

氧氟沙星的毛细管气相色谱测定及其应用

许庆琴^{1,2}, 姚如心¹, 双少敏², 杜黎明^{*1}, 黄辉胜¹, 郭志昊¹

(1. 山西师范大学分析测试中心, 山西临汾 041004;

2. 山西大学化学与化工学院, 太原 030006)

摘要:采用 $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ 为衍生化试剂, 壬烷作内标, 建立了氧氟沙星的气相色谱分析法。氧氟沙星在其质量浓度为 1.0~250.0 mg/L 时, 药物与内标物峰面积比和药物浓度呈良好的线性关系, 其相关系数为 0.9988, 检出限为 10 $\mu\text{g/L}$ 。该法已成功用于药物制剂与体液中氧氟沙星含量的测定。

关键词:衍生化气相色谱法; 三氟化硼; 氧氟沙星; 尿; 血浆

中图分类号: O657.7⁺1

文献标识码: A

氧氟沙星(Ofloxacin, OFLX)属于第三代喹诺酮类药物, 为 DNA 螺旋酶抑制剂, 具有抗菌谱广、生物利用度好、毒副作用小等优点而广泛应用于临床。该药通过肾脏排泄, 大部分以原形由尿液中排出, 因此测定体液中的 OFLX 在临床和药代动力学研究方面是十分必要的。目前体液中氧氟沙星的测定主要有紫外分光光度法^[1]、荧光分光光度法^[2]、高效液相色谱法^[3]、流动注射法^[4]和毛细管电泳法^[5]等, 尚未见有关测定 OFLX 的气相色谱法报道。

本文以 $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ 为衍生化试剂, 壬烷作内标, 对氧氟沙星的衍生化气相色谱法进行了研究。结果表明, OFLX 质量浓度为 1.0~250.0 mg/L 时, 药物与内标物的峰面积比与药物浓度呈良好的线性关系, 据此建立了一种药物制剂和体液中氧氟沙星的气相色谱分析方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HP 5890 II 型气相色谱仪(美国, 惠普公司), 氢火焰离子化检测器(FID), HP 化学工作站; UV-2201 型紫外可见分光光度计(日本, 岛津公司); FTIR 410 型傅立叶变换红外光谱仪(美国, NICOLET 公司)。

氧氟沙星标准溶液: 称取氧氟沙星标准品(质量分数为 99.5%, 中国药品生物制品检定所), 用甲醇配制成 100 mg/L 的标准储备液, 使用时稀释至所需浓度; 壬烷(色谱纯): 用甲醇配制成 100 mg/L 的内标储备液, 使用时稀释至所需浓度; 衍生化试剂: 47.7% 的三氟化硼乙醚溶液配成 14% 的甲醇溶液; 甲醇、氯化钠和正己烷均为分析纯。

1.2 色谱条件

HP-FFAP 石英毛细管柱(25 m $\times$ 0.20 mm i. d. $\times$ 0.33 μm); 载气(N_2) 流速 2.0 mL/min, 柱温 140 $^\circ\text{C}$; 进样口温度 250 $^\circ\text{C}$; 检测器温度 250 $^\circ\text{C}$; 分流比 100:1, 进样量 1 μL ; 内标法定量。

1.3 实验方法

准确吸取 0.5 mL 一定浓度的氧氟沙星标液于 5 mL 具塞试管中, 加入 0.5 mL 14% $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ 溶液和 1 mL 100 mg/L 内标溶液, 摇匀, 在 80 $^\circ\text{C}$ 水浴中酯化 30 min 后, 取出置于冰水中冷至室温, 再加入 1 mL 正己烷和 1 mL 饱和氯化钠溶液, 超声振荡萃取 2 min, 直接取上层清液 1 μL 进行 GC 分析。

收稿日期: 2006-03-23

修回日期: 2006-04-29

基金项目: 山西省自然科学基金(No. 20041030)

