

# 荧光分析法测定药物及尿样中的氨曲南

程乙真, 江虹\*

(长江师范学院化学化工学院, 长江师范学院武陵山片区绿色发展协同创新中心, 重庆 408100)

**摘要:**通过罗丹明 B 与氨曲南的荧光反应建立了测定药物及生物样品中氨曲南的荧光分析新方法。在 pH 6.55 的弱酸性介质中, 罗丹明 B 与氨曲南反应生成红色离子缔合物, 使体系发生荧光猝灭, 氨曲南在 0.015~17.4 mg/L 范围内与缔合物的荧光猝灭程度 ( $\Delta F$ ) 呈线性关系, 检出限 ( $3S_b/S$ ) 为 0.010 mg/L。同时, 还考察了荧光光谱特征、适宜反应条件及共存物质的影响。结果表明, 该方法可用于药物及人体尿液中氨曲南含量的测定, 加标回收率为 97.7%~103%, 相对标准偏差 (RSD) ( $n=5$ ) 为 2.0%~2.8%。

**关键词:**氨曲南; 罗丹明 B; 荧光法; 药物; 尿样

中图分类号: O657.3; R917

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2019)04-0228-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2019.04.053

## Determination of aztreonam in drugs and urine sample by fluoroscopy

CHENG Yi-zhen, JIANG Hong\*

(Collaborative Innovation Center for Green Development in Wuling Mountain Areas, School of Chemistry and Chemical Engineering, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China)

**Abstract:** The fluorescence reaction between rhodamine B and aztreonam is studied and a novel sensitive fluoroscopy for the determination of aztreonam in drugs and biological samples is established accordingly. In a weak acidic medium with pH=6.55, rhodamine B reacts with aztreonam to form a red ionic association complex, which leads to the fluorescence quenching of the system. The mass concentration of aztreonam in the range of 0.015~17.4 mg·L<sup>-1</sup> shows a direct proportion to the fluorescence quenching degree ( $\Delta F$ ) of system, with a detection limits ( $3S_b/S$ ) of 0.010 mg·L<sup>-1</sup>. The spectral characteristics of fluorescence, the suitable reaction conditions and the effect of coexisting substances are also studied. The results show that this method can be applied to determining the content of aztreonam in the drugs and human urine, with a spiked recovery in the ranges of 97.7%~103% and RSD ( $n=5$ ) in the range of 2.0%~2.8%.

**Key words:** aztreonam; rhodamine B; fluoroscopy; drug; urine sample

氨曲南 (aztreonam) 是一种具有单酰胺环类 (monobactams) 的新型  $\beta$ -内酰胺类抗生素, 是一种细菌杀菌剂, 抗菌谱较窄, 仅对需氧革兰阴性杆菌 (如大肠杆菌、克雷白杆菌、沙雷杆菌、奇异变形杆菌、吡哌阳性变形杆菌、枸橼酸杆菌、流感嗜血杆菌、铜绿假单胞菌及其他假单胞菌、某些肠杆菌属、淋球菌等) 具有抗菌作用, 对许多细菌产生的  $\beta$  内酰胺酶高度稳定。临床上, 氨曲南主要用于治疗由敏感菌所致的呼吸系统感染、泌尿感染、生殖系统感染 (包括急性淋病)、腹腔感染、皮肤感染、软组织感染、手术前预防感染及其他严重感染等。虽然氨曲南的副作用较小, 但若不合理用药, 仍会产生较严重的不良反应 (如皮疹、紫癜、瘙痒、腹泻、恶心、呕吐、黄疸、药物性肝炎等)<sup>[1]</sup>。因此, 研究药物中氨曲南含量的快速检测方法具有重要意义。目前, 国内外对氨曲南的检测方法研究很少, 主要是高效液相色

谱法<sup>[2-6]</sup>, 也有液-质联用法<sup>[7]</sup>、原子吸收法<sup>[8]</sup>、紫外-可见分光光度法<sup>[9]</sup>和电化学法<sup>[10]</sup>等的报道。虽有荧光法对氨曲南的报道<sup>[11]</sup>, 但其研究的是氨曲南与牛血清蛋白间的相互作用, 并未对氨曲南含量的检测方法进行研究。在酸性条件下, 笔者以罗丹明 B 作探针, 采用荧光法检测氨曲南的含量, 该方法具有灵敏度高、较宽的线性范围及良好的选择性, 用于实际药物及人体尿样中氨曲南的测定, 结果令人满意。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

pHS-3C 型精密酸度计, 上海虹益仪器仪表有限公司生产; F-2500 型荧光分光光度计, 日本日立公司生产。

氨曲南 (简称为 ATN, 质量分数为 96.9%, 中国食品药品检定研究院生产, 批号: 130507-201303)

