

丸剂中非法添加环丙沙星的快速检测方法研究

白洁^{1,2}, 刘阳^{3*}, 刘静³, 袁松³, 张涛⁴, 朱雪妍⁴, 杨平荣^{2*}

1. 兰州大学, 甘肃 兰州 730000

2. 甘肃省药品检验研究院, 甘肃 兰州 730000

3. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629

4. 广西壮族自治区食品药品检验所, 广西 南宁 530021

摘要: 目的 建立一种丸剂中非法添加环丙沙星的快速检测方法。方法 通过¹⁹F-核磁共振定量(¹⁹F-qNMR)法对添加入当归苦参丸中的环丙沙星进行检测,以4,4'-二氟二苯甲酮为内标,以氘代DMSO为溶剂,采集 δ -120.3处环丙沙星信号和 δ -104.8处内标信号面积,计算环丙沙星的含量。结果 以环丙沙星和内标信号面积比为纵坐标,环丙沙星和内标质量比为横坐标,得到线性回归方程为: $Y=3.384 1X+0.114 8$, $R^2=0.992$,环丙沙星在5~30 mmol/L具有良好的线性,检出限为 7.798×10^{-2} mg/mL,定量限为0.260 mg/mL。建立的¹⁹F-qNMR法精密度、重复性、稳定性、加样回收率均符合检测要求。结论 所建立的¹⁹F-qNMR法样品制备简单,检测时间短,灵敏度高,适合对丸剂中非法添加的环丙沙星进行含量测定。

关键词: ¹⁹F核磁共振定量技术; 环丙沙星; 非法添加; 4,4'-二氟二苯甲酮

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2020)06-1075-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.06.016

A rapid detection method for illegal addition of ciprofloxacin in pills

BAI Jie^{1,2}, LIU Yang³, LIU Jing³, YUAN Song³, ZHANG Tao⁴, ZHU Xueyan⁴, YANG Pingrong²

1. Lan Zhou University, Lanzhou 730000, China

2. Gansu Institute for Drug Control, Lanzhou 730000, China

3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China

4. Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China

Abstract: Objective To establish a rapid detection method for illegal addition of ciprofloxacin in pills. **Methods** The qualitative examination of the presence of illegally added ciprofloxacin in the pill was conducted by the ¹⁹F-quantitative nuclear magnetic resonance (¹⁹F-qNMR) method. 4,4'-difluorobenzophenone as an internal standard and DMSO-d₆ as the solvent were used in ¹⁹F-qNMR. The ciprofloxacin content was calculated by comparing the response signal (δ -120.3) of sample and internal standard (δ -104.8). **Results** Taking the area ratio of ciprofloxacin and internal standard signal as ordinate and the mass ratio of ciprofloxacin and internal standard as abscissa, the linear regression equation was: $Y = 3.384 1X + 0.114 8$, $R^2 > 0.99$. This method had a good linearity in the range of 5—30 mmol/L. The detection limit was 7.798×10^{-2} mg/mL and the limit of quantitation was 0.260 mg/mL. The precision, repeatability, stability and recovery rate of ¹⁹F-qNMR method meet the requirements of detection. The mass fraction of ciprofloxacin was 83.94%, RSD was 0.54%, and the results were accurate. **Conclusion** This method requires short detection time and simple sample preparation, has high sensitivity. ¹⁹F-qNMR is suitable for the content determination of ciprofloxacin illegally added in pills.

Key words: ¹⁹F-quantitative NMR; ciprofloxacin; illegally added drugs; 4,4'-difluorobenzophenone

