

甲氧苄氨嘧啶(TMP)的电分析化学研究 及其在药物分析中的应用

汪乃兴 谢振贵

(复旦大学化学系, 上海)

提要 本文用微分脉冲极谱法和循环伏安法研究了甲氧苄氨嘧啶(TMP)的电化学行为, 选择了最佳的测定条件, TMP 的检出限可达 2.0×10^{-7} mol/L, 方法灵敏度较高; 并研制了 TMP-PVC 膜离子选择性电极, 试验了该电极的各种特性及 Nernst 响应范围。本法应用于制剂中 TMP 的测定, 选择性好, 干扰少, 毋须分离, 方法简便快速。选择电极在人尿和血清的介质中测定, 也能获得良好的结果。

关键词 脉冲极谱; 循环伏安法; TMP

甲氧苄氨嘧啶(TMP)是一种广谱抗菌药。近年来有关测定 TMP 的文献报道很多。如非水滴定法⁽¹⁾、紫外分光光度法⁽²⁾、荧光分析法⁽³⁾、高效液相色谱法⁽⁴⁾等。这些方法用来测定样品时, 一般多需经过萃取分离步骤, 操作不甚简便。电化学分析研究 TMP 主要是脉冲极谱法^(5,6), 测定限为 5×10^{-5} mol/L。用选择性电极测定 TMP 的方法, 迄今尚未见报道。

我们用脉冲极谱法研究了 TMP 在不同介质、pH 值等实验条件下的电化学行为, 找出了 TMP 测定的最佳条件, 检出限可达 2.0×10^{-7} mol/L, 峰电流与浓度的线性范围为 $5.5 \times 10^{-7} \sim 5.5 \times 10^{-6}$ mol/L。本文还用循环伏安法研究了 TMP 在悬汞电极上的氧化还原性质, 认为 TMP 在电极上的反应是不可逆的。本文还研制了 TMP 的 PVC 膜选择性电极, 试验了该电极的各种特性及 Nernst 响应范围。该方法的测定下限可达 4.6×10^{-6} mol/L, Nernst 响应范围在 $4.4 \times 10^{-5} \sim 2.2 \times 10^{-3}$ mol/L。该电极的选择性好、干扰少、响应迅速、性能稳定。应用于 TMP 片剂和复方 SMZ 等制剂毋须经过分离步骤即可直接测定, 方法简便快速, 测定结果用脉冲极谱法对照比较, 结果基本一致, 并符合药物的标示量。TMP 电极在人尿和血清介质中的线性结果良好。

实验部分

一. 仪器与试剂

F-78 型脉冲极谱仪(复旦大学电子仪器厂); 多功能电化学测量仪(自制。美国 Bioanalytical Systems 已有生产); pH S-2 型酸度计(上海第二分析仪器厂)。

脉冲极谱三电极体系: 工作电极为滴汞电极; 参比电极为 Ag-AgCl 电极; 对极为玻璃态石墨电极。循环伏安法的三电极体系除工作电极为悬汞电极外, 其它均同脉冲极谱法。电位法中使用的参比电极为 217 型甘汞电极(上海电光器件厂)。

TMP 标准溶液: 称取 0.9825 g TMP(上海信谊药厂提供), 溶于 1 mol/L HAc 并定容

为 250 ml, 为标准贮备液(1.218×10^{-2} mol/L)。

其余试剂均为分析纯。水为重蒸馏水

二. 实验方法

(一) 脉冲极谱法

在电解池中加入选定的底液和一定量的 TMP 试液, 用水稀释至 20 ml, 通入氮气 5 min, 从 -1.00 V 扫描到 -1.50 V (其它实验仪器参数: 电压扫描速度 5 mV/s, 脉冲振幅 50 mV, 脉冲间隔 2 s), 记录微分脉冲极谱曲线(见图 1)。

