技术与方法 文章编号:0253-3626(2011)02-0185-03

滂胺天蓝与阿米卡星相互作用的共振瑞利散射光谱及其应用

韩文莉,曲 斐,陆 巍,尚京川
(重庆医科大学药学院药物分析教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:采用共振瑞利散射法(Resonance Rayleigh scattering, RRS)测定不同制剂中阿米卡星(Amikacin,AMK)的含量。方法:考察 RRS 增强的机理、反应条件对 RRS 强度的影响以及 AMK 浓度与 RRS 强度的关系。结果:在 pH3.0 的 Britton-Robinson 缓冲液中,滂胺天蓝(Pontamine sky blue,PSB)与 AMK 在静电引力及疏水性作用结合成组成比为 2:1 的离子缔合物。AMK 的浓度在 0.01 ~ 1.7 mg/L 范围内与 RRS 强度成正比,检出限(3σ)为 3.0 μg/L。结论:该法简便快速、结果准确可靠,可用于不同制剂中 AMK 的含量测定。

【关键词】共振瑞利散射;阿米卡星;滂胺天蓝
【中国图书分类法分类号】R917 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-10-13

The resonance Rayleigh scattering spectra of the interaction between amikacin and pontamine sky blue and its application

HAN Wen-li, et al
(*Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmaceutical, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To determine simply and rapidly amikacin (AMK) in different pharmaceutical formulations with resonance Rayleigh scattering (RRS) method. *Methods*: The mechanism of generating greatly enhanced RRS signals, the effects of the interacting conditions on the enhanced intensity of RRS, and the relationship between the enhanced RRS intensity and the concentration of AMK were investigated. *Results*: In a Britton-Robinson buffer solution (pH3.0), AMK interacted with pontamine sky blue (PSB) to form an ion-association complex with the composition ratio of 2:1 by virtue of electrostatic attraction and hydrophobic effect. It was found that the enhanced intensity of RRS was in good proportion to the concentration of AMK in the range of 0.01 ~ 1.7 mg/L with the detection limit (3σ) at 3.0 μg/L. *Conclusion*: The method is satisfactorily applied to the determination of AMK in different pharmaceutical formulations.

【Key words】resonance Rayleigh scattering; amikacin; pontamine sky blue

硫酸阿米卡星,又称丁胺卡那霉素(Amikacin,AMK)属第三代半合成氨基糖苷类抗生素,具有抗菌效率高、耐药性低等优点,但 AMK 仍具有与其他氨基糖苷类抗生素相似的耳毒性和肾毒性等副作用,且毒副作用具有明显的量效依赖性[1]。在一定程度上限制了其临床应用,因此对其含量的测定具有十分重要的意义。由于 AMK 分子结构中无特征紫外吸收基团,给 AMK 的痕量测定带来了一定的困难。目前,测定 AMK 的方法有中国药典中的微生物检定法[2]、分光光度法[3,4]、荧光法[5]、化学发光法[6]、毛细管电泳法[7]、高效液相色谱 - 柱前衍生法[8-10]等。微生物法耗时长,操作复杂,灵敏度较低,且易被干扰。分光光度法、荧光法与高效液相色谱 - 柱前衍生法测定时需要使用荧光试剂或其它试剂进行衍生,样品处理操作繁琐、干扰因素多。毛细管电泳法的检出限通常在几十到几千纳克之间,不能完全满足临床痕量分析的要求。

作者介绍:韩文莉(1986-),女,硕士,
研究方向:体内药物分析。
通信作者:尚京川,男,副教授,Email:sjc20@126.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30700775)。

近年来,共振瑞利散射(Resonance Rayleigh scattering,RRS)作为一种新发展起来的定量分析技术,因其操作简便、灵敏度高等优点而受到国内外许多研究团队的广泛关注。目前,RRS 法已成功用于蛋白质、核酸、药物、表面活性剂和金属离子等物质的测定[11]。经研究发现,在弱酸性条件下,滂胺天蓝(Pontamine sky blue,PSB)可与 AMK 形成离子缔合物,使该体系的散射强度显著增强,且在一定范围内,散射强度与AMK 浓度成良好的线性关系。本文从影响因素、RRS 增强的机理及 AMK 浓度与散射强度的关系等方面对 PSB 与 AMK 相互作用的 RRS 光谱进行研究,建立 RRS 光谱法测定 AMK 含量的分析方法,拟用于 AMK 制剂中 AMK 含量的测定中。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Cary Eclipse 型荧光分光光度计(瓦利安 美国);U-3019/3310 紫外可见分光光度计(日立,日本);pHS-3C 酸度计(上海大普仪器公司)。