环丙沙星是抗生素类药物,是广泛使用的第三代喹诺酮类抗菌药物之一,属广谱抗菌药,杀菌效

果好,其杀菌原理为干扰细菌的DNA旋转酶的正常代谢^[1]。喹诺酮类抗菌药物有广谱抗菌性、口服效

收稿日期: 2019-11-20

基金项目: 甘肃省科技重大专项(17ZD2FA009); 广西自治区第五批特聘专家支持

第一作者: 白洁 Tel: 15293184729 E-mail: baij16@lzu.edu.com

*通信作者: 刘阳 Tel: (010)53851571 E-mail: liuyang1819@126.com

杨平荣 Tel: (0931)7822960 E-mail: 504760772@qq.com

果好、外用无刺激等特点,所以偶有被不法商家添加到具有相应疗效的中药制剂中,用以提高药品短期疗效^[2]。文献资料显示,环丙沙星很可能引发过敏性休克、精神异常等不良反应。同时,长期服用喹诺酮类药物会造成肝肾功能损害,还可能造成中枢神经系统损害^[2-3]。中药制剂中非法添加环丙沙星,隐瞒药剂的真实成分含量,对患者的健康造成潜在威胁,严重时可能危及患者生命。所以,对于中药制剂中非法添加药物检查方法的研究应该得到重视。目前,对于环丙沙星非法添加常用的检测方法有高效液相色谱(HPLC)、液相色谱-质谱(HPLC-MS)联用等方法^[4-6]。这些方法前处理过程相对复杂,实验时间较长,不适用于环丙沙星快速检测。相比较而言,核磁共振法的前处理简单,实验时间短且灵敏度高,适用于环丙沙星的快速检测。考虑到环丙沙星结构中含有氟原子,故研究用¹⁹F-核磁共振定量(¹⁹F-qNMR)法对丸剂中非法添加环丙沙星进行检测。

最常用的qNMR方法为¹H-qNMR,但是这种方法易受干扰,定量信号选择较难。尤其是在制剂等复杂样品中,由于辅料等干扰,几乎无法进行。对于含氟化合物而言,¹⁹F-NMR的检测灵敏度高,谱图简单,化学位移的范围广,很少出现样品信号重叠,内标物质和样品定量信号容易选择,检测时不受氘代试剂的使用限制,可在任何溶液体系下进行探讨。对于阳性样品,可以用¹⁹F-NMR法进行定性实验,也可以用¹⁹F-qNMR法进行定量实验。所以,在含氟药物的含量测定方面,¹⁹F-qNMR技术有特有的优势^[7-8]。本研究采用¹⁹F-qNMR技术建立测定丸剂中非法添加的环丙沙星含量的方法。

1 材料

1.1 仪器

Bruker Ascend 600型核磁共振仪(瑞士布鲁克公司);5 mm PABBO探头及Topspin3.2试验控制及数据处理软件;Mettler Toledo XP205电子天平。

1.2 样品及主要试剂

环丙沙星(批号130451-201203,质量分数84.2%,中国食品药品检定研究院);氘代DMSO(批号STBJ0941,质量分数99.85%,Sigma);4,4'-二氟二苯甲酮(批号H7H4B-ND,内标,质量分数99.0%,TCI chemicals);当归苦参丸(市售,规格:每100粒重10 g)。

2 方法与结果

2.1 样品溶液的制备

精密称取环丙沙星样品和内标物质适量,加入5 mL量瓶中,用氘代DMSO溶解并定容至刻度,取0.7 mL转入5 mm核磁管中备用。

2.2 实验条件及方法

采用zgig脉冲序列在恒温(25 °C)下获取¹⁹F-NMR图谱。具体试验参数设置如下:谱宽(SW) δ 50,射频中心频率(O1P) δ -113,采样点数(TD) 131 072,采样时间(AQ) 2.36 s,弛豫时间(D1) 15 s,采样次数(NS) 16,空扫次数(DS) 4,增益(RG) 101。

2.3 图谱测定结果

如图1所示,¹⁹F-NMR图谱直观简单,容易选择内标和样品定量信号,方便含量测定。

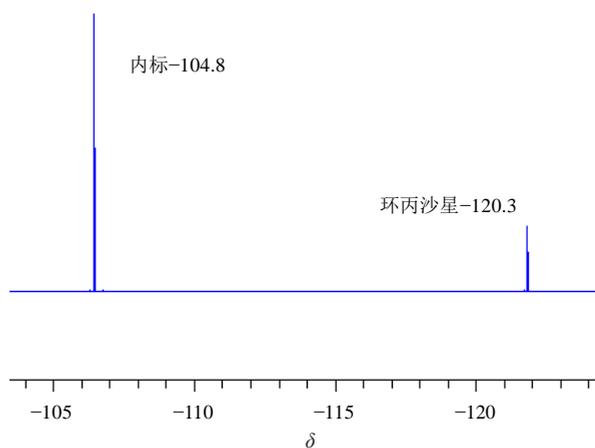


图1 环丙沙星与内标的¹⁹F-NMR核磁响应信号
Fig. 1 ¹⁹F-NMR signals of ciprofloxacin and internal standard

