

• 药物分析与检验 •

荧光分光光度法测定血清中环丙沙星浓度

张善堂 胡巧华 屈建 操乐杰 (安徽省立医院临床药学研究室, 合肥 230001)

摘要 建立了荧光分光光度法测定血清中环丙沙星浓度的新方法。以磷酸盐缓冲液(pH 3.0)为溶媒, 环丙沙星标准溶液的线性测定范围为0.005—0.300 $\mu\text{g/ml}$, 最低检测浓度2 ng/ml。血清中环丙沙星线性测定范围为0.05—3.00 $\mu\text{g/ml}$, 最低检出浓度0.03 $\mu\text{g/ml}$; 相对回收率 $99.98 \pm 1.99\%$; 日内误差小于3%, 日间误差小于5%。本法操作简便、快速, 适用于环丙沙星血药浓度测定。

关键词 荧光分光光度法 环丙沙星 血药浓度

环丙沙星(Ciprofloxacin, CPFX)是第三代喹诺酮类抗菌药, 具有抗菌活性强, 抗菌谱广的特点。目前, 测定CPFX血药浓度的方法有微生物法^[1]和高效液相色谱法^[2,3,4]。采用荧光分光光度法测定CPFX血药浓度, 作者未见国内文献报道。CPFX具有强烈的自身荧光, 根据这一特性, 本文建立了利用荧光分光光度计测定血清中CPFX浓度的新方法。

1 仪器与试剂

仪器

LS-30荧光分光光度计(美国PE公司); LG10-3 A高速冷冻离心机(北京医用离心机厂); XW-80 A旋涡混合器(上海医科大学仪器厂)。

试剂

盐酸环丙沙星(含量100.09%)合肥制药厂提供, 磷酸氢二铵、磷酸、氯仿、异丙醇等均为分析纯、市售。

2 方法与结果

2.1 CPFX 贮备液的配制

精密称取盐酸环丙沙星145.6 mg(相当于CPFX 125.0 mg), 用重蒸馏水溶解后, 移至250 ml容量瓶中, 加重蒸馏水至刻度、混匀; 精密量取该液2 ml, 置于100 ml容量瓶中, 加重蒸馏水至刻度, 混匀, 即得浓度为10 $\mu\text{g/ml}$ 的CPFX贮备液。置于冰箱中备用。

2.2 实验条件的选择

2.2.1 CPFX激发光谱与发射光谱 CPFX血清经碱化后, 用氯仿—异丙醇(9:1)提取, 提取液再经磷酸盐缓冲液(pH 3.0)萃取, 得到CPFX血清提取液。分别以CPFX血清提取液、环丙沙星标准液(pH 3.0的磷酸盐缓冲液为溶媒)及空白血清磷酸盐缓冲液(pH 3.0)提取液, 在LS-30荧光分光光度计(狭缝10 nm/10 nm)上进行激发光谱和发射光谱扫描。结果, CPFX血清提取液与CPFX标准液具有相同特征的激发光谱和发射光谱, 且不受血清成份干扰(图1)。CPFX的激发波长和发射波长分别为 λ_{ex} 275 nm、 λ_{em} 447 nm。

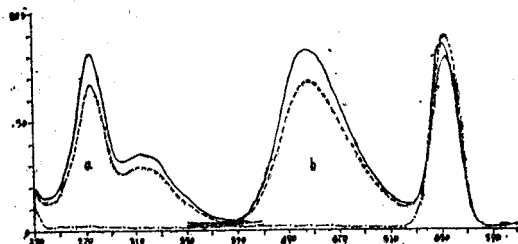


图1 环丙沙星激发光谱(a)及发射光谱(b)

—CPFX标准液 CCPF血清提取液

— · — 空白血清提取液

2.2.2 CPFX在磷酸盐缓冲液中的荧光稳定性 取CPFX贮备液适量, 用磷酸盐缓冲液(pH 3.0)稀释成含CPFX 0.10 $\mu\text{g/ml}$ 。室温($22 \pm 2^\circ\text{C}$)放置,

分别于不同时间(10、30 min, 1、2、3、4、6、8 h)测定荧光强度。结果, 荧光强度无显著变化($F \pm S = 246.3 \pm 6.1$, $CV\% = 2.48$)。

