

双波长负吸收光谱法测定药物中的吡哌酸

肖双宏, 江虹*

(长江师范学院化学化工学院, 长江师范学院武陵山片区绿色发展协同创新中心, 重庆 408100)

摘要:建立了简便、快速、灵敏的测定药物中吡哌酸的双波长负吸收光谱法。在 pH 6.63 的酸性介质中, 吡哌酸与亮绿反应, 在 500~700 nm 范围内生成具有 2 个较强负吸收峰的二元离子缔合物, 2 个负吸收峰分别位于 578 nm 和 648 nm, 表观摩尔吸光系数(κ)分别为 7.22×10^4 L/(mol·cm) (578 nm) 和 7.81×10^4 L/(mol·cm) (648 nm)。当用双波长叠加法负吸收光谱法测定时, 其表观摩尔吸光系数(κ)可达 1.50×10^5 L/(mol·cm), 吡哌酸的质量浓度在 0~5.5 mg/L 范围内与吸光度绝对值(|A|)呈线性关系, 并服从朗伯-比尔定律。将双波长法用于市售吡哌酸片和胶囊中吡哌酸的测定, 加标回收率和相对标准偏差 RSD($n=5$) 分别为 97.2%~103% 和 2.3%~2.6%。

关键词: 吡哌酸; 显色反应; 吸收光谱; 亮绿

中图分类号: O657.3; R917

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2019)06-0228-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2019.06.049

Determination of pipemidic acid in drugs by dual wavelength negative absorption spectrometry

XIAO Shuang-hong, JIANG Hong*

(Collaborative Innovation Center for Green Development in Wuling Mountain Areas, School of Chemistry and Chemical Engineering, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China)

Abstract: A simple, rapid and sensitive dual wavelength negative absorption spectroscopy for the determination of pipemidic acid in drugs is established. In an acidic media of pH = 6.63, pipemidic acid reacts with brilliant green to form a green binary ion association complexes with two strong negative absorption peaks in the range of 500 to 700 nm. The negative absorption peaks are located at 578 nm and 648 nm, respectively, and their apparent molar absorptivity (κ) are 7.22×10^4 L/(mol·cm) for 578 nm peak and 7.81×10^4 L/(mol·cm) for 648 nm peak, respectively. When the double wavelength superposition negative absorption spectrometry is used for the determination of pipemidic acid, its apparent molar absorption coefficient (κ) can achieve 1.50×10^5 L/(mol·cm). The mass concentration of pipemidic acid in the range of 0~5.5 mg·L⁻¹ is linearly related to the absolute value of absorbance (|A|) and follows Lambert-Beer law. The recoveries and relative standard deviations RSD($n=5$) are 97.2%~103% and 2.3%~2.6%, respectively when the dual wavelength method is applied to determine the content of pipemidic acid in commercially available pipemidic acid tablets and capsules.

Key words: pipemidic acid; chromogenic reaction; absorption spectrum; brilliant green

吡哌酸是一种合成类抗菌药, 主要用于治疗敏感革兰阴性杆菌和葡萄球菌所引起的尿路感染、肠道感染及耳道感染等。若用药不当或过量, 则会引起某些胃肠道的不良反应(如恶心、嗝气、上腹不适、食欲减退等)或头痛、头晕、皮疹、瘙痒等不良症状。为了保障用药质量, 减少药物对患者的副作用, 满足临床急检需要, 对药物中吡哌酸的快速检测方法进行研究显得很有必要。目前, 国内外所报道的对吡哌酸的检测方法主要有液-质联用法^[1-3]、高效液相色谱法^[4-8]及我国药典采用的紫外分光光度法^[9], 也偶有电化学法^[10-11]和荧光法^[12]等的报道。

高效液相色谱法和液-质联用法的前处理工作较为麻烦、费时, 且仪器价格较贵、不易普及、维护成本高。紫外分光光度法的灵敏度和选择性欠佳。笔者利用易于普及的紫外-可见分光光度计, 并用简便、快速、灵敏的双波长负吸收光谱法对药物中吡哌酸进行定量分析。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

紫外-可见分光光度计, U-3010 型, 日本日立公司生产; 精密酸度计, pHs-3C 型, 上海虹益仪器

收稿日期: 2018-09-28; 修回日期: 2019-04-03

基金项目: 重庆市教委科技基金资助项目(KJ1401226); 长江师范学院科技基金资助项目(2018CXX150)