2.4 线性与范围

按“2.1”项下配制方法,分别精密称取环丙沙星和4,4'-二氟二苯甲酮适量,使待测样品浓度约为30、20、15、10、5 mmol/L,内标浓度约为20 mmol/L,按“2.2”项下试验条件测定¹⁹F-qNMR谱,记录响应信号面积,以 δ -120.3处环丙沙星信号和 δ -104.8处内标信号面积比为纵坐标,环丙沙星和内标质量比为横坐标,进行线性回归,回归方程为: $Y=3.384 1X+0.114 8$, $R^2=0.992$ 。证明环丙沙星在5~30 mmol/L线性关系良好。

2.5 进样精密度

使用“2.4”中配制的环丙沙星样品及内标物质浓度分别约为30、20 mmol/L的溶液,连续测定5次,记录积分面积,计算环丙沙星和内标信号面积比值,其RSD=0.85% ($n=5$),证明方法的精密

度较好。

2.6 重复性

按照“2.1”项下方法,平行配制5份样品溶液(环丙沙星样品及内标物质浓度分别约为30、20 mmol/L),按“2.2”项下条件进行测定,计算环丙沙星的平均含量,RSD为1.46%。取样品1图谱重复积分5次,计算 δ -120.3处和 δ -104.8处内标信号面积比值,RSD为0.85%。实验表明,结果的重复性较好。

2.7 稳定性

按照“2.1”项下方法配置1份样品溶液(环丙沙星样品及内标物质浓度分别约为30、20 mmol/L),分别在0、24 h进行测定,计算样品中环丙沙星的含量,含量分别为81.9%和81.8%,表明供试品溶液室温放置24 h稳定。

2.8 检出限和定量限

在丸剂粉末样品中添加低浓度环丙沙星和内标物质,以信噪比 $S/N=3$ 时对应的质量浓度为方法的检出限(LOD),以信噪比 $S/N=10$ 时对应的质量浓度为其定量限(LOQ),环丙沙星的检出限为 7.798×10^{-2} mg/mL,定量限为0.260 mg/mL。

2.9 加样回收率

将当归苦参丸1 g研碎,置入5 mL量瓶中,精密称取环丙沙星约10 mg和内标物质约4 mg,加入5 mL量瓶,振荡,将环丙沙星和内标物质与丸剂碎末混匀,用氘代DMSO定容至刻度,超声10 min,离心,上层清液转入5 mm核磁管中备用。

按照上述方法,平行配制5份样品溶液,根据“2.2”项的条件步骤进行测定,采集 δ -120.3处和 δ -104.8处内标信号面积,按下式计算检出的环丙沙星量。

$$m_s = \frac{(A_s/n_s) \times M_s \times m_r \times P_r}{(A_r/n_r) \times M_r \times P_s}$$

A_s 为环丙沙星的信号面积; n_s 为环丙沙星的氟原子数(1); M_s 为环丙沙星的相对分子质量(331.34); A_r 为内标信号面积; n_r 为内标中包含的氟原子数(2); M_r 为内标物质的相对分子质量(218.20); m_s 为称取环丙沙星的质量; m_r 为称取的内标物质的质量; P_r 为内标的质量百分含量(99.0%); P_s 为环丙沙星的质量百分含量(84.2%)。

回收率结果见1。环丙沙星的平均加样回收率为83.9%,RSD%为1.46%,说明该方法可以准确的检出加入丸剂中的环丙沙星。

3 讨论

3.1 氢谱与氟谱比较

qNMR既可以进行定性实验也可以做定量实

表1 丸剂中环丙沙星的回收率

Table 1 Recovery of ciprofloxacin in pills

加入量/mg	测得量/mg	加样回收率/%
10.262	8.577	83.58
9.791	8.367	85.46
9.453	7.767	82.16
10.466	8.856	84.61
10.015	8.404	83.91