PSB(购自 Chroma 公司,德国):配制成 2.5×10^{-5} mol/L 的工作溶液;AMK 对照品(中国药品生物制品检定所,批号:130335-200204):配制成 10 mg/L 的工作溶液;Britton-Robinson(BR)缓冲溶液由 0.04 mol/L H_3PO_4、H_3BO_3、CH_3COOH 组成的三酸与 0.2 mol/L NaOH 溶液按一定比例混合,配成不同pH 值的缓冲溶液,用酸度计校正其 pH 值。实验中均使用超纯水。注射用硫酸 AMK(规格 0.2 g/支,批号:090915,090916,090917);硫酸 AMK 注射液(规格 0.2 g:2 ml;批号:090822,090823,090824);AMK 洗剂(规格:10 ml:25 mg;批号:090701、090702、090703),上述样品均由企业提供。

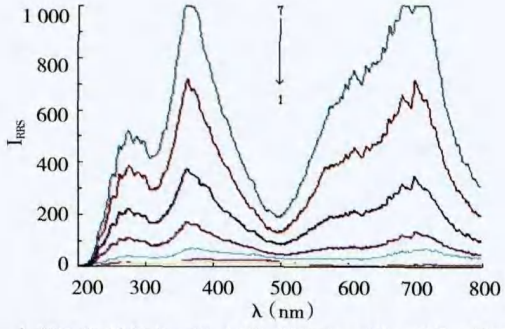
1.2 RRS 实验方法

于 10 ml 比色管中,依次加入 1.0 ml pH 3.0 的 BR 缓冲溶液、一定量的 AMK 标准溶液和 2.5×10^{-5} mol/L 的 PSB 溶液 1.0 ml,用水稀释至刻度摇匀,于荧光分光光度计上以 λex = λem 方式进行同步扫描,记录 RRS 光谱,并分别于最大RRS 波长处测量离子缔合物的 RRS 强度 I_{RRS} 及相应试剂空白的 RRS 强度 I_0,$\Delta I_{RRS} = I_{RRS} - I_0$。

2 结果与讨论

2.1 RRS 散射光谱

图 1 为在 pH 为 3.0 的 BR 缓冲溶液中,AMK、PSB 及 PSB 与不同浓度 AMK 相互作用后的 RRS 光谱图。从图 1 中可以看出:①在一定酸度下,PSB 及 AMK 自身的 RRS 均十分微弱,但当 PSB 与 AMK 反应形成离子缔合物时,RRS 强度显著增强;②最大散射波长位于 362 nm 处,另外 2 个散射峰分别位于 275 nm 与 677 nm;③在最大散射波长处,RRS 强度与一定范围的 AMK 浓度呈良好的线性关系。因此,RRS 法可用于一定浓度范围的 AMK 的含量测定。



1. PSB;2. AMK;3 ~ 10. AMK-PSB、C_{PSB}: 2.5×10^{-5} mol/L;C_{AMK} (from 3 to 10, mg/L): 0.5、0.8、1.0、1.4、1.7, pH3.0

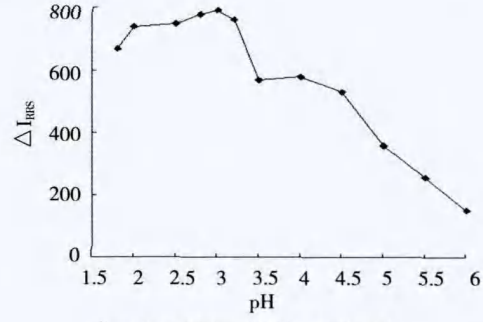
图 1 AMK-PSB 体系的 RRS 光谱图

2.2 适宜的反应条件

2.2.1 PSB 浓度对 RRS 强度的影响 实验考察了浓度范围为 $1.0 \times 10^{-5} \sim 5.0 \times 10^{-5}$ mol/L 的 PSB 溶液对 RRS 强度的影响。结果表明 PSB 的最佳浓度为 2.5×10^{-5} mol/L,若低于此浓度,AMK 与 PSB 反应不完全,RRS 反应强度随 PSB 浓度的增大而增大。当浓度大于 2.5×10^{-5} mol/L 时,PSB 趋于饱和,继续增大浓度,PSB 自身形成二聚物的趋势加大[12],与 PSB-AMK 分子间的缔合作用相竞争,导致离子缔合物的 RRS 强度随 PSB 浓度的增大而减小。