收稿日期: 2018-08-07; 修回日期: 2019-01-31

基金项目: 重庆市教委科技基金资助项目 (KJ1401226); 长江师范学院科技基金资助项目 (2017CXX172)

作者简介: 程乙真 (1995-), 男, 本科, 研究方向为分子光谱分析, chengyiyi2017@163.com; 江虹 (1956-), 女, 理学学士, 教授, 研究方向为分子光谱分析, 通讯联系人, jianghongch@163.com。

标准溶液:435.4 mg/L 贮备液(准确称取一定量的氨曲南对照品,加入少许甲醇使其溶解后,转入100 mL容量瓶中,用水定容),冰箱4℃保存,操作液质量浓度为43.54 mg/L。罗丹明B(简称为RhB,质量分数为99%,成都贝斯特试剂有限公司生产)溶液: $1.00 \times 10^{-4}$  mol/L。Tris-盐酸溶液:取适量盐酸(0.10 mol/L)和三羟甲基氨基甲烷(简称为Tris,0.20 mol/L)混合,用酸度计测定,配成pH 3.0~9.5的系列溶液。实验用水为二次蒸馏水。

样品:市售氨曲南药物(无片剂型)、人体样液。

### 1.2 样品预处理

取市售不同规格注射用氨曲南各1支(简称为1<sup>#</sup>、2<sup>#</sup>),将内容物分别置于不同烧杯中,各加入少许甲醇,待氨曲南溶解后,转入1000 mL容量瓶中,用水稀释至刻度。取1<sup>#</sup>稀释液10.0 mL、2<sup>#</sup>稀释液5.00 mL,分别用水定容至100 mL,即为1<sup>#</sup>和2<sup>#</sup>待测液。

取健康学生新鲜尿液(3<sup>#</sup>)适量,过滤,即得待测液。

### 1.3 实验方法

准确移取2.00 mL  $1.00 \times 10^{-4}$  mol/L RhB溶液于10 mL具塞比色管中,再顺序加入3.00 mL pH

6.55 Tris-盐酸缓冲溶液和适量43.54 mg/L TN标准溶液或适量样液,用蒸馏水定容,摇匀,室温下20℃左右、15 min后,利用荧光光度计(光电管负高压400 V,激发和发射光谱通带5 nm)于 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 556 \text{ nm}/583 \text{ nm}$ 下测定体系及试剂空白的荧光强度 $F$ 及 $F_0$ ,并计算 $\Delta F = F - F_0$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 ATN-RhB的激发和发射光谱

ATN和RhB的激发和发射光谱如图1所示。由图1可以看出,当反复固定最大激发波长扫描发射光谱和固定最大发射波长扫描激发光谱时,体系的激发峰和发射峰在 $\lambda_{\text{ex}} = 556 \text{ nm}$ 、 $\lambda_{\text{em}} = 583 \text{ nm}$ 时最大且稳定,故选择 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 556 \text{ nm}/583 \text{ nm}$ 作为测定波长。从图1(a)中可以看出,ATN的固有荧光十分微弱(曲线1,1');RhB在水溶液中发出强的玫瑰红荧光(曲线2,2'),当在RhB溶液中加入适量pH 6.55的Tris-盐酸溶液及ATN溶液后,体系发生荧光猝灭现象(曲线3,3'及4,4')。从图1(b)中可以看出,ATN在一定浓度范围内与体系的荧光猝灭程度呈良好的线性关系,故该体系可用于氨曲南的定量分析。

(上接第227页)

在上述显色反应过程中,溶液始终都是澄清的,可以确保双偶合反应的顺利进行。假设偶合过程染料M是定量生成,则可以计算出溶液中DCB重氮盐质量分数为4.68%,进而获得DCB重氮化反应的收率为98.5%。

## 3 结论

通过使用饱和 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液调节偶合剂溶液pH约9.5,并配制偶合剂溶液质量浓度低于3 g/L,使生成的染料M溶液处于澄清状态,保证双偶合反应的顺利进行。建立了通过测量染料M的质量浓度来间接计算DCB重氮盐质量浓度的方法。确定了在pH=8.5~9.5,质量浓度为1~68 mg/L范围内,染料M质量浓度与吸光度有良好的线性关系,该方法解决了偶氮颜料生产过程中重氮化收率测定难的问题,为优化重氮化反应条件提供了依据。

### 参考文献

[1] 王文明,刘兰平,胡文祥.氨基与硝基的相互转换[J].合成化

学,2000,8(3):207-210.

