

流动注射化学发光法测定诺氟沙星

廖素兰^{1,2}, 谢增鸿^{1*}

1. 福州大学化学系, 福建 福州 350002
2. 南平师范高等专科学校, 福建 南平 353000

摘要 在酸性条件下, Ce(IV)与诺氟沙星(NFLX)能产生弱的化学发光反应, 十二烷基硫酸钠(SDS)对其有较强的增敏作用。据此建立了一种简单、快速、可连续测定诺氟沙星的流动注射化学发光新方法。该法线性范围 $7.78 \times 10^{-8} \sim 5.82 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 检测限(3σ)为 $1.57 \times 10^{-8} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对 $1.94 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的NFLX标准溶液平行测定10次, 相对标准偏差为1.7%。该法成功应用于诺氟沙星胶囊的测定, 还对其机理进行了初步探讨。

主题词 化学发光; 诺氟沙星; 流动注射

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2005)12-1938-05

引言

诺氟沙星(norfloxacin, NFLX), 1-乙基-6-氟-1, 4-二氢-4-氧代-7-(1-哌嗪基)-3-喹啉羧酸, 属第三代氟喹诺酮类抗菌药物。能抑制细菌DNA螺旋酶, 抗菌谱广、高效、副作用小、组织穿透力强^[1]。1980年投放市场, 用于临床。目前国内外已批准用于兽药。在兽医临床和水产养殖中是最重要的抗感染药物之一, 被大量用于治疗、预防和促生长。但药物残留使我国水产动物产品国际声誉降低, 无法参与国际竞争, 影响水产养殖业的持续健康发展。因此药品的质量、用量、安全性、致病菌产生的耐药性, 成了近年来人们关注的焦点。

目前, 用于NFLX的分析方法有FIA-SP法^[2]、荧光法^[3, 4]、分光光度法^[5]、高效液相色谱法^[6, 7]、化学发光法^[8-10]等。荧光法具有灵敏度高的优点, 但荧光法、分光光度法等需要激发光源和分光系统, 设备复杂且产生高的背景信号。而化学发光法具有设备简单、线性范围宽、灵敏度高、快速、可连续测定、重现性好等特点。现有测定诺氟沙星的化学发光方法存在灵敏度不理想, 线性范围窄^[8]或试剂贵, 毒性大^[9]或试剂的制备和测试的方法复杂^[10]等缺陷。

我们研究发现, Ce(IV)与诺氟沙星(NFLX)能产生化学发光反应, 十二烷基硫酸钠(SDS)对该体系有较强的增敏作用。本文详细研究了该体系的反应条件以及共存物质的影响, 据此建立了一种测定诺氟沙星的流动注射化学发光方法。并对其机理进行了初步探讨。方法简便快速, 线性范围

宽, 重现性好, 药品廉价易得, 毒性很小。用本方法可在无任何预处理条件下, 适当稀释样品就可直接测定胶囊中诺氟沙星的含量。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

IFFM-D流动注射发光仪(西安瑞迈电子科技有限公司); UV-1100紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司); 970CRT荧光光谱仪(上海分析仪器总厂)。

诺氟沙星标准溶液($1.62 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$): 准确称取8.1 mg诺氟沙星对照品(中国药品生物制品检定所)用0.005 mol·L⁻¹ H₂SO₄溶液溶解定容至50.0 mL, 置于冰箱保存, 工作液用0.005 mol·L⁻¹硫酸稀释, 避光; 诺氟沙星胶囊(胶囊1, 福建省古田华闽抗生素有限公司, 批号20030504。胶囊2, 广东康美药业股份有限公司, 批号20030501); 十二烷基硫酸钠(SDS)(日本进口分装)溶液0.1 mol·L⁻¹; 硫酸铈(Ce(SO₄)₂·4H₂O)溶液(中国医药(集团)上海化学试剂公司) $1.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (含硫酸1.1 mol·L⁻¹), 使用时用水稀释; 硫酸(上海联合试剂有限公司)1.0 mol·L⁻¹, 实验用水为石英亚沸蒸馏水, 所用试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

如图1所示, 将一定体积的诺氟沙星标准溶液(含一定浓度的SDS)或样品溶液(含一定浓度的SDS)注入到水载流中, 再与酸性硫酸铈混合反应后, 以流动注射发光仪测量体系的化学发光强度 I , 同时测定空白试剂的发光强度 I_0 。其强

