

高灵敏共振瑞利散射技术快速检测药物中的美司那

张淑琼, 李晓彤, 彭建, 江虹^{*}(长江师范学院化学化工学院, 重庆 408100)

摘要: 目的 建立快速、准确测定药物中美司那的高灵敏共振瑞利散射(resonance Rayleigh scattering, RRS)新方法。方法 在 BR 弱碱性溶液中, 亮绿与美司那以静电作用生成的缔合物使 RRS 信号显著增强, RRS 强度在最大 RRS 峰处与美司那的浓度有线性关系。检测波长为 344 nm。结果 在 pH 7.75 BR 缓冲溶液中, 亮绿与美司那结合生成绿色二元离子缔合物, 产生以 294, 344, 468 nm 为特征峰的新 RRS 光谱。最大 RRS 峰位于 344 nm, 线性范围为 0.006~0.41 mg·L⁻¹, 检出限为 0.005 2 mg·L⁻¹。该法用于市售美司那药物中美司那的测定, 加样回收率和相对标准偏差(RSD, $n=6$)分别为 98.3%~103%和 1.6%~2.3%。结论 该法简便、快速, 有高灵敏度和高选择性, 可用于实际药物中美司那的测定。

关键词: 美司那; 亮绿; 共振瑞利散射

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)18-2211-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.18.007

引用本文: 张淑琼, 李晓彤, 彭建, 等. 高灵敏共振瑞利散射技术快速检测药物中的美司那[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(18): 2211-2214.

Rapid Detection of Mesna in Drugs by Highly Sensitive Resonance Rayleigh Scattering Technique

ZHANG Shuqiong, LI Xiaotong, PENG Jian, JIANG Hong^{*}(College of Chemistry and Chemical Engineering, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a new high sensitivity resonance Rayleigh scattering(RRS) method for the rapid and accurate determination of mesna in drugs. **METHODS** In the weakly basic solution of BR, bright green was combined with mesna by electrostatic interaction to form ionic association complex, which led to a significantly enhanced of the RRS signal. The RRS intensity had a good linear relationship with mesna concentration at the peak of the maximum RRS. The detection wavelength was 344 nm. **RESULTS** In a BR buffer solution of pH 7.75, bright green combined with mesna to form a green binary ionic association. New RRS spectra with characteristic peaks at 294, 344, 468 nm was produced. The maximum RRS peak was located at 344 nm, linear range was 0.006–0.41 mg·L⁻¹, the detection limit was 0.005 2 mg·L⁻¹. This method had been applied to determine the content of mesna in commercially available mesna drugs, with the spiked recoveries and relative standard deviations(RSD, $n=6$) were 98.3% to 103% and 1.6% to 2.3%, respectively. **CONCLUSION** The method is simple, rapid. It has high sensitivity and selectivity, and it is suggested to be applied to the determination of mesna in the actual drug.

KEYWORDS: mesna; bright green; resonance Rayleigh scattering

美司那, 化学名为 2-巯基乙磺酸钠, 是一种辅助类的肿瘤化疗药物, 临床上应用广泛。当过量使用美司那药物时, 它会产生某些不良反应, 如呕吐、腹痛、腹泻、变态反应等。为了合理用药, 尽量减轻患者痛苦, 对美司那药物含量进行研究有着一定意义。近来, 国内外对美司那的检测方法研究不多, 报道的方法中主要是 HPLC^[1-6], 也偶见电化学法^[7]、离子色谱法^[8]、拉曼散射法^[9]及分光光度法^[10-13]等的报道。这些方法各有其优缺点, 有的测定准确, 但前处理麻烦; 有的灵敏度较低, 或有较高灵敏度, 但选择性较差或条件

要求苛刻。因此有必要对美司那的高灵敏快检技术进行研究。本工作采用高灵敏的共振瑞利散射(resonance Rayleigh scattering, RRS)技术来研究药物中美司那含量的检测方法, 其实验原理为亮绿(一种三苯甲烷类的阳离子染料)与美司那(其结构中含有磺酸根离子)以静电作用相互反应生成二元离子缔合物, 使 RRS 显著增强, 并产生 1 个高散射峰和 2 个较低散射峰的新 RRS 光谱, 在最大散射峰处, RRS 增强强度(ΔI_{RRS})与美司那的质量浓度呈线性关系。本研究旨在找出产生 RRS 的最佳条件及线性范围, 以进行美司那的定量分析。

基金项目: 重庆市教委科技基金资助项目(KJ1401226)

