

荷移荧光光谱法测定加替沙星

敖登高娃, 陶玉龙, 樊海燕

内蒙古大学化学化工学院 内蒙古 呼和浩特 010021

摘要 研究了加替沙星(GFLX)与电子受体四氯对苯醌(TCBQ)之间的荷移反应,建立了测定加替沙星的新方法。实验结果表明,在甲醇-水介质中于45℃水浴恒温20 min, GFLX与TCBQ可形成稳定的1:1电荷转移络合物,其荧光发射强度较GFLX本身有显著的增强。在 $0.19 \sim 5.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内,荧光强度与GFLX浓度呈良好的线性关系,检出限为 $0.0056 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。用于药物制剂中GFLX的含量测定,其回收率为101.1%~103.9%;标准偏差为1.0%~1.9%。同时建立了测定尿样中GFLX的荷移同步荧光光谱法, GFLX浓度在 $0.023 \sim 3.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内与荧光强度呈良好的线性关系,检出限为 $0.0034 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。用本方法测定尿液中的GFLX,结果与文献值基本一致,回收率为93.9%~101.0%;标准偏差为1.0%~1.7%。

关键词 加替沙星; 四氯对苯醌; 荷移反应; 荧光光谱

中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2007)08-1615-04

引言

加替沙星(gatifloxacin, GFLX)是日本杏林制药株式会社继诺氟沙星、氟罗沙星之后研制开发的又一新型氟喹诺酮类合成抗菌剂,具有抗菌谱广、抗菌活性强、口服生物利用度高、临床副作用小等优点,应用前景广阔^[1]。单剂口服加替沙星200 mg,约用药量的83%在48 h内由尿液排出^[2]。目前加替沙星的分析方法有高效液相色谱法^[3-8],紫外分光光度法^[9-13],化学发光法^[14],荧光光谱法^[15]等。而采用荧光光谱对加替沙星荷移反应的研究至今尚未见文献报道。作者曾用荧光猝灭法和同步荧光法分别测定过中草药、茶叶中的微量Fe^[16]和尿中的依诺沙星^[17],本文对加替沙星与四氯对苯醌的荷移反应条件和产物的荧光性质进行了研究,发现加替沙星在适宜的条件下,可与四氯对苯醌发生电荷转移反应,并能生成稳定的 $n-\pi$ 络合物,其荧光发射显著增强。据此建立了直接法测定药物制剂及同步荧光光谱法测定尿液中加替沙星含量的新方法。经样品测定,结果令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

F 3010 型荧光光谱仪(日本日立公司); HH-S 型恒温水

浴(巩义市英峪予华仪器厂)。

加替沙星(GFLX)(中国药品生物制品检定所提供)储备液: $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,使用时逐级稀释至所需浓度;四氯对苯醌(TCBQ)(北京市北苑化工厂,分析纯)溶液: $3 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甲醇溶液;其余试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

吸取适量加替沙星溶液于10 mL具塞比色管中,加入1.5 mL TCBQ 甲醇溶液,用甲醇定容至刻度,摇匀,于45℃水浴中恒温20 min,取出冷却至室温,以334 nm为激发波长,在476 nm处测定荷移反应产物的荧光强度,同时做空白实验。

2 结果与讨论

2.1 激发和发射光谱

按实验方法配制溶液,分别对所得荷移反应产物、加替沙星和空白试剂进行荧光激发和发射扫描,结果见图1。在甲醇-水介质中加替沙星自身能发射微弱荧光,其最大激发和发射波长分别为300和412 nm。当与TCBQ发生荷移反应后,荧光激发和发射峰分别红移至340和476 nm,产物的荧光强度较加替沙星本身增强了5倍,这表明GFLX与TCBQ荷移络合物的生成。

收稿日期: 2006-05-10, 修订日期: 2006-08-20

基金项目: 内蒙古教育厅项目(NJ05040)资助

作者简介: 敖登高娃,女,1956年生,内蒙古大学化学化工学院教授, e-mail: hxgaowa@126.com

©1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 反应温度的影响

按实验方法, 分别测定在 20~60 ℃ 的水浴中 GFLX 与 TCBQ 电荷转移反应的荧光强度。从 20 ℃ 起, 随温度的升高荧光强度逐渐增强, 40 ℃ 以后荧光强度受温度的影响不大, 本实验选择 45 ℃ 为反应温度。

2.3 反应时间的影响

在确定的温度下, 选择反应时间为 5~60 min 内的不同时间段进行荧光光谱考察。结果表明 GFLX 与 TCBQ 15 min 后即可反应完全, 实验选择反应时间为 20 min。荷移反应产物在室温放置 24 h, 荧光值无明显变化, 说明电荷转移络合物具有较好的稳定性。

