

[研究简报]

酶催化-荧光猝灭法测定药物中的万古霉素

冯霞光, 张敏, 赵虎, 王怀友

(山东师范大学化学化工与材料科学学院, 济南 250014)

关键词 万古霉素; 酪氨酸; 辣根过氧化物酶; H_2O_2 ; 荧光猝灭

中图分类号 O657.39

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2007)07-1270-03

万古霉素对革兰氏阳性细菌、金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌有较好疗效, 且不易诱导细菌产生耐药性, 因而深受临床工作者重视. 但其具有耳、肾毒副反应, 临床应用时常需进行血药浓度监测, 以避免耳、肾功能损害^[1]. 测定血清、血浆、尿液及药物制剂中万古霉素含量的方法有多种, 如荧光偏振免疫法^[2]、放射性免疫测定^[3]、微生物测定法^[4]、高效液相色谱法^[5,6]、伏安法^[7]、热解质谱法^[8]及气相色谱-质谱联用技术^[9]. 但这些方法所需设备昂贵、反应条件苛刻、操作费时. 因此, 建立一种简便、快捷且选择性好的定量分析万古霉素的方法将具有较好的应用价值.

近年来, 随着酶的理论与实际应用的发展, 酶法分析已成为分析化学的一个重要分支, 辣根过氧化物酶作为一种重要的酶制剂, 被广泛应用于生物工艺技术^[10,11]、生物传感器^[12~14]及神经解剖学^[15]等领域. 介质环境对辣根过氧化物酶催化荧光反应体系的影响已有报道^[16]. 酪氨酸在辣根过氧化物酶(HRP)催化下可被 H_2O_2 氧化为强荧光物质^[17]. 实验发现, 万古霉素对产物的荧光具有猝灭作用, 根据这种原理, 本文研究了万古霉素的荧光猝灭机理, 建立了测定万古霉素的方法. 该方法具有操作简便、快速及选择性好等优点, 可用于注射液中万古霉素含量的测定, 与药典法对照, 结果令人满意.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂 FLS920 荧光分光光度计(Edinburgh, 英国); pHs-3C 型酸度计(上海雷磁仪器厂).

1000 $\mu\text{g/mL}$ 盐酸万古霉素(化学对照品, 纯度 99.8%, 中国药物和生物制品鉴定所, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存); 酪氨酸(色谱纯, 上海试剂公司), 辣根过氧化物酶(Sigma 公司): 100 $\mu\text{g/mL}$, 用时稀释至 20.0 $\mu\text{g/mL}$ (于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存); H_2O_2 : 体积分数为 0.3%, 用时稀释至体积分数为 $3 \times 10^{-3}\%$, 现用现配; $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 缓冲溶液: $\text{pH} = 10.08$. 其它试剂均为分析纯, 水均为二次水.

1.2 实验过程 准确移取 1.00 mL 酪氨酸于 10 mL 容量瓶中, 依次加入 1.00 mL H_2O_2 、1.00 mL HRP 及缓冲溶液 2.00 mL, 用水稀释到刻度, 混匀, 于室温放置 20 min, 在 307 nm 处激发, 在 400 nm 处测量其荧光强度(F_0); 按照上述试剂量加于另一 10 mL 容量瓶中, 再加入 1.00 mL 万古霉素, 按照相同步骤测定其荧光强度(F).

2 结果与讨论

2.1 产物荧光光谱 由图 1 可知, 产物的激发波长为 307 nm, 发射波长为 400 nm, 加入万古霉素后, 产物的相对荧光强度降低, 表明发生了荧光猝灭.

2.2 荧光猝灭机理探讨 万古霉素对产物具有猝灭作用, 将不同浓度的万古霉素加入到产物中, 按照分析步骤测定 F_0 及 F , 绘制 Stern-Volmer 图. 若猝灭过程为动态猝灭^[18], 需满足 Stern-Volmer 方程, F_0/F 与猝灭剂的浓度呈如下线性关系:

$$F_0/F = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1)$$

式中, F_0 为未加入猝灭剂时的荧光强度, F 为加入给定浓度的猝灭剂时的荧光强度, k_q 为猝灭过程的

收稿日期: 2006-11-24.

基金项目: 山东省自然科学基金(批准号: Y2006B31)资助.

联系人简介: 王怀友(1952 年出生), 男, 教授, 从事光分析化学研究. E-mail: wanghuaiyou@sdu.edu.cn

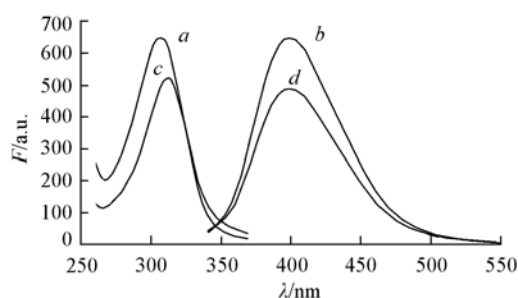


Fig. 1 Fluorescence spectra of the product

a and *b* were excitation and emission spectra of the product, respectively; *c* and *d* were excitation and emission spectra of the product in the presence of vancomycin, respectively.

