

液相色谱测定水样中的氧氟沙星手性对映体

孙小杰^{1,2} 邵兵^{2*} 董慧茹¹ 胡建英³

(1. 北京化工大学理学院, 北京 100029; 2. 北京市疾病预防控制中心, 北京 100013;

3. 北京大学环境学院, 北京 100085)

摘要: 利用大赛路(CHIRALCEL OD-H)手性柱对氧氟沙星对映体进行分离,考察了在流动相组分、流动相添加剂和流速对手性分离的影响。结果表明, $V_{\text{正己烷}} : V_{\text{乙醇}} : V_{\text{乙酸}} = 80 : 20 : 0.5$ 的流动相能够使氧氟沙星得到较好的分离,左氧氟沙星和右氧氟沙星的质量浓度在 $0.25 \sim 5.00 \mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好($r^2 = 0.9997$)。实际水样中该方法的最低检出限左氧氟沙星为 $0.28 \mu\text{g}/\text{L}$ 、右氧氟沙星为 $0.10 \mu\text{g}/\text{L}$,最低定量限左氧氟沙星为 $0.36 \mu\text{g}/\text{L}$ 、右氧氟沙星为 $0.21 \mu\text{g}/\text{L}$ 。氧氟沙星的两组浓度加标平均回收率左氧氟沙星 90.1% 和 88.6% 、右氧氟沙星为 87.6% 和 85.4% ,左氧氟沙星的相对标准偏差(RSD)为 5.2% 、 6.4% ,右氧氟沙星的 RSD 为 4.8% 、 7.6% ($n = 3$)。

关键词: 液相色谱; 手性分离; 氧氟沙星

中图分类号: O657.7

引言

自 1962 年 Lesher 等合成第一个喹诺酮类药物萘哌酸以来,科学家们对喹诺酮类药物不断进行结构修饰,使得这一类药物得到很快的发展。目前医疗使用最为广泛的喹诺酮药物之一是氧氟沙星,它是第三代喹诺酮类药,为全合成抗菌药物^[1-2],左氧氟沙星属于第四代喹诺酮类,是氧氟沙星(消旋体)中具有抗菌活性的左旋光学对映体。目前临床使用的为 S(-) 和 R(+) 两种光学异构体的混合物和 S-氧氟沙星^[3-4]。这些药物在治疗和预防各种疾病,以及延长人类和动物生命的同时,也引发了相关的环境微生物的耐药性问题。同时它能够通过饮用水、食品以及其他途径传播给人,这也是继持久性污染物后的又一新兴污染物。通常使用后的氧氟沙星通过污水排放系统进入环境中,氧氟沙星的活性成分主要是 S(-)-氧氟沙星,R(+) 氧氟沙星没有抗菌活性,S(-) 和 R(+) 氧氟沙星两种光学异构体在环境中的行为以及环境风险将不尽相同。因此,很

有必要建立一种环境水体中氧氟沙星异构体的分析方法为研究相关的环境行为和风险评估提供技术支持。

目前有关氧氟沙星的手性分离方法主要包括采用手性流动相^[5]或衍生^[6]的方法进行分离,尚未见利用手性固定相的高效液相色谱手性分离的研究报道,也未见针对环境样品的分析方法的报道。本文利用大赛路(CHIRALCEL OD-H)手性柱,以正己烷/乙醇/乙酸为流动相对其进行了对映体分离研究。考察了不同浓度、不同种类的醇类添加剂、乙酸的含量、流速对溶质分离的影响,并初步探讨了固定相对溶质的手性分离机理。此类药物光学异构体的分离方法可行,该方法分离效果好、简便、快速、重现性好。

1 实验部分

1.1 主要试剂

氧氟沙星,化学名称为(±)-9-氟-2,3-二氢-3-甲基-10-(4-甲基-1-哌嗪基)-7-氧代-7H-吡啶并[1,2,3-de]-[1,4]苯并恶嗪-6-羧酸(OFL),纯度 98.6% ,Sigma 公司;左氧氟沙星,纯度 98.1% ,中国生物药品制品检定所;正己烷、甲醇,DIKMA 公司;乙醇、异丙醇,Scharlau Chemie S A 公司;盐酸,优级纯,北京北化精细化学品有限责任公司。正己烷、甲醇、乙醇和异丙醇均为色谱纯试剂。氧氟沙星的结构式如下^[6-7]:

