

拉曼光谱快速检测盐酸左氧氟沙星注射液*

陈斌¹, 张少敏¹, 余岳林¹, 陈桂良², 乐健², 张予敏³

(1. 上海市闸北食品药品检验所, 上海 200435; 2. 上海市食品药品检验所, 上海 201203;
3. 上海市食品药品监督管理局, 上海 200010)

摘要 目的: 建立一种运用拉曼光谱技术快速鉴别、检查和测定盐酸左氧氟沙星注射液的方法。方法: 以氧氟沙星、左氧氟沙星、盐酸左氧氟沙星以及盐酸左氧氟沙星注射液为研究对象, 运用拉曼光谱技术对盐酸左氧氟沙星注射液进行快速鉴别、检查和含量测定。结果: 拉曼光谱法可以鉴别出氧氟沙星消旋体和左氧氟沙星, 辨别出不同 pH 的左氧氟沙星注射液的图谱差异并可用于盐酸左氧氟沙星注射液的含量测定。结论: 本方法操作简便、快速无损, 可成为注射剂快速检测的分析方法。

关键词: 拉曼光谱; 快速检测; 左氧氟沙星; 氧氟沙星; 消旋体; 鉴别

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)09-1715-05

Rapid Raman spectra identification and determination of levofloxacin hydrochloride injection*

CHEN Bin¹, ZHANG Shao-min¹, YU Yue-lin¹,
CHEN Gui-liang², LE Jian², ZHANG Yu-min³

(1. Shanghai Zhabei Institute for Food and Drug Control, Shanghai 200435, China; 2. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China; 3. Shanghai Municipality Food and Drug Administration, Shanghai 200010, China)

Abstract Objective: To develop a method for the rapid identification, test and determination of levofloxacin hydrochloride injection using Raman spectra. **Method:** Raman spectra was used as the method of identifying, testing and determination the levofloxacin hydrochloride injection. **Results:** The result showed that the method of Raman spectra can identify the different of floxacin (despinner), levofloxacin and levofloxacin hydrochloride, test pH of levofloxacin hydrochloride injection, determinate the levofloxacin hydrochloride injection. **Conclusion:** Owing to its fast and nondestructive properties, the presented method can be developed as an analysis method for injection.

Key words: Raman spectra; rapid identification and determination; levofloxacin; ofloxacin; despinner; identification

拉曼光谱是一种散射光谱, 对与入射光频率不同的散射光谱进行分析以得到分子振动、转动方面信息, 并应用于分子结构研究的一种分析方法。拉曼光谱相对于红外光谱具有独特的优势, 由于水的拉曼散射很微弱, 所以拉曼光谱是研究水溶液中的生物样品和化学化合物的理想工具^[1]。拉曼光谱峰清晰尖锐, 更适合定量研究、数据库搜索, 以及运用差异分析进行定性研究。在化学结构分析中, 独立的拉曼区间的强度可以和功能集团的数量相关。拉曼光谱可以做到无损检测, 此外, 拉曼显微镜

物镜还可将激光束进一步聚焦至 20 μm 甚至更小, 可分析更小面积的样品。正因为拉曼光谱有以上特点, 拉曼光谱在食品药品安全控制上可以在定性和含量测定方面加以充分利用^[2-10]。首先是定性鉴别, 拉曼光谱可提供有关样品分子中存在何种功能团的结构信息, 所以可用于鉴别试验和结构解析。拉曼光谱与红外吸收光谱相似, 由于功能团或化学键的拉曼位移与它们在红外光谱中的吸收波数相一致, 所以谱图的解析也与红外吸收光谱相同。其次是含量测定, 拉曼谱带的强度与待测物浓度的关系

* 上海市食品药品监督管理局十二五规划子课题(编号: 2011JY1-5)
第一作者 Tel: (021) 66836106; E-mail: chenbin_zb@smda.gov.cn

遵守比尔定律。本研究应用拉曼光谱研究了左氧氟沙星的拉曼光谱特性,拉曼光谱可以鉴别出氧氟沙星(消旋体)、左氧氟沙星和盐酸左氧氟沙星三者光学异构体(左氧氟沙星和氧氟沙星的分子结构式见图1),并利用拉曼光谱的符合比尔定律特对盐酸左氧氟沙星注射液进行了含量测定研究,结果拉曼光谱可快速、简单地对盐酸左氧氟沙星注射液进行鉴别、检查和含量测定,符合快速检测要求。

