

文章编号: 1000-7032(2012)04-0453-05

## 利用铈(Ⅲ)-诺氟沙星-十二烷基硫酸钠的光致发光及稀土敏化荧光法测定硫酸新霉素的浓度

刘保生\*, 闫潇娜, 种宝红, 曹世娜, 吕运开

(河北大学化学与环境科学学院 药物化学与分子诊断教育部重点实验室, 河北 保定 071002)

**摘要:** 室温下,在 pH=7.4 的氨-氯化铵缓冲溶液中,铈(Ⅲ)与诺氟沙星反应形成稳定络合物,产生稀土敏化荧光,其最佳激发、发射波长分别为  $\lambda_{ex}=340\text{ nm}$ 、 $\lambda_{em}=612\text{ nm}$ ,表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)的加入使其荧光强度进一步增加。在该反应体系中加入适量硫酸新霉素溶液,铈(Ⅲ)与诺氟沙星络合物的激发、发射峰位置不变,但荧光强度降低,据此建立了灵敏的测定硫酸新霉素的荧光分析方法。硫酸新霉素的浓度在 0.909~22.72 mg/L 范围内符合线性关系。该方法的检出限为 0.40 mg/L,可用于片剂及滴眼液中硫酸新霉素含量的测定,快速、简便、结果满意。6 次平行测定的回收率为 90.5%~102.3%,相对标准偏差为 1.4%~3.5%。

**关键词:** 硫酸新霉素; 铈; 诺氟沙星; 十二烷基硫酸钠; 荧光猝灭

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

DOI: 10.3788/fjxb20123304.0453

## Determination of Trace Neomycin Sulfate by Photoluminescence and Lanthanide Sensitized Fluorescence Quenching on Europium-norfloxacin-SDS

LIU Bao-sheng\*, YAN Xiao-na, CHONG Bao-hong, CAO Shi-na, LV Yun-kai

(Key Laboratory of Medical Chemistry and Molecular Diagnosis, Ministry of Education,

College of Chemistry &amp; Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

\* Corresponding Author, E-mail: lbs@hbu.edu.cn

**Abstract:** In the ammonia-ammonium chloride buffer solution of pH = 7.4, europium ion ( $\text{Eu}^{3+}$ ) and norfloxacin (NFLX) react and combine as steady complex under room temperature. The complex shows its sensitized fluorescence of rare earth. The maximum excitation wavelength and maximum emission wavelength are 340 nm and 612 nm, respectively. The fluorescence intensity has a further increase in sodium dodecyl sulfate (SDS). When neomycin sulfate solution is added, the fluorescence intensity of the system of  $\text{Eu}^{3+}$ -NFLX-SDS diminishes, while the locations of the excitation and emission wavelengths stay the same. According to this result, a new way to determine the concentration of neomycin sulfate is established. The concentration range that neomycin sulfate can detect is 0.909~22.7 mg/L. The detection limit is up to 0.4 mg/L. This measurement has been applied to determine neomycin sulfate in tablet and drops. The relative standard deviation is 1.4%~3.5% for 6 parallel determination of neomycin sulfate samples and the recovery is 90.5%~102.3%.

**Key words:** neomycin sulfate; europium ion; norfloxacin; sodium dodecyl sulfate; fluorescence quenching

收稿日期: 2011-12-13; 修订日期: 2012-01-20

基金项目: 国家自然科学基金(20675024); 河北省重点基础研究项目(10967126D)资助

作者简介: 刘保生(1963-), 男, 河北保定人, 研究员, 主要从事分子发光学理论与应用的研究。

E-mail: lbs@hbu.edu.cn, Tel: (0312)5079385

## 1 引 言

硫酸新霉素是一种易溶于水,性质稳定,用途较广的氨基糖甙类广谱抗生素<sup>[1]</sup>,对革兰氏阳性、阴性细菌<sup>[2]</sup>均具抗菌作用。医院临床上常被制成硫酸新霉素滴眼液或滴耳剂,主要用于敏感细菌引起的角膜炎、结膜炎、眼睑炎及中耳炎等的治疗。对于硫酸新霉素含量的测定,有微生物检定法<sup>[3-5]</sup>、薄层色谱法<sup>[6]</sup>、高效液相色谱法<sup>[7-9]</sup>、分光光度法<sup>[10]</sup>、比色法<sup>[11]</sup>、旋光法<sup>[12]</sup>和酶联免疫法(ELISA)<sup>[13-14]</sup>等,这些方法存在反应时间较长、使用了较多的有机溶剂或试剂价格昂贵等问题。迄今尚未见利用荧光法测定硫酸新霉素含量的报道。