收稿日期: 2004-09-02, 修订日期: 2004-12-16

基金项目: 福建省自然科学基金(D0310010)和福建省科技攻关资助项目(2003Y005, 2002Y051)

作者简介: 廖素兰, 1974年生, 福州大学化学系硕士研究生 * 通讯联系人

度差 $\Delta I(I-I_0)$ 与 NFLX 的浓度呈线性关系。

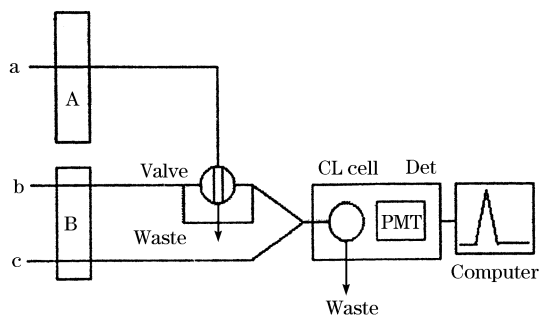


Fig. 1 Schematic diagram of flow injection chemiluminescence analysis

PMT, photomultiplier tube; a, NFLX+SDS;
b, H_2O ; c, $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ (in H_2SO_4)

2 结果与讨论

2.1 化学发光反应动力学曲线

实验表明(见图 2), 该体系的化学发光强度在注射 3 s 内达到最大值, 30 s 后体系发光强度衰减至 0, 该反应是一相对较快的化学发光反应。

2.2 仪器及流路参数的选择

实验证实, 溶液采用图 1 所示的进样方式, 流动注射仪两个泵的速度均为 $60 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 与酸性硫酸铈混合时泵速为 $70 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 聚乙烯管的内径 0.8 mm , 进样管长 10 cm ($50 \mu\text{L}$), 混合池与三通管之间的管长为 16 cm 时, 具有最大的信噪比。

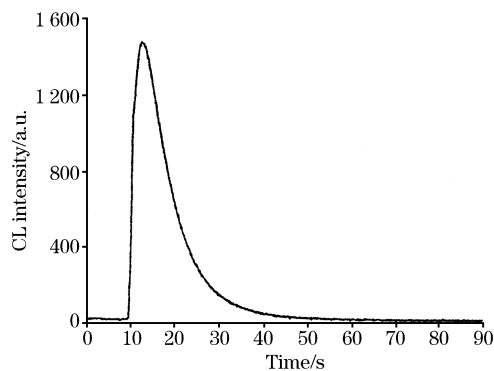


Fig. 2 The kinetic curve of CL reaction

$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (in $0.11 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$); Norfloxacin, $8.0 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ + SDS, $6.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (injection)

2.3 反应条件的选择

2.3.1 硫酸浓度的影响和选择

为了防止 $\text{Ce}(\text{IV})$ 的水解, 在配制 $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 溶液时加入一定量的硫酸。本文考察了 $0.03 \sim 0.50 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内的硫酸浓度对体系化学发光强度的影响。实验结果表明(见图 3), 当硫酸的浓度为 $0.11 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 体系的化学发光强度最大。

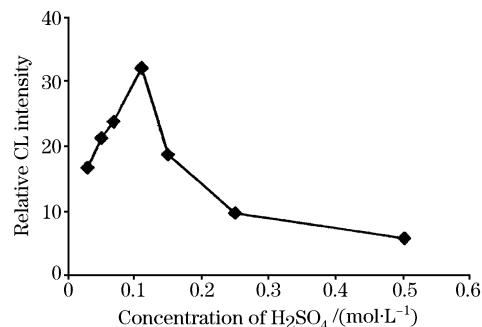


Fig. 3 Effect of concentration of sulphuric acid on the CL intensity

Norfloxacin, $7.8 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$; $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
SDS, $6.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

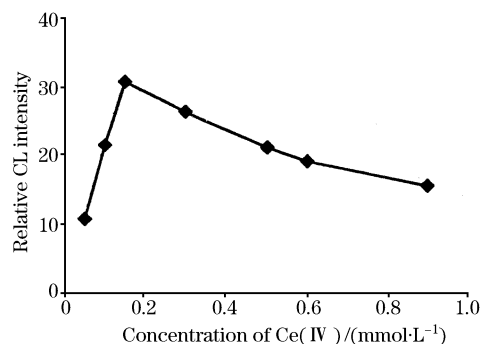


Fig. 4 Effect of concentration of $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ on the CL intensity

Norfloxacin, $7.8 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$; H_2SO_4 , $0.11 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
SDS, $6.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.3.2 $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 浓度的影响和选择