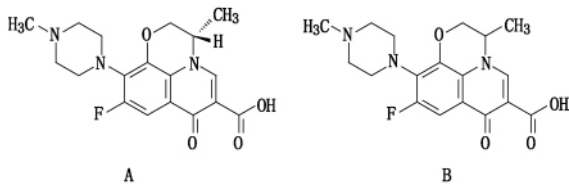


图1 左氧氟沙星(A)和氧氟沙星(B)的分子结构式
Fig 1 Structural formula of levofloxacin(A) and ofloxacin(B)

1 仪器与试剂

Thermo Nicolet DXR 激光显微拉曼光谱仪(赛默飞世尔,美国),OMNIC 仪器控制软件 and 数据处理软件; Agilent 1100 高效液相色谱仪(安捷伦,美国); 氧氟沙星对照品(中国药品生物制品检定所,批号 130454-200403),左氧氟沙星原料(上海三维制药厂,批号 1000310)、盐酸左氧氟沙星原料(上海京新药业,批号 DK20-1003273)和盐酸左氧氟沙星注射液(上海和丰制药有限公司;批号 100601,101001,101002),盐酸(国药集团化学试剂有限公司,批号 10011018),水为重蒸水。

2 实验方法与结果

2.1 鉴别 取氧氟沙星对照品、左氧氟沙星原料、盐酸左氧氟沙星原料粉末少许置于拉曼光谱仪样品池中进行光谱测定,得到各自的拉曼光谱图,见图2。

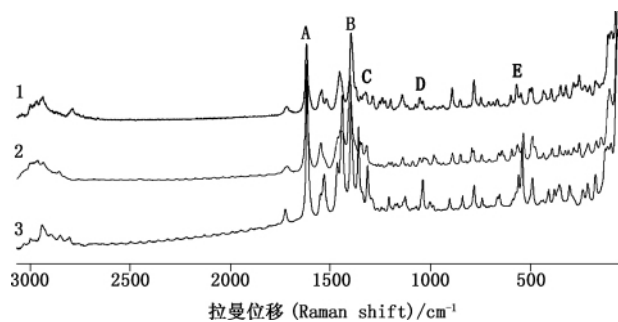


图2 拉曼光谱图(A: 1620 cm⁻¹附近; B: 1400 cm⁻¹附近)
Fig 2 Raman spectra(A: near about 1620 cm⁻¹; B: near about 1400 cm⁻¹)

1. 左氧氟沙星(levofloxacin) 2. 盐酸左氧氟沙星(levofloxacin hydrochloride) 3. 氧氟沙星(ofloxacin)

2.2 检查 称取盐酸左氧氟沙星原料适量,以水

配成浓度约为 70 mg · mL⁻¹的水溶液,用盐酸分别调成 pH 1.52、pH 3.41、pH 4.87、pH 5.18、pH 6.05、pH 7.05、pH 7.68、pH 9.08、pH 10.29、pH 11.48 的水溶液,将这些溶液置于拉曼光谱仪的样品池中进行拉曼光谱测定,所得图谱见图3、图4。

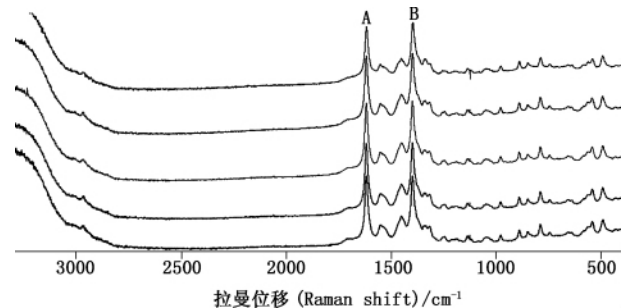


图3 pH 1.52~6.05的拉曼光谱图(从下往上分别为 pH 1.52、pH 3.41、pH 4.87、pH 5.18、pH 6.05; A: 1620 cm⁻¹附近; B: 1400 cm⁻¹附近)

Fig 3 Raman spectra of pH 1.52-6.05 (from down to up: pH 1.52, pH 3.41, pH 4.87, pH 5.18, pH 6.05; A: near about 1620 cm⁻¹; B: near about 1400 cm⁻¹)