镧系离子( $\text{Eu}^{3+}$ 、 $\text{Tb}^{3+}$ )与某些有荧光或无荧光的有机化合物配位后,有机配体能够吸收紫外光并将能量传递给稀土离子,然后发出镧系离子的特征荧光,这就是所谓的“稀土敏化荧光”<sup>[15]</sup>。这种敏化荧光具有 Stokes 位移大、发射镧系离子的锐线光谱、荧光寿命长、稳定、背景干扰小等优良性能,因此得到日益广泛的应用。

## 2 实 验

### 2.1 仪器与试剂

荧光数据或谱图采用岛津公司 RF-540 荧光分光光度计及日立公司 F-4500 荧光分光光度计获得,酸度由上海雷磁仪器厂 pH-3C 型精密酸度计测定。

硫酸新霉素(NEO, Sigma 公司):准确称取 0.090 9 g NEO,加少量水溶解并定容于 100 mL 容量瓶中,配成  $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L 水溶液,用时适当稀释。诺氟沙星(NFLX,中国药品生物制品检定所,含量 > 99.0 %):配成  $5.0 \times 10^{-3}$  mol/L 水溶液,用时适当稀释。 $\text{Eu}^{3+}$ 溶液:准确称取 0.175 9 g  $\text{Eu}_2\text{O}_3$  粉末(含量 > 99.9 %)于 100 mL 烧杯中,加入少量 1:1 的盐酸,并加几滴  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,小心加热使其溶解,蒸发至近干,任其自然冷却至结晶析出,用蒸馏水将结晶溶解,移至 100 mL 容量瓶中定容,配成  $1.0 \times 10^{-2}$  mol/L  $\text{Eu}^{3+}$  的储备液, $\text{Eu}^{3+}$  工作溶液浓度为  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L,每天临用时稀释。十二烷基硫酸钠(SDS): $1.0 \times 10^{-2}$  mol/L 水溶液。氯化铵-氨水缓冲溶液(pH = 7.4):由 0.5 mol/L 的  $\text{NH}_4\text{Cl}$  和 0.5 mol/L 的  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  在酸

度计上调节得到。所用试剂除注明外均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

### 2.2 实验方法

于 10 mL 比色管中依次加入 1.0 mL pH = 7.4 的  $\text{NH}_4\text{Cl}-\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  缓冲溶液,  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L 的  $\text{Eu}^{3+}$  溶液 1.0 mL,一定量  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L 的 NEO 溶液, 1.25 mL  $5.0 \times 10^{-4}$  mol/L NFLX 溶液, 0.5 mL  $1.0 \times 10^{-2}$  mol/L 的 SDS 溶液,摇匀,用水定容,放置 10 min。在室温条件下,用 1 cm 的石英比色皿,入射和出射狭缝均为 10 nm,固定激发波长 340 nm,记录发射波长 612 nm 处的荧光谱图或荧光强度  $F$ ,同时作试剂空白  $F_0$ ,以  $F - F_0 = \Delta F$  作为体系的荧光强度值。