[2] Yonezawa N, Hino T, Namie T, et al. Synthesis of 3-Trifluoromethyl-1,4-halobenzonitriles[J]. Synthetic Communications, 1996, 26(8): 1575-1578.

[3] 刘展鹏,林原斌.对氨基苯甲酸乙酯的合成研究[J].合成化学, 2002, 10(1): 59-61.

[4] 卢俊瑞,马霞苗,刘梅,等.邻氨基二苯醚类重氮盐的水解及分子内缩合反应[J].高等学校化学学报, 2007, 28(11): 2081-2085.

[5] Min Zhou, Yun Yu, Pierre-Yves Blanchard, et al. Surface patterning using diazonium ink filled nanopipette[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(21): 10956-10962.

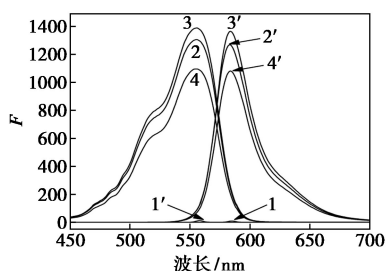
[6] Fitzgerald E. Separation and quantitation of diazonium salts as heptanesulfonate ion pairs by high pressure liquid chromatography[J]. Analytical Chemistry, 1976, 48(12): 1734-1735.

[7] Miroslav Remes. Method of amperometric determination of the concentration of arenediazonium salts; US, 4019966.2[P]. 1997-04-26.

[8] 杨玉宇,陈冰冰,张元平.无冷却螺旋管式苯胺重氮化反应工艺试验研究[J].浙江工业大学学报, 2009, 37(2): 213-216.

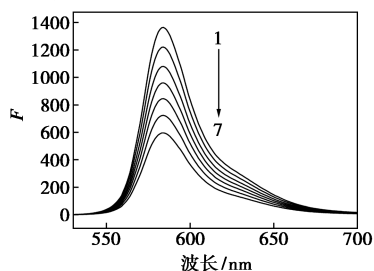
[9] 郑敏燕,杜帅,李学超,等.对羟基偶氮苯甲醛的合成及其光响应性能研究[J].应用化工, 2014, 43(4): 613-615, 620.

[10] 赵琼,阮班锋,吴杰颖,等.新型偶氮化合物的合成及其光学性质[J].合成化学, 2009, 17(4): 450-452. ■



1~4—激发光谱;1'~4'—发射光谱;1,1'—ATN;2,2'—RhB;  
3,3'—RhB (pH 6.55);4,4'—ATN-RhB (pH 6.55);  
ATN—4.35 mg/L;RhB— $2.00 \times 10^{-5}$  mol/L

(a) ATN-RhB 的激发和发射光谱



1~7—0.0, 2.18, 4.35, 6.53, 8.71, 10.9, 13.1 mg/L ATN  
溶液— $2.00 \times 10^{-5}$  mol/L RhB, pH 6.55

(b) ATN-RhB 的发射光谱

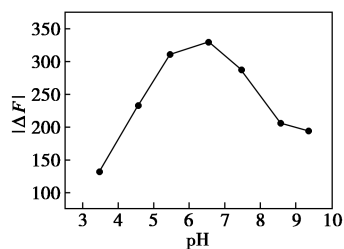
图 1 氟曲南与罗丹明 B 的激发和发射光谱

反应机理: RhB 是一种碱性染料, 在溶液中以阳离子形式存在, ATN 在溶液中, 结构上的羧酸和磺酸上的  $H^+$  离子后, ATN 以阴离子形式存在于溶液中, 于是二者以静电引力结合生成二元离子缔合物。