当 $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 浓度太低时, 化学发光信号较弱, 当浓度过高时, $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 溶液会吸收光辐射而导致化学发光信号的减小; 且 $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 是该体系的重要反应物之一, 故其浓度对体系的发光强度影响很大。本文考察了 $5.0 \times 10^{-5} \sim 9.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内的 $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 浓度对体系化学发光强度的影响。实验结果表明(见图 4), 当 $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 浓度为 $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 体系的化学发光强度最大。

2.3.3 表面活性剂 SDS 浓度的影响和选择

$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 与 NFLX 是一化学发光反应。本文考察了 tween-20, tween-40, tween-60 及 SDS 对体系化学发光反应的影响, 发现 tween-20, tween-40 和 tween-60 对该体系的发光强度没影响, SDS 对体系的发光强度有较大的影响。因化学发光反应的可能发光体是以阳离子络合物形式存在, 它被阴离子表面活性剂 SDS 包围, 阻止水对化学发光的猝灭。文献报道^[11], 胶束环境有利于激发态寿命的延长和使发光体系稳定性提高, 提高荧光量子产率。实验也表明 SDS 在该反应体系中对化学发光强度的提高有重大作用。考察了 $1.0 \times 10^{-3} \sim 2.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内的 SDS 浓度对体系化学发光强度的影响。实验结果表明(见图 5), 当 SDS 浓度大于 $6.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 发光强度随 SDS 浓度的变化趋于

平缓, 因此实验中选定 SDS 浓度为 $6.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

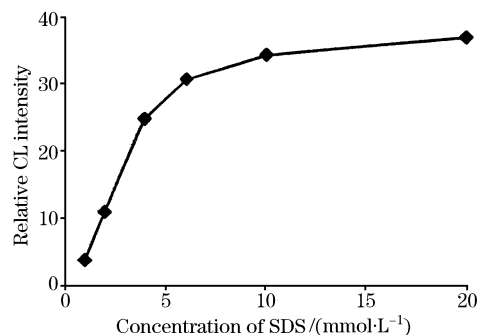


Fig. 5 Effect of concentration of SDS on the CL intensity

Norfloxacin, $7.8 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$; $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$,
 $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (in $0.11 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$)

2.4 工作曲线

在上述最佳条件下, 控制仪器的负高压为 -850 V 时, NFLX 的浓度与化学发光强度在 $7.78 \times 10^{-8} \sim 5.82 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间呈良好的线性关系, 线性方程为 $\Delta I = 32.464 \times 10^6 c(\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) + 1.695$, $R^2 = 0.9977$, 根据 IUPAC 建议 (3σ), 计算得方法的检测限为 $1.57 \times 10^{-8} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。对 $1.94 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 NFLX 标准溶液平行测定 10 次, 相对标准偏差为 1.7%。

2.5 干扰实验

考察了常见的药物赋形剂及生物体中的金属离子对体系发光强度的影响。在上述最佳条件和 NFLX 的浓度为 $3.0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 条件下, 加入的离子或赋形剂的浓度对体系发光强度的影响实验结果如表 1。

Table 1 Tolerance to different substances
in the determination of NFLX ($n=5$)

Species added	Mole ratio ($c_{\text{species}}/c_{\text{NFLX}}$)	The variation of the CL peak height/%
Fe^{3+}	30	-5.65
Ca^{2+}	45	4.86
Na^+	100	-5.66
NH_4^+	50	-5.33
Al^{3+}	150	-8.07
Zn^{2+}	40	-2.16
K^+	100	-6.27
Cu^{2+}	20	-8.04
Ni^{2+}	50	-9.21
Pb^{2+}	40	9.14
Co^{2+}	30	-6.14
乳糖	2 000	-1.09
淀粉	800	-7.04
葡萄糖	800	2.55
糊精	950	7.04

2.6 样品测定

取诺氟沙星胶囊 6 粒, 研磨均匀后, 准确称取相当于 1 粒的药粉, 将其用 $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸溶液充分溶解, 过滤, 洗涤, 于 100 mL 容量瓶中定容, 用 $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的

硫酸溶液适当稀释后, 在最佳实验条件下进行测定, 结果见表 2。

Table 2 Results of determination of NFLX
in capsules ($n=5$)

Sample	Amount/mg		Added /mg	Found /mg	Recovery /%
	Labeled /mg	Found/mg \pm RSD/%			
Capsule 1	100	100.3 ± 2.0	40.0	38.5	96.3
Capsule 2	100	100.1 ± 1.0	40.0	41.3	103.3