入猝灭剂万古霉素时的荧光寿命, 结果如图 2 所示. 由图 2 可知, τ_0 为 4.65 ns, τ_1 为 4.72 ns, $\tau_0/\tau_1 \cong 1$, 万古霉素对产物的猝灭过程为静态猝灭. 由方程式(2)得到 K 值为 4.6×10^3 .

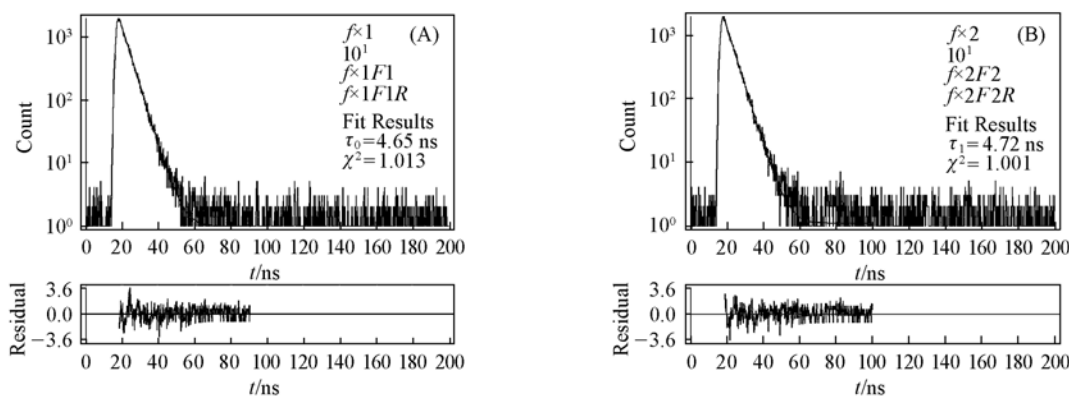


Fig. 2 Fluorescence lifetime of the product(A) and in the presence of vancomycin(B)

2.3 pH 值影响 按照分析步骤, 实验了 pH 对产物荧光强度的影响, 结果显示, 产物的荧光强度随 pH 值的增大而增加, 在 pH = 8.0 ~ 11.8 之间, 产物的荧光强度没有显著变化. 因此选定 pH = 10.08 的 $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 缓冲溶液控制体系的 pH 值. 另外发现, 缓冲溶液对万古霉素的测定也没有影响.

2.4 试剂加入顺序和放置时间的影响 按照分析步骤, 实验了试剂加入顺序对测定的影响. 结果表明, 试剂的最佳加入顺序为: 酪氨酸, H_2O_2 , HRP, 缓冲溶液, 万古霉素. 测定了放置时间对产物荧光强度的影响. 结果表明, 于室温放置 20 min 后, 荧光强度不再变化, 并且至少稳定 2.5 h.

2.5 干扰离子的影响 实验了常见离子对测定 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 万古霉素的影响, 结果表明, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 K^+ , Na^+ , Cl^- 及 OAc^- ; 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 NO_3^- 及 SO_4^{2-} ; 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CO_3^{2-} ; 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- 及 HCO_3^- ; 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的腺嘌呤; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Ca^{2+} ; 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的胸腺嘧啶以及 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Mg^{2+} 均不对结果产生影响.

2.6 工作曲线 在实验条件下测得万古霉素的质量浓度在 40.0 ~ 450.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与 F_0/F 呈线性关系, 线性回归方程为 $c = 320.5 F_0/F - 297.4$, 线性相关系数为 0.9991.

2.7 精密度和检出限的测定 将同一样品测定 10 次, 测得万古霉素的平均含量为 109.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 相对标准偏差为 0.70%. 按照同样的分析步骤测定试剂空白 10 次, 得出检出限为 10.91 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.8 万古霉素回收率 从表 1 结果可见, 万古霉素的回收率在 91.7% ~ 98.3% 之间.

