

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 仪器和试药

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 试药

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 μm)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 μl。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 μl 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 μl, 计算峰面积(A)与

浓度(C)的关系, 其回归方程为: $A = -290.1 + 405.8C$ ($r = 0.9996$)。

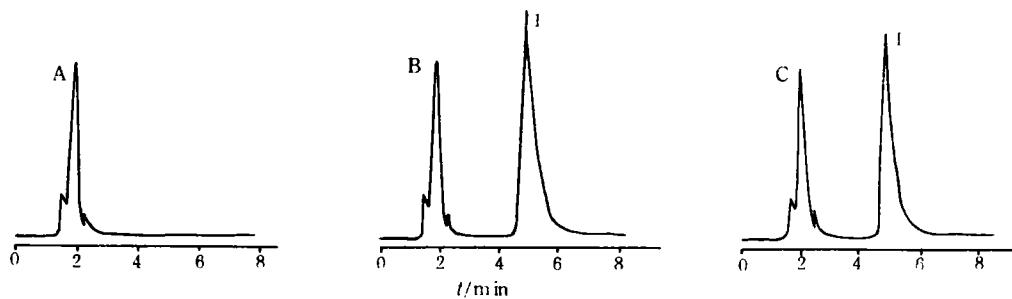


Fig 1. Chromatograms of ofloxacin. A: blank human serum; B: blank human serum spiked with ofloxacin; C: serum of a healthy volunteer after administration of ofloxacin; I: site of ofloxacin

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 μg/ml 的氧氟沙星 0.1 mol/L 溶液各 20 μl, 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 μg/ml)各 20 μl, 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±12	99.85±3.0	3.0
1000	1008±28	100.8±2.8	2.8
4000	3986±72	99.67±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±16	4.0	395.5±15	3.8
1000	985.0±35	3.6	991.0±45	4.5
4000	4072±81	2.0	3963±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,由氟氯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

由于氟哌酸类的 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-NH₂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。

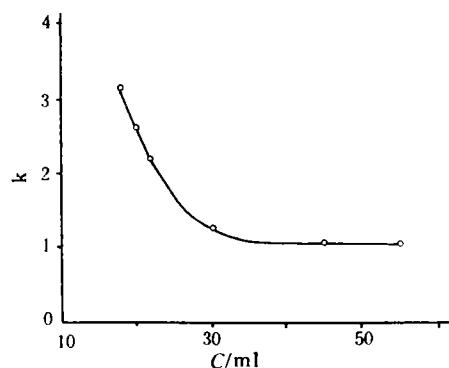


Fig 2. Effect of the content of acetonitrile in the mobile phase on k of ofloxacin

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。