通讯联系人: 杜黎明, 男, 教授, 从事药物分析研究。

2 结果与讨论

2.1 色谱柱的选择

对 HP-1、HP-1701、HP-20M 和 HP-FFAP 等不同极性的色谱柱进行考察,发现 OFL X 衍生物在非极性和中等极性柱上的响应值不高,峰形拖尾;而在极性柱上尤其在 TPA 改性聚乙二醇为固定相的 HP-FFAP 极性毛细管色谱柱上出峰速度快、分离度好、峰形对称无拖尾。故本实验选用 HP-FFAP(25 m × 0.20 mm i. d. × 0.33 μm)毛细管色谱柱为分离柱。不同试样的分离效果见图 1。

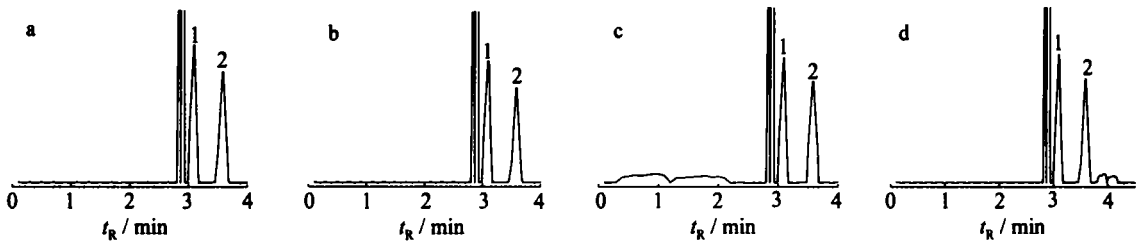


Fig. 1 Chromatograms of OFL X standard (a) , tablet sample (b) , urine sample (c) and plasma sample(d)
1. n-nonance(internal standard); 2. OFL X derivation.

2.2 衍生化反应条件的选择

采用不同的方法对氧氟沙星进行衍生化处理。实验发现,以六甲基二硅胺烷法制备衍生物后,反应体系处于均相状态,便于直接进行气相色谱分析,但硅烷化衍生物易于水解,需在无水条件下操作,难于控制;硫酸-甲醇法操作简便、转化率高,但酯化时间冗长;而三氟化硼-甲醇法反应速度快、酯化产率高。故本实验选择三氟化硼-甲醇作衍生化试剂。

研究了温度、时间和三氟化硼用量对酯化反应的影响。结果表明,酯化反应温度过低时反应不完全;过高时产物易分解。其它条件不变,三氟化硼浓度过低时,所需衍生化试剂的量增加,反应时间延长;三氟化硼浓度过高时,会使衍生化后的反应体系酸性增强,柱效降低;而三氟化硼在 12 %~16 %范围内不仅催化效果好、色谱响应值高且反应后混合液几乎为中性。本实验选择 14 %三氟化硼-甲醇溶液与氧氟沙星(体积比 1 : 1)在 80 °C加热 30 min 为最佳衍生化反应条件。

用不同溶剂对氧氟沙星衍生物的萃取效率进行了比较,实验表明,正己烷分层速度快、萃取效果好,故本实验选正己烷作萃取溶剂。为提高萃取效率,在酯化体系中加入饱和氯化钠溶液,不仅使氧氟沙星衍生物的色谱响应值显著提高,而且使上层液由酸性转变成中性,有利于延长色谱柱的寿命。

2.3 衍生化产物的红外光谱表征

将酯化产物的正己烷溶液用氮气吹干,采用 KBr 压片法制样,直接放入傅立叶变换红外光谱仪中测定。对氧氟沙星酯化产物进行傅立叶红外光谱分析。从红外光谱图可以看出,在 1 740 cm⁻¹处有一强的酯羰基(—COOR)吸收峰,在 1 212 cm⁻¹和 1 171 cm⁻¹为 ν (C = O) 和 ν_{as} (C = O) 伸缩振动吸收峰;而 3 150 cm⁻¹处的羧羟基吸收峰完全消失,表明生成了酯化产物。

2.4 线性关系与检出限

分别取 1.0~250.0 mg/L 氧氟沙星系列标准溶液各 0.5 mL,按实验方法处理,在选定的色谱条件下分析,以氧氟沙星/内标物浓度比(c_i/c_s)为横坐标 X、相应峰面积比(A_i/A_s)为纵坐标 Y,进行线性回归,得到的线性回归方程及相关参数列于表 1。

