

# 新型手性 HPCE 整体柱拆分氧氟沙星

沈静茹<sup>1</sup> 蔡薇<sup>1</sup> 余学红<sup>2</sup> 王伟<sup>1</sup> 张祎<sup>1</sup>

(1 中南民族大学 化学与材料科学学院 分析化学国家民委重点实验室; 2 中南民族大学 校医院 武汉 430074)

**摘要** 采用双-(6-氧-间羧基苯磺酰基)- $\beta$ -环糊精手性 HPCE 整体柱对药物氧氟沙星手性拆分,在高效毛细管电泳仪上,考察了缓冲液浓度、pH 值、分离电压、进样量对分离度的影响。结果表明:在 pH 4.0,浓度为 50 mmol/L 的 Tris-磷酸缓冲液中进样 20 s,工作电压 25 kV,检测波长 254 nm 条件下,氧氟沙星对映体得到基线分离,分离度达到 7.72。氧氟沙星对照品浓度在  $(2 \sim 6) \times 10^{-9}$  g/L,前峰峰高与浓度的线性相关系数  $r = 0.9804$ ,后峰峰面积与浓度的线性相关系数  $r = 0.9872$ 。

**关键词** 手性 HPCE 整体柱; 双-(6-氧-间羧基苯磺酰基)- $\beta$ -环糊精; 氧氟沙星; 手性拆分

中图分类号 O657.8 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2013)01-0012-04

## The New Chiral Monolithic HPCE Column for Resolution of Ofloxacin

Shen Jingru<sup>1</sup>, Cai Wei<sup>1</sup>, Yu Xuehong<sup>2</sup>, Wang Wei<sup>1</sup>, Zhang Yi<sup>1</sup>

(1 Key Laboratory of Analytical Chemistry of the State Ethnic Affairs Commission, College of Chemistry and Materials Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China; 2 University Hospital, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

**Abstract** To separate ofloxacin enantiomers on bis-(6-oxy-m-carboxyl-phenylsulfonyl)- $\beta$ -cyclodextrin chiral monolithic HPCE column, the effects of buffer concentration, pH, separation voltage, injection volume of separation were discussed. The results showed that under the optimal conditions (pH 4.0, 50 mmol/L Tris-phosphate buffer, 20 s injection time, 25 kV separation voltage, 254 nm detection wavelength), the baseline separation of ofloxacin enantiomers was achieved, with the resolution  $R_s$  of 7.72. The linear range of racemate concentration was  $(2 \sim 6) \times 10^{-9}$  g/L, the linear relationship coefficients ( $r$ ) for the first peak height was 0.9804 and the second peak areas was 0.9872.

**Keywords** chiral HPCE monolithic column; bis-(6-oxy-m-carboxyl-phenylsulfonyl)- $\beta$ -cyclodextrin; ofloxacin; chiral separation

氧氟沙星是一种喹诺酮类广谱抗菌药,为 DNA 螺旋酶抑制剂,主要通过选择性抑制细菌 DNA 回旋酶的活性,阻碍细菌 DNA 的合成,达到杀菌的目的。药品氧氟沙星是其左旋和右旋异构体的消旋体化合物,其中左旋光学异构体的抗菌活性较右旋体强<sup>[1]</sup>。目前,在高效毛细管电泳(HPCE)中用 $\beta$ -环糊精(CD)及其衍生物作为手性拆分氧氟沙星的主要

方法是手性添加剂法。如 Khaldun M. Al Azzam<sup>[2]</sup>采用硫酸基- $\beta$ -CD 手性添加剂法使氧氟沙星对映体得到基线分离,分离度  $R_s$  达 5.45; 马骞<sup>[3]</sup>等分别采用 $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD (羟丙基- $\beta$ -CD) 和 DM- $\beta$ -CD (二甲基- $\beta$ -环糊精)对氧氟沙星对映体进行了拆分,结果 $\beta$ -CD 不能分离氧氟沙星,HP- $\beta$ -CD 分离效果较差且分析时间较长,DM- $\beta$ -CD 可使氧氟沙星达到基线分

收稿日期 2012-10-23

作者简介 沈静茹(1966-),女,教授,研究方向:手性物质分离分析, E-mail: 985630456@qq.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(21275165)

