

反相高效液相色谱法测定人血清中氧氟沙星的含量

杜迎翔 骆 丹¹ 王乔飞

(中国药科大学分析化学教研室, 南京 210009; ¹ 南京铁道医学院, 南京 210009)

摘 要 建立了人血清中氧氟沙星的反相高效液相色谱测定方法, 采用乙腈沉淀蛋白后直接进样, 方法简便易行, 准确度高, 精密度好, 方法回收率 > 98%, 日内 RSD 2.0~4.0%, 日间 RSD 为 2.2~4.5%, 血药浓度在 40~6000 ng/ml 范围内呈线性关系, $r=0.9992$, 采用荧光检测器, 灵敏度大大提高, 血药最小检测浓度为 25 ng/ml。

关键词 氧氟沙星; 高效液相色谱; 含量测定

氧氟沙星是一种新型喹诺酮类抗菌药, 对革兰氏阳性菌和阴性菌均具有较强活性, 与其它抗菌素无交叉耐药性, 具广谱、高效、可口服等特点^[1], 国外已广泛应用于临床。有关氧氟沙星的测定方法, 有微生物法和 HPLC 法, 而 HPLC 法或多或少存在色谱峰拖尾、灵敏度低、需要萃取分离等缺点^[2,3], 本文采用反相 HPLC, 用乙腈沉淀蛋白后直接进样, 采用荧光检测器检测氧氟沙星血药浓度, 具有简便、灵敏、准确等特点, 为氧氟沙星的药动学和药效学研究奠定了基础。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪器

美国 Waters 高效液相色谱仪系统(包括 510 泵, 680 梯度控制器, 740 色谱数据处理机); 岛津 RF-530 荧光 HPLC 检测器。

1.1.2 试剂

氧氟沙星标准品(符合部颁标准, 江苏昆山制药厂); 重蒸馏水; 乙腈、乙酸铵、柠檬酸、二乙胺、磷酸等为分析纯; 空白血清、血清样品均由南京铁道医学院提供。

1.2 实验条件

色谱柱(C₁₈ Hypersil 5 μ m) 100×4.6 mm

不锈钢柱, 柱温: 室温。流动相: 0.05 mol/L 柠檬酸-0.5 mol/L 乙酸铵-乙腈-1% 磷酸-二乙胺(75:1:22:2:0.15), 流速 1 ml/min, 进样量 20 μ l。荧光检测器激发波长为 295 nm, 发射波长为 505 nm。

1.3 测定方法

1.3.1 贮备液配制

精密称取氧氟沙星标准品 0.1002 g, 用 0.1 mol/L HCl 溶解并定容至 500 ml, 得 0.2 mg/ml 标液, 临用时将贮备液用 0.1 mol/L 稀 HCl 稀释至所需浓度。

1.3.2 血样预处理

精取 0.5 ml 血清样品于具塞离心管中, 加 2 ml 乙腈, 涡旋振荡 1 min, 离心 10 min (转速 2500 r/min) 后, 取上清液 20 μ l 进样。

2 实验结果

2.1 色谱行为

在本色谱条件下, 空白血清经乙腈沉淀后的色谱峰对氧氟沙星色谱峰无干扰, 两者达到良好分离(图 1), 氧氟沙星保留时间为 4.8 min。

2.2 线性关系

2.2.1 氧氟沙星的标准曲线

精密配制浓度为 8.0, 20.0, 80.0, 200,

收稿日期 1993-10-05

400,800,1200 ng/ml 的氧氟沙星 0.1 mol/L HCl 溶液,分别进样 20 μ l,计算峰面积(A)与浓度(C)的关系,其回归方程为: $A=-290.1+405.8C$ ($r=0.9996$)。

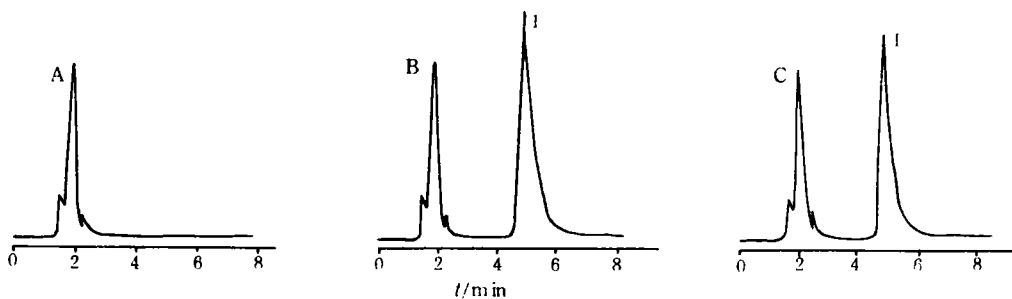


Fig 1. Chromatograms of ofloxacin. A,blank human serum; B,blank human serum spiked with ofloxacin; C,serum of a healthy volunteer after administration of ofloxacin; 1:site of ofloxacin