## 3 结果与讨论

### 3.1 体系的荧光光谱

各种体系的荧光光谱见图 1。由图可知,氯化铈水溶液中, $\text{Eu}^{3+}$  不能显现其特征发射峰,且  $\text{Eu}^{3+}$  与 NEO、SDS 不能发生能量传递效应(曲线 9); NEO 为带正电荷分子<sup>[16]</sup>,与 SDS 反应在 418 nm 附近出现荧光峰(曲线 8),但很弱;NFLX 与 SDS 反应,使 NFLX 在 414 nm 处发生荧光猝灭,且在 420 nm 处产生荧光峰,峰位移 6 nm(曲线 2、4),两者间发生静态猝灭过程;NFLX 和 NEO 之间不发生反应(曲线 3 表现为曲线 4 与 8 的合谱); $\text{Eu}^{3+}$  与 NFLX 反应,发生能量传递效应,在 590,612 nm 处出现  $\text{Eu}^{3+}$  的特征发射峰(曲线 5),即稀土敏化荧光,也就是说,NFLX 将吸收的能量传递给  $\text{Eu}^{3+}$ ,从而敏化了  $\text{Eu}^{3+}$  的荧光,且在 612 nm 处的峰值最大。这些特征峰是由于  $\text{Eu}^{3+}$  的  ${}^5\text{D}_0-{}^7\text{F}_n$  ( $n = 4, 3, 2, 1, 0$ ) 跃迁引起的。在 590 nm 处( ${}^5\text{D}_0-{}^7\text{F}_1$  跃迁)和 612 nm 处( ${}^5\text{D}_0-{}^7\text{F}_2$  跃迁),SDS 的加入使 612 nm 处荧光峰增强,能量传递效率增加(曲线 7)。NEO 的加入可猝灭 612 nm 处的荧光(曲线 6),这是由于 NEO 和 NFLX 与 SDS 反应竞争的结果。在  $\text{Eu}^{3+}$ -NFLX-SDS 体系中加入 NEO,由图 2 知,  $\text{Eu}^{3+}$ -NFLX-SDS-NEO 体系的荧光强度发生规律性猝灭,且发射峰位置和峰形不变。这表明在该体系内发生了静态猝灭过程,其中 612 nm 处荧光强度猝灭程度最大。据此,可建立用  $\text{Eu}^{3+}$ -NFLX-SDS-NEO 体系测定 NEO 的新方法。本实验选择激发波长为 340 nm、发射波长为 612 nm 作为测定波长。

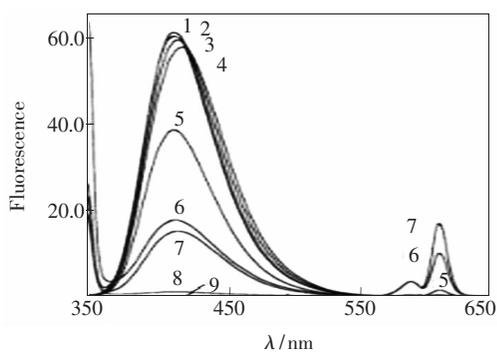


图1 NFLX-NEO (1)、NFLX (2)、NFLX-NEO-SDS (3)、NFLX-SDS (4)、NFLX-Eu<sup>3+</sup> (5)、Eu<sup>3+</sup>-NFLX-SDS-NEO (6)、Eu<sup>3+</sup>-NFLX-SDS (7)、NEO-SDS (8)、NEO、SDS、Eu<sup>3+</sup>、Eu<sup>3+</sup>-SDS、Eu<sup>3+</sup>-NEO(9)体系的荧光光谱。

Fig.1 The fluorescence spectra coming from NFLX-NEO (1), NFLX (2), NFLX-NEO-SDS (3), NFLX-SDS (4), NFLX-Eu<sup>3+</sup> (5), Eu<sup>3+</sup>-NFLX-SDS-NEO (6), Eu<sup>3+</sup>-NFLX-SDS (7), NEO-SDS (8), NEO, SDS, Eu<sup>3+</sup>, Eu<sup>3+</sup>-SDS, Eu<sup>3+</sup>-NEO(9).  $C_{\text{NFLX}} = 6.5 \times 10^{-5}$  mol/L,  $C_{\text{Eu}^{3+}} = 1.1 \times 10^{-5}$  mol/L,  $C_{\text{SDS}} = 5.0 \times 10^{-4}$  mol/L,  $C_{\text{NEO}} = 2.0 \times 10^{-5}$  mol/L.