(二) 选择电极法

1. 活性物质制备

取 25 ml 0.01 mol/L TMP, 在搅拌下加至 40 ml 0.01 mol/L 四苯硼钠液液中, 静置过夜, 用 3 号砂芯漏斗抽滤, 沉淀用重蒸馏水洗涤 3 次, 在 P_2O_5 干燥器中真空干燥 3~4 h, 由此配制一定浓度的邻苯二甲酸二丁酯液液。

2. 聚氯乙烯(PVC)膜电报的制备

称取 7.0 mg TMP—四苯硼盐, 加邻苯二甲酸二丁酯 0.69 g, 搅拌溶解, 加 10% PVC 四氢呋喃溶液 3.0 g, 混匀, 置入直径 60 mm 的培养皿中, 待液剂蒸发后, 用打孔器割取膜片, 贴于 PVC 管端, 注入内参比溶液, 插入 Ag—AgCl 内参比电极, 在重蒸馏水中活化 24 h 以上。

3. 测量方法

测量电池 PVC 膜电极/试液/0.1 mol/L KCl/饱和甘汞电极

内参比电极为 Ag—AgCl 电极, 内参比溶液为 0.01 mol/L KCl—0.001 mol/L TMP。在测量前, 将电极浸入重蒸馏水中, 使电极洗至稳定电位, 再测量溶液电位。

结 果

一. 脉冲极谱法

(一) 选择介质的组成及浓度

试验了 H_2SO_4 , HCl, $HClO_4$, HAc, KCl 等一系列介质, 结果表明在各种底液中 TMP 均能出现脉冲极谱峰, 峰电流受介质组成的影响不大。在介质浓度分别为 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05 和 0.01 mol/L 时, 在中性介质(如 KCl)中, 峰电流和峰电位均不受介质浓度的影响, 而对于酸性介质, 峰电流大小亦不随介质浓度而改变, 但峰电位则随氢离子浓度的增加而正移。

(二) pH 的影响

试验了 HAc—NaAc 和 HCl—柠檬酸钠两种缓冲体系, 实验表明 pH 在 3.9~5.0, TMP 的脉冲极谱峰形较好, 当 $pH < 3.9$ 时, 随着 pH 值的降低, H^+ 提前放电, 掩盖了 TMP 的波峰, 而 $pH > 5.0$ 时, 峰形越来越差, 且随着 pH 值的增大, TMP 的溶解度亦随之降低, 故实验选取 pH 4.0 为测定介质。

(三) 工作曲线、检出限及重现性

在 0.04 mol/L HAc—NaAc 缓冲液液 (pH 4) 中, TMP 浓度在 $5.5 \times 10^{-7} \sim 5.5 \times 10^{-6}$ mol/L 范围内与峰电流有良好的线性关系, TMP 的检出限为 2.0×10^{-7} mol/L。

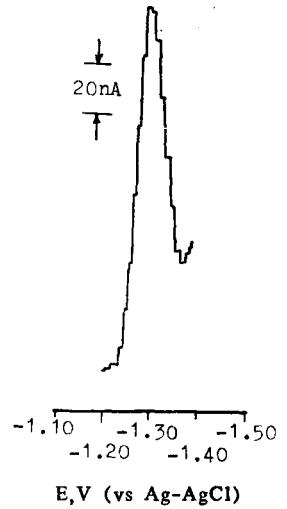


Fig 1. Differential pulse polarographic waves for trimethoprim (2.8×10^{-4} mol/L) in 0.04 mol/L HAc NaAc (pH 4.0).

在 0.04 mol/L HAc—NaAc 缓冲溶液介质中,以 2.2×10^{-5} mol/L 的 TMP 溶液为试验溶液,按上述步骤重复实验六次,得出的峰高变异系数为 2.4%,重现性良好。

(四) 电极反应的可逆性

TMP 浓度为 1.1×10^{-4} mol/L, 介质为 0.04 mol/L HAc—NaAc(pH 4) 缓冲溶液时,分别取下列不同的电压扫描速度 (mV/s): 50, 100, 500, 1003, 5120, 10240, 得到循环伏安曲线见图 2。从图 2 可知: 1. TMP 在电极上的反应只有一个还原峰, 而无氧化峰, 表明