取 0.5 mL 空白尿或空白血浆,分别加入不同体积的氧氟沙星浓度系列标准溶液,使其质量浓度分别为 1,2,6,8,10,20 mg/L,加入 0.5 mL 14 %BF₃-CH₃OH 溶液和 1 mL 10 mg/L 内标溶液,按实验方法进行操作,色谱分析前需离心 5 min(2 000 r/ min)取上清液分析,实验结果见表 1。

2.5 样品分析及回收率试验

2.5.1 药物测定 取 10 枚 OFL X 药片,准确称取其总重 1/10(相当于含有 OFL X 约 100 mg)的药粉用甲醇定容至 100 mL 容量瓶中,待药物充分溶解后过滤除去不溶物,弃去 10 mL 前滤液,取 10 mL 后续液用甲醇适量稀释。取 0.5 mL 样品溶液按上述方法进行处理,其色谱图见图 1b。为了验证方法的有效性,

Table 1 Regression equations and related parameters for OFL X

Sample solution	Regression equation	<i>r</i>	Linear range (mg/L)	Detection limit (μg/L)
Standard	$Y = 15.5740 X + 0.5957$	0.9993	1.0~250.0	10
Urine	$Y = 0.6310 X - 1.3650$	0.9988	1.0~20.0	10
Plasma	$Y = 0.1819 X + 0.3376$	0.9997	1.0 ~ 20.0	10

采用标准加入法做回收率实验,平行测定 5 次,其测定结果见表 2。经 *t* 和 *F* 检验,本方法与文献^[1]方法不存在显著性差异(*P* > 0.05 时),这表明两者间有相似的精密度和准确度。

Table 2 Determination of OFL X (% of quantity specified, n = 5)

Sample No.	GC method				Reference method
	Content (%)	Recovery (%)	RSD (%) Inter-day	RSD (%) Intra-day	Content (%)
0412122	97.76 (<i>t</i> ,2.57; <i>F</i> ,4.65)	102.03	1.39	2.31	97.61
0407021	98.35 (<i>t</i> ,2.66; <i>F</i> ,3.37)	98.54	2.17	2.56	98.15
B050209-01	97.68 (<i>t</i> ,2.45; <i>F</i> ,5.12)	99.02	1.54	2.78	99.13

2.5.2 尿样测定 5 名健康志愿者单剂量口服氧氟沙星药片 300 mg 后,于不同时间取尿样,取 0.5 mL 尿样按上述方法处理,图 1c 表明尿中内源性物质不干扰 OFL X 衍生物的测定,将测定结果代入线性方程计算其尿药浓度,其平均尿药浓度-时间曲线见图 2。分别取 1 h、2 h 和 4 h 尿样 0.25 mL,加入相应浓度的氧氟沙星标准溶液 0.25 mL,按实验方法进行衍生化和色谱测定,平行测定 5 次,将所测定的峰面积比值 (*A_i*/*A_s*) 代入线性回归方程,计算回收率和精密度,结果见表 3。

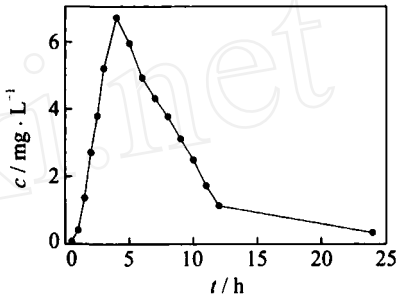


Fig. 2 Mean urine concentration-time curve of OFL X in 5 healthy volunteers after oral administration of OFL X

2.5.3 血浆测定 分别于 0.5 mL 空白血浆中加入不同浓度的氧氟沙星标准溶液 0.5 mL,得到氧氟沙星含量为 0.5、3 和 5 mg/L 的血浆样品,按上述方法测定,所加试剂中的甲醇就可沉淀蛋白,离心,用正己烷萃取,样品处理简单。图 1d 表明血浆中物质与氧氟沙星衍生物完全分离,不干扰其测定。计算回收率和精密度,结果见表 3。