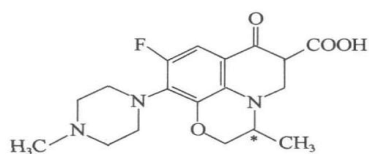
收稿日期: 2007-07-10

基金项目: 国家自然科学基金国际合作重点课题(20610103); 科技部国际科技合作项目(2006DFA91130)

第一作者: 男,1983 年生,硕士生

*通讯联系人

E-mail: shaobingch@sina.com



1.2 样品处理

取 2L 水样于玻璃容器中,用盐酸调节 pH 为 3,待过 WCX 固相萃取柱(6 mL,150 mg)。WCX 固相萃取柱依次用 6 mL 甲醇、6 mL pH = 3 的超纯水活化。上样时,用质量分数为 0.5% 甲酸的甲醇水($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=10:90$)溶液 2 mL 进行淋洗,吹干。用 6 mL 甲醇洗脱,氮气吹干。用流动相定容至 1 mL,待上机分析。

1.3 氧氟沙星的检测

Waters2695 高效液相色谱仪,Waters 公司(美国);Waters2475 荧光检测器;Waters Empower 软件系统;WCX 固相萃取柱,6 mL,150 mg;手性柱为大赛路(CHIRALCEL OD-H)手性柱,5 μm ,0.46 cm \times 25 cm,DaiceI 公司(日本)。流动相为正己烷及不同比例的醇类添加剂。高效液相色谱测试的过程中,流速 1.0 mL/min,柱温 40 $^{\circ}\text{C}$,进样体积 20 μL ,激发波长 278 nm,发射波长 465 nm。

用乙醇配成不同浓度的标准溶液,将乙醇、正己

烷和乙酸配成所需比例($V_{\text{正己烷}}:V_{\text{乙醇}}:V_{\text{乙酸}}=80:20:0.5$)超声脱气。

2 结果与讨论

2.1 流动相组成和流速对手性分离的影响

CHIRALCEL OD-H 手性色谱柱属于以硅胶为载体、纤维素氨基甲酸酯为手性固定相的正相色谱柱,因此含有少量醇(乙醇和异丙醇)和体积分数为 0.5% 乙酸的 正己烷常用作流动相分离手性化合物。

本文首先比较了不同比例的正己烷-乙醇-0.5% 乙酸(体积分数)体系对氧氟沙星手性分离的影响。结果表明(表 1 中样品 1~5),当正己烷和乙醇的体积比为 80:20 时,对映体的分离度达到最佳(为 0.98)。随着乙醇含量增加,流动相洗脱强度增加,各化合物保留因子降低,分离因子变化不大。

分离度(R)、分离因子(α)、理论塔板数(N)和相邻两峰的保留因子的平均值(K)的关系如下:

$$R = \frac{(\alpha - 1) KN^{1/2}}{4(K + 1)}$$

根据上式,在 N 、不变的情况下, K 降低,则 R 将降低。

表 1 不同条件下氧氟沙星的手性分离效果

Table 1 Effect of varying conditions on the chiral separation of ofloxacin

试样编号	流速/ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	$V_{\text{正己烷}}$	$V_{\text{乙醇}}$	$V_{\text{乙酸}}$	t_1	t_2	K_1	K_2	R	
1	1.0	90	10	0.5	17.934	21.058	5.76	7.66	1.33	0.97
2	1.0	80	20	0.5	14.035	17.857	5.21	6.90	1.33	0.98
3	1.0	75	25	0.5	12.763	17.500	4.64	6.73	1.45	0.88
4	1.0	70	30	0.5	8.495	10.402	2.72	3.55	1.31	0.74
5	1.0	60	40	0.5	5.772	6.899	1.49	1.98	1.33	0.60
6	1.2	80	20	0.5	14.035	17.857	5.21	6.90	1.33	0.98
7	1.2	80	20	0.4	14.484	18.199	5.50	7.17	1.30	0.94
8	1.2	80	20	0.3	14.287	17.880	5.32	6.92	1.30	0.92
9	1.2	80	20	0.2	12.965	16.070	4.72	6.09	1.29	0.84
10	1.2	80	20	0.5	14.035	17.857	5.21	6.90	1.33	0.98
11	1.2	80	20	0.5	14.035	17.857	5.21	6.90	1.33	0.98
12	1.0	80	20	0.5	17.685	23.917	5.24	7.45	1.42	1.02
13	0.9	80	20	0.5	19.933	26.908	5.33	7.55	1.42	1.02
14	0.7	80	20	0.5	25.383	34.303	5.29	7.50	1.42	1.01