TMP 的电极反应为不可逆性。2. 峰电位随扫描速度的增加而负移, 这是由于电极反应速度跟不上扫描速度而引起的。3. 峰电流随扫描速度 (V) 增加而增加, 这是因为循环伏安法中峰电流大小与 $V^{1/2}$ 成正比。

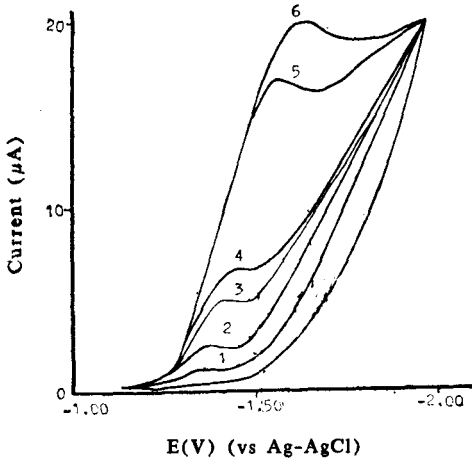


Fig 2. Cyclic voltammogram of 1.0 mmol/L trimethoprim, mV/s: 1. 50; 2. 100; 3. 500; 4. 1003; 5. 5120; 6. 10240.

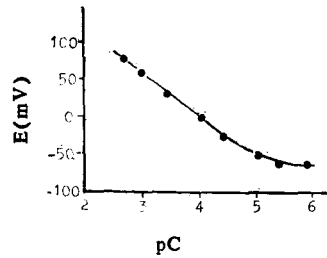


Fig 3. Response curve of the electrode.

二. 选择电极法

(一) 电极的响应曲线

膜的活性物质浓度为 10^{-2} mol/L (下同) 的 PVC 膜电极的响应曲线如图 3。电极的 Nernst 响应区为 $4.4 \times 10^{-5} \sim 2.2 \times 10^{-3}$ mol/L, 平均斜率 57.3 mV/级差, 电极的检出下限为 4.6×10^{-6} mol/L。

(二) pH 值的影响

TMP 浓度为 1.1×10^{-4} mol/L, 用 HAc—NaAc 缓冲体系, 在 pH 为 1.09~5.20 范围内, 电极电位值随 pH 值的变化影响不太大, 见表 1。

Tab 1. Influence of pH on the response of electrode

pH	1.09	1.99	3.09	3.95	4.76	5.20
E(mV)	-53.2	-54.2	-54.6	-56.0	-57.2	-57.0

(三) 响应时间

电极同上。在 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ mol/L TMP 液液中, 响应时间不超过 5 s; 在 10^{-6} mol/L TMP 溶液中, 响应时间不超过 30 s; 在 10^{-7} mol/L TMP 溶液中, 响应时间不超过 2 min。

(四) 内参比溶液对电极的影响

内参比液液分别是 10^{-2} mol/L KCl, 10^{-1} mol/L KCl, 10^{-2} mol/L KCl— 10^{-3} mol/L TMP, 10^{-2} mol/L KCl— 10^{-2} mol/L TMP, 比较在不同参比溶液中, 电极的 Nernst 响应区

间、斜率及检测下限(表 2)。结果表明, 随着内参比溶液中 KCl 和 TMP 溶液浓度的增加, 对同一 TMP 测定浓度所测得电位随之变负, 但它们的 Nernst 响应区间、直线斜率和检测限无明显变化。本实验选取 10^{-2} mol/L KCl— 10^{-3} mol/L TMP 为内参比溶液。