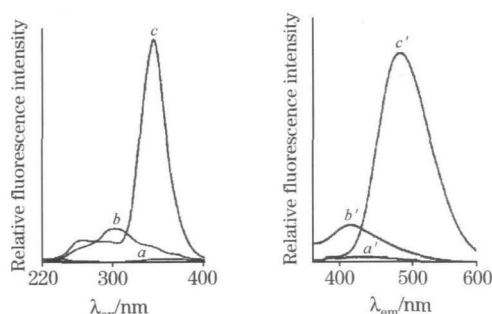


Fig 1 Fluorescence spectra of TCBQ, GFLX and TCBQ/GFLX complex

a, a' : TCBQ; b, b' : GFLX, $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 300/412$ nm;

c, c' : TCBQ/GFLX, $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 340/476$ nm

$c_{TCBQ} = 3 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{GFLX} = 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.4 溶剂的影响

在所选择反应温度和反应时间下, 分别以水、甲醇、乙醇、丙酮、正丙醇、乙醚、氯仿、四氢呋喃和其中任意两者的混合液作为溶剂进行试验。结果表明, GFLX 与 TCBQ 的

移反应在甲醇-水介质中进行, 其灵敏度最高。试验醇水比为 9:1~7:3 荧光强度最大且稳定。本实验选择醇水比为 8:2。

2.5 TCBQ 用量的选择

当 TCBQ 用量在 1.0~2.5 mL 范围时荧光强度最大且稳定。浓度过低则反应不完全, 而浓度高导致荧光强度下降。选择 $3 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TCBQ 1.5 mL。

2.6 干扰实验

实验条件下, 考察了药物制剂中常见辅料对加替沙星测定的干扰情况。1500 倍量的葡萄糖, 1200 倍量的乳糖, 1000 倍量的蔗糖、谷氨酸, 45 倍量的淀粉, 20 倍量的糊精等均不干扰测定。同时考察了体内常见金属离子对加替沙星测定的干扰情况。330 倍量的 K^+ , 175 倍量的 Ca^{2+} , 50 倍量的 Na^+ , 20 倍量的 Zn^{2+} , 15 倍量的 Al^{3+} , 2 倍量的 Mg^{2+} , 0.1 倍量的 Fe^{3+} , 0.06 倍量的 Cu^{2+} 等金属离子均不干扰测定。

2.7 标准曲线与检出限

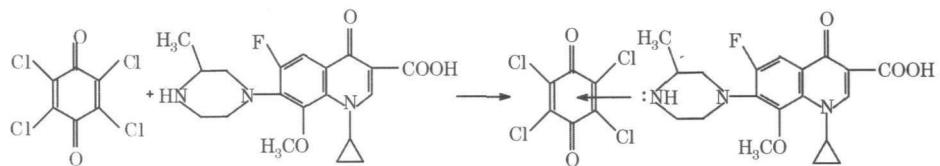
配制浓度为 1.0~100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的加替沙星系列标准工作液, 按上述实验方法操作, 分别对不同浓度的荷移反应体系进行荧光光谱扫描, 在所选取的最佳实验条件下, 荧光强度与加替沙星浓度在 0.19~5.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内呈良好线性关系, 其线性回归方程为 $F = -23.787 + 202.13c$ (c : $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); 相关系数 $r = 0.9990$; 检出限为 0.0056 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.8 络合物组成比的测定

用平衡移动法和斜率比法测得 GFLX/TCBQ 络合物的组成比为 1:1。

2.9 反应机理初探

TCBQ 是一个平面型 π 电子受体, GFLX 分子内含有一个咪唑基, 其 N 原子上有一孤电子对, 可作为电子给体, 两者在最佳反应条件下可形成 1:1 的 $n-\pi$ 络合物。其形成过程见 Scheme 1,



Scheme 1 Process of formation

3 样品分析

3.1 药物制剂中加替沙星含量及回收率的测定

3.1.1 试样的制备

取加替沙星胶囊 5 粒, 准确称重后, 研成粉末混匀。准确称取总质量的 1/5 样品粉末, 用水溶解, 定量转移至 100 mL 容量瓶中, 过滤, 弃去初滤液, 精确量取续滤液 10 mL 于 100 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀作为试样溶液。

准确移取 10 mL 加替沙星氯化钠注射液于 100 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀作为试样溶液。

3.1.2 试样含量及回收率的测定

取适量加替沙星试样溶液于 10 mL 比色管中, 按实验方法操作, 求得样品实际含量。准确称取适量加替沙星对照品加入到适量的样品中, 其余按试样溶液制备进行。取适量此溶液按实验方法操作, 由所得荧光强度计算回收率, 结果见表 1。