作者简介: 肖双宏(1997-), 女, 本科, 研究方向为分子光谱分析, xiaoshuanghong2018@163.com; 江虹(1956-), 女, 理学学士, 教授, 研究方向为分子光谱分析, 通讯联系人, jianghongch@163.com。

仪表有限公司生产。

亮绿(BLG,上海将来实业股份有限公司生产)溶液: 1.0×10^{-4} mol/L;吡哌酸(PPA,批号:100151-201103,中国食品药品检定研究院生产)标准溶液:称取适量吡哌酸对照品(精确至 ± 0.0001 g),用少量0.010 mol/L HCl溶解后,用水定容,配成303.3 mg/L贮备液,保存于冰箱(4℃)中;取贮备液用水稀释10倍,配成30.33 mg/L操作液;Tris(三羟甲基氨基甲烷)-HCl溶液:取适量Tris(0.20 mol/L)与盐酸(0.10 mol/L)混合,用pH计测定,配成pH 3.0~9.7;水:二次蒸馏水;所有试剂均为分析纯;样品为市售不同厂家的吡哌酸片(1[#])和吡哌酸胶囊(2[#])。

1.2 样品处理

取某厂家生产的吡哌酸片(1[#])6片和吡哌酸胶囊(2[#])5粒,去包衣或胶壳后,将内容物分别置于烧杯中,用0.010 mol/L HCl 10 mL溶解,搅拌,再加适量蒸馏水,搅拌,过滤,滤液用水定容至1000 mL。取前述溶液10 mL,加水定容至1000 mL,摇匀后即配成1[#]和2[#]待测液。

1.3 吸光度A的测定

依次移取1.50 mL pH 6.63 Tris-HCl溶液、3.50 mL 1.00×10^{-3} mol/L亮绿溶液及适量30.33 mg/L吡哌酸标准溶液于10 mL具塞比塞管中,用水定容。10 min后,在U-3010光谱仪上,以试剂空白作参比,利用双波长叠加负吸收光谱法测定体系溶

液的吸光度 $A_{578+648}$ 。

2 结果与讨论

2.1 PPA-BLG的吸收光谱

吡哌酸与亮绿的吸收光谱如图1所示。由图1可以看出,在可见光区,PPA溶液基本无吸收,BLG溶液在弱酸性溶液(pH 6.63)中有1个强吸收峰和1个弱吸收峰,最大吸收波长位于624 nm。当在BLG的弱酸性溶液中加入不同质量浓度的PPA标准溶液后,光谱曲线在500~700 nm范围内呈现2个较大的、吸光强度相当的负吸收峰,分别位于578 nm(蓝移46 nm)和648 nm(红移24 nm)。结果表明,PPA与BLG间确实能够发生反应生成新物质(以阳离子形式存在于溶液中的BLG与以阴离子形式存在于溶液中的PPA以静电引力结合生成二元离子缔合物)。从图1中曲线3~7可以看出,在578 nm和648 nm处,PPA的质量浓度在一定范围内与体系的吸光度绝对值|A|呈线性关系并服从朗伯-比尔定律。故578 nm和648 nm均可选作单波长法的测定波长。由于吸光度的加和性及双波长法具有比单波长法更高灵敏度的特点,当采用双波长叠加负吸收光谱法来测定PPA时,一定质量浓度范围的PPA的质量浓度与体系|A|仍呈线性关系并遵从比尔定律,且双波长法的灵敏度约是单波长法的2倍。故选用双波长法来定量检测PPA。

(上接第227页)

[20] Toshiaki Y, Yasushi N, Koichi H, *et al.* Development of an analytical method for polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee beverages and dark beer using novel high-sensitivity technique of supercritical fluid chromatography/mass spectrometry[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2018, 126(1): 126-130.

[21] Bernal J L, Martín M T, Toribio L. Supercritical fluid chromatography in food analysis[J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1313(20): 24-36.

[22] Bieber S, Greco G, Grosse S, *et al.* RPLC-HILIC and SFC with mass spectrometry: Polarity-extended organic molecule screening in environmental (Water) samples [J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(15): 7907-7914.