作者简介: 张淑琼, 女, 副教授 Tel: (023)72790016 E-mail: zhangshuqiong2017@163.com *通信作者: 江虹, 女, 教授 Tel: (023)72790016 E-mail: jianghongch@163.com

1 仪器与试剂

1.1 仪器

F-2500 型荧光分光光度计($\lambda_{\text{ex}}=\lambda_{\text{em}}=220\text{ nm}$, 测定狭缝 5.0 nm , 日本日立公司); pH-3C 型精密酸度计(上海虹益仪器仪表有限公司); EL104 型电子天平(上海梅特勒托利多公司)。

1.2 试剂

亮绿(分析纯, 成都市科龙化工试剂, 批号: 201411101); 美司那对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: M225750-201501; 纯度 $\geq 98\%$)。H₃PO₄、H₃BO₃、HAc(成都化夏化学试剂有限公司/北京公司, 纯度: 99%); NaOH(分析纯, 天津市博迪化工有限公司); 样品: 市售美司那注射液(不同厂家编号为 1#和 2#, 批号分别为 MS170404, B2H1609003); 水为二次蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液和试剂溶液的配制

美司那对照品溶液: 称取适量美司那对照品(精确至 $\pm 0.0001\text{ g}$), 加少量水溶解后, 用水定容至量瓶中, 配成 $164.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 贮备液, 取贮备液稀释 100 倍配成 $1.642\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 对照品溶液, 保存于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。亮绿: $1.0\times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水溶液。H₃PO₄: $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; H₃BO₃: $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; HAc: $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; NaOH: $0.04\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。pH 3.5~9.5 BR 缓冲溶液: 取适量 H₃PO₄、H₃BO₃、HAc 及 NaOH 溶液混合, 用酸度计测定 pH 值。

2.2 供试品溶液的制备

随机抽取美司那注射液(现仅有的剂型)1#和 2#各 1 支, 将内容物置于 $1\ 000\text{ mL}$ 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀。移取此液 10.0 mL 于另一 $1\ 000\text{ mL}$ 量瓶中, 用水定容, 摇匀后即得 1#和 2#待测液。

2.3 方法

准确移取亮绿溶液 2.50 mL 、 $1.642\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 美司那对照品溶液(或已制备好的美司那待测液)0~ 2.50 mL 和 pH 7.75 BR 缓冲溶液 1.00 mL 于 10 mL 比色管中, 用水定容。5 min 后, 在荧光分光光度计上同步扫描 RRS 光谱, 在最大 RRS 波长(344 nm)处测定 I_{RRS} 及 I_0 (前者为体系的 RRS 强度, 后者为试剂空白的 RRS 强度), 最后计算 $\Delta I_{\text{RRS}}(=I_{\text{RRS}}-I_0)$ 。

2.4 工作曲线及灵敏度

按“2.3”项下方法测得美司那的线性范围为 $0.006\sim 0.41\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 线性回归方程为 $\Delta I_{\text{RRS}}=-26.62+3\ 475\rho$ (ρ : $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 相关系数 $r=0.999\ 4$, 检出限

$D=0.005\ 2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。实验表明, 该方法有很好的线性关系, 能用于美司那的定量分析。

2.5 仪器精密度试验

取 2.50 mL 亮绿溶液、 1.00 mL $1.642\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 美司那对照品溶液及 1.00 mL pH 7.75 BR 溶液于 10 mL 比色管中, 用水稀至刻度, 再平行配制 5 份溶液。按“2.3”项下方法, 5 min 后在荧光仪上扫描 RRS 光谱, 求得 344 nm 处的 RRS 强度, 最后计算得相对标准偏差为 2.0% 。由此说明该方法有较好的仪器精密度。

2.6 样品测定及回收率试验

精密移取“2.2”项下已处理的 1#和 2#供试品溶液各 0.30 mL , 按“2.3”项下方法用供试品溶液代替标液并加入其他试剂溶液, 用水定容, 5 min 后在荧光仪上测定 344 nm 处的 RRS 强度, 根据美司那的工作曲线或回归方程, 求得供试品溶液中美司那的含量及原始 1#和 2#供试品中美司那的含量, 各供试品平行测定 6 份。为了判断方法的准确度, 用高、中、低 3 种加样水平各做 6 份加样回收试验, 求出各水平的平均回收率。结果表明该方法有较高的准确度和仪器精密度, 故本方法准确、可靠, 见表 1。