3.2 尿样中加替沙星含量及回收率的测定

3.2.1 实验方法

准确取 1 mL 空白尿液于 10 mL 比色管中, 加入适量加替沙星溶液, 1.5 mL TCBQ 甲醇溶液, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 于 45 ℃ 水浴中恒温 20 min, 取出冷却至室温, 在

Table 1 Analytical results of GFLX samples and recoveries(*n*= 5)

样品	标示量/ mg	本方法测得值/ mg	加入量/ mg	测得值/ %	回收率/ %	RSD/ %
1	200	197. 0	18. 77	19. 50	103. 9	1. 7
2	100	98. 75	28. 16	29. 11	103. 8	1. 0
3	200	195. 2	18. 77	18. 98	101. 1	1. 9

样品 1 为山东罗欣药业股份有限公司产品(批号: 05050441); 样品 2 为成都恒瑞制药有限公司产品(批号: 031205); 样品 3 为成都倍特药业股份有限公司产品(批号: 20040802)

$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=337/472\text{ nm}$ 处($\Delta\lambda=135\text{ nm}$), 测荧光强度, 同时做试剂空白实验。

3. 2. 2 同步荧光光谱

分别对 GFLX/TCBQ 络合物和空白尿样进行荧光光谱扫描, 如图 2 所示。由图可以看出测定尿液中 GFLX 时, 由于尿液中内源性荧光物质的背景干扰, 用常规荧光分析方法难以测定。同步导数荧光光谱法能很好的解决这个问题, 在同步荧光光谱测定中, $\Delta\lambda$ 是最重要的参数, 它直接影响方法的灵敏度和选择性。分别在 $\Delta\lambda=20, 40, 60, 80, 100, 120, 125, 130, 135, 140, 145$ 和 150 nm 时, 对含有 GFLX 的尿液进行了同步荧光光谱扫描, 结果表明 $\Delta\lambda=135\text{ nm}$ 时, GFLX 与尿液中的内源性荧光物质分辨率最好, 灵敏度最高, 结果见图 3。

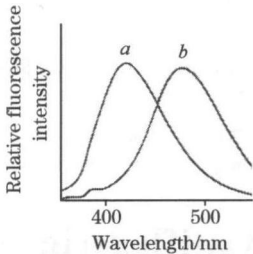


Fig 2 Fluorescence emission spectra

a: Fluorescence substance of human urine;

b: GFLX/TCBQ complex

$c_{\text{TCBQ}}=3\times10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}, c_{\text{GFLX}}=3\times10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

3. 2. 3 标准曲线及检出限

按 3. 2. 1 实验方法操作, 设置 $\Delta\lambda=135\text{ nm}$, 分别对不同

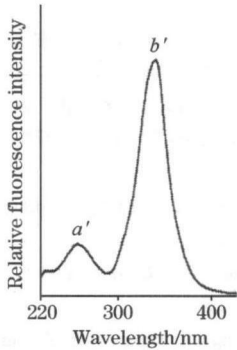


Fig 3 Synchronous fluorescence emission spectra

a': Fluorescence substance of human urine;

b': GFLX/TCBQ complex

$c_{\text{TCBQ}}=3\times10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}, c_{\text{GFLX}}=3\times10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

浓度的荷移反应体系, 在波长为 $220\sim420\text{ nm}$ 范围内进行同步荧光光谱扫描。结果表明, GFLX 浓度在 $0.023\sim3.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内与荧光强度呈良好线性关系, 其回归方程为 $F=23.036+183.46c(c:\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$; 相关系数 $r=0.9991$; 检出限为 $0.0034\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3. 2. 4 试样的制备

准确量取口服加替沙星胶囊 200 mg 的健康受试者 24 h 之内的尿样 10 mL 于 100 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀作为试样溶液。

3. 2. 5 试样含量及回收率的测定

取 1 mL 试样溶液于 10 mL 比色管中, 按 3. 2. 1 实验方法操作, 求得样品实际含量。同时进行标准回收实验, 结果见表 2。

Table 2 Analytical results of GFLX samples and recoveries(*n*= 5)

样品	文献 ^[2] 测定值/ % *	本方法测得值/ % *	加入量/ mg	测得值/ mg	回收率/ %	RSD/ %
1	83. 4	83. 9	5. 631	5. 289	93. 9	1. 7
			11. 26	11. 37	101. 0	1. 0