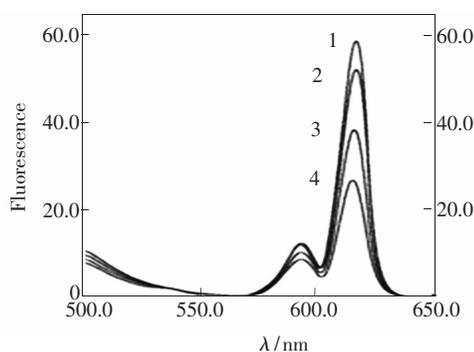


图2 Eu<sup>3+</sup>-NFLX-SDS-NEO体系的荧光光谱。曲线1~4: Eu<sup>3+</sup>-NFLX-SDS-NEO ( $C_{\text{NEO}} = 0, 0.5, 1.5, 2.0$ )  $\times 10^{-5}$  mol/L。

Fig 2 The fluorescence spectra of Eu<sup>3+</sup>-NFLX-SDS-NEO. Curve 1~4: Eu<sup>3+</sup>-NFLX-SDS-NEO ( $C_{\text{NEO}} = 0, 0.5, 1.5, 2.0$ )  $\times 10^{-5}$  mol/L.  $C_{\text{NFLX}} = 6.0 \times 10^{-5}$  mol/L,  $C_{\text{Eu}^{3+}} = 1.0 \times 10^{-5}$  mol/L,  $C_{\text{SDS}} = 5.0 \times 10^{-4}$  mol/L.

### 3.2 溶液酸度的影响

固定 NEO 用量为 1.5 mL ( $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L), 改变溶液酸度, 按实验方法操作, 体系随 pH 值的变化见图 3。当介质 pH 值在 7.3 ~ 7.5 之间时, 诺氟沙星为两性分子<sup>[17-18]</sup>, 体系的荧光强度变化较大。在实验中, 分别尝试了 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、

Tris-HCl 和 NH<sub>4</sub>Ac-NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O 等缓冲溶液, 效果都不理想。最后确定浓度为 0.5 mol/L、pH = 7.4 的 NH<sub>4</sub>Cl-NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O 缓冲溶液 1.0 mL 为最佳用量。

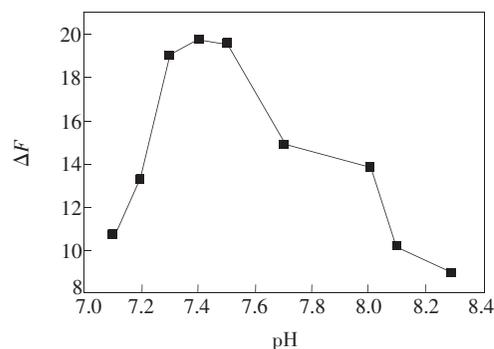


图3 缓冲溶液 pH 值对体系的影响

Fig. 3 The effect of buffer solution acidity on the system

### 3.3 诺氟沙星、Eu<sup>3+</sup>、SDS 的用量选择

分别改变 NFLX、Eu<sup>3+</sup> 和 SDS 的用量, 按实验方法操作。结果表明: 当 NFLX 用量为 1.2 ~ 1.4 mL ( $6.0 \times 10^{-5} \sim 7.0 \times 10^{-5}$  mol/L)、Eu<sup>3+</sup> 用量为 0.9 ~ 1.1 mL ( $9.0 \times 10^{-6} \sim 1.1 \times 10^{-5}$  mol/L) 及 SDS 的用量为 0.4 ~ 0.6 mL ( $4.0 \times 10^{-4} \sim 6.0 \times 10^{-4}$  mol/L) 时, 体系的荧光强度猝灭最大。实验中也考察了十二烷基硫酸钠和十二烷基苯磺酸钠。结果表明: 十二烷基磺酸钠不能使体系显现 Eu<sup>3+</sup> 的特征发射谱线, 十二烷基苯磺酸钠则使体系产生大量沉淀。因此, 本实验选定反应物的最佳用量分别为  $5.0 \times 10^{-4}$  mol/L 的 NFLX 1.25 mL,  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L 的 Eu<sup>3+</sup> 1.0 mL,  $1.0 \times 10^{-2}$  mol/L 的 SDS 0.5 mL。

### 3.4 反应时间

考察反应时间对该体系稳定性的影响。结果表明: 反应 10 min 后, Eu<sup>3+</sup> 在 612 nm 处的荧光特征峰猝灭程度最大, 且 30 min 内不变。本实验选择放置 10 min 后测定, 并在 10 min 内完成。