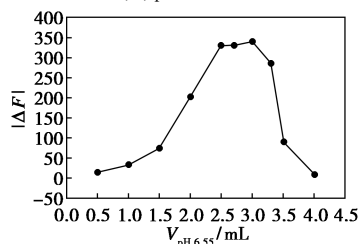
## 2.2 反应条件

### 2.2.1 溶液酸度及用量

改变 Tris-盐酸溶液 pH, 考察其对体系荧光强



(a) pH 的影响



(b) pH 6.55 用量的影响

图 2 pH 及用量的影响

注: ATN 的质量浓度为 4.35 mg/L; RhB 的浓度为  $2.00 \times 10^{-5}$  mol/L。

度  $\Delta F$  的影响, 结果如图 2(a) 所示。由图 2(a) 可以看出, 当缓冲溶液  $pH = 6.55$  时, 体系的荧光猝灭程度最大, 灵敏度最高。继而改变  $pH 6.55$  的缓冲溶液用量, 考查其对体系荧光强度  $\Delta F$  的影响, 结果如图 2(b) 所示。由图 2(b) 可以看出, 缓冲溶液用量在 2.50~3.20 mL 范围内, 体系荧光猝灭程度相对较大, 灵敏度较高。故选用  $pH 6.55$  Tris-盐酸溶液 3.00 mL 控制反应酸度。

### 2.2.2 RhB 溶液的浓度

改变  $1.00 \times 10^{-4}$  mol/L RhB 溶液的用量, 考察其对体系荧光强度  $\Delta F$  的影响, 结果如图 3 所示。由图 3 可以看出, RhB 溶液的最佳浓度为  $2.00 \times 10^{-5}$  mol/L, 此时体系的荧光猝灭程度最大, 灵敏度相对最高。当 RhB 溶液的浓度大于或小于  $2.00 \times 10^{-5}$  mol/L 时, 体系的荧光猝灭程度均有减小。故选用  $1.00 \times 10^{-4}$  mol/L 罗丹明 B 溶液 2.00 mL。

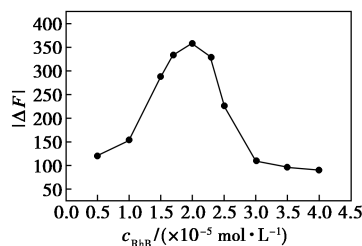


图 3 RhB 溶液浓度的影响

注: ATN 的质量浓度为 4.35 mg/L; Tris-盐酸的  $pH 6.55$ , 用量为 3.00 mL。

### 2.2.3 试剂加入顺序

考察了试剂加入顺序对体系荧光强度  $\Delta F$  的影响。结果表明, 试剂的加入顺序对体系荧光强度有一定影响, 当加入顺序为 RhB、Tris-盐酸、ATN 溶液时, 体系荧光猝灭程度相对较大、灵敏度较高。故按该加入顺序加入各试剂溶液。

### 2.2.4 反应时间及缔合物的稳定性

考察了反应时间对体系荧光强度  $\Delta F$  的影响。结果表明, 15 min 前, 随着反应时间的进行, 体系的  $|\Delta F|$  逐渐增大, 曲线表现为 1 条向上的斜线, 表明此段时间内荧光反应并未完全; 当反应进行到 15 min 后,  $|\Delta F|$  基本处于同一平台上, 说明荧光反应在 15 min 内可以进行完全, 15 min 后, 体系的荧光猝灭基本完成,  $|\Delta F|$  基本不变, 稳定时间至少 1 h。故选在 15 min 后进行测定。

## 2.3 ATN 标准曲线及相关参数

在选定条件下, 对不同质量浓度的 ATN 标准系列溶液进行测定, 并作  $\Delta F-\rho$  标准曲线, 结果如图 4

所示。由图4可以看出, ATN在0.015~17.4 mg/L范围内与体系的荧光猝灭程度呈线性关系, 一元线性回归方程为  $\Delta F = -18.14 - 57.89\rho$ , 相关系数  $r = 0.9991$ , 检出限 ( $3S_b/S$ ) 为 0.010 mg/L。