离. Li Yingjie<sup>[4]</sup>用 Asp- $\beta$ -CD、NH<sub>2</sub>- $\beta$ -CD、HP- $\beta$ -CD 以聚合物手性整体形式聚合到以甲基丙烯酸缩水甘油酯及乙烯二甲基丙烯酸酯为单体制备的整体柱上,成功实现了几种外消旋体中对映异构体的分离及几种常见氨基酸的分离; Tian Yun<sup>[5]</sup>用新型的  $\beta$ -CD 衍生物 HPCE 整体柱成功分离了布洛芬和萘普生; Koide Takashi<sup>[6]</sup>用手性冠醚键合的整体柱分离了主要的氨基化合物对映体.

本文首次采用新型  $\beta$ -CD 衍生物手性 HPCE 整体柱,即选用双-(6-氧-间羧基苯磺酰基)  $\beta$ -CD(简称  $\beta$ -CD-M<sub>1</sub>) 将其作为固定相中单体制备 HPCE 整体柱.在高效毛细管电泳仪上分离手性药物氧氟沙星对映体,分离度  $R_s$  可达 7.72,与文献 [2] 中硫酸基- $\beta$ -CD 衍生物比多了苯环的  $\pi$ -电子的影响和间位羧基的作用.构建的手性环境与氧氟沙星对映异构体之间的相互作用位点相对较丰富,故而达到更优分离效果,为分离氧氟沙星对映异构体提供了新的手性 HPCE 整体柱拆分方法.

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器和试剂

高效毛细管电泳仪( CL1020 型,北京彩陆科学仪器有限公司,中国科学院研究生院应用化学所) 酸度计( pHS-3C 型,上海伟业仪器仪表厂) 融硅石英毛细管( 75  $\mu$ m,有效长度 55 cm,河北永年光纤厂), 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜( 上海市新亚净化仪器厂).

三羟甲基氨基甲烷( Tris,上海山浦化工有限公司) 磷酸( 天津市科密欧化学试剂有限公司) 盐酸( 信阳市化学试剂厂) 氧氟沙星片( 广州白云山制药有限公司) 氧氟沙星对照品( 含量 98.8%,中国药品生物制品检定所) 超纯水( 美国 Molecular 超纯水机) 双-(6-氧-间羧基苯磺酰基)  $\beta$ -环糊精<sup>[7]</sup> 自行合成,其他试剂均为分析纯.

### 1.2 药品前处理

将氧氟沙星片溶于水中,用超纯水稀释,配置成不同浓度,氧氟沙星对照品,用超纯水配置成  $10^{-9}$  g/L, Tris-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液按实验需要配置成不同浓度和 pH. 所有溶液均经 0.22  $\mu$ m 的微孔滤膜过滤.

### 1.3 HPCE 整体柱分析前处理

HPCE 手性整体柱在每次运行之前用 Tris-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液冲洗 1 h,采用注射器压力进样 20 s,分离电压为 25 kV,检测波长为 254 nm,温度 20 $^{\circ}$ C.

## 2 结果与讨论

### 2.1 缓冲液 pH 值对分离的影响

在  $\beta$ -CD-M<sub>1</sub> 衍生物 HPCE 整体柱上,检测波长 254 nm,工作电压 25 kV,  $10^{-8}$  g/L 氧氟沙星进样 20 s, 20 $^{\circ}$ C 的电泳条件下,固定 Tris-磷酸总浓度为 50 mmol/L,通过改变溶液中磷酸的量来改变溶液的 pH 值,使之分别为 3.5、3.7、4.0、4.5、5.0、5.5,分离结果见图 1. 如图 1 所示,氧氟沙星对映体的分离度均大于 7,表明缓冲液 pH 在上述范围内变化对分离度的影响较小,在此酸度范围内整体柱内 pH 对电渗流的影响变小,缓冲液 pH 为 5.0 时氧氟沙星对映体虽可分离( $R_s = 7.47$ ),但基线不稳; pH 大于 5.0 时,氧氟沙星的洗脱强度减弱;缓冲液 pH 在 3.5 ~ 5.0 时,氧氟沙星对映体均达到基线分离;缓冲液 pH 小于 3.5 (pH 2.8 ~ 3.4) 时,毛细管整体柱柔性变弱,易断; pH 为 4.0 时分离度最大且峰对称性、洗脱强度、基线均较理想: 故选择缓冲液为 pH 4.0.