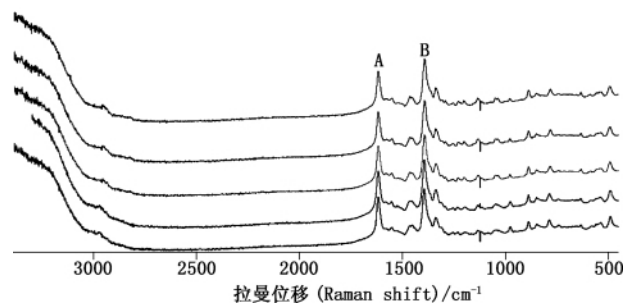


图4 pH 7.05~11.48的拉曼光谱图(从下往上分别为 pH 7.05、pH 7.68、pH 9.08、pH 10.29、pH 11.48; A: 1620 cm⁻¹附近; B: 1400 cm⁻¹附近)

Fig 4 Raman spectra of pH 7.05-11.48 (from down to up: pH 7.05, pH 7.68, pH 9.08, pH 10.29, pH 11.48; A: near about 1620 cm⁻¹; B: near about 1400 cm⁻¹)

2.3 含量测定

2.3.1 线性关系考察 精密称取盐酸左氧氟沙星原料适量,分别以水配成浓度为 31.92, 53.20, 85.10, 106.4, 212.5 mg · mL⁻¹的溶液,将这些溶液置于拉曼光谱仪的样品池中进行拉曼光谱测定,所得的数据用 TQ 软件进行定量分析,回归系数为 0.9997,表明盐酸左氧氟沙星浓度在 32.92 ~ 212.50 mg · mL⁻¹范围内与峰面积呈良好线性关系。

2.3.2 检出限 取一定浓度的盐酸左氧氟沙星溶液,置于样品池中进行测定,信噪比 3:1 时,浓度为 3.20 mg · mL⁻¹。

2.3.3 定量限 取一定浓度的盐酸左氧氟沙星溶液,置于样品池中进行测定,信噪比 10:1 时,浓度为

10.60 mg · mL⁻¹。

2.3.4 精密度试验 取 0.1064 g · L⁻¹ 的盐酸左氧氟沙星溶液,连续测定 6 次,测得的平均浓度为 101.30 mg · mL⁻¹,计算 RSD 为 0.98%。

2.3.5 重复性试验 将盐酸左氧氟沙星注射液(上海和丰制药有限公司,批号 100601)样品溶液连续测定 6 次,测得的平均浓度为 107.20 mg · mL⁻¹,RSD 为 1.3%。

2.3.6 加样回收试验 精密量取盐酸左氧氟沙星注射液(上海和丰制药有限公司,批号 100601)样品 5 mL 于试管中,精密称取盐酸左氧氟沙星原料 100 mg 于试管中,超声溶解,溶解后将溶液置于拉曼光谱仪样品池中进行拉曼光谱测定,测得回收率为 98.7%,RSD 为 2.6%(n=5)。

2.3.7 样品测定 将盐酸左氧氟沙星注射液 3 个批次(上海和丰制药有限公司,批号 100601,101001,101002)样品置于拉曼光谱仪样品池中进行拉曼光谱测定,测得的浓度分别为 109.50,98.70,103.60 mg · mL⁻¹。

2.3.8 高效液相色谱法验证 将同一批号(上海和丰制药有限公司,批号 100601)的样品按照盐酸左氧氟沙星注射液的法定标准方法进行含量测定,结果为 102.30 mg · mL⁻¹,并进行 t 检验,结果和拉曼光谱法测定的结果无显著性差异。

3 讨论

3.1 根据采集的拉曼光谱,表 1 列出了盐酸左氧氟沙星、左氧氟沙星和氧氟沙星的拉曼光谱主要位移峰频率及归属^[11,12]。

表 1 氧氟沙星、左氧氟沙星和盐酸左氧氟沙星的拉曼光谱主要位移频率 (cm⁻¹) 及其归属

Tab 1 Raman frequencies of ofloxacin, levofloxacin and levofloxacin hydrochloride