K 为保留因子

由于氧氟沙星的 $pK_{\text{a}1} = 5.97$,因此在流动相中加入乙酸以改善色谱分离的峰形。在流速为 1.2

mL/min、 $V_{\text{正己烷}}:V_{\text{乙醇}}$ 为 80:20 的条件下,考察不同浓度的乙酸对手性分离的影响。由于该色谱柱要

求的流动相中乙酸的体积分数最多不能超过 0.5%,因此,本文分别比较体积分数为 0.2、0.3、0.4、和 0.5%的乙酸浓度。结果表明(表 1 中样品 6~样品 10),当在乙酸含量为 0.5%时,分离度最好。

在利用 CHIRALCEL OD-H 进行手性分离时,醇的种类常常影响分离,由于甲醇在正己烷中的溶解度很小,本文比较了异丙醇-正己烷-0.5%乙酸(体积分数)和乙醇-正己烷-0.5%乙酸(体积分数)体系对氧氟沙星分离的影响。实验结果表明,正己烷-异丙醇-0.5%乙酸体系(体积分数),无论怎么样改变流动相的比例都不能使氧氟沙星得到手性分离,而乙醇-正己烷-0.5%乙酸(体积分数)体系则能通过优化其比例使氧氟沙星得到较好分离。这主要由于较高分子量醇的使用降低了其与修饰的纤维素固定相的氢键相互作用,溶剂洗脱强度增加,从而使手性氧氟沙星保留降低,分离度下降。手性分离标准色谱图如图 1 所示。

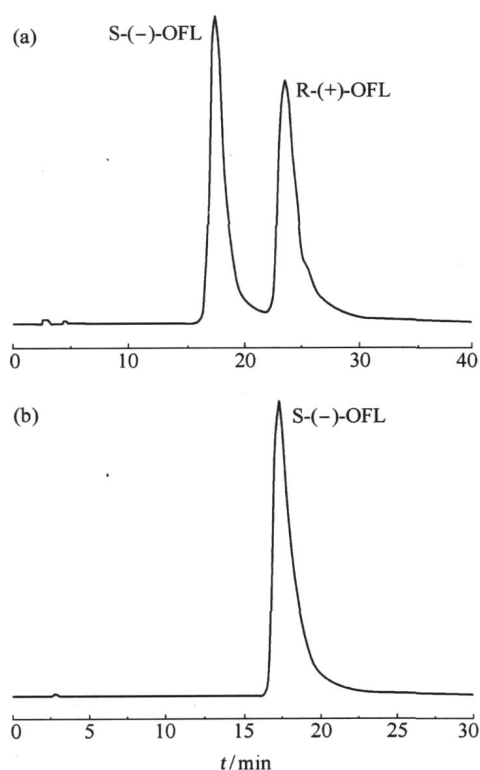


图 1 外消旋氧氟沙星(a)和左氧氟沙星(b)标准溶液手性分离色谱图

Fig. 1 Chromatograms of chiral separation of standard ofloxacin (a) and standard S(-)-ofloxacin (b)

在流动相组成优化的条件下($V_{\text{正己烷}}:V_{\text{乙醇}}:V_{\text{乙酸}}=80:20:0.5$),进一步研究流速对其手性分离的影响。

结果表明(表 1 中样品 11~样品 14),流速对保留时间影响很大,流速的变化对分离因子的变化几乎没有影响。在分离度没有差别的前提下,该实验选择流速为 1.0 mL/min,这样可以使目标化合物的保留时间缩短,且分离效果不受影响。

2.2 氧氟沙星的检测值与理论值的线性关系

配制不同浓度的氧氟沙星标准溶液,以峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标,绘制标准曲线。结果表明,左氧氟沙星在 0.25~5 $\mu\text{g/mL}$ 内呈现良好的线性关系,回归方程为 $Y = 617495 - 190695$, $r^2 = 0.9997$;右氧氟沙星在 0.25~5 $\mu\text{g/mL}$ 也呈现良好的线性关系,回归方程为 $Y = 671041 - 189362$, $r^2 = 0.9997$ 。