Table 3 Recovery and precision of OFL X in urine and plasma (n = 5)

Sample		Background (mg/L)	Added (mg/L)	Found (mg/L)	Recovery (%)	Intra day RSD (%)	Inter day RSD (%)
Urine	1 h	0.411	0.5	0.894	98.13	1.87	2.91
	2 h	2.712	2.5	5.280	101.30	2.02	3.16
	4 h	6.721	6.5	12.930	97.80	2.31	3.08
Plasma	-	-	0.5	0.486	97.20	2.12	2.75
	-	-	5.0	2.907	96.91	1.75	3.06
	-	-	5.0	4.934	98.67	1.98	3.14

参考文献:

[1] Sastry C S P, Rao K R, Prasad D S. Talanta[J], 1995, 42(3) :311.
[2] Du L M, Yang Y Q, Wang Q M. Anal. Chim. Acta[J], 2004, 516(1-2) :237.
[3] Chandra I, A. K. Hemanth K. J. Chromatogr. B[J], 2001, 760(1) :91.
[4] Soledad G M, Isabel A M, Concepci n S P, Mustafa S A. Eur J. Pharm. Biopharm. [J], 2005, 61(1-2) :87.
[5] Lin F M, Kou H S, Wu S M, Chen S H, Wu H L. Anal. Chim. Acta[J], 2004, 523(1) :9.

Determination of Ofloxacin by Capillary Gas Chromatography and Its Application

XU Qing-qin^{1,2}, YAO Ru-xin¹, SHUANG Shao-min², DU Li-ming^{*1},
HUANG Hui-sheng¹, GUO Zhi-hao¹
(1. Center of Analysis and Testing, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041004;
2. Department of chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract : A new method has been developed for the determination of ofloxacin in pharmaceutical dosage forms and human fluid samples by derivatization gas chromatography. Ofloxacin was esterified by means of BF₃·CH₃OH and analyzed by GC-FID with HP-FFAP capillary column (25 m ×0.20 mm ×0.33 μm). The calibration curve had good linearity in the range of 1.0 ~ 250.0 mg/L. The correlation coefficient was 0.9988 and the detection limit was 10 μg/L for OFLX. The method has been successfully applied to the determination of OFLX in medicament and human fluid samples.

Keywords : Gas chromatography; Derivatization; Boron trifluoride; Ofloxacin (OFLX); Urine; Plasma

中国分析测试协会培训中心 2007 年上半年培训计划

为提高广大仪器分析工作者的仪器使用水平和应用水平,并且为大家提供高质量的培训服务,中国分析测试协会联合中国分析仪器学会和仪器信息网于 2006 年 12 月正式成立“仪器培训中心”。培训中心的主要工作是举办技术交流活动、培训班和企事业单位的内训等。培训中心的所有课程和通知都将预先公布在仪器信息网培训栏目 (<http://www.instrument.com.cn/training>) 和中国分析测试协会网站 (<http://www.caia.org.cn>) 上,请大家随时关注。

培训中心 2007 年上半年培训计划如下表所示:

课程名称	授课老师	开班日期	地点
仪器分析的样品前处理与数据处理(第一期)	邓勃、汪正范、闫军等	4 月 10 日 - 13 日	北京
实验室管理(第一期)	邓勃、王庚辰、汪正范等	5 月 22 - 25 日	北京
气相色谱(第一期)	傅若农、刘虎威、庞增义、杨永坛等	4 月 17 - 20 日	北京
液相色谱(第一期)	刘国詮、于世林、刘虎威、汪正范等	5 月 15 - 18 日	北京
原子吸收光谱(第一期)	邓勃、郑永章、高介平、章诒学等	6 月 5 - 8 日	北京
红外光谱(第一期)	徐振华、孙素琴、翁诗甫等	6 月 19 - 22 日	北京

中国分析测试协会培训中心联系人:杨老师 电话:010-51654077-8015 email:training@instrument.com.cn

(仪器信息网供稿)