氧氟沙星(消旋体)(ofloxacin)	左氧氟沙星(levofloxacin)	盐酸左氧氟沙星(levofloxacin hydrochloride)	归属(assignment)
2999 m[宽峰(broad)]	3000 vw[宽峰(broad)]	—	$\nu_{CH_3} + \nu_{CH_2}$
2985 m[宽峰(broad)]	—	2962 m[宽峰(broad)]	$\nu_{CH_3} + \nu_{CH_2}$
2968 m[宽峰(broad)]	—	—	$\nu_{CH_3} + \nu_{CH_2}$
2949 m[宽峰(broad)]	2937 vw[宽峰(broad)]	—	$\nu_{CH_3} + \nu_{CH_2}$
2934 m[宽峰(broad)]	—	2934 m[宽峰(broad)]	$\nu_{CH_3} + \nu_{CH_2}$
—	2893 vw[宽峰(broad)]	—	$\nu_{CH_3} + \nu_{CH_2}$
2785 m[宽峰(broad)]	2803 vw[宽峰(broad)]	2856 m[宽峰(broad)]	ν_{CH}
1719 w	1728 w	1719 w	$\nu_{C=O(-OH)}$
1623 s	1616 s	1621 s	$\nu_{C=O}$
1547 sm	1551 m	1547 m	$\nu_{C=C[芳环(aromatic)]}$
1519 m	1536 m	—	$\nu_{C=C[芳环(aromatic)]}$
—	1469 m	1467 m	$\delta_{CH} + \delta_{CH_2} + \delta_{CH_3} + \nu$
1455 m	—	1451 m	$\delta_{CH} + \delta_{CH_2} + \delta_{CH_3} + \nu$
—	1442 m	1438 s	$\delta_{CH} + \delta_{CH_2} + \delta_{CH_3} + \nu$
1399 s	1401 s	1401 s	δ_{OH}
1355 w	1359 m	1352 m[分叉(biforked)]	$\delta_{CH} + \delta_{CH_2} + \delta_{CH_3}$
—	—	1342	$\delta_{CH} + \delta_{CH_2} + \delta_{CH_3}$
1325 w	1313 m	1319 w	ν_{C-N}
1287 w	1296 w	—	$\delta_{CH} + \delta_{CH_2} + \delta_{CH_3} + \nu$
1257 w	—	—	$\delta_{CH} + \delta_{CH_2} + \delta_{CH_3} + \nu$
1236 w	—	—	ν_{C-O}
1227 w	—	—	ν_{C-O}
—	1208 w	1206 w	ν_{C-O}
1199 w	—	1191 w	ν_{C-O}
—	1172 w	—	ν_{C-N}
—	1162 w	—	ν_{C-N}
1145 w	—	1141 w	ν_{C-N}

续表 1

氧氟沙星(消旋体) (ofloxacin)	左氧氟沙星(levofloxacin)	盐酸左氧氟沙星(levofloxacin hydrochloride)	归属(assignment)
—	1129 w	1115	ν_{C-N}
1072 w	—	1090 w	ν_{C-N}
1057	1041	1050	$\nu_{C-N} + \rho_{CH_2}$
1039 m	—	1030 m	$\nu_{C-N} + \rho_{CH_2}$
1010	1001	—	$\nu_{C-N} + \rho_{CH_2}$
983	988	985	$\nu_{C-N} + \rho_{CH_2}$
893 m	905 m	—	$\nu_{C-N} + \rho_{CH_2}$
—	—	889	$\nu_{C-N} + \rho_{CH_2}$
852	835	848	$\nu_{C-N} + \rho_{CH_2}$
—	—	798	$\nu_{C-N} + \rho_{CH_2}$
786 m	783 m	783 m	$\nu_{C-N} + \rho_{CH_2}$
750	749	746	$\nu_{C-N} + \rho_{CH_2}$
709	—	—	$\nu_{C-N} + \rho_{CH_2}$
688	—	—	$\nu_{CH} + \delta_{CH}$
670	668	663	$\nu_{CH} + \delta_{CH}$
—	653	645	$\nu_{CH} + \delta_{CH}$
599	—	596	$\delta_{\text{环(cyclo)}} + \delta_{CH}$
569	560	567	$\delta_{\text{环(cyclo)}} + \delta_{CH}$
548	547	538	$\delta_{\text{环(cyclo)}} + \delta_{CH}$
504	486	491	$\delta_{\text{环(cyclo)}} + \delta_{CH}$

注(note) : ν - 伸缩振动(stretch vibration) δ - 弯曲振动(bent vibration) s - 强峰(stong peak) m - 中等强度峰(medium intensity peak) w - 弱峰(weak peak)