Table 1 Results for the recovery of the vancomycin

Sample No.	Sample content/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	Added/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	Average found/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	Average recovery(%)	RSD(%)
1	57.25	100	157.21	98.3	2.63
2	96.04	100	184.59	92.3	1.53
3	198.21	100	275.05	91.7	1.40

2.9 注射液中万古霉素的测定 将万古霉素注射液稀释至不同浓度进行测定,并根据中国药典中的液相色谱法测定这些样品中万古霉素的浓度(表2)。由表2可看出,本文提出的方法与药典法^[20]的测定结果吻合,用 Cochran 法^[21]检验表2中的数据,在置信度等于95%时,两种方法无明显差异。

Table 2 Results of determination of the vancomycin ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Sample No.	Proposed method	HPLC ^[20]
1	57.25 \pm 4.18	58.42 \pm 3.21
2	96.04 \pm 5.72	97.83 \pm 5.16
3	198.21 \pm 3.77	198.79 \pm 4.97

参 考 文 献

- [1] DAI Zhi-Yong(戴智勇), LI Xin-Zhong(李新中), YIN Tao(尹桃), *et al.*. Chinese Journal of Antibiotics(中国抗生素杂志)[J], 2002, **27**(10): 599—601
- [2] Schwenzer K. S., Wang C. H. J., Anhalt J. P.. Ther. Drug Monit. [J], 1983, **5**: 341—345
- [3] Crossley C. B., Rotschafer J. C., Chen M. M., *et al.*. Antimicrob. Agents Chemother[J], 1980, **17**: 654—657
- [4] Walker C. A., Koop B.. Antimicrob. Agents Chemother[J], 1978, **13**: 30—33
- [5] Ristuccia P. A., Ristuccia A. M., Bidanset J. H., *et al.*. Ther. Drug Monit. [J], 1984, **6**: 238—242
- [6] Bauchet J., Puissard E., Garaud J. J.. J. Chromatogr. [J], 1987, **414**: 472—476
- [7] Belal F., el-Ashry S. M., el-Kerdawy M. M., *et al.*. Arzneimittelforschung[J], 2001, **51**(9): 763—768
- [8] Alireza G., Masoud K. D., Feridoun S. A.. Talanta[J], 2001, **55**(3): 573—580
- [9] Shibata N., Ishida M., Prasad Y. V. R., *et al.*. Journal of Chromatography B[J], 2003, **789**(2): 211—218
- [10] Ryan B. J., Carolan N., Fágáin C.Ó.. Trends in Biotechnol. [J], 2006, **24**: 355—363
- [11] Azevedo A. M., Matins V. C., Prazeres D. M., *et al.*. Biotechnol. Annu. Rev. [J], 2003, **9**: 199—247
- [12] Ruzgas T., Emneus J., Gorton L., *et al.*. Anal. Chim. Acta[J], 1995, **311**: 245—253
- [13] Caramori S. S., Fernandes K. F.. Process Biochem. [J], 2004, **39**: 883—888
- [14] Luo X. L., Xu J. J., Zhang Q., *et al.*. Biosensor and Bioelectronics[J], 2005, **21**: 190—196
- [15] Jeffery A., Winer A.. Biobehavioral Reviews[J], 1977, **1**: 45—54
- [16] Tang B., Wang Y., Liang H., *et al.*. Spectrochim. Acta, Part A[J], 2006, **63**: 609—613
- [17] Yamazaki I., Mason H. S., Piette L.. Biochem. Biophys. Res. Commun. [J], 1959, **1**: 336—337
- [18] Lakowicz J. R.. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd Ed. [M], New York: Plenum Press, 1986: 264
- [19] CHEN Guo-Zhen(陈国珍), HUANG Xian-Zhi(黄贤智), ZHENG Zhu-Zi(郑朱梓), *et al.*. Method of Fluorescence Analysis(荧光分析法), 2nd Ed. [M], Beijing: Science Press, 1991: 115—118
- [20] The Pharmacopoeia Committee of the Ministry of Health of People's Republic of China(中华人民共和国药典委员会). Pharmacopoeia of People's Republic of China, Part II(中华人民共和国药典, 二部)[M], Beijing: Chemical Industry Press, 2000: 554
- [21] ZHENG Yong-Xi(郑用熙). The Method of Mathematical Statistics in Analytical Chemistry(分析化学中的数理统计方法)[M], Beijing: Science Press, 1986: 122, 231, 308

Determination of Vancomycin in Injection via Enzyme Catalysis-Fluorescence Quenching Method

FENG Xia-Guang, ZHANG Min, ZHAO Hu, WANG Huai-You*

(College of Chemistry, Chemical Engineering and Materials Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract A new method for determining vancomycin was established based on the principle of fluorescence quenching. The mechanism of the fluorescence quenching was discussed. A linear relationship is obtained between F_0/F and the concentration of vancomycin in the range of 40.0—450.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with the correlation coefficient 0.9991. The detection limit was 10.91 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the relative standard derivative was 0.70%. The effects of pH, foreign ions, standing time on the determination of vancomycin were examined. The results obtained by this method were agreed with those by the official method.

Keywords Vancomycin; Tyrosine; Horseradish peroxidase; H_2O_2 ; Fluorescence quenching

(Ed.: A, G)