[23] Wicker A P, Carlton D Jr, *et al.* On-line supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography-mass spectrometry of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil[J]. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*, 2018, 1086: 82-88.

[24] Zhang Y, Xiao Z, Lv S, *et al.* Simultaneous determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in reclaimed water using solid-phase extraction followed by ultra-performance convergence chromatography with photodiode array detection[J]. *Journal of Separation Science*, 2016, 39(5): 993-999.

[25] 太史剑瑶,程仲芊,凌凤香.超临界流体色谱法测定柴油芳烃含量[J]. *当代化工*, 2014, 43(10): 2199-2202.

[26] Julien C, Agnès L M, Nadège C, *et al.* Ultra-high performance supercritical fluid chromatography hyphenated to atmospheric pressure chemical ionization high resolution mass spectrometry for the characterization of fast pyrolysis bio-oils[J]. *Journal of Chromatography B*, 2018, 1086: 82-88.

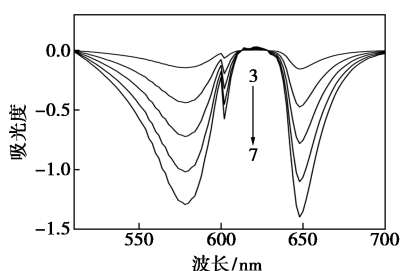
[27] Ratsameepakai W, Hermiman J M, Jenkins T J, *et al.* Evaluation of ultrahigh-performance supercritical fluid chromatography-mass spectrometry as an alternative approach for the analysis of fatty acid methyl esters in aviation turbine fuel[J]. *Energy & Fuels*, 2015, 29(4): 2485-2492.

[28] 杜琳娟,杜珂,曹宏伟,等.废变压器油中氧化成分检测方法研究[J]. *化学研究与应用*, 2016, 28(4): 558-563.

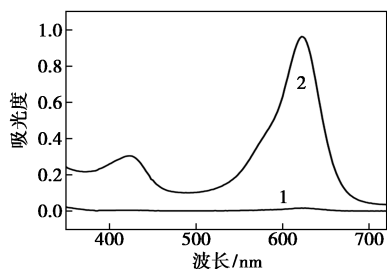
[29] 姜磊.五种偶氮型致敏性分散染料的SFC-UV测定[J]. *印染*, 2016, 42(20): 38-42.

[30] 楼超艳,姜磊,段芬,等.超临界流体色谱-紫外检测法同时测定混纺地毯中8种致敏性分散染料[J]. *色谱*, 2017, 35(4): 453-457.

[31] Chaoyan L, Can W, Kai Z, *et al.* Graphene-coated polystyrene-divinylbenzene dispersive solid-phase extraction coupled with supercritical fluid chromatography for the rapid determination of 10 allergenic disperse dyes in industrial wastewater samples [J]. *Journal of Chromatography A*, 2018, 1550: 45-46. ■



(a) 吡哞酸与亮绿缔合物的吸收光谱



(b) 吡哞酸、亮绿的吸收光谱

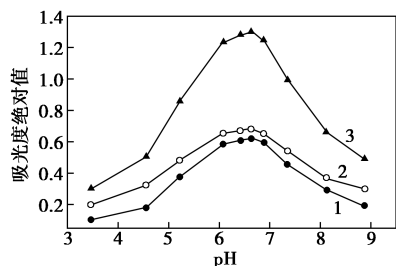
1—3.03 mg/L PPA,水作参比;2— 3.50×10^{-5} mol/L BLG,水作参比;
3~7—0.607、1.82、3.03、4.25、5.46 mg/L PPA— 3.50×10^{-4} mol/L
BLG,试剂空白作参比;pH:6.63

图 1 吡哞酸与亮绿的吸收光谱

2.2 反应条件的选择

2.2.1 酸度及用量

在 PPA 质量浓度为 3.03 mg/L、BLG 浓度为 3.50×10^{-4} mol/L 时,考察了用单波长法和双波长法测定时,不同 pH 对 PPA-BLG 体系吸光度绝对值 |A| 的影响,结果如图 2 所示。由图 2 可以看出,PPA 与 BLG 反应的最适酸度为 pH 6.0~7.0 之间,在此范围外,|A| 均有不同程度降低。曲线还表明,用双波长法测定的灵敏度比单波长法高。继而考察了不同用量的 pH 6.63 Tris-HCl 溶液对体系 |A| 的影响,结果表明,适宜用量为 1.50 mL。故选用 1.50 mL pH 6.63 Tris-HCl 溶液来控制反应的酸度。



