

高效液相色谱法测定氧氟沙星

杨长生 李 玉 王福安
(郑州工业大学化工系)

摘 要 提出了新一代喹诺酮类抗菌药氧氟沙星的高效液相色谱分析方法。以 H_3PO_4 — $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液(内加离子对试剂四乙基溴化铵)和甲醇为流动相,在 ODS 柱上成功地对氧氟沙星进行了分析。方法重现性好,氧氟沙星的相对偏差小于 0.58%,回收率大于 99.30%。

关键词 氧氟沙星;苯甲酸;离子对色谱

中图分类号 O657.72

氧氟沙星(ofloxacin)又名氟嗟酸,化学名称是 9-氟-2,3-二氢-3-甲基-10-(4-甲基-哌嗪)-7-氧-7-氢-吡啶(1,2,3-de)-1,4-苯并-喹-6-羧酸,分子式是 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_4$ 。它是第三代喹诺酮类抗菌药物,对呼吸道、尿道、肠道等多种系统感染有特殊疗效^[1]。药典上介绍的分析方法是电位滴定法,这种方法有时终点难以判断,分析误差大。国外早期测定氧氟沙星的方法是微生物法^[2],近年来有采用高效液相色谱(HPLC)法来分析尿样或血样中的氧氟沙星而进行药理研究的报道^[3]。国内文献未见有利用高效液相色谱对氧氟沙星进行分析的报道。本文利用反相 HPLC,在磷酸二氢铵缓冲溶液中加入离子对试剂四乙基溴化铵,同甲醇组成二元流动相,在 ODS 柱上成功地对氧氟沙星进行了定量分析,方法简便、快捷、灵敏,回收率大于 99.30%。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

日本岛津公司 LC-6A 高效液相色谱系统,包括:两台 LC-6A 输液泵、SPD-6AV 紫外-可见光检测仪、Model 6000 手动进样阀、CTO-6AV 恒温箱、C-R3A 色谱数据处理机、Shimadzu 十万分之一分析天平。

氧氟沙星(日本进口分装)新乡华星制药厂提供,磷酸二氢铵、四乙基溴化铵、苯甲酸、甲醇都为分析纯,86%磷酸,水为二次蒸馏水。

1.2 色谱条件

色谱柱 ZORBAX ODS 柱,250mm×4.6mm(Du Pont 公司制备),甲醇-水作流动相,其中水相为 0.003mol/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液,用 86% H_3PO_4 调整 pH=2.5,内加 0.01mol/L 四乙基溴化铵离子对试剂。流动相使用前过滤和超声脱气,流速为 0.5ml/min,柱温 60℃,紫外检测波长 280nm,内标法定量。

1.3 测定方法

准确称取 0.2g 氧氟沙星于烧杯中,加入少许蒸馏水,然后滴加 0.01mol/L NaOH 溶液

收稿日期:1998-01-15

第一作者 男 1964 年 5 月生 硕士学位 讲师

直到全部溶解为止,定容于 1000ml 容量瓶中,作为储备液,同样方法配制 0.3g/L 苯甲酸储备液。标准溶液由蒸馏水稀释储备液而制得。进样分析标准液,做校正曲线。

取实验制得的氧氟沙星悬浮液,过滤,滤饼用乙醇、乙醚洗净,烘干至恒重,准确称取一定量于烧瓶中,滴加 0.01mol/L NaOH 溶液至溶解,定容,取 10μl 进行分析。

2 结果与讨论

2.1 色谱分离条件的选择

2.1.1 检测波长确定

用不同波长的紫外光对氧氟沙星和内标物苯甲酸进行光吸收测量,氧氟沙星最大吸收在 280~300nm 之间,苯甲酸在 260nm 左右对紫外光有强吸收,检测波长选择 280nm。

2.1.2 流动相的选择

在 ODS 色谱柱上以甲醇-水作流动相对氧氟沙星进行分析,色谱峰严重拖尾,且氧氟沙星的保留时间很长。这是因为氧氟沙星分子中含有羧基,分析样品是以其钠盐(RCOON⁻a)形式存在,在水中发生电离形成 RCOO⁻阴离子,这样色谱峰会产生拖尾现象,根据离子对色谱理论^[4],需要在流动相中加入反离子,并且在缓冲溶液条件下进行分析。因此在甲醇-水流动相中加入离子对试剂四乙基溴化铵,并且用磷酸二氢铵缓冲溶液控制反离子的 pH 值。