氧氟沙星在 2999 2986 2967 2949 cm^{-1} 的峰归属于 CH_3 、 CH_2 的对称和不对称伸缩振动 ,2786 cm^{-1} 的峰应属于 CH 的伸缩振动 ,1719 cm^{-1} 为羧基 C = O 的伸缩振动 ,1623 cm^{-1} 为 C = O 峰 ,最强峰 1623 cm^{-1} 可能由环伸缩振动引起 ,分子中的苯环、氮杂环等伸缩振动可能对此峰均有一定贡献; 1547 cm^{-1} 和 1519 cm^{-1} 的 2 个峰归属苯环伸缩振动 ,1455 , 1355 ,1287 ,1257 cm^{-1} 的峰归属于 CH_3 、 CH_2 的变形振动 ,也可能含有环的伸缩振动; 1325 cm^{-1} 的峰应是 C - N 伸缩振动; 1236 ,1227 ,1199 cm^{-1} 应为 C - O 伸缩振动; 1145 ,1072 cm^{-1} 的 2 个峰为 C - N 伸缩振动; 1057 ,1039 ,1010 ,983 ,893 ,852 ,786 ,750 ,709 cm^{-1} 的峰可归属于 C - N 伸缩振动和 CH_2 的 C - H 变形振动; 599 ,569 ,548 ,504 cm^{-1} 可归属于苯环或氮杂环上 CH 或 CH_2 的变形振动 ,且受环上取代基种类和位置的影响。以上这些峰全部或部分组合代表了主要官能团 ,可作为鉴别的判断依据。

左氧氟沙星和氧氟沙星在分子结构上的区别在于手性 C 原子上 CH_3 和 H 空间位置差异 ,由于空间位置的差异可导致两分子在拉曼光谱图上差异 ,而盐酸左氧氟沙星由于和盐酸形成盐酸盐 极性加大 ,

使三者分子结构产生一些细小的差异 ,它们之间的这些微小的差异在拉曼光谱中得到放大 ,在图谱中可以找到明显的差异: 3000 cm^{-1} 附近 CH_3 、 CH_2 的伸缩振动 2999 2985 2968 2934 cm^{-1} 处存在明显的差异; 在 1469 ,1455 ,1442 ,1287 ,1257 cm^{-1} 处 CH、 CH_2 、 CH_3 的 C - H 变形振动存在着差异; 在 1236 , 1227 ,1208 ,1199 处 C - O 伸缩振动也存在明显的差异; 在 1172 ,1162 ,1145 ,1129 处 C - N 伸缩振动存在差异; 在 889 ,798 CH_2 变形振动存在差异 ,709 , 688 ,599CH 伸缩振动和 CH 变形振动存在差异 ,以上这些峰可以区别左氧氟沙星。

3.2 拉曼光谱可以鉴别出盐酸左氧氟沙星、左氧氟沙星和氧氟沙星三者的差别。在图 2 中 ,盐酸左氧氟沙星、左氧氟沙星和氧氟沙星(消旋体) 三者的拉曼光谱存在明显的差异 ,在 A 处左氧氟沙星为 2 个峰 左边峰大 右边峰小 ,氧氟沙星也为 2 个峰 ,但峰的大小正好与左氧氟沙星相反 ,左峰小右峰大 ,左氧氟沙星只是 1 个峰; 在 B 处 ,左氧氟沙星和盐酸左氧氟沙星基本一致 ,氧氟沙星却为 2 个峰; 在 C 处 ,左氧氟沙星和盐酸左氧氟沙星均为弱峰 ,而氧氟沙星却为强峰; 在 D 处 ,左氧氟沙星和盐酸左氧氟

沙星均为弱峰,而氧氟沙星却为强峰;在 E 处,左氧氟沙星和盐酸左氧氟沙星均为弱峰,而氧氟沙星却为强峰。具体的峰位在光谱解析中已作了详细的说明。

3.3 拉曼光谱可以检查盐酸左氧氟沙星溶液的 pH。在图 3 和图 4 中,从下往上分别为 pH 1.52、pH 3.41、pH 4.87、pH 5.18、pH 6.05、pH 7.05、pH 7.68、pH 9.08、pH 10.29、pH 11.48 共 10 个 pH 梯度的盐酸左氧氟沙星水溶液,从图中可以看出 pH 在 6.05 时,A 处的峰形开始变小,到 pH 7.05 时发生突变,A 处的峰形基本消失,同样在 B 处,也是在 pH 7.05 时发生突变,由 2 个分离的小峰突变成单峰;在图 3 中,从下往上分别为 pH 7.05、pH 7.68、pH 9.08、pH 10.29、pH 11.48,在图中 A 处和 B 处基本上没有差异。出现这种现象的原因可能是:在 pH 7 以下为酸性条件,此时左氧氟沙星以盐的形式存在,在 pH 7 以上是为碱性条件,此时的左氧氟沙星以游离态形式存在,拉曼光谱能够检测到这些细微的差别。