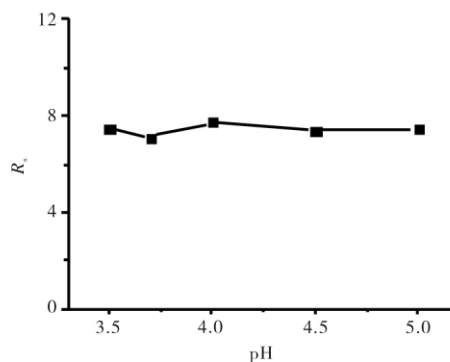


图1 不同 pH 对氧氟沙星对映体分离度的影响

Fig.1 Effect of different pH buffer on the separation of ofloxacin

### 2.2 缓冲液浓度对分离的影响

在  $\beta$ -CD-M<sub>1</sub> 衍生物 HPCE 整体柱上,检测波长 254 nm,工作电压 25 kV,进样  $10^{-8}$  g/L 氧氟沙星 20 s, Tris-磷酸缓冲液 pH 4.0, 20 $^{\circ}$ C 的电泳条件下,改变缓冲液 Tris-磷酸的浓度分别为 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 mmol/L,结果见表 1. 如表 1 所示,缓冲液浓度为 10 mmol/L 或 80 mmol/L 均未有物质洗出,在 20 ~ 70 mmol/L 范围内,氧氟沙星两对映体均可达到基线分离.缓冲液浓度较低,基线出现漂移,且有杂峰出现;缓冲液浓度较高时,基线同样出现漂移和杂峰,且缓冲液对氧氟沙星的洗脱强度较小;缓冲液浓度为 50 mmol/L 时,峰形较为对称,基线平稳,缓冲液对氧氟沙星的洗脱强度较大: 故选择缓冲液浓度为 50 mmol/L 为最适浓度.

表1 不同缓冲液浓度对氧氟沙星对映体分离的影响

Tab.1 Effect of different buffer concentrations on the separation of ofloxacin enantioseparation

缓冲液浓度 $c / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	保留时间 $t_R / \text{min}$		峰面积 $A / (\text{mV} \cdot \text{s})$		峰高 $h / \text{mV}$		分离度 $R_s$
	前锋	后峰	前锋	后峰	前锋	后峰	
20	6.744	8.435	979223	1530653	69.000	75.011	3.67
30	2.842	5.005	216536	761029	36.299	64.029	9.11
40	5.612	7.716	16071	48969	2.958	9.318	14.80
50	4.259	6.007	1203298	1649909	154.145	179.111	7.72
60	2.886	4.753	19134	85503	4.120	19.301	15.47
70	4.113	5.667	24170	60516	4.595	15.690	12.81

### 2.3 不同电压对分离的影响

在 $\beta$ -CD-M1 衍生物 HPCE 整体柱上,检测波长 254 nm,进样  $10^{-8}$  g/L 氧氟沙星 20 s, Tris-磷酸缓冲液 50 mmol/L, pH 4.0, 20°C 的电泳条件下,分别考察 5, 10, 15, 20, 25, 28 kV 时,氧氟沙星对映体的分离状况,结果见图 2. 如图 2 所示,改变分离电

压对电迁移和电渗流有一定的影响,增加电压有利于加快分离速度. 随着电压的逐渐增大保留时间逐渐减小,当电压达到 28 kV 时两峰重叠,无法分离;而电压为 25kV 时峰形对称,两峰响应相当,且洗脱强度均较大,总的分离分析时间最短,达到基线分离;故选择电压为 25 kV 为最适电压.