2.3 检出限及定量限

由于氧氟沙星广泛存在于各种污水中,因此,难于筛选出空白水样进行定量限和检出限测定。因此,本研究通过测定实际样品(图 2)中氧氟沙星对映体的浓度来计算这两种化合物的检出限(LOD)和定量限(LOQ)。其中,LOD 按信噪比为 3 计算,左氧氟沙星的最低检出限为 0.28 $\mu\text{g/L}$,右氧氟沙星的最低检出限为 0.10 $\mu\text{g/L}$;LOQ 按信噪比为 10 计算,测得左氧氟沙星的最低定量限为 0.36 $\mu\text{g/L}$,右氧氟沙星的最低定量限为 0.21 $\mu\text{g/L}$,能够满足实际样品中痕量氧氟沙星的检测。

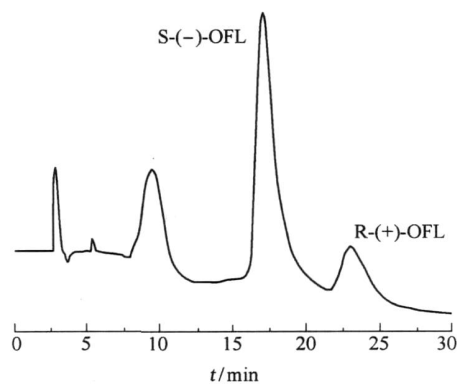


图 2 实际水样中氧氟沙星手性分离色谱图
Fig. 2 Chromatograms of chiral separation of ofloxacin in water

2.4 回收率分析

在某城市污水处理厂的出水中添加 3、5 $\mu\text{g/mL}$ 两组浓度水平的氧氟沙星标准溶液,测得回收率见表 2。左旋和右旋的氧氟沙星回收率在不同添加浓度的回收率均高于 85%,相对标准偏差小于 8%。

表 2 氧氟沙星标准添加回收率

Table 2 Recovery of the standard ofloxacin

分析物	添加/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	平行样品数	平均 回收率/ %	相对标准 偏差/ %
左氧氟沙星	1.5	3	90.1	5.2
	2.5	3	88.6	6.4
右氧氟沙星	1.5	3	87.6	4.8
	2.5	3	85.4	7.6

参考文献:

- [1] 范柏, 袁雯玮, 杉井笃, 等. 手性 HPLC 拆分氧氟沙星对映体[J]. 中国药学杂志, 1998, 33: 693 - 695.
- [2] 叶巧旦. 用手性拆分法测定氧氟沙星中左氟沙星含量[J]. 现代实用医学, 2004, 16: 93 - 94.
- [3] Zeng S, Zhong J, Pan L, et al. High-performance liquid chromatography separation and quantitation of ofloxacin enantiomers in rat microsomes[J]. Journal of Chromatography B, 1999, 728: 151 - 155.
- [4] Nakata H, Kannan K, Jones P, et al. Determination of fluoroquinolone antibiotics in wastewater effluents by liquid chromatography-mass spectrometry and fluorescence detection[J]. Chemosphere, 2005, 58: 759 - 766.
- [5] Yan Hongyuan, Row K H. Rapid chiral separation and impurity determination of levofloxacin by ligand-exchange chromatography. Analytica Chimica Acta, 2007, 584: 160 - 165.
- [6] Lehr K H, Damm P. Quantification of the enantiomers of ofloxacin in biological fluids by High-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography, 1988, 425: 153 - 161.
- [7] Grellet J, Ba B, Saux M C. High-performance liquid chromatographic separation of fluoroquinolone enantiomers: A review [J]. J Biochem Biophys Methods, 2002, 54: 221 - 233.

Analysis of ofloxacin enantiomers in sewage by high performance liquid chromatography

SUN XiaoJie^{1,2} SHAO Bing² DONG HuiRu¹ HU Jian Ying³

(1. School of Science, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029; 2. Beijing Center for Disease control and Prevention, Beijing 100013; 3. College of Urban and Environment, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: A comprehensive method has been developed for the analysis of ofloxacin enantiomers in sewage by high performance liquid chromatography coupled with a fluorescence detector. Chiral separation was performed on a CHIRALCEL OD-H column using *n*-hexane-ethanol-acetic acid as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min. The ofloxacin enantiomers were extracted by a weak cation ion exchange resin (WCX) and eluted with methanol, resulting in ofloxacin recoveries generally above 85%. Good linearities were achieved in the range of 0.25 - 5.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for R-ofloxacin and S-ofloxacin ($r^2 = 0.9997$). The limits of quantitation (LOQ) were estimated to be about 0.36 $\mu\text{g}/\text{L}$ for S-ofloxacin and 0.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for R-ofloxacin. An actual sample was determined quantitatively using the above method.

Key words: high performance liquid chromatography; chiral separation; ofloxacin enantiomers