### 3.5 干扰实验

测定 9.089 mg/L 的 NEO, 相对误差在  $\pm 5\%$  范围内。体系对一些常见金属离子和药品辅料的允许浓度分别是 Na<sup>+</sup> (92 mg/L)、K<sup>+</sup> (390 mg/L)、Mg<sup>2+</sup> (12 mg/L)、Ca<sup>2+</sup> (8.80 mg/L)、Zn<sup>2+</sup> (20 mg/L)、Ba<sup>2+</sup> (6.87 mg/L)、Cu<sup>2+</sup> (1.27 mg/L)、Al<sup>3+</sup> (693.9 μg/L)、Ni<sup>2+</sup> (1.47 mg/L)、Mn<sup>2+</sup> (2.20 mg/L)、Fe<sup>3+</sup> (784 μg/L)、Pb<sup>2+</sup> (20.7 mg/L), 大量的淀粉、糊精自然沉降后不影响测定。

### 3.6 工作曲线

按实验方法操作,加入不同量的 NEO 标准溶液,测得相应的  $\Delta F$  值,绘制工作曲线,得其线性回归方程为: $\Delta F = 1.9627 + 1.3257C$  (mg/L),线性相关系数  $r = 0.9990$ ;硫酸新霉素在  $0.909 \sim 22.72$  mg/L 浓度范围内服从线性关系。按  $3\sigma/K$  方法测得方法检出限为  $0.40$  mg/L。

### 3.7 样品分析

#### (1) 滴眼液中硫酸新霉素的测定

对不同厂家的硫酸新霉素滴眼液进行检测。取硫酸新霉素滴眼液 (NEO 含量为  $3.5$  mg/mL)  $1.0$  mL 定容至  $100$  mL 容量瓶中,取稀释后溶液  $2.0$  mL,按实验方法进行操作,测定含量的同时进行回收试验,测定结果见表 1。

表 1 硫酸新霉素滴眼液或硫酸新霉素片中硫酸新霉素的测定结果 ( $n=6$ )

Table 1 Results of the NEO concentration in eye drops and pills ( $n=6$ )

样品	NEO 含量	测定量/(mg · L <sup>-1</sup> )	加入量/(mg · L <sup>-1</sup> )	回收率/%	相对标准偏差/%
滴眼液					
1	3.36 g/L	6.72		95.41	2.84
2	3.63 g/L	7.26	4.54	93.80	1.42
3	3.52 g/L	7.04		102.25	3.03
片剂					
1	99.3 mg/片	9.93		95.66	2.05
2	105.9 mg/片	10.59	4.54	90.47	1.49
3	97.4 mg/片	9.74		90.60	3.51

#### (2) 片剂中硫酸新霉素含量的测定

取硫酸新霉素 10 片 (含量  $100$  mg/片),精确称定、研细,准确称取相当于一片的量,用水溶解并定容至  $1$  L 容量瓶中,过滤弃去初滤液,取续滤液  $1.0$  mL 于  $10$  mL 比色管中,按实验方法进行测定,再根据平均片重计算出每片的含量。经平行 6 次取样测定,测定结果见表 1,结果满意。

(Ⅲ) 形成稳定配合物使铈 (Ⅲ) 光致发光,表面活性剂 SDS 的增敏作用又使铈 (Ⅲ) 的荧光进一步敏化增强。优化了 NEO 猝灭  $\text{Eu}^{3+}$ -NFLX-SDS 三元配合物荧光的最佳酸度、最佳试剂用量等反应条件,据此建立了测定 NEO 的新荧光分析方法。该方法由于利用了稀土荧光 Stokes 位移大、发射锐线光谱、谱线窄、荧光寿命长、稳定、背景干扰小等优良性能,用于实际样品中 NEO 的测定结果满意。该研究对于拓展稀土元素在荧光分析中的研究及应用具有一定的指导意义。