3 机理探讨

从荧光光谱图(见图 6)可以看出: 在相同激发波长条件下, $\text{Ce}(\text{IV})$ 和 NFLX 混合液(曲线 3), $\text{Ce}(\text{IV})$, NFLX 和 SDS 混合液的荧光光谱图(曲线 4)均与 $\text{Ce}(\text{III})$ (曲线 1)的荧光光谱图非常相似, 在 NFLX 处(曲线 2)没有较强的荧光发射。 $\text{Ce}(\text{IV})$ 是没有荧光的物质^[12]。因此产生化学发光的物质可能是 $\text{Ce}(\text{III})$ 或 $\text{Ce}(\text{III})$ 与 NFLX 的络合物, 而不可能为 NFLX 的氧化产物。

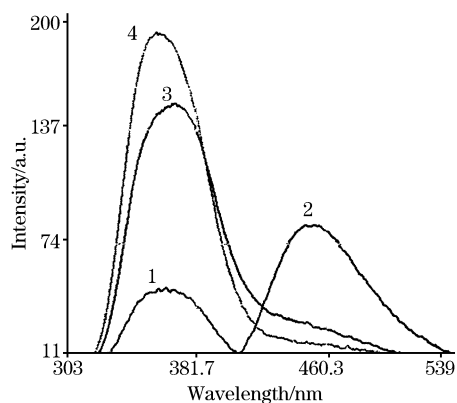


Fig. 6 Fluorescence spectra

1, $\text{Ce}(\text{III})$, $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$;

2, Norfloxacin, $6.3 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\lambda_{\text{em}} = 454 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$;

3, $2 + \text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, $7.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\lambda_{\text{em}} = 362 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$;

4, $3 + \text{SDS}$, $6.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\lambda_{\text{em}} = 356 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$

从 UV 吸收光谱图(见图 7)可以看出: $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 与 NFLX 混合后的紫外光谱(曲线 3)与 NFLX(曲线 2)相似, 只是吸光度减小并发生蓝移, 而没有其他的吸收峰出现。说明在这些物质之间没有络合反应。但是 NFLX 有合适的官能团可与 $\text{Ce}(\text{III})$ 形成络合物。而成为化学发光物质。

从 $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ -NFLX 的化学发光反应动力学曲线(见图 8)和 $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ -NFLX-SDS 的化学发光反应动力学曲线(见图 2)看, 在相同的负高压实验条件下, 加入表面活性剂后, 大大缩短了化学发光达最大强度所需时间, 且化学发光强度提高近 30 倍。这可能与 SDS 胶束和反应物的静电作用

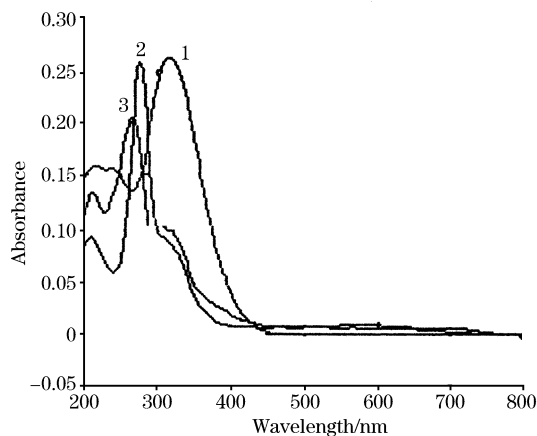


Fig. 7 UV spectra

- 1, $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, $7.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
2, Norfloxacin, $6.3 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 3, 1+2

及胶束疏水作用有关。由于阴离子表面活性剂 SDS 胶束的静电作用,使 $\text{Ce}(\text{IV})$, $\text{Ce}(\text{III})$ 等异电荷离子在 Stern 区浓集。在胶束的憎水环境中, NFLX 可有效地与 $\text{Ce}(\text{IV})$, $\text{Ce}(\text{III})$ 反应生成可能的激发态阳离子或激发中间体阳离子络合物,可有效减少水对发光体的猝灭,延长激发态的寿命,提高发光体系稳定性。此外在小极性环境中,可使生成激发中间体的速率常数加大,并可限制非辐射能量的传递,提高荧光量子产率,改善化学发光反应的速度和激发效率,提高分析方法的灵敏度。