样品 1 为山东罗欣药业股份有限公司产品(批号: 05050441); * 表示 48h 内由尿液排出的加替沙星的量占用药量(200 mg)的百分数。

参 考 文 献

- [1] Caroline M Perry, Julia A Barman Balfour, Harriet M Lamb. *Drugs*, 1999, 58(4): 683.
- [2] DU Yu, GUO Huīyuan(杜煜, 郭惠元). *World Notes on Antibiotics*(国外医药抗生素分册), 2001, 22(1): 34.
- [3] ZHU Man, WANG Rui, FANG Yi, et al(朱曼, 王睿, 方毅, 等). *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*(药物分析杂志), 2003, 23(1): 53.
- [4] ZHU Hong-da, WANG Zhen-ping, GAO Feng-xi(祝红达, 王振平, 高逢喜). *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*(中国医院药学杂志), 2006, 26(9): 1180.
- [5] BAI Rong, LIU Xia(白荣, 刘峡). *Journal of Medical Research*(医学研究杂志), 2006, 35(9): 71.
- [6] XIANG Ping, WU Yur-ling(向萍, 吴渝陵). *China Pharmaceuticals*(中国药业), 2006, 15(4): 17.
- [7] LI Hong, ZHANG Li(李红, 张翎). *China Pharmaceuticals*(中国药业), 2006, 15(3): 31.
- [8] HU A Jurr-yan, TIAN Wei-qiang, ZHU Yā-yan, et al(华俊彦, 田伟强, 朱雅艳, 等). *Strait Pharaceuticals Journal*(海峡药学), 2006, 18(2): 142.
- [9] XU Qin, QIN Xue-lian, DENG Lī-dong(徐勤, 秦雪莲, 邓立东). *Journal of Guangdong College of Pharmacy*(广东药学院学报), 2003, 19(3): 234.
- [10] YANG Jī-zhang, LIU Ruī-qin, YANG Shu-min(杨继章, 刘瑞琴, 杨树民). *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*(中国医院药学杂志), 2006, 26(9): 1061.
- [11] WANG Xiao-ling, LI Dong, NIE Zhong-yue(王晓玲, 李东, 聂中越). *China Pharmacist*(中国药师), 2005, 8(12): 1014.
- [12] QIN Xue-lian, XU Qin, DENG Lī-dong(秦雪莲, 徐勤, 邓立东). *Northwest Pharmaceutical Journal*(西北药学杂志), 2004, 19(4): 154.
- [13] HUANG Qī-chun(黄其春). *Strait Pharmaceutical Journal*(海峡药学), 2002, 14(2): 34.
- [14] LIAN Ning, ZHAO Huī-chun, SUN Churr-yan(连宁, 赵慧春, 孙春燕). *Chemical Journal of Chinese Universities*(高等学校化学学报), 2002, 23(4): 564.
- [15] LIAN Ning, SUN Churr-yan, ZHAO Huī-chun(连宁, 孙春燕, 赵慧春). *Journal of Instrumental Analysis*(分析测试学报), 2002, 21(1): 79.
- [16] DAI Gang, AODENG Gao-wa(代钢, 敖登高娃). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), 2004, 24(7): 848.
- [17] DAI Gang, AODENG Gao-wa(代钢, 敖登高娃). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), 2005, 25(10): 1634.

Fluorescence Spectrometric Determination of Gatifloxacin by Charge Transfer Reaction

AODENG Gao-wa, TAO Yur-long, FAN Hai-yan

College of Chemistry and Chemical Engineering, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China

Abstract A new method for the determination of gatifloxacin (GFLX) has been developed based on the charge transfer reaction between gatifloxacin as the donor and chloranil(TCBQ) as the acceptor by fluorimetry. Experiments show that GFLX has reacted with TCBQ in a mixture of methanol and water at 45 °C for 20 min and the complex was formed. The composition ratio was 1: 1. A linear calibration graph was obtained over the GFLX concentration range from 0.19 to 5.6 mg · L⁻¹ with a detection limit of 0.005 6 mg · L⁻¹. The method has been applied to the determination of GFLX in the preparation, the recoveries are 101.1%-103.9%, and the relative standard deviation is 1.0%-1.9%. At the same time we proposed a method for the determination of GFLX in urine by charge transfer-synchronous fluorescence spectroscopy. Beer's law is obeyed in the range of 0.023-3.4 mg · L⁻¹ of GFLX with a detection limit of 0.003 4 mg · L⁻¹, the recoveries are 93.9%-101.1%, and the relative standard deviation is 1.0%-1.7%.

Keywords Gatifloxacin; Chloranil; Charge transfer reaction; Fluorescence spectroscopy

(Received May 10, 2006; accepted Aug. 20, 2006)