2.1.3 pH 值的影响

当 pH 值为 7 时,氧氟沙星与内标物苯甲酸 k' 值很接近,达不到基线分离。pH 值减小,两种物质 k' 随之减小,但氧氟沙星 k' 值减小幅度比苯甲酸大,两种物质达到很好分离。这是因为 pH 值降低后,样品中 RCOO⁻ 形成不解离 RCOOH,从而导致固定相中样品离子对减少,降低了样品的保留值。本实验选 pH=2.5。

2.1.4 温度的影响

为了减少流动相的粘度,防止作为流动相的缓冲溶液形成结晶堵塞管路,选择柱温为 60℃。

2.2 色谱图

最优分离条件下氧氟沙星与内标物苯甲酸色谱图见图 1。

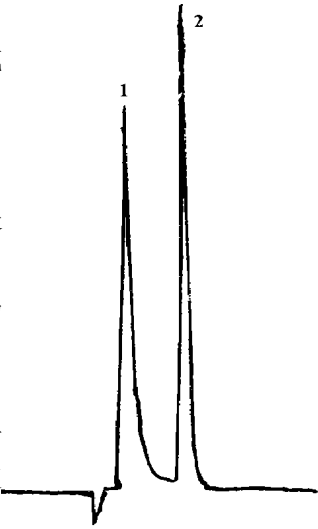
分别用氧氟沙星和内标物苯甲酸的储备溶液配成标准溶液,每次进样 10μl,以氧氟沙星和苯甲酸的峰高比对氧氟沙星的浓度进行回归分析。在 0~75μg/ml 范围内,回归方程为 $y=41.01x-4.720$ ($R=0.9999$)。

2.3 方法的精密度和回收率

为验证方法的精密度和可靠性,任取一样品配成溶液,然后分别准确量取一定量溶液于 3 个容量瓶中,第 1 个样品直接定容,另外两个样品分别加入不同量储备液,定容,进行色谱分析,同时测定其精密度和回收率,结果列于表 1 中。

2.4 样品分析

用本文分析方法测定实验室合成的氧氟沙星粗品以及精制品,其中的两次分析结果见表 2。



1. 氧氟沙星 2. 苯甲酸

图 1 样品色谱图

表 1 方法的精密度和回收率

样品	1	2	3
加入量($\mu\text{g/ml}$)	0	10.00	20.00
1	14.72	24.69	34.73
2	14.87	24.92	34.88
测定值	3	24.51	34.46
($\mu\text{g/ml}$)	4	24.78	34.42
5	14.84	24.70	34.54
6	14.75	24.45	34.79
平均值±标准偏差	14.75±0.085	24.68±0.13	34.64±0.16
相对标准偏差	0.58	53	0.47
回收率	—	99.30%	99.40%

表 2 氧氟沙星样品的分析结果

样品	配制浓度($\mu\text{g/ml}$)	测定浓度($\mu\text{g/ml}$)	百分含量
粗品	30.18	28.31	93.8%
精品	30.56	30.27	99.05%

3 结论

建立了用苯甲酸做内标物在反相离子对色谱上测定氧氟沙星的方法。方法简便、快速、准确率高,可用来分析氧氟沙星原药成品中有效成分,也可以作为测定人体血样、尿样中氧氟沙星时的参考分析方法。

参考文献

1 R·Janknegt,Pham·Weekbl·,Sci·Ed·1986,8,1~7
2 M·R·Locklgeg and R·Wise,J·Dent,J·Antimicrob·Chemother·,1984,14,647~652
3 Yoshihiro Katagiri,Kohjinaora,Nobuhiro Ichikawa,·Chromatogr·1988,431,135~142
4 L·R 斯奈德,J·J·柯克兰编著·现代液相色谱导论·北京:化学工业出版社,1988.120~128

Determination of Ofloxacin by High—performance
Liquid Chromatography

Yang Changsheng Li Yu Wang Fu'an
(Zhengzhou University of Technology)

Abstract A method for determining quinolone antibacterial agent ofloxacin·With high—performance liquid chromatography on a reversed—phase column is presented·Quantitative and reproducible determination were possible for ofloxacin over the concentration ranges 0.5—75 $\mu\text{g/ml}$ ·The recovery of ofloxacin was larger than 99.30% and the relative standard deviation was 0.58%.

Keywords ofloxacin;benzoic acid;ion—pair chromatography