2.2.2 酸度对 RRS 反应的影响 实验通过调节 BR 缓冲溶液的 pH 值来考察酸度对 RRS 的反应,如图 2 所示:反应的最佳酸度范围为 pH 2.4 ~ 3.3。超出此范围,PSB-AMK 体系的 RRS 强度均会明显降低。这与 AMK 及 PSB 的结构有关(AMK 及 PSB 结构见图 3)。在较低的 pH 值下,PSB 结构中的 2 个氨基基团(-NH_2)将会吸引溶液中的氢质子(H^+),而使 PSB 带 2 个单位的正电荷,PSB 自身形成二聚物的趋势增加,与 PSB-AMK 分子间的缔合作用相竞争,导致离子缔合物的 RRS 强度减小;另一方面,在较高 pH 值条件下,不利于形成 AMK 阳离子,亦使 RRS 反应强度减低。

2.2.3 反应时间及稳定性 实验中考察了反应时间及稳定性对 RRS 反应的影响,结果表明,在室温下,PSB 与 AMK 可迅速反应,反应强度可稳定至少 2 h。



C_{PSB}, 2.5×10^{-5} mol/L; C_{AMK}, 1.5 mg/L

图 2 pH 值对 RRS 反应的影响

2.2.4 共存物质对 AMK 测定的影响 在最佳的实验条件下,考察了 AMK 浓度为 1.2 mg/L 下,20 余种物质对于测定 AMK 的影响,当允许误差在 ± 10%时,结果见表 1。由表 1 可知,常见的无机离子、糖类等物质在较高浓度下不影响测定,但个别金属离子对测定的干扰较大,如 Fe(Ⅲ)。测实际样品时,如有干扰物质,须预分离处理后再测定。

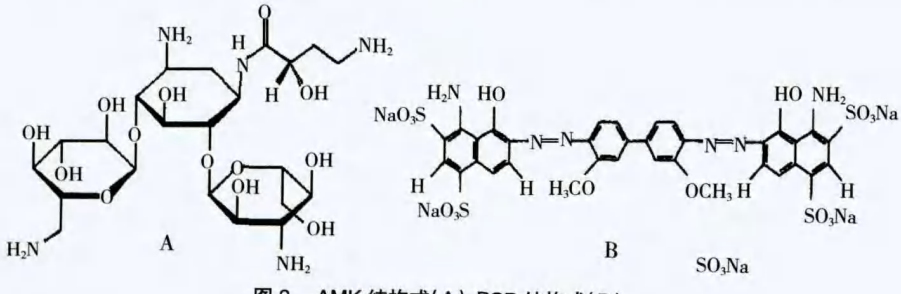


图 3 AMK 结构式(A),PSB 结构式(B)

表 1 共存物质对 AMK 测定的影响 (AMK, 1.2 mg/L; PSB, 2.5×10^{-5} mol/L; pH 3.0)

共存物质	允许浓度 (mg/L)	允许倍数	共存物质	允许浓度 (mg/L)	允许倍数
Mg (Ⅱ)	24	20	Na^+	120	100
Al (Ⅲ)	216	180	K^+	84	70
Cu (Ⅱ)	60	50	NH^{4+}	36	30
Sn (Ⅱ)	36	30	Cl^-	240	200
Co (Ⅱ)	12	10	NO_3^-	24	20
Mo (Ⅵ)	60	50	SO_4^{2-}	36	30
Ba (Ⅱ)	120	100	$C_2O_4^{2-}$	108	90
Fe (Ⅱ)	12	10	SO_3^{2-}	12	10
Fe (Ⅲ)	2.4	2	HCO_3^-	72	60
Ca (Ⅱ)	54	45	Ac^-	90	75
dextrin	48	40	EDTA	144	120
Starch	72	60	Citric acid	96	80
Lactose	48	40	Glucose	108	90

2.3 PSB 与 AMK 之间的离子缔合反应及该反应体系散射增强的机理

2.3.1 离子缔合物的形成 用摩尔比法和等摩尔连续变化法测定了 AMK 与 PSB 结合成离子缔合物的组成比约为 2:1。在一定的酸性介质中，AMK 阳离子(A^{2+})与 PSB 阴离子(P^{4-})由于静电引力及疏水性作用结合成离子缔合物，反应如图 4 所示，结合成离子缔合物后分子体积及分子量均明显增大，散射强度随分子量的增大而增加。综合以上原因，使得 PSB-AMK离子缔合物的 RRS 强度显著增加。