验,与其他实验方法相比,qNMR不需要对照品,不破坏样品结构,前处理简单且缩短了实验时间。在2000年时,国际化学测量委员会(Comité Consultatif pour la Quantité de Matière, CCQM)定义qNMR为基本比例测定方法^[9]。由于其广泛的应用,qNMR也收录在《中国药典》2010版附录中^[10]。

核磁共振氢谱是核磁共振图谱中使用最为广泛的一种。氢谱具有适用范围广,灵敏度高,实验时间短等特点。资料表明,在单一化合物的测定中,氢谱的测定结果准确,精密性、重复性和回收率都很好^[11-13]。但在中药制剂的化合物含量测定中,氢谱可检测的成分过多,造成图谱杂乱,无法确定内标信号和样品定量信号。相对氢谱而言,氟谱的可检测成分少,更适合中药制剂中化合物的定性定量实验,但氟谱只适用于含氟化合物。在实验中,应该结合实验目的,合理的选择使用的核磁共振谱图。

3.2 仪器参数

O1P、SW和NS等参数的设置将影响实验图谱的呈现和最终结果,NS与D1共同决定实验时间。NS不够得到的含量测定结果误差较大,NS过多则实验时间变长增加无效时间。结合文献资料,最终选择NS为16,既能保证实验结果的准确性又控制了实验时间。因为¹⁹F谱的范围较宽的特点,当样品与内标物质的响应频率距离中心频率较远的时候,图谱又可以有严重的畸变,加大相位校正的难度,严重时可能无法完成相位校正^[14]。本实验中的样品信号和内标信号分别出现在 δ -120.3和 δ -104.8处,当不更改O1P和SW时,图谱显示如图2。将O1P设置为 δ -113,SW设置为50后,图谱显示如图3。对比可知,更改O1P和SW可以保证图谱完整清晰的显现,更适合数据分析。

3.3 内标化合物的选择

内标化合物的选择一般要符合以下条件:易溶于所用溶剂、具有化学惰性、不与样品发生反应且

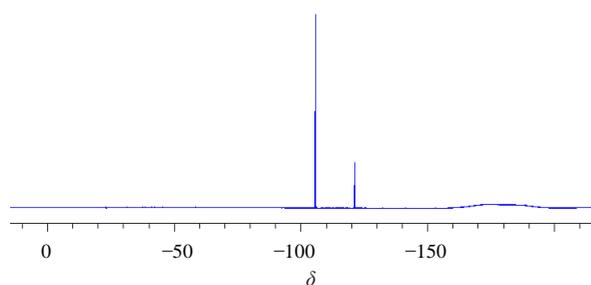


图2 更改O1P和SW前的¹⁹F-NMR谱图
Fig. 2 ¹⁹F-NMR before changing O1P and SW

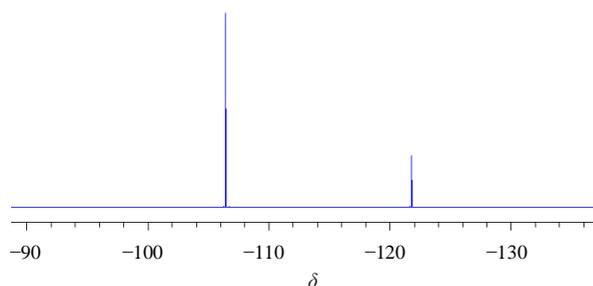


图3 更改O1P和SW后的¹⁹F-NMR谱图
Fig. 3 ¹⁹F-NMR after changing O1P and SW

与样品信号分离良好。选择与样品信号半信号宽相近的内标更能保证积分结果的准确性。在¹⁹F-NMR试验中,由于氟谱范围比较宽(通常为 δ -200~100),2种物质的氟谱响应信号重叠的情况很少出现,所以¹⁹F核磁共振定量试验中内标的选择范围十分广泛^[7,14]。4,4'-二氟二苯甲酮的结构中含氟,化学性质稳定,不与样品反应且半信号宽相近,故选择4,4'-二氟二苯甲酮做为内标化合物。