综上所述,可能的化学发光反应机理如下。

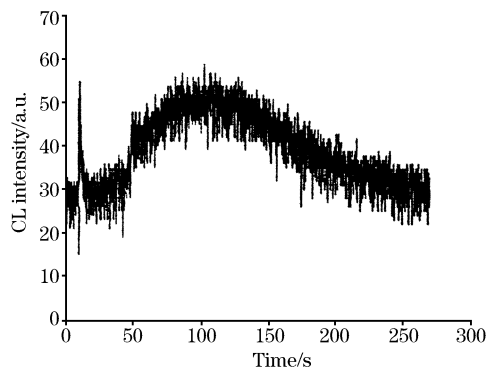
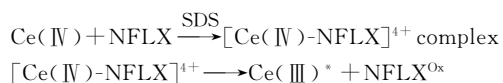
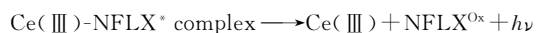
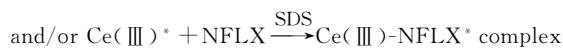
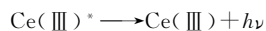


Fig. 8 The kinetic curve of CL reaction

$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (in $0.11 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$);
Norfloxacin, $8.0 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (injection)



(NFLX=norfloxacin; SDS=sodium dodecylsulfate;

Ox=oxidized form; $h\nu$ =light emission)

4 结 论

基于 NFLX 在酸性 $\text{Ce}(\text{IV})$ 溶液产生化学发光反应,发光体可能是中间体 $\text{Ce}(\text{III})$ 与 NFLX 的络合物,SDS 对该体系有较强的增敏作用。

目前,这种方法简单、廉价、快速、低毒,可应用于 NFLX 药剂的测定。若为该方法提供一个色谱前处理技术,可进一步提高该法的选择性,并可望用于其他样品的测定。

参 考 文 献

- [1] Ito A, Hirai K, Inoue M, et al. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1980, 17(2): 103.
- [2] Sultan S M, Suliman F E O. *Analyst*, 1993, 118: 573.
- [3] Vilchez J L, Ballesteros O, Taoufiki J, et al. *Anal. Chim. Acta*, 2001, 444: 279.
- [4] LI Jian-qing, FENG Xiao-hua, DONG Chuan(李建晴, 冯小花, 董川). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2003, 23(2): 311.
- [5] Rahman N, Ahmad Y, Hejaz Azmi SN. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2004, 57(2): 359.
- [6] Mascher H J, Kikuta C. J. *Chromatogr. A*, 1998, 812: 381.
- [7] Wallis S C, Charles B G, Gahan L R. J. *Chromatogr. B*, 1995, 674: 306.
- [8] Rao Y, Tong Y, Zhang X R, et al. *Anal. Lett.*, 2000, 33: 1117.
- [9] Aly F A, Al-Tamimi S A, Alwarthan A A. *Talanta*, 2001, 53: 885.
- [10] LIAN Ning, SUN Chun-yan, ZHAO Hui-chun(连宁, 孙春燕, 赵慧春). *Journal of Analytical Science(分析科学学报)*, 2002, 18(2): 111.
- [11] CHEN Guo-nan, ZHANG Fan(陈国南, 张帆). *Chemiluminescence and Bioluminescence-Theory and Application(化学发光与生物发光——理论及应用)*. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press(福州: 福建科技出版社), 1998. 265.
- [12] Wolkoff A W, Larose R H. *Anal. Chem.*, 1975, 47: 1005.

Determination of Norfloxacin by Flow-Injection Chemiluminescence

LIAO Su-lan^{1, 2}, XIE Zeng-hong^{1*}

1. Department of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China

2. Nanping Teachers College, Nanping 353000, China

Abstract Sodium dodecylsulfate(SDS) can greatly enhance the emission intensity of the weak chemiluminescence reaction of Ce(IV) with norfloxacin(NFLX) in acid medium. Based on this phenomenon, a simple and rapid new method for the continuous determination of norfloxacin was developed. The calibration graph is linear for 7.78×10^{-8} – 5.82×10^{-6} g · mL⁻¹, the detection limit(3σ) is 1.57×10^{-8} g · mL⁻¹, and the relative standard deviation ($n=10$, $c=1.94 \times 10^{-6}$ g · mL⁻¹) is 1.7%. The method was successfully applied to the determination of norfloxacin in capsules. Additionally, the system's mechanism was discussed.

Keywords Chemiluminescence; Norfloxacin; Flow-injection

(Received Sep. 2, 2004; accepted Dec. 16, 2004)

* Corresponding author