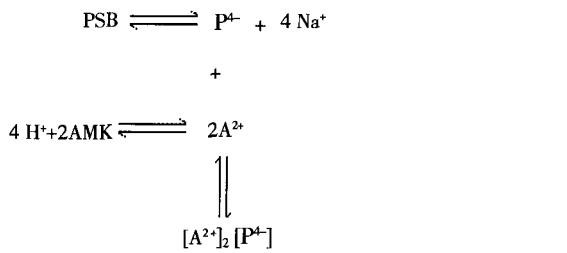


图 4 AMK 与 PSB 反应式及离子缔合物组成

2.3.2 散射增强机理的讨论 从 AMK-PSB 离子缔合物紫外－可见光(UV/VIS)吸收图谱与 RRS 光谱图的对比图(图 5) 中可以看出：AMK-PSB 的 2 个主要的吸收峰分别位于 317 nm 和 617 nm；RRS 散射峰位于分子吸收带内，其中 362 nm 及 677 nm 的散射峰与 317 nm 及 617 nm 的吸收峰相对映。这是 RRS 散射强度增强的主要原因[13]。此外，反应前，PSB 阴离子及 AMK 阳离子均具有良好的水溶性，此时散射强度十分微弱。但当离子缔合物形成后，电荷被中和，亲水性消失，离子缔合物的疏水芳基骨架与水相之间易形成疏水界面，而疏水界面的形成也有利于 RRS 强度的提高[14]。正是由于上述因素的共同影响，使反应产物的 RRS 强度显著增强。

2.4 线性范围与检出限

在上述的优化实验条件下，以 ΔI_{RRS} 对 C_{AMK} 作图，绘制标准曲线。结果表明，C_{AMK} 在 0.01 ~ 1.7 mg/L 的浓度范围内与

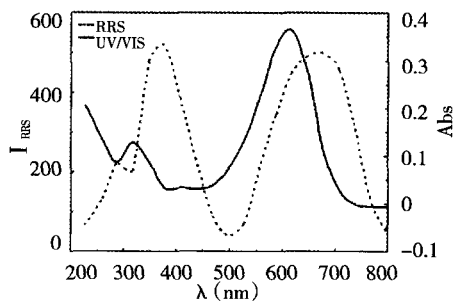


图 5 PSB-AMK 离子缔合物 UV/VIS 吸收图与 RRS 光谱图对比图

ΔI_{RRS} 呈良好的线性关系，其回归方程为 $\Delta I_{RRS} = 928.72c - 610.7$ (c：mg/L)，$r = 0.999\,4$，AMK 的检测限为 3.0 μg/L。

2.5 分析应用

将硫酸阿米卡星注射剂、注射用硫酸阿米卡星及阿米卡星洗剂，分别制备成浓度为 1.00 mg/L 的样品溶液各 5 份，进行测定，结果见表 2。不同制剂中 AMK 的平均回收率为95.69% ~ 97.43%，准确度较高；相对标准偏差 1.07% ~ 1.91%，重现性较好。

表 2 制剂中 AMK 含量的测定

样品	测定值(mg/L)	回收率(%)	精密度(n=5)
注射剂	1.05	96.31	1.44
注射用粉针剂	0.96	97.43	1.07
洗剂	1.03	95.69	1.91

2.6 结论

在 pH3.0 的 Britton-Robinson 缓冲液中，AMK 与 PSB 在静电引力及疏水性作用结合成组成比约为 2:1 的离子缔合物。该离子缔合物的 RRS 散射峰位于其分子吸收带内，最大吸收波长为 362 nm。在适宜范围内 RRS 强度随着 PSB 浓度与 BR 缓冲液的酸度的增大呈先增后减的变化趋势。除个别金属离子对测定的干扰较大外，常见的无机离子、糖类等物质在较高浓度下不影响测定。该方法简便、快速、灵敏度高，可满足不同制剂中 AMK 的质量检测。

技术与方法 文章编号:0253-3626(2011)02-0188-04

医学图像融合算法的应用与研究

张 彬[1],郑永果[1],马 芳[2],东野长磊[1]

(1. 山东科技大学信息科学与工程学院,青岛 266510;2. 山东电力中心医院内科,济南 250001)

