

文章编号: 1009-4490(2006)04-0064-04

培氟沙星的气相色谱法测定及其应用

姚如心, 许庆琴, 杜黎明

(山西师范大学分析测试中心, 山西 临汾 041004)

摘 要: 采用三氟化硼-甲醇为衍生化试剂, 以 HP-FFAP 毛细管柱为分离柱, 建立了培氟沙星的气相色谱分析法。培氟沙星在质量浓度 1.0 mg/L ~ 250.0 mg/L 内, 药物与内标物峰面积比和药物浓度呈良好的线性关系, 检出限为 10 μ g/L。该方法前处理步骤简单, 处理后杂质干扰少, 灵敏度高, 适用性强, 用于药物制剂和体液中培氟沙星含量的测定, 平均回收率为 93.75% ~ 102.73%, 日间 RSD 均小于 2.85% ($n=5$)。

关键词: 气相色谱法; 衍生化; 三氟化硼; 培氟沙星; 尿

中图分类号: O658.1

文献标识码: A

培氟沙星 (pefloxacin, PEFX), 属于新型氟喹诺酮类药物 (氟喹诺酮类药物的发现和发展, 创造了合成抗菌药的新时代, 是一类可与抗生素并驾齐驱的合成抗菌药), 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, 在治疗各种泌尿系统感染方面具有重要价值。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 PEFX 在临床和药代动力学研究方面是十分必要的。目前药物和体液中培氟沙星的测定方法主要有紫外分光光度法^[1]、荧光分光光度法^[2,3]、高效液相色谱法^[4,5]、电化学分析法^[6]和毛细管电泳法^[7]等, 至今尚未见培氟沙星的气相色谱法报道。本文对培氟沙星的衍生化气相色谱法进行了研究, 据此建立了一种测定药物制剂和体液中培氟沙星的气相色谱新方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HP-5890 型气相色谱仪 (美国惠普公司), 氢火焰离子化检测器 (FD), HP 化学工作站; UV-2201 型紫外可见分光光度计 (日本岛津公司); FTIR410 型傅立叶变换红外光谱仪 (美国 NICOLET 公司); 电热恒温水浴锅 (北京永光明医疗仪器厂)。培氟沙星标准品 (中国药品生物制品检定所) 配制成 100 mg/L 的标准储备液; 十三烷为色谱纯, 配制成 100 mg/L 的内标储备液; 衍生化试剂: 47.7% 的三氟化硼乙醚溶液配成 14% 的甲醇溶液; 甲醇和环己烷均为分析纯。

1.2 衍生化过程

准确吸取一定浓度的培氟沙星-甲醇标准溶液 0.5 mL 于 5 mL 具塞试管中, 加入 0.5 mL 14% $\text{BF}_3 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ 溶液和 1 mL 一定浓度的内标溶液, 摇匀, 在 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中酯化 30 min, 取出冷至室温, 再加入 1 mL 环己烷和 1 mL 饱和氯化钠溶液, 超声振荡萃取 2 min, 静置分层, 直接取上层清液 0.6 μL 分析。

1.3 色谱条件

HP-FFAP (25m \times 0.20mm i.d. \times 0.33 μm) 石英毛细管柱, 柱温 180 $^{\circ}\text{C}$; 汽化室温度 250 $^{\circ}\text{C}$, 检测器温

收稿日期: 2006-09-04

基金项目: 山西省自然科学基金资助项目 (20041030)。

作者简介: 姚如心 (1974—), 女, 山西临汾人, 山西师范大学分析测试中心硕士研究生, 主要从事药物的色谱研究。通信作者: 杜黎明。

度 250 ;载气 (N_2) 流速为 1.0 mL/min, 分流比 80:1, 进样量 0.6 μ L.