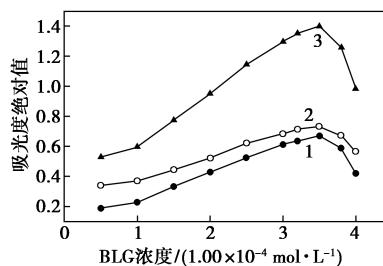
1—578 nm;2—648 nm;3—(578+648) nm

图 2 pH 对体系 |A| 的影响

2.2.2 显色剂的浓度

在 PPA 质量浓度为 3.03 mg/L 及选定的 pH 条件下,考察了用单波长法和双波长法测定时,不同浓

度的显色剂溶液对 PPA-BLG 体系吸光度绝对值 |A| 的影响,结果如图 3 所示。由图 3 可以看出,无论是单波长法还是双波长法,最佳 BLG 浓度为 3.50×10^{-4} mol/L,当大于或小于该值时,|A| 均有不同程度降低。同时,用双波长法测定的灵敏度比单波长法高。故实验选用双波长法进行测定,BLG 的浓度控制在 3.50×10^{-4} mol/L。



1—578 nm;2—648 nm;3—(578+648) nm

图 3 亮绿浓度对体系 |A| 的影响

2.2.3 试剂加入顺序

在 PPA 质量浓度为 3.03 mg/L 及选定的 pH 和 BLG 浓度的条件下,考察了用单波长法和双波长法测定时,各试剂的加入顺序对 PPA-BLG 体系吸光度绝对值 |A| 的影响。结果表明,最佳加入顺序为:Tris-HCl 溶液、BLG 溶液及 PPA 溶液,此顺序下,PPA 与 BLG 反应生成的新物质的 |A| = 1.48,该方法的灵敏度相对于其他加入顺序是最高的,双波长法测定的灵敏度仍比单波长法高。故实验中选用双波长法并在最佳试剂加入顺序下进行测定。

2.2.4 反应时间

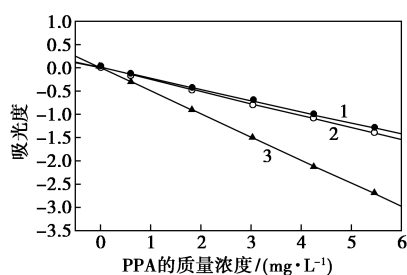
在上述选定的条件下,考察了用单波长法和双波长法测定时,反应时间对 PPA-BLG 体系吸光度绝对值 |A| 的影响。结果表明,PPA 与 BLG 的反应在 10 min 内可以进行完全,10~100 min 内,|A| 基本不变,即生成的新物质的稳定时间至少 1.5 h。因此,实验选在 10 min 后进行测定。

2.3 PPA 的标准曲线

在选定的最佳条件下,PPA 质量浓度在 0~5.5 mg/L 范围内与 PPA 和 BLG 反应生成的缔合物的 |A| 呈线性关系,服从比尔定律。标准曲线如图 4 所示,相关参数如表 1 所示。

2.4 干扰试验

在选定的最佳条件下,用双波长法考察了相对误差 $\leq \pm 5\%$ 时,某些常见共存物质对测定 PPA 的干扰情况。结果表明,下列倍数的共存物质不干扰测定:100 倍的蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、L-色氨酸、L-赖



1—578 nm;2—648 nm;3—(578+648) nm

图4 标准曲线

表1 PPA标准曲线相关参数

回归方程 $\rho/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	相关系数 r	表观摩尔吸光系数 $\kappa/[\text{L}\cdot(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}]$
$A_{578} = -0.0017 - 0.2375\rho$	0.9999	7.22×10^4
$A_{648} = 0.00025 - 0.2575\rho$	0.9999	7.81×10^4
$A_{578+648} = -0.00145 - 0.4950\rho$	0.9999	1.50×10^5