Tab 2. Effect of internal reference solution on electrode function

Electrode function	Internal reference solution			
	10^{-2} mol/L KCl	10^{-2} mol/L KCl— 10^{-3} mol/L TMP	10^{-1} mol/L TMP	10^{-1} mol/L KCl— 10^{-3} mol/L TMP
Linearity range (mol/L)	$8.8 \times 10^{-6} \sim 2.2 \times 10^{-5}$	$4.4 \times 10^{-6} \sim 2.2 \times 10^{-5}$	$4.4 \times 10^{-5} \sim 2.2 \times 10^{-3}$	$4.4 \times 10^{-5} \sim 2.2 \times 10^{-3}$
Slope (mV/log C)	56.0	57.2	56.9	57.3
Detection limit (mol/L)	6.0×10^{-6}	4.0×10^{-6}	3.6×10^{-6}	4.6×10^{-6}

(五) 膜浓度对电位的影响

以邻苯二甲酸二丁酯为溶剂和增塑剂, 当活性物质浓度分别为 1.0×10^{-1} , 4.0×10^{-2} , 1.0×10^{-2} , 8.0×10^{-3} mol/L 时, 电极的响应性能无显著变化。

(六) 电极的稳定性

电极同(二), 溶液中 TMP 浓度为 1.2×10^{-4} mol/L, 经过 20 天, 电极电位漂移 4.00 mV, 每天最大漂移不超过 ± 0.70 mV。表明电极稳定性良好。

(七) 电极的选择性

用分别溶液法⁽⁷⁾测定了电极对 20 种干扰物质的选择性系数, 按下式计算:

$$\log K_{ij} = (E_j - E_i) / S - \log a_i - \log a_j / Z_j$$

式中 K_{ij} 为选择性系数; a_i 与 a_j 分别为 TMP 与干扰离子的活度(测量时均用 mol/L 代替, 本文均取 10^{-3} mol/L); Z_j 为干扰离子电荷数; E_i 与 E_j 分别为 TMP 溶液中和干扰物溶液中的电极电位。

结果表明(表 3), 一般常见阳离子与有机物均无明显干扰。

Tab 3. Selectivity coefficients for the electrode

Interferent	pK _{ij}	Interferent	pK _{ij}	Interferent	pK _{ij}
KCl	2.72	Citric acid	3.31	Pyridine	3.32
NaCl	3.22	Malic acid	3.36	Aniline	3.30
KBr	2.81	Tartaric acid	3.28	Ethylamine	3.32
CuSO ₄	2.12	Hydramine hydrochloride	3.45	O-Toluidine	2.93
MnSO ₄	2.33	Hydramine sulfate	3.16	Propylene amide	3.71
Malonic acid	3.19	N-Dimethyl amide	3.82	Sulfamethoxy-diazine	2.98
Acetic acid	3.24				

应 用

一. 制剂中 TMP 的测定

(一) 脉冲极谱法

取 10 片含 TMP 的片剂, 称重, 研细溶于 1 mol/L HAc 中, 定量转入 250 ml 容量瓶, 加 1 mol/L HAc 至刻度, 摇匀后, 吸取清液 0.5 ml, 用重蒸水稀至 25 ml, 吸取此液 0.5 ml 于 20 ml 电解池中, 加入 4.0 ml 0.2 mol/L HAc—NaAc(pH 4.0) 缓冲溶液, 稀释至 20 ml, 通氮除氧后, 自 -1.0 V 起记录脉冲极谱曲线, 然后每次加入 0.1 ml 10^{-3} mol/L TMP 标准溶液, 重复加入四次, 用外推法测得 TMP 含量。六次平行分析结果的变异系数为 3%。

(二) 选择性电极法

同上取上述样品液用直接电位法测定电位, 测得结果与脉冲极谱法对照列于表 4。回收率见表 5。

Tab 4. Assay of trimethoprim pharmaceutical preparations by differential pulse polarography and ion selective electrode

Sample No.	Form	Label claim (mg)	Trimethoprim content found (%)	
			Differential pulse polarography	Ion-selective electrode
TMP (No.1)	Tablet	100	99.4	98.6
TMP (No.2)	Tablet	100	99.4	99.4
SMZ co. (No.1)	Tablet	80	81.1	79.5
SMZ co. (No.2)	Tablet	80	80.3	81.9
SMZ co. (No.3)	Tablet	80	79.5	78.7