3.4 结论

目前,一般选择仪器分析法对化合物进行含量测定实验,常用的实验方法有HPLC、GC、红外光谱、紫外光谱、质谱和各种仪器联用等。这些方法的特点是准确、结果可靠,缺点是方法建立过程烦琐,且需提供对照品,对待测样品纯度要求高、样品预处理过程复杂等。故常用于已知化合物的分析,其应用也受到一些限制。

qNMR技术无需待测物对照品、样品预处理步骤简单、测定快速准确、专属性强、不破坏样品等特点弥补了传统定量方法的缺陷,现已应用在化学、食品、农业以及军事领域。最近几年,qNMR技术在药学领域的发展很快,已在越来越多的环节中应用^[15]。¹⁹F-qNMR法具备qNMR技术的优点,缺点是只适用于含氟化合物。目前含氟药物在抗肿瘤、抗感染、心血管系统以及呼吸、神经系统等方面应用广泛,故¹⁹F-qNMR也具有较广泛的应用范围。本方法的实际应用主要是定性与定量两个方面。首先,

该方法可以准确检测出对照品中环丙沙星的含量,可用于对照品的标定;第二,该方法可以用于中药丸剂中非法添加的环丙沙星的检测与定量,前期处理简单,实验耗时短;第三,该方法可以扩展出不同剂型中环丙沙星的定性定量方法,值得后续研究。

参考文献

- [1] 方建萍. 环丙沙星不良反应回顾性分析 [J]. 中国处方药, 2017, 15(6): 55-56.
- [2] 郭宇鹏, 潘军. 中成药中非法添加10种喹诺酮类药物的LC-MS/MS检测方法研究 [J]. 中国药师, 2015, 18(12): 2162-2164.
- [3] 范铭. 环丙沙星致不良反应213例文献分析 [J]. 中国药房, 2017, 28(6): 780-782.
- [4] 张航俊, 周芷锦, 侯轩, 等. HPLC-MS/MS检测双黄连注射液中非法添加13种喹诺酮类药物的研究 [J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(12): 59-64.
- [5] 温家欣, 陈林, 赖宇红, 等. 高效液相色谱法同时快速测定凉茶中11种非法添加化学药物 [J]. 分析测试学报, 2016, 35(3): 285-291.
- [6] 方忠意, 班付国, 周红霞, 等. 氟苯尼考粉中非法添加四种喹诺酮类药物的HPLC检测方法研究 [J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(3): 34-37.
- [7] 刘阳, 魏宁漪, 张琪, 等. ¹⁹F核磁共振定量技术测定酒石酸吉米格列汀倍半水合物含量 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(7): 1197-1199.
- [8] 杨百勤, 孔二丽, 薛满迪, 等. 采用核磁共振氟谱定性与定量分析盐酸氟西汀 [J]. 药学报, 2012, 47(5): 630-633.
- [9] Holzgrabe U, Deubner R, Schollmayer C, et al. Quantitative NMR spectroscopy-applications in drug analysis [J]. Pharm Biomed Anal, 2005, 38(5): 806-812.
- [10] 张芬芬, 蒋孟虹, 沈文斌, 等. 定量核磁共振(QNMR)技术及其在药学领域的应用进展 [J]. 南京师范大学学报(工程技术版), 2014, 14(2): 8-18.
- [11] 杜章斌, 滕英来, 汪勇, 等. 核磁共振氢谱法测定卵磷脂、溶血磷脂和甘油磷脂酰胆碱含量 [J]. 中国油脂, 2015, 40(3): 83-86.
- [12] 卢爱民, 蒋红梅, 吕波, 等. 核磁共振氢谱内标法测定饮料中咖啡因含量 [J]. 南京农业大学学报, 2014, 37(6): 119-124.
- [13] 蒋文, 苏敏, 陈双全, 等. 核磁共振氢谱内标法测定茛地普隆的含量 [J]. 分析化学, 2008, 36(3): 385-388.
- [14] 刘阳, 魏宁漪, 岳瑞齐, 等. 新型¹⁹F核磁共振定量技术测定氟哌利多含量 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(16): 1960-1962.
- [15] 于小波, 沈文斌, 相秉仁, 等. 定量核磁共振技术及其在药学领域中的应用进展 [J]. 药学进展, 2010, 34(1): 17-23.