2.2.2 血清中氧氟沙星的标准曲线与最低检测限

精密量取浓度为 1.0,2.5,10.0,25.0,50.0,100,150 μ g/ml 的氧氟沙星 0.1 mol/L 溶液各 20 μ l,分别置于 7 个 5 ml 具塞离心管中,吹干,加空白血清 0.5 ml,按“血样预处理”项下操作,用氧氟沙星的峰面积(A)和血清浓度(C)进行回归计算,结果表明,氧氟沙星血药浓度在 40~6000 ng/ml 范围内线性关系良好(未作最高限),回归方程为: $A=420.9+65.56C$ ($r=0.9992$)。当信噪比 $S/N=3$ 时,血清中氧氟沙星的最低检测浓度为 25 ng/ml。

2.3 血清中氧氟沙星的回收率

2.3.1 方法回收率

精密吸取不同浓度的氧氟沙星 0.1 mol/L HCl 溶液(10.0,25.0,100 μ g/ml)各 20 μ l,分别置于具塞离心管中,吹干,加空白血样 0.5 ml,按“血样预处理”项下操作,测得的氧氟沙星峰面积,从血清中氧氟沙星的标准曲线上求得含量,计算回收率,结果见表 1。

Tab 1. Recovery of the proposed method ($n=5$)

Added, ng/ml	Measured, ng/ml	Recovery, %	RSD, %
400	399.4 \pm 12	99.85 \pm 3.0	3.0
1000	1008 \pm 28	100.8 \pm 2.8	2.8
4000	3986 \pm 72	99.67 \pm 1.8	1.8

2.3.2 绝对回收率

按上法配制 0.5 ml 三种不同浓度(400,1000,4000 ng/ml)的氧氟沙星血清模拟样品,同法预处理,进样,结果与对应条件下含相同浓度氧氟沙星的 0.1 mol/L HCl 溶液直接进样时相比,得绝对回收率分别为 89.5%,90.1%,89.7%($n=5$)。

2.4 精密度试验

2.4.1 日内相对标准偏差

按 2.3.1 法配制 0.5 ml 三种不同浓度(400,1000,4000 ng/ml)的氧氟沙星血清模拟样品,分别按“血样预处理”项下操作,连续进样 5 次,测得日内标准偏差,结果见表 2。

Tab 2. Precision of method within-day and between-day

Added, ng/ml	Within-day ($n=5$)		Between-day ($n=7$)	
	Measured, ng/ml	RSD, %	Measured, ng/ml	RSD, %
400	404.8 \pm 16	4.0	395.5 \pm 15	3.8
1000	985.0 \pm 35	3.6	991.0 \pm 45	4.5
4000	4072 \pm 81	2.0	3963 \pm 87	2.2

2.4.2 日间相对标准偏差

按上法配制血清模拟样品,分别按“血清预处理”项下操作,样品每天测定 1 次,连续 1 周,求得日间标准偏差,结果见表 2。

2.5 样品测定

3 位健康志愿者口服适量氧氟沙星片,数小时后取静脉血,分取血清 0.5 ml,按“血

样预处理”项下操作,由氧氟沙星的峰面积计算血药浓度,结果见表 3。

Tab 3. Determination of ofloxacin in human serum samples

No.	Content, ng/ml	Average content, ng/ml	RSD, %
1	1251 1240 1279 1230	1250	1.7
2	798.5 760.1 750.6 808.4	779.4	3.6
3	63.30 59.10 61.20 64.40	62.00	3.9

3 讨论

3.1 血样预处理方法选择

分别用 CHCl_3 和 CH_2Cl_2 在 pH7.0 磷酸盐缓冲液中对血清样品进行萃取分离,回收率很低($<30\%$),与文献[2]不符,本文采用乙腈沉淀蛋白后直接进样,不仅蛋白沉淀作用完全,且回收率高,处理方法简便易行。

3.2 二乙胺的影响

由于氟喹酸类的 RP-HPLC 色谱分离方法均或多或少存在峰形展宽且拖尾的缺点,目前国内外均采用离子对色谱以改善其峰形,本文采用柠檬酸-乙酸铵-乙腈-磷酸系统作流动相,峰形得到一定改善,当向流动相中加入一定量的二乙胺时, t_R 大大降低,峰形明显改善,这可能是因为流动相中的游离- NH_2 与反相键合相表面残余硅羟基(Si-OH)作用,从而掩盖了溶质分子与键合相的亲合作用,即消除了“亲硅羟基效应”。