表 1 美司那注射液的分析结果及回收试验($n=6$)

Tab. 1 Analytical results and recovery tests of mesna injection($n=6$)

样 品	每支标示 量/ mg	每支测得 值/ mg	已知量/ μg	加样量/ μg	平均值/ μg	回收 率/%	RSD/ %
1#	400	405	1.22	0.657	1.89	102	1.6
				1.31	2.57	103	2.3
				2.46	3.73	102	1.8
2#	400	397	1.19	0.493	1.68	99.4	2.0
				1.15	2.32	98.3	1.8
				2.13	3.29	98.6	2.1

3 讨论

3.1 反应条件

3.1.1 溶液酸度 取 1.00 mL $1.642\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 美司那对照品溶液、 2.00 mL 亮绿溶液, 考察 pH 3.5~9.5 的 BR 缓冲溶液对美司那-亮绿体系 $\Delta I_{\text{RRS}(344)}$ 的影响, 结果见图 1。图 1 表明, 体系的最适酸度为 pH 7.75, 当 pH 大于或小于该酸度, $\Delta I_{\text{RRS}(344)}$ 均有不同程度降低。当考察 pH 7.75 用量对体系 $\Delta I_{\text{RRS}(344)}$ 的影响时, 实验表明, 用量为 1.00 mL 时, 体系 $\Delta I_{\text{RRS}(344)}$ 相对最大, 灵敏度最高。实验选用 1.00 mL pH 7.75 BR 缓冲溶液来控制溶液的酸度。

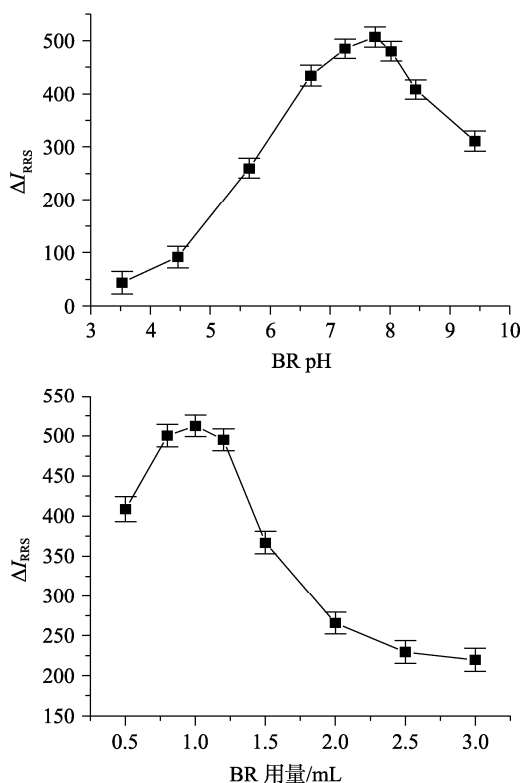


图1 缓冲溶液酸度及用量对 ΔI_{RRS} 的影响

Fig. 1 Effect of acidity and dosage of buffer solution on ΔI_{RRS}

3.1.2 亮绿溶液浓度 取 1.00 mL $1.642 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 美司那对照品溶液、1.00 mL pH 7.75 BR 缓冲溶液, 考察 0.5~4.0 mL 亮绿溶液对美司那-亮绿体系 $\Delta I_{RRS(344)}$ 的影响, 结果见图 2。从图 2 可知, 亮绿溶液适宜用量为 2.2~2.8 mL (即亮绿浓度为 $2.2 \times 10^{-5} \sim 2.8 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 此条件下, 体系的 $\Delta I_{RRS(344)}$ 相对较大, 灵敏度较高, 实验用 $2.50 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亮绿溶液。

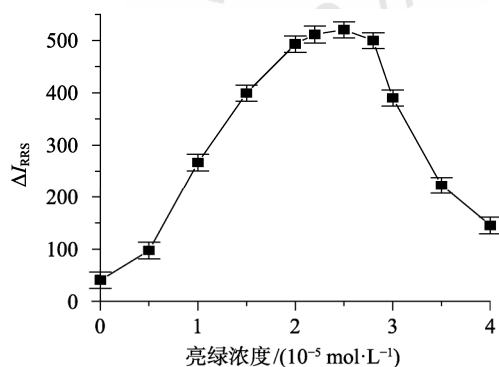


图2 亮绿浓度对 ΔI_{RRS} 的影响

Fig. 2 Effects of concentration of bright green on ΔI_{RRS}

3.1.3 试剂加入顺序 取 1.00 mL $1.642 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 美司那对照品溶液、2.50 mL 亮绿溶液及 1.00 mL pH