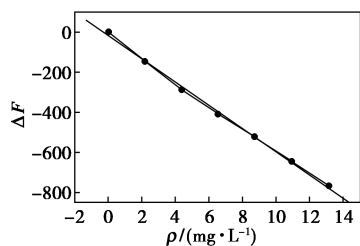


图4 标准曲线

#### 2.4 共存物质的影响

当ATN溶液质量浓度为4.35 mg/L时, 考察了多种氨基酸、糖类及常见阴、阳离子对其测定的影响。结果表明, 相对误差  $\leq \pm 5\%$  时, 下列物质不干扰测定: 200 倍的麦芽糖、蔗糖、葡萄糖、L-赖氨酸、L-亮氨酸、L-色氨酸、 $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $NH_4^+$ 、 $Cl^-$ 、 $NO_3^-$ ; 100 倍的 L-丙氨酸、L-组氨酸、L-白氨酸、L-谷氨酸、柠檬酸三钠、 $Mg^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Sr^{2+}$ 、 $I^-$ 、 $S_2O_3^{2-}$ 、 $SO_4^{2-}$ ; 50 倍的  $Cu^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $SO_3^{2-}$ 、 $C_2O_4^{2-}$ 、淀粉、尿素; 20 倍的  $Sn^{2+}$ 、 $Ag^+$ ; 10 倍的  $Fe^{3+}$ 、 $Al^{3+}$ 。可见, 该法具有良好的选择性。

### 3 分析应用

取1.2中的1<sup>#</sup>~3<sup>#</sup>待测液各1.00 mL, 按所述实验方法加入RhB溶液及缓冲溶液, 再按选定的仪器参数条件测定各样品的荧光强度, 求得各样品的含量(各平行测定5份)。同时做3种不同加标梯度的回收试验, 结果如表1所示。

表1 ATN样品的分析结果及回收试验 ( $n=5$ )

样品	测得值/ (mg·支 <sup>-1</sup> )	标示量/ (mg·支 <sup>-1</sup> )	取样量 $\rho/(mg·L^{-1})$	加入 标准量 $\rho/(mg·L^{-1})$	测得 平均值 $\rho/(mg·L^{-1})$	平均 回收 率/%	RSD/ %
1 <sup>#</sup>	492	500	4.92	2.18	7.12	101	2.2
				4.35	9.35	102	2.0
				6.53	11.6	102	2.3
2 <sup>#</sup>	1022	1000	5.11	2.61	7.69	98.9	2.5
				5.45	10.5	98.9	2.4
				8.18	13.2	98.9	2.2

3 <sup>#</sup>	ND	—	0.00	1.31	1.35	103	2.7
				2.61	2.67	102	2.4
				3.92	3.99	102	2.6

### 4 结论

利用RhB荧光分析法测定氨曲南的质量浓度, 与高效液相色谱法相比, 具有操作简便、前处理简单的优点。与分光光度法相比, 该方法有更高的灵敏度, 准确度和精密度满足痕量分析要求, 并有较宽的线性范围和良好的选择性, 测定结果符合允许误差要求。该方法可用于药物及尿样中氨曲南的定量分析。

#### 参考文献

- [1] Vardakas K Z, Kalimeris G D, Triarides N A, et al. An update on adverse drug reactions related to  $\beta$ -lactam antibiotics[J]. Expert Opinion on Drug Safety, 2018, 17(5): 499-508.
- [2] 吴高芬, 任荣军, 刘伟, 等. HPLC法测定注射用氨曲南的有关物质[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(12): 2381-2384.
- [3] Ye Q, Ding W, Rinaldi F, et al. Structural characterization of low level degradants in aztreonam injection and an innovative approach to aid HPLC method validation[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016, 124: 358-364.
- [4] 刘浩, 仇士林. 注射用氨曲南高效液相色谱法含量测定[J]. 中国抗生素杂志, 1998, 23(3): 197-202.
- [5] 陈秀兰, 李祥, 蔡乾铭, 等. HLC测定Azolam血药浓度及药代动力学的研究[J]. 中国药理学杂志, 1992, 27(8): 475-477.
- [6] 左登平. HPLC测定注射用氨曲南含量的不确定度评估[J]. 北方药学, 2015, 12(5): 4-5.
- [7] 施妍, 卜俊, 沈敏. 超高效液相色谱串联质谱法检测血液中的氨曲南及甲硝唑[J]. 复旦学报(医学版), 2017, 44(增刊): 11-15.
- [8] Alaa S A, Hisham M A. Utilization of colorimetric and atomic absorption spectrometric determination of aztreonam through ion pair complex formation[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2000, 205(1): 35-41.
- [9] Hod Hoda M. Spectrophotometric and fluorimetric determination of aztreonam in bulk and dosage forms[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003, 31(4): 767-774.
- [10] Nagwa A E M. Electrochemical behaviour of the monobactam antibiotic aztreonam at different electrodes and in biological fluids[J]. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1998, 45(2): 281-286.
- [11] 李苑, 朱小月, 周娟, 等. 荧光光谱法研究氨曲南与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 分析实验室, 2011, 30(6): 28-31. ■