3.3 流动相中乙腈含量对分离的影响

当流动相中其它组分量(ml)不变时(柠

檬酸 75,磷酸 2,乙酸铵 1,二乙胺 0.15),仅改变乙腈含量,样品容量因子 k 与乙腈量的关系如图 2。

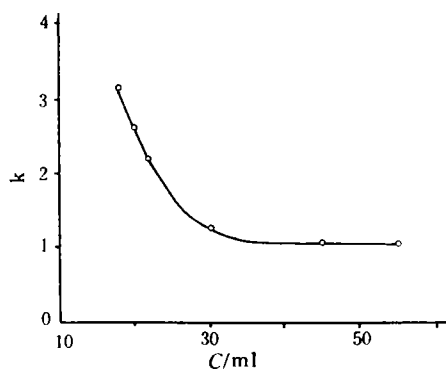


Fig 2. Effect of the content of acetonitrile in the mobile phase on k of ofloxacin

图 2 表明,乙腈用量小于 30 ml 时, k 值随乙腈含量增加呈明显减小趋势,当乙腈量超过 30 ml 时,其变化趋于平缓,考虑到样品出峰时间不能太慢,但出峰太快又将导致血清空白峰与样品峰的部分重叠,影响分离度,故本文选用乙腈 22 ml。

参考文献

- 1 陈琼,陆红,徐秀英等.国产氟喹酸人体生物利用度及药代动力学研究.中国临床药理学杂志,1992,8(4):193
- 2 David SF, Guay RP, Opsahl JA, et al. Effects of magnesium-aluminum hydroxide and calcium carbonate antacids on bioavailability of ofloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1990,34(12):2436
- 3 杜迎翔.高效液相色谱法测定唾液中氟喹酸的含量.药物分析杂志(待发表)

Determinatin of Ofloxacin in Human Serum by Reversed-Phase HPLC

Du Yingxiang, Luo Dan¹, Wang Qiaofei

China Pharmaceutical University, Department of Analytical Chemistry, Nanjing 210009; ¹Nanjing Railway Medical College, Nanjing 210009

A sensitive and rapid method for the determination of ofloxacin in serum was developed. High performance liquid chromatograph (Waters, USA) with a variable wavelength fluorospectrophotometric detector (Shimadzu RF-530, Japan) and reversed-phase C₁₈ Hypersil column (100 mm × 4.6 mm) were used. The mobile phase of 0.05 mol/L citric acid-0.5 mol/L ammonium acetate-acetonitrile-1% phosphoric acid-diethylamine (75 : 1 : 22 : 2 : 0.15) was pumped at 1.0 ml/min through the column. The retention time for ofloxacin was 4.8 min. The serum samples were deproteinized by adding acetonitrile. After centrifugation a 20 μl portion of the supernatant was directly chromatographed by using a RP-HPLC system. Standard curve was linear over the concentration range of 40~6000 ng/ml, and the detective limit in serum was 25 ng/ml. The recovery of proposed method was more than 98% and the absolute recovery more than 89%. The within-day RSD ranged from 2.0% to 4.0% and the between-day RSD from 2.2% to 4.5%.

Key words Ofloxacin; HPLC; Content determination

【文摘 003】角质层及其类脂对 5-氟脲嘧啶经皮渗透的作用 平其能,孙国庆,刘国杰. 药学报, 1993,28(12):924

采用离体皮肤扩散等技术研究了 5-氟脲嘧啶(5-Fu)在人皮肤各层次中的渗透性质和 1,8-桉油精(1,8-CN)对药物渗透及皮肤热转变的影响。实验表明 5-Fu 在皮肤各层次中有相近分配系数,但扩散性质不同。角质层、全皮层、脱脂角质层和去角质层全皮扩散系数依次为 1.32×10^{-7} , 1.01×10^{-7} , 1.37×10^{-6} 和 $54.09 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{h}$ 。用 1,8-CN 处理上述皮肤样品 12 h 后,5-Fu 在各组织的分配均减少,角质层和全皮的通透性显著增加($P < 0.05$),对去脂角质层和去角质层全皮的通透性无明显影响。结合 DSC 分析证明,角质层是 5-Fu 经皮渗透的重要屏障,类

脂对 5-Fu 的扩散和 1,8-CN 的增效具有重要意义。

【文摘 004】数种中药对迟发型变态反应的影响

徐强,赵红,王蓉. 中药药理与临床,1993,9(4):30

观察了苦参、地肤子、赤芍和鸡血藤对迟发型变态反应(DTH)的影响。结果发现,在抗原致敏后至攻击前(DTH 的诱导相)期间给药,对 2,4-二硝基氯苯(DNCB)或 2,4,6-三硝基氯苯(CP)所致的接触性皮炎、SRBC 所致足跖反应的诱导相及在抗原攻击后(DTH 的效应相)给药,鸡血藤有较明显或显著的抑制作用;其它三味中药仅在抗原攻击后给药对 PC 所致的 DTH 有较强的抑制作用,表明这三味中药主要是抑制致敏 T 淋巴细胞释放淋巴因子及其以后的炎症过程。