Tab 5. The recovery test

Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)
1.92	1.87	97.4
1.92	1.94	101.0
1.92	1.92	100.0
1.92	1.94	101.0

Average recovery 100.3%. Standard deviation 1.8%

二. 人血清存在下 TMP 的测定

取 5 份人血清各 0.2 ml, 分别加入 5.0 ml 0.2 mol/L HAc—NaAc(pH 4.0) 缓冲溶液, 及 10^{-2} mol/L 标准溶液 0.1, 0.2, 1.0, 2.0, 5.0 ml, 用水稀释至 25 ml, 以 TMP—四苯硼盐 PVC 膜电极测定电位, 绘制血清存在下 TMP 的标准曲线, 结果表明在 TMP 浓度为 $4.4 \times 10^{-5} \sim 2.2 \times 10^{-3}$ mol/L 范围内, 线性良好, 直线斜率为 53.7 mV/级差。

三. 尿液存在下 TMP 的测定

电极同上。取 5 份新鲜尿液各 1.0 ml, 同上分别加入 HAc—NaAc 缓冲溶液及标准溶液, 用水稀至 25 ml, 用直接电位法测量电位, 绘制尿液存在下 TMP 的标准曲线, TMP 浓度在 $4.4 \times 10^{-5} \sim 2.2 \times 10^{-3}$ mol/L 范围内有良好的线性关系, 直线斜率为 52.5 mV/级差。

参 考 文 献

1. 中华人民共和国药典. 二部. 1985 年版. 北京: 人民卫生出版社, 1985.
2. 上海医科大学药理学系分析组, 等. 紫外分光光度法测定复方庆大霉素注射液中甲氧苄氨嘧啶含量. 医药工业 1985; 16; 6.
3. Lichtenwalner DM. Rapid assay for determination of trimethoprim and sulfamethoxazole levels in serum by spectrophotometry. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; 16: 579.

4. Hung C T, et al. Determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in serum by reverse phase and ion pair HPLC. *J Liq Chromatogr* 1985; 8:521.
5. Chatten LG, et al. Electrochemical determination of trimethoprim. *Analyst* 1982; 107:1026.
6. Bishop E, et al. Electroanalytical studies of antibacterial and diuretic at rotating disc electrodes of gold and platinum. *Ibid* 1984; 109:913.
7. 姚守拙, 等. 延胡索乙素选择性 PVC 膜电极的研制. *药物分析杂志* 1984; 4:103.

ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY STUDY OF TRIMETHOPRIM AND ITS APPLICATION TO PHARMACEUTICAL ANALYSIS

WANG Nai-Xing and XIE Zhen-Ben

(Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai)

ABSTRACT The electrochemical behaviour of trimethoprim was investigated by differential pulse polarography and cyclic voltammetry. The optimum conditions for the determination of TMP were as follows: The electrolyte was 0.02 mol/L HAc-NaAc (pH 4.0) buffer solution, initial potential -1.00 V(vs.Ag-AgCl), final potential -1.50 V (vs. Ag-AgCl). The calibration graph was linear over the range of TMP concentrations $5.5 \times 10^{-7} \sim 5.5 \times 10^{-6}$ mol/L. The detection limit was 2.0×10^{-7} mol/L.

This paper also reports the construction and performance characteristics of a PVC membrane trimethoprim ion selective electrode. It is based on the use of tetraphenylborate-TMP ion pair complex as the active material. The PVC membrane electrode showed Nernstian response over the trimethoprim concentration range from 4.4×10^{-5} to 2.2×10^{-3} mol/L, with a slope of 57.3 mV/decade, the limit of detection being 4.6×10^{-6} mol/L. The electrode gave fast response, and good reproducibility. The electrode potential drift was less than 4 mV for a duration of twenty days.

The trimethoprim ion selective electrode and differential pulse polarographic methods have been applied to the determination of TMP in pharmaceutical preparations. The electrode can also be used to determine TMP in urine and serum with satisfactory results.

Key words Differential pulse polarography; Cyclic voltammetry; Trimethoprim