7.75 BR 缓冲溶液, 考察它们的加入顺序对美司那-亮绿体系 $\Delta I_{RRS(344)}$ 的影响。实验表明, 它们的加入顺序为亮绿溶液、美司那溶液、BR 溶液时, 体系的 $\Delta I_{RRS(344)} = 520$, 相对于其他顺序, 该顺序的 $\Delta I_{RRS(344)}$ 是最大的, 其灵敏度也是最高的。故实验用最佳试剂加入顺序进行各项试验。

3.1.4 反应时间及稳定性 在上述选定的各项最佳条件下, 考察了美司那与亮绿的反应在 5~120 min 内对体系 $\Delta I_{RRS(344)}$ 的影响, 结果见图 3。曲线表明, 美司那与亮绿从开始至反应 5 min 时, $\Delta I_{RRS(344)}-t$ 曲线为一斜线, 说明二者间的反应尚未完全; 反应在 5~120 min, 随着反应时间的增加, $\Delta I_{RRS(344)}$ 变化不大, 说明 5 min 后反应已进行完全, 生成的缔合物的稳定时间 $\geq 1 \text{ h}$ 。实验选在 5 min 后的 1 h 内进行测定。

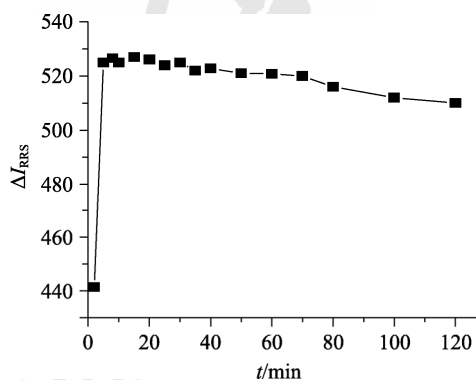


图3 反应时间对 ΔI_{RRS} 的影响

Fig. 3 Effect of reaction time on ΔI_{RRS}

3.2 体系的 RRS 光谱特征

亮绿与美司那的特征光谱见图 4。图中曲线表明, 在 220~700 nm, 美司那溶液几乎无散射信号, 亮绿溶液的散射信号也很微弱, 只有在亮绿溶液中加入 pH 7.75 BR 溶液后, 亮绿的弱碱性溶液散射信号有显著增强, 最大 RRS 峰位于 344 nm ($I_{RRS} = 5178$), 在其附近的 294 nm 和 468 nm 处分别有相对较弱的 RRS 峰 [$I_{RRS(294)} = 2115$ 和 $I_{RRS(468)} = 2415$]。若在亮绿的弱碱性溶液中加入不同用量的 $1.642 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 美司那对照品溶液, 则在 294, 344, 468 nm 处, RRS 强度有不同程度的增强, 但只有在最大散射峰 344 nm 处, 亮绿与美司那反应生成的新物质(离子缔合物)的 $\Delta I_{RRS(344)}$ 与一定浓度范围内的美司那的质量浓度间有很好的线性关系。故选择 344 nm 作为测定波长, 该法可用于美司那的定量分析。

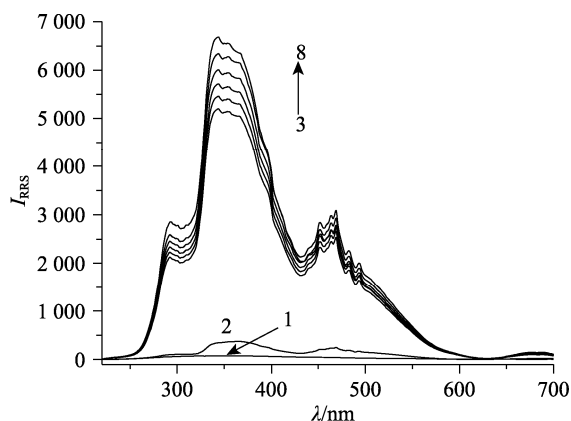


图4 美司那与亮绿的RRS光谱

1-美司那($0.164 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); 2-亮绿($2.50 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 3~8-美司那($0.0, 0.082, 0.164, 0.246, 0.328, 0.411 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)-亮绿($2.50 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), pH 7.75。

Fig. 4 RRS spectra of mesna and bright green

1-mesna($0.164 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); 2-bright green($2.50 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 3~8-mesna ($0.0, 0.082, 0.164, 0.246, 0.328, 0.411 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)-bright green($2.50 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), pH 7.75.