2 结果与讨论

2.1 色谱柱选择

本文对 HP-1、HP-5、HP-50⁺、HP-1701、HP-20M 和 HP-FFAP 等不同极性的色谱柱进行考察, 发现 PEFX 衍生物在非极性和中等极性柱上的响应值不高, 峰形拖尾; 而在极性柱上响应值高、峰形对称无拖尾, 具有良好的分离度; 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, 所测组分与内标物 4 min 内即可完成分离, 故本实验选用 HP-FFAP (25 m \times 0.20 mm i.d. \times 0.33 μ m) 毛细管色谱柱为分离柱, 取得良好的分离效果 (见图 1).

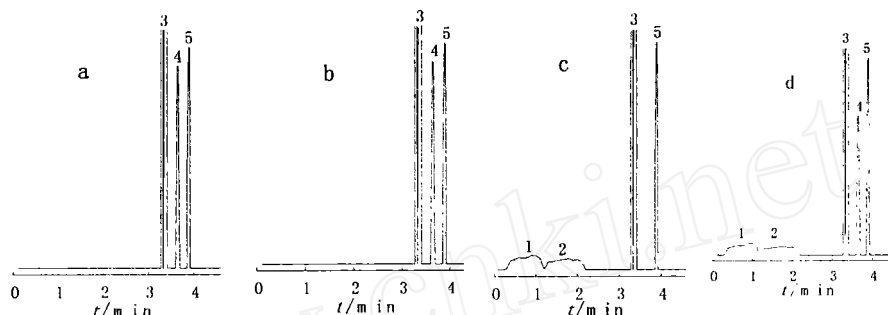


图 1 培氟沙星的标准样品 (a)、胶囊样品 (b)、空白尿样 (c) 和受试者服药后尿样 (d) 的色谱图

1、2 尿中物质 (substances of urine), 4 培氟沙星衍生物 (PEFX derivation), 5 十三烷 (tridecane, internal standard)

Fig 1 Chromatograms of PEFX standard (a), capsule sample (b), blank urine (c) and a urine sample from healthy volunteer (d)

2.2 衍生化反应条件选择

采用不同的方法对培氟沙星进行衍生化处理, 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-甲醇作为衍生化试剂.

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. 当酯化反应温度为 75 ~ 85 时 A_i/A_s (PEFX 衍生物峰面积/内标峰面积) 最大, 本实验选择 80 为反应温度. 反应时间对衍生化产率的影响可从图 2 中看出, 当 $t = 30$ min 时, 反应已达平衡, 所以选择 30 min 为衍生化反应时间. 在上述条件下, 分别用 47.7%、30%、14% 和 10% 三氟化硼-甲醇溶液对药物进行衍生化处理, 三氟化硼浓度过低时, 所需衍生试剂的量增加, 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, 而且反应后混合液几乎为中性. 最终本实验选择 14% 三氟化硼-甲醇溶液与培氟沙星 (体积比 1:1) 在 80 加热 30 min 为最佳的衍生化反应条件.

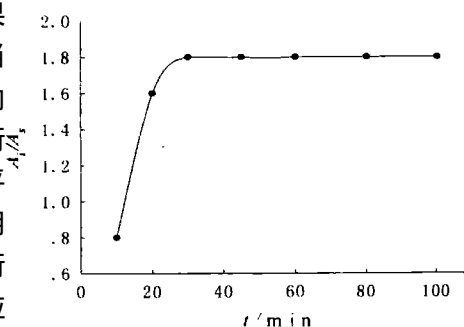


图 2 A_i/A_s 与衍生时间的关系曲线

Fig 2 Relation between the derivatization time and A_i/A_s

用环己烷、乙醚、氯仿和四氯化碳等不同的溶剂对培氟沙星衍生物的萃取效率进行了比较研究, 乙醚作萃取剂时, 两相分层较慢; 氯仿和四氯化碳的萃取效率不高, 实验表明环己烷具有分层速度快、萃取效果好等优点, 故本实验选环己烷作为萃取溶剂.