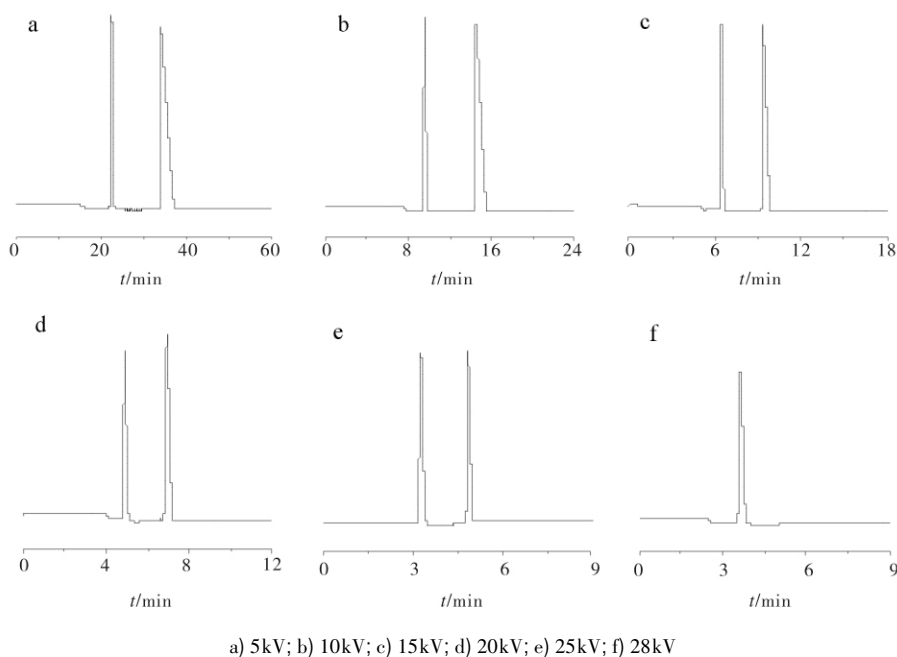


图2 不同电压下的氧氟沙星对映体分离图

Fig.2 Effect of voltages on the separation of ofloxacin enantioseparation

### 2.4 方法评价

#### 2.4.1 对照品线性范围

配置氧氟沙星对照品溶液,浓度分别为:  $2 \times 10^{-9}$ ,  $3 \times 10^{-9}$ ,  $4 \times 10^{-9}$ ,  $5 \times 10^{-9}$ ,  $6 \times 10^{-9}$  g/L, 在 $\beta$ -CD-M1 为单体制备的手性 HPCE 整体柱上,分离电压 25 kV, Tris- $\text{H}_3\text{PO}_4$  50 mmol/L, pH 4.0, 检测波长 254 nm, 进样 20 s 的条件下,考察了氧氟沙星标准品的线性范围,氧氟沙星前峰峰高与浓度线性方程为  $y = 26598.78 + 4.817 \times 10^{-13}x$ ,  $r = 0.9804$ , 前峰峰面积与浓度线性方程为  $y = 202662.36 + 3.746 \times 10^{-14}x$ ,  $r = 0.9779$ ; 后峰峰高与浓度的线性方程为

$y = 36914.14 + 4.652 \times 10^{-13}x$ ,  $r = 0.9614$ , 后峰峰面积与浓度的线性方程为  $y = 139120 + 3.48092 \times 10^{-14}x$ ,  $r = 0.9872$ .

#### 2.4.2 精密度测定

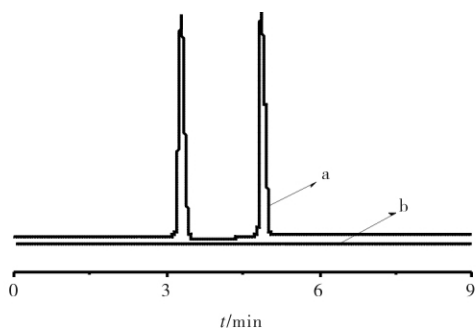
将浓度为  $2 \times 10^{-9}$  g/L 的氧氟沙星对照品,在最佳分离条件下,重复进样 7 次测定两组份的保留时间  $t_R$ 、峰高  $h$ 、峰面积  $A$  结果见表 2. 由表 2 可知,前峰各电泳参数的 RSD 为 5.37% ~ 12.54%, 而后峰的各参数 RSD 为 4.22% ~ 5.18%, 说明后峰各参数重现性优于前峰.