3.3 方法的选择性

在前述最优条件下,考察了相对误差 $\leq \pm 5\%$ 时,常见无机阴、阳离子及有机物对测定美司那($0.164 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的影响。实验显示,300倍的 Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、 Sr^{2+} 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、 NO_3^- 、麦芽糖、葡萄糖、L-丙氨酸、L-白氨酸、L-色氨酸、柠檬酸三钠,100倍的 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Sn^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cl^- 、 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 、蔗糖、L-亮氨酸、L-组氨酸、L-赖氨酸、L-谷氨酸、甘氨酸,50倍的 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 I^- 、 SO_4^{2-} 、L-异亮氨酸、尿素、阿莫西林、利福平、卡马西平等不干扰美司那的测定。由此可知,本方法有高的选择性。

3.4 结论

利用美司那与亮绿的静电相吸作用建立的测定美司那的RRS法具有高的灵敏度(检出限为 $0.0052 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和选择性,较高的准确度(回收率为 $98.3\% \sim 103\%$)和仪器精密性(RSD为 $1.6\% \sim 2.3\%$),方法简便、快速。本法适于药物中美司那的定量测定。

REFERENCES

- [1] LI H, CHEN M, WU W C, et al. Determination of components of mesna injections by HPLC [J]. Anhui Med Pharm J(安徽医药), 2012, 16(6): 757-759.
- [2] SHANMUGARAJAH D, DING D Y, HUANG Q, et al. Analysis of BNP7787 thiol-disulfide exchange reactions in phosphate buffer and human plasma using microscale electrochemical high performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr B, 2009, 877(10): 857-866.
- [3] KUŚMIEREK K, CHWATKO G, GŁOWACKI R, et al. Determination of endogenous thiols and thiol drugs in urine by HPLC with ultraviolet detection [J]. J Chromatogr B, 2009, 877(28): 3300-3308.
- [4] VERSCHRAAGEN M, ZWIERS T H U, TORUN E, et al. Simultaneous determination of BNP7787 and its metabolite mesna in plasma and tissue by micro-HPLC with a dual electrochemical detector [J]. J Pharm Sci, 2003, 92(5): 1040-1050.
- [5] GŁOWACKI R, GRYGLIK D, KUŚMIEREK K, et al. Urinary mesna and total mesna measurement by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection [J]. Talanta, 2005, 66(3): 534-539.
- [6] VERSCHRAAGEN M, BOSMA M, ZWIERS T H U, et al. Quantification of mesna and total mesna in kidney tissue by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. J Chromatogr B, 2003, 783(1): 33-42.
- [7] FURMANIAK P, KUBALCZYK P, STACHNIUK J, et al. Novel MEKC method for determination of sodium 2-mercaptoethanesulfonate in human plasma with in-capillary derivatization and UV detection [J]. J Chromatogr B, 2016(1027): 88-95.
- [8] YANG L M, PENG Y Z, SUN J, et al. Determination of sodium 2-mercaptoethanesulfonate in mesna injection by using ion chromatography [J]. Exp Technol Manag(实验技术与管理), 2015, 32(6): 59-60, 68.
- [9] ZHENG X, CHEN Y H, BI N, et al. Determination of the sodium 2-mercaptoethanesulfonate based on surface-enhanced Raman scattering [J]. Spectrochimica Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc, 2011, 81(1): 578-582.
- [10] ZHANG J M, ZHANG C, WANG P, et al. Screening of antitumor active fraction extracted from roots of actinidia eriantha *in vitro* and determination of total triterpenoids [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(10): 1232-1235.
- [11] WU Y, YAN D M, TU L L, et al. Catalytic spectrophotometric determination of trace cisplatin injection by tribromochlorophosphonazo [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(6): 558-560.
- [12] LI Q, MA W X. Indirect photometric method for determination of sodium 2-sulfanyethanesulfonate in pharmaceuticals with diazo-coupling reaction [J]. Chin J Anal Lab(分析实验室), 2017, 36(5): 589-592.
- [13] SANDEEP K V, KULESHWAR P, KUMUDINI C, et al. Surface plasmon resonance based spectrophotometric determination of medicinally important thiol compounds using unmodified silver nanoparticles [J]. Spectrochim Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc, 2017(179): 155-162.

收稿日期: 2019-11-30

(本文责编: 李艳芳)