3.4 拉曼光谱可以对盐酸左氧氟沙星注射液进行含量测定,拉曼光谱法结合 TQ 分析软件,可以对盐酸左氧氟沙星注射液进行准确含量测定。实验中得到的回归系数达到 3 个 9,回收率也超过 95%,基本上满足含量测定的要求。

3.5 通过以上实验,拉曼光谱可以鉴别出氧氟沙星(消旋体)、左氧氟沙星和盐酸左氧氟沙星三者光学异构体,并利用拉曼光谱的符合比尔定律对盐酸左氧氟沙星注射液进行了含量测定研究,含量测定的结果与高效液相色谱法测定的结果一致,实验所用时间与高效液相色谱法相比,具有快速、简便、无损特性,因此拉曼光谱法可快速、简单地对盐酸左氧氟沙星注射液进行鉴别、检查和含量测定,符合快速检测要求。

参考文献

1 Sylwester M, Roman S. Quantitative determination of diclofenac sodium and aminophylline in injection solutions by FT-Raman spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal* 2006 40: 1235
 2 Findlay WP, Bugay DE. Utilization of Fourier transformant - raman

spectroscopy for the study of pharmaceutical crystal forms. *J Pharm Biomed Anal* 1998 16(6): 921
 3 Vankeisbilleck T, Vercauteren A, Baeyens W. Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis. *Trends Anal Chem* 2002 21(12): 869
 4 KONG Ling - ce(孔令策), ZUO Guo - min(左国民), CHENG Zhen - xing(程振兴). Surface - enhance raman spectroscopy for trace fentanyl detection in water(表面增强拉曼光谱检测水中微量的芬太尼). *J Ligh Scatt(光散射学报)* 2010 22(1): 57
 5 CAO Ling(曹玲), SHI Bei - jia(石蓓佳), WU Li(吴莉), et al. Qualitative analysis of carboxylic acids and commonly used derivatives as pharmaceutical excipients by Raman spectra(常用羧酸类及其衍生物药用辅料的拉曼光谱鉴别). *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)* 2010 30(3): 484
 6 ZHANG Yan(张雁), YIN Li - hui(尹利辉), FENG Fang(冯芳). Introduction for the application of Raman scattering method(拉曼光谱分析法的应用介绍). *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2009 29(7): 1236
 7 ZOU Ming(邹明), ZOU Yuan - lei(邹远磊). Quantitative determination of glycine by internal standard laser Raman spectra(激光拉曼光谱内标法测定甘氨酸浓度). *J Hubei Ins Nation(Nat Sci Ed)* [湖北民族学院学报(自然科学版)], 2010 28(1): 39
 8 LU Dong - lian(陆冬莲), HAN He - you(韩鹤友), LIANG Jian - gong(梁建功). Highly sensitive silver mirror substrate preparation and its application to surface enhanced Raman spectroscopic detection of furazolidone(基于银镜的高灵敏表面增强拉曼光谱基底制备及其用于呋喃唑酮检测). *Chin J Anal Chem(分析化学)*, 2010 38(5): 736
 9 LIU Xiao - wei(刘晓伟), WU Wei(吴维), ZHU Dong - yin(朱冬寅). The application of Raman spectrum in screening illegal additives(拉曼光谱及其在非法添加物快速筛检中的应用). *China Food Safety(食品安全导刊)* 2010 2: 93
 10 LU Jie(鲁杰), WANG Zhu - tian(王竹天), YANG Da - jin(杨大进). Review of analytical methods for determining melamine in different matrix(不同基质中三聚氰胺分析方法的研究进展). *China Food Add(中国食品添加剂)* 2009 2: 102
 11 KE Yi - kan(柯以侃), DONG Hui - ru(董慧如). Chemical Analytical Handbook(分析化学手册). Fascicle Book Three(第三分册). 2nd Ed(第二版). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 1998. 928, 1120
 12 ZHANG Zheng - xing(张正行). Analysis of Organic Chemicals Spectroscopy(有机光谱分析). Beijing(北京): People's Medical Publishing House(人民卫生出版社) 2009. 75

(本文于 2010 年 12 月 16 日收到)