表 2 氧氟沙星对照品精密测定结果( $n=7$ )Tab.2 Results of ofloxacin eniramine standard precision determination( $n=7$ )

对照品	保留时间 $t/\text{min}$		峰面积 $A/(\text{mv} \cdot \text{s})$		峰高 $h/\text{mv}$	
	$t_{R1}$	$t_{R2}$	$A_1$	$A_2$		
1	2.674	3.888	841391	1171914	123289	166655
2	3.145	4.332	923919	1242221	146338	172892
3	2.968	4.087	946316	1295460	135185	160728
4	2.929	4.063	721354	1259988	132853	154884
5	2.643	3.832	1062491	1219634	132629	167568
6	2.975	4.002	826107	1231309	133573	149347
7	2.977	4.188	820922	1135203	141157	155666
$X \pm S$	$2.902 \pm 0.18$	$4.056 \pm 0.17$	$877500 \pm 110030.00$	$1222247 \pm 53824.61$	$135003 \pm 7256.11$	$161106 \pm 8348.50$
RSD/%	6.20	4.22	12.54	4.40	5.37	5.18

### 2.4.3 对比实验

在 50mmol/L Tris- $\text{H}_3\text{PO}_4$  缓冲液, pH 值为 4.0, 进样量为  $10^{-9}$  g/L, 进样时间 20s 的氧氟沙星标准品 20℃ 的电泳条件下, 在  $\beta$ -CD-M1 衍生物 HPCE 整体柱和空管柱中拆分氧氟沙星对映体, 结果如图 3 所示. 由图 3 可见, 手性 HPCE 整体柱能够将氧氟沙星基线分离(图 3a), 洗脱强度比较大, 分离时间比较短, 并且分离度达到 7.72, 空的毛细管柱不能将其分离(图 3b).



a) 整体柱; b) 空柱

图 3 氧氟沙星对映体在不同毛细管柱下的分离

Fig.3 Separation of Ofloxacin with different columns

## 3 结语

以双-(6-氧-间羧基苯磺酰基)- $\beta$ -CD 手性 HPCE 整体柱拆分了手性药物氧氟沙星, 并研究了缓冲液的浓度、酸度、分离电压对分离情况的影响, 建立了新的高效毛细管电泳手性整体柱拆分氧氟沙星的方法. 在 pH 4.0, 浓度为 50 mmol/L 的 Tris-磷酸缓冲液中进行进样时间 20 s, 工作电压 25 kV, 检测波长 254 nm 条件下, 氧氟沙星对映体得到基线分离, 分离度达到 7.72. 氧氟沙星对照品浓度在  $(2 \sim 6) \times 10^{-9}$  g/L 范围内, 峰高、峰面积与浓度成线性关系, 相关系数  $r$  最高可达 0.9872. 经 7 次相同条件的精密密度实验确定, 前峰相应信号重现性低于后峰, 后峰

峰高、峰面积的 RSD 分别为 5.18% 和 4.40%.

## 参 考 文 献

- [1] David M L, Trevor G W and Kevin P S. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes [J]. J Antimicrob Chemother, 2001, 48 (sup 1): 87-102.
- [2] Khaldun M A, Bahruddin S, Rohana A, et al. Enantioselective analysis of ofloxacin and ornidazole in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis using single chiral selector and computational calculation of their inclusion complexes [J]. Anal Chim Acta, 2010, 674(2): 249-255.
- [3] 马 骞, 赵明丽, 王柱命, 等. 氧氟沙星片剂和滴眼液中氧氟沙星对映体的毛细管电泳拆分及定量分析 [J]. 分析测试技术与仪器, 2003, 9(2): 84-87.
- [4] Li Yingjie, Song Chunhui, Zhang Lingyi, et al. Fabrication and evaluation of chiral monolithic column modified by  $\beta$ -Cyclodextrin derivatives [J]. Talanta, 2010, 80(3): 1378-1384.
- [5] Tian Y, Zhong C, Fu E, et al. Novel-cyclodextrin derivative functionalized polymethacrylate-based monolithic columns for enantioselective separation of ibuprofen and naproxen enantiomers in capillary electrochromatography [J]. J Chromatography A, 2009, 1216(6): 1000-1007.
- [6] Koide T, Ueno K. Enantiomeric separations of primary amino compounds by capillary electrochromatography with monolithic chiral stationary phases of chiral crown ether-bonded negatively charged polyacrylamide gels [J]. J Chromatography A, 2001, 909(2): 305-315.
- [7] 丁志刚, 刘学群, 詹国庆, 等.  $\beta$ -CD 与间羧基苯磺酰基及  $\text{Fe}^{3+}$  构筑氧化还原酶 [J]. 化学学报, 1995, 53: 578-582.