为提高萃取效率, 在酯化体系中加入饱和氯化钠溶液, 不仅使培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 衍生化产物红外光谱表征

将酯化产物的环己烷溶液用氮气吹干,采用 KBr 压片法制样,取培氟沙星衍生物粉末 3 mg 与 200 mg KBr 粉末混合研磨均匀后,直接放入傅立叶变换红外光谱仪中测定.对培氟沙星酯化产物进行红外光谱分析,从红外光谱图可以看出在 1740 cm^{-1} 处有一强的酯羰基 ($-\text{COOR}$) 吸收峰,在 1212 cm^{-1} 和 1171 cm^{-1} 为 $\nu_s(\text{C}-\text{O})$ 和 $\nu_{as}(\text{C}-\text{O})$ 伸缩振动吸收峰(图 3);而 3150 cm^{-1} 处的羧羟基吸收峰完全消失,这说明了酯化反应进行得比较完全.

2.4 线性关系与检测限

分别取培氟沙星标准系列溶液各 0.5 mL 按上述方法处理,在选定的色谱条件下分析,以培氟沙星/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如表 1 所示.取 0.5 mL 空白尿,分别加入不同体积的培氟沙星标准系列溶液,使其质量浓度分别为 1 mg/L, 2 mg/L, 6 mg/L, 8 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 加入 0.5 mL 14% $\text{BF}_3 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ 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.

表 1 培氟沙星的线性方程和相关系数

Tab 1 Regression equations and related parameters for PEFX

样品溶液	线性方程	相关系数	线性范围 (mg/L)	检测限 ($\mu\text{g/L}$)
标准	$Y = 13.325X + 0.1927$	0.9992	1.0 ~ 250.0	10
尿	$Y = 0.3597X - 0.2886$	0.9989	1.0 ~ 20.0	10

2.5 回收率实验及精密度

分别取 1 h, 2 h 和 3 h 尿样 0.25 mL, 加入相应浓度的培氟沙星标准溶液 0.25 mL, 按实验方法进行衍生化和测定, 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 2.

表 2 测定尿样中培氟沙星的回收率和精密度 ($n=5$)

Tab 2 Recovery and precision of PEFX in urine ($n=5$)

尿样	本底值 (mg/L)	加入量 (mg/L)	测得值 (mg/L)	回收率 (%)	日内 RSD (%)	日间 RSD (%)
1 h	1.927	2	3.802	93.75	1.37	2.84
2 h	3.674	4	7.439	94.13	1.43	2.46
3 h	5.220	8	12.926	96.33	1.58	2.14

2.6 样品测定

2.6.1 药物的测定 取 PEFX 胶囊 10 粒, 准确称取其总重 1/10 (相当于含有 PEFX 约 100 mg) 的药用甲醇定容至 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 后续液用甲醇稀释到适量. 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, 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性.

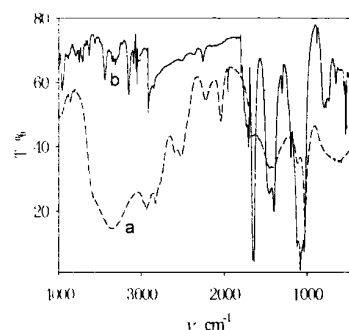


图 3 培氟沙星红外图

Fig 3 IR spectrum of PEFX

a PEFX b PEFX derivation

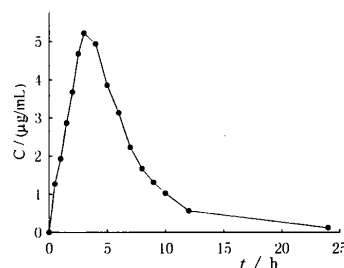


图 4 口服 PEFX 后平均尿药-时间曲线图

Fig 4 Mean urine concentration - time curve of PEFX after oral administration of PEFX