氨酸、L-亮氨酸、L-谷氨酸、L-组氨酸、 NH_4^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 NO_3^- 、 Cl^- ; 50 倍的 L-白氨酸、L-异亮氨酸、甘氨酸、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Sn^{2+} 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、 SO_3^{2-} 、 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$; 20 倍的 Al^{3+} 、柠檬酸三钠、淀粉; 5 倍的 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 。可见,该方法的选择性良好。

3 分析应用

精密移取已处理好的待测液 1[#]和 2[#]各 1.00 mL 分别代替实验方法中的标准溶液,按实验方法加入其他试剂溶液,扫描吸收光谱,依据吸收曲线及双波长法的回归方程或标准曲线求得待测液中的吡哌酸质量浓度及药片、胶囊中吡哌酸的质量浓度,各样品平行测定 5 份。进行 3 种加标水平的回收试验,各水平平行测定 5 份。结果如表 2 所示。

表2 样品分析结果及回收试验 (n=5)

样品	测得值	标示量	取样量		测得值	平均回收率/%	RSD/%
			$\rho/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	加标量 $\rho/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$			
1 [#]	247 mg/片	250 mg/片	1.48	0.607	2.10	102	2.5
				1.520	3.04	103	2.6
				2.730	4.26	102	2.4
2 [#]	242 mg/粒	250 mg/粒	1.21	0.607	1.80	97.2	2.6
				1.210	2.40	98.3	2.4
				2.640	3.82	98.8	2.3

4 结论

用亮绿作探针测定吡哌酸的双波长负吸收光谱

法简便、快速,具有较高的灵敏度 [$\kappa = 1.50 \times 10^5 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$]、较高的准确度和精密性,测定结果符合药物分析要求。该方法适于市售吡哌酸药片及胶囊中吡哌酸的定量检测。

参考文献

- [1] Diego G R, Flavio A S, Julio C C S, *et al.* Multiresidue determination of fluoroquinolones in poultry muscle and kidney according to the regulation 2002/657/EC. A systematic comparison of two different approaches: Liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry or tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1379: 83-91.
- [2] 王硕,张晶,邵兵.超高效液相色谱-串联质谱测定污泥中氯霉素、磺胺类、喹诺酮类、四环素类与大环内酯类抗生素[J]. *分析测试学报*, 2013, 32(2): 179-185.
- [3] 钱卓真,朱世超,魏博娟,等.高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中 19 种喹诺酮类药物残留量[J]. *中国渔业质量与标准*, 2012, 2(3): 68-75.
- [4] 王艳红,李冰,陈真.高效液相色谱法同时测定止咳平喘类中成药中违规添加的磺胺嘧啶等 7 种化学抗菌物质[J]. *中国药理学杂志*, 2014, 49(8): 683-687.
- [5] Antonio V H H, Javier H B, Teresa M B M, *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of 25 sulfonamide and quinolone antibiotics in water samples [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013, 75: 130-137.
- [6] Maria A C S, Maria R A, Samuel C B, *et al.* Simultaneous Separation and determination of quinolones in pharmaceuticals by micellar liquid chromatography [J]. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2010, 33(4): 513-525.
- [7] Zhang H, Chen S, Lu Y B, *et al.* Simultaneous determination of quinolones in fish by liquid chromatography coupled with fluorescence detection: Comparison of sub-2 microm particles and conventional C18 columns [J]. *Journal of Separation Science*, 2010, 33(13): 1959-1967.
- [8] Li Y L, Hao X L, Ji B Q, *et al.* Rapid determination of 19 quinolone residues in spiked fish and pig muscle by high-performance liquid chromatography (HPLC) tandem mass spectrometry [J]. *Food Additives & Contaminants: Part A-Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 2009, 26(3): 306-313.
- [9] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(二部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 472-474.
- [10] Sun H W, Li L Q, Su M. Simultaneous determination of proline and pipemidic acid in human urine by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection [J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2010, 24(5): 327-333.
- [11] Antonio V H H, Javier H B, Teresa M B M, *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction combined with nonaqueous capillary electrophoresis for the determination of fluoroquinolone antibiotics in waters [J]. *Electrophoresis*, 2010, 31(20): 3457-3465.
- [12] 张先廷. 吡哌酸荷移反应及荧光光谱性质研究 [J]. *化工技术与开发*, 2015, 44(5): 46-49. ■