【摘 要】目的:不同的医学影像为医生提供不同的医学信息,图像融合技术逐渐成为临床诊断和医学研究的重要手段。方法:本文采用了一种基于不可分离小波框架的图像融合算法。算法首先对已配准的医学图像进行非分离小波分解,把图像分解成低频和高频子图像,针对高频分量和低频分量不同的特点,采用不同的融合规则对其进行融合,最后进行小波逆变换,得到最终的融合图像。此外,文中引入了熵、平均梯度,融合均匀度对融合图像进行评价。结果:实验结果表明,本文算法获得的融合图像包含更丰富、更全面的细节信息,优于传统的小波变换方法。结论:采用基于不可分离小波框架的图像融合算法是一种有效的医学图像融合方法,提高了疾病诊断的准确性和正确性。

【关键词】小波变换;梅花形采样;医学图像;效果评价

【中国图书分类法分类号】TP 391.4 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-09-26

Research and application of medical image fusion algorithm

ZHANG Bin, et al

(*College of Information Science and Engineering, Shandong University of Science and Technology*)

【Abstract】*Objective*: Doctors can get different details from different medical images because of the different imaging theory of medical instruments and application, image fusion become a key means in clinic diagnose and medical research. *Methods*: This paper adopted an image fusion method based on non-separable wavelet frame transform. Firstly, having finished the registration, medical image was decomposed with non-separable wavelet decomposition, and into low and high frequency sub-image. According to the

作者介绍:张 彬(1981-),男,博士,
研究方向:医学图像融合、图形图像处理等。

基金项目:国家高技术研究与发展计划("863"计划)项目(编号:2009AA0627018);山东省教育厅计划资助项目(编号:J08LJ10);山东科技大学研究生科技创新基金项目(编号:YCA100208)。

参 考 文 献

[1] Jr.McCracken G H. Aminoglycoside toxicity in infants and children [J]. Am J Med, 1986, 80 (6): 172-178.

[2] 中华人民共和国国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 二部 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.737.

[3] 湛海鄰,胡小莉,江 虹.伊文思蓝光度法测定硫酸阿米卡星的含量[J].分析科学学报, 2004, 20 (2): 169-171.

[4] 胡小莉,安兰香,刘绍璞,等.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[J].应用化学,2009,26(5): 587-592.

[5] Sánchez-Martínez M L, Aguilar-Caballos M P, Gómez-Hens A. Selective kinetic determination of amikacin in serum using long-wavelength fluorimetry[J].J. Pharm Biomed Anal, 2004, 34(5): 1021-1027.

[6] Ramos Fernández J M, Bosque-Sendra J M, García-Campaña A M, et al.Chemiluminescence determination of amikacin based on the inhibition of the luminol reaction catalyzed by copper[J].Pharm Biomed Anal, 2005, 36(5): 969-974.

[7] 翟海云,路新卫,吴燕红,等.硫酸阿米卡星的毛细管电泳法快速测定[J].分析测试学报,2008,27 (7): 769-771.

[8] Papp E A, Knupp C A, Barbhaiya R H. High-performance liquid chromatographic assays for the quantification of amikacin in human plasma and urine[J].Chromatogr, 1992, 574(1): 93-99.

[9] Caturla M C, Cusido E, Westerlund D. Solid-phase extraction for the high-performance liquid chromatographic determination of indomethacin, suxibuzone, phenylbutazone and oxyphenbutazone in plasma, avoiding degradation of compounds[J].Chromatogr, 1992, 581(1): 101-107.

[10] 王明娟,胡昌勤,金少鸿.硫酸阿米卡星注射液及有关物质的 HPLC 法分析[J].中国抗生素杂志,2001,26 (5): 345-347.

[11] Lu W, Fernández Band B S, Yu Y, et al.Resonance light scattering and derived techniques in analytical chemistry: past, present, and future [J]. Microchim Acta, 2007, 158: 29-58.

[12] Antonov L, Gergov G, Petrov V, et al. UV-Vis spectroscopic and chemometric study on the aggregation of ionic dyes in water[J].Talanta, 1999, 49(1): 99-106.

[13] 李原芳,黄承志,胡小莉.共振光散射技术的原理及其在生化研究和分析中的应用[J].分析化学,1998,26(12): 1508-1515.

[14] 刘绍璞,蒋治良,孔 玲,等.$[HgX_2]_n$ 纳米微粒的吸收光谱、Rayleigh 散射和共振 Rayleigh 散射光谱[J].中国科学:B 辑,2002,32 (6): 554-560.

(责任编辑:张学颖)