表 3 甲磺酸培氟沙星的分析结果和回收率实验 (n=5)
Tab 3 Analytical results and recovery tests of Pefloxacin mesylate (n=5)

批号	本方法				文献方法 ^[1]	
	测得值 mg/grain	相当于标示量 (%)	回收率 (%)	日内 RSD (%)	测得值 mg/grain	相当于标示量 (%)
20040902 ^a	97. 86	97. 86 (t, 2. 45; F, 3. 62)	102. 73	1. 84	97. 64	97. 64
20040905 ^a	98. 39	98. 39 (t, 1. 98; F, 3. 87)	98. 76	1. 27	98. 59	98. 59
20040907 ^a	98. 45	98. 45 (t, 2. 62; F, 2. 33)	99. 56	2. 15	98. 15	98. 15

注: a 甲磺酸培氟沙星胶囊(青岛国大药业有限公司,批号 20040902、20040905和 20040907) P > 0. 05时,理论值 t = 2. 78, F = 6. 39

2. 6. 2 尿样测定 5名健康志愿者单剂量口服培氟沙星胶囊 200 mg后不同时间取尿样,取 0. 5 mL尿样按上述方法处理,图 1d表明尿中内源性物质不干扰 PEFX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 4,服药后 3 h尿药浓度达最大值.

参考文献:

[1] Mostafa S, El- Sadek M, Alla E A. Spectrophotometric detemination of enrofloxacin and pefloxacin through ion - pair complex formation[J]. Pham Biomed Anal, 2002, 27 (1 - 2) : 133 ~ 142

[2] Du L M, Lin A P, Yang Y Q. Spectrofluorimetric detemination of certain fluoroquinolone through charge transfer complex formation[J]. Anal Lett, 2004, 37 (10) : 2175 ~ 2188

[3] Veiopoulou C J, Loannou P C, Lianidou E S. Application of terbium sensitized fluorescence for the detemination of fluoroquinolone antibiotics pefloxacin, ciproflaxacin and norfloxacin in serum[J]. Pham BiomedAnal, 1997, 15 (12) : 1839 ~ 1844.

[4] Beatrice H, Michel A, Pierre C et al. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic detemination of enoxacin and 4-oxo-enoxacin in human plasma and prostatic tissue application to a phamacokinetic study[J]. Chromatogr A, 1998, 812 (1) : 369 ~ 379.

[5] 杜黎明, 卫洪青, 张俊燕, 张巧平. 反相高效液相色谱法同时测定 6种氟喹诺酮类药物 [J]. 色谱, 2003, 21(5) : 503 ~ 506.

[6] Beltagi A M. Detemination of the antibiotic drug pefloxacin in bulk form, tablets and human serum using square wave cathodic adsorptive stripping voltammetry[J]. Pham Biomed Anal, 2003, 31 (6) : 1079 ~ 1088.

[7] Sun S W, Chen L Y. Optimization of capillary electrophoretic separation of quinolone antibacterials using the overlapping resolution mapping scheme[J]. Chromatogr A, 1997, 766 (1 - 2) : 215 ~ 224.

Analysis and Application of Pefloxacin by Gas Chromatography

YAO Ru-xin, XU Qing-qin, DU L im ing

(Analytical and Testing Center, Shanxi Normal University, Linfen 041004, Shanxi, China)

Abstract: A new method has been developed for the detemination of pefloxacin (PEFX) in pharmaceutical dosage forms and human urine by derivatization gas chromatography. PEFX was esterified with boron trifluoride catalyzed reaction 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 ranges of 1. 0 mg/L ~ 250. 0 mg/L, and the correlation coefficient was 0. 9989 for PEFX, the detection limit was 10 μg/L. The method has been successfully applied to determine PEFX pharmaceutical dosage forms with good precision and accuracy, and also applied for the detemination of studied drugs in human urine.

Key words: gas chromatography; derivatization; boron trifluoride; pefloxacin; urine