龙大成, 孙宗招, 郑滢婷, 陈丽君, 王桦. 化学传感器), **2018**, 38(1): 39-43.
- [8] Wang H X, Sheng L, Han X Q. *Chin. J. Spectrosc. Lab.* (王海霞, 盛丽, 韩小茜. 光谱实验室), **2007**, 24(4): 587-589.
- [9] Luan C L, Li Y Q. *Chin. J. Anal. Lab.* (栾崇林, 黎源倩. 分析实验室), **2003**, 22(3): 74-76.
- [10] Li J G, Wang Y R, Tang Y L. *Chin. J. Anal. Chem.* (李建国, 王耀荣, 唐亚莲. 分析化学), **1997**, 25(5): 590-593.
- [11] Zhang J, Zheng J D, Chen Y. *Chin. J. Anal. Chem.* (张杰, 郑基甸, 陈颖. 分析化学), **1997**, 25(9): 1082-1085.
- [12] Feng P, Liu S P, Liu Z F. *Chin. J. Anal. Chem.* (奉平, 刘绍璞, 刘忠芳. 分析化学), **1997**, 25(9): 1072-1075.
- [13] Bai Y, Zhang X L. *Chin. J. Chem. Edu.* (白莹, 张小林. 化学教育), **2018**, 39(4): 29-30.
- [14] Huang B J, Li J J, Qu L B. *J. Tianjin Normal Univ. : Nat. Sci. Ed.* (黄保军, 李建军, 屈凌波. 天津师范大学学报: 自然科学版), **2005**, 25(3): 8-10.
- [15] Liu X D. *Chem. Res. Appl.* (刘希东. 化学研究与应用), **2002**, 14(2): 225-226.

(责任编辑: 盛文彦)