## 4 结 论

荧光光谱分析法具有灵敏度高、选择性好、快速简便等特点。本文研究发现诺氟沙星与铈

## 参 考 文 献:

- [1] Deng Jiuyao, Huang Wenxin, Jiang Zhiliang. Resonance scattering spectral analysis of trace neotamicin [J]. *Anal. Test. Technol. Instrum.* (分析测试技术与仪器), 2007, 13(3):174-176 (in Chinese).
- [2] Lu Fang, Liu Qun, Yu Xianghua, et al. Assay of neomycin sulfate by polarimetry [J]. *Chin. J. Veterinary Drug.* (中国兽药杂志), 2006, 40(6):31-32 (in Chinese).
- [3] Huang Yun, Xu Xingya. Preparation and quality control of neomycin sulfate and hydrocortisone gel [J]. *Practi. Pharm. Clin. Rem.* (实用药物与临床), 2010, 13(6):428-430 (in Chinese).
- [4] Čanžek Majhenič A, Rogelj I, Perko B. Enterococci from tolminc cheese: population structure, antibiotic susceptibility and incidence of virulence determinants [J]. *Int. J. Food Microbiol.*, 2005, 102(2):239-244.
- [5] Molina M P, Althaus R L, Molina A, et al. Antimicrobial agent detection in ewes' milk by the microbial inhibitor test brilliant black reduction test: BRT AiM [J]. *Int. Dairy J. A*, 2003, 13(10):821-826.
- [6] Jiang Xia, Chen Yi. Qualitative analysis of compound neomycin nasal drops by TLC [J]. *Drug Standards of China* (中国

- 药品标准), 2003, 4(5):63-64 (in Chinese).
- [ 7 ] Clarot I, Regazzeti A, Auzeil N, *et al.* Analysis of neomycin sulfate and framycetin sulfate by high-performance liquid chromatography using evaporative light scattering detection [J]. *J. Chromatogr. A*, 2005, 1087(1-2):236-244.
- [ 8 ] Megoulas N C, Koupparis M A. Enhancement of evaporative light scattering detection in high-performance liquid chromatographic determination of neomycin based on highly volatile mobile phase, high-molecular-mass ion-pairing reagents and controlled peak shape [J]. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1057(1-2):125-131.
- [ 9 ] Vucićević-Prcečić K, Cservenák R, Radulović N. Determination of neomycin and oxytetracycline in the presence of their impurities in veterinary dosage forms by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *J. AOAC Int.*, 2011, 94(3):750-757.
- [ 10 ] Jiang Hong, Liu Yan. Spectrophotometric determination of kanamycin and neomycin by ion-association reaction with the binary complex of La(Ⅲ) and methyl blue [J]. *Phys. Test. Chem. Anal. Part B; Chem. Anal.* (理化检验:化学分册), 2007, 43(1):54-56 (in Chinese).
- [ 11 ] Amin A S, Issa Y M. Ion-association method for the colorimetric determination of neomycin sulphate in pure and dosage forms [J]. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2003, 59(4):663-670.
- [ 12 ] Lu Fang, Liu Qun, Yu Xianghua. Determination of neomycin sulfate in feed by polarimetry [J]. *China Feed* (中国饲料), 2006(18):31-32 (in Chinese).
- [ 13 ] Jin Y, Jang J W, Lee M H, *et al.* Development of ELISA and immunochromatographic assay for the detection of neomycin [J]. *Clin. Chim. Acta*, 2006, 364(1-2):260-266.
- [ 14 ] Wang S, Xu B, Zhang Y, *et al.* Development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of neomycin residues in pig muscle, chicken muscle, egg, fish, milk and kidney [J]. *Meat Sci.*, 2009, 82(1):53-58
- [ 15 ] Sun Chunyan, Ping Hong, Li Hongkun, *et al.* The fluorescence characteristic of yttrium(Ⅲ) ciprofloxacin complex and its application [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2010, 31(5):646-650 (in Chinese).
- [ 16 ] Palvannan T, Boopathy R. Interaction of aminoglycoside antibiotics with surface Asp and Glu residues of phosphatidylinositol-specific phospholipase C [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 2006, 38(7):899-904.
- [ 17 ] Zhang Qin, Huang Guancun, Zhao Ling, *et al.* Influence of pH and ions on sorption of norfloxacin on humic acid [J]. *China Environ. Sci.* (中国环境科学), 2011, 31(1):78-83 (in Chinese).
- [ 18 ] Liu Baosheng, Xue Chunli, Wang Jing, *et al.* Studies on the interaction between ciprofloxacin and ofloxacin in presence of bovine serum albumin by spectroscopic methods [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2010, 31(2):285-290 (in Chinese).