2.3 标准曲线的绘制

分别取 CPFX 贮备液适量, 用磷酸盐缓冲液(pH 3.0)稀释成不同浓度(0.005、0.010、0.020、0.040、0.080、0.100、0.200、0.300 $\mu\text{g/ml}$)。以磷酸盐缓冲液(pH 3.0)为空白。测定荧光强度(λ_{ex} 275 nm, λ_{em} 447 nm)。以荧光强度 F 为纵座标, CPFX 浓度为横座标绘制标准曲线(图 I A)

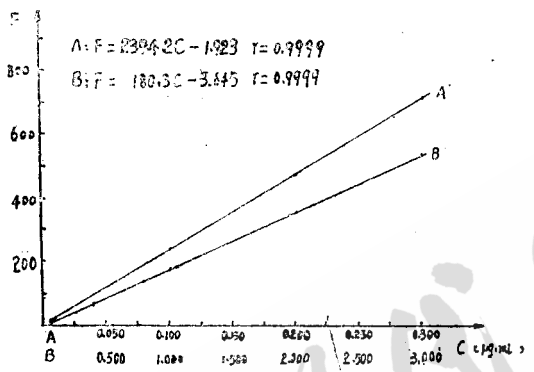


图 I 环丙沙星标准曲线(A)及血清回收曲线(B)

2.4 CPFX 血清回收试验

2.4.1 回收曲线 分别取 CPFX 贮备液适量, 加空白血清、配制成不同浓度(0.050—3.000 $\mu\text{g/ml}$) CPFX 标准血清。取不同浓度 CPFX 标准血清各

0.5 ml, 分别加入碱化剂(磷酸盐缓冲液 pH 7.4)、提取溶媒(氯仿-异丙醇 9:1)适量, 振荡、离心, 吸取部份有机相, 加入等体积的磷酸盐缓冲液(pH 3.0), 经振荡、离心后, 取水相测定荧光强度; 同时作血清空白校正。以荧光强度为纵座标, CPFX 血清浓度为横座标, 绘制 CPFX 血清回收曲线(图 I B)。由图可见血清中 CPFX 在上述浓度范围内与其荧光强度有良好的线性关系。

2.4.2 CPFX 血清回收率 取不同浓度的 CPFX 标准血清, 按 2.4.1 项下方法操作, 测定荧光强度, 根据血清回收曲线求出实测浓度。计算相对回收率, 结果见表 1

表 1 环丙沙星血清相对回收率

标示浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	测定浓度 n	回收率 (%)	平均回收率 ($\bar{x} \pm s$)%
0.100	7	0.099 ± 0.005	99.53
0.200	8	0.207 ± 0.008	103.6
0.400	8	0.395 ± 0.013	98.75
0.800	5	0.778 ± 0.012	97.16
1.000	8	1.009 ± 0.026	99.98 $\pm$ 1.99
2.000	8	1.99 ± 0.05	100.9
3.000	8	3.01 ± 0.14	99.60

2.5 精密度试验

取不同浓度的 CPFX 标准血清各数份, 按照 2.4.1 项下方法, 于一日内数次或连续数日测定。计算日内及日间变异系数, 结果见表 2。

表 2 环丙沙星血清测定精密度

CPF X 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	日内	日间
	n	n
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
	CV%	CV%
0.100	5	8
	0.0970 ± 0.0026	0.098 ± 0.004
	2.68	4.08
1.000	5	8
	0.982 ± 0.015	1.009 ± 0.026
	1.53	2.58
3.000	5	8
	2.98 ± 0.07	3.01 ± 0.14
	2.35	4.65

2.6 最低检测浓度

由信噪比求得本方法的最低检测浓度为: CPFX 标准液 2 ng/ml, 血清中 CPFX 最低检出浓度为 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.7 患者血清中 CPFX 浓度测定

准确吸取患者血清 0.5 ml, 按 2.4.1 项下方法操作, 测定荧光强度。根据回收曲线计算血清 CPFX

浓度。4 例患者血清中 CPFX 浓度测定结果见表 3。

3 讨论

3.1 CPFX 化学结构为

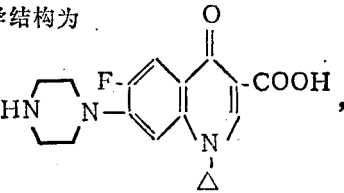


表3 4例患者临床资料及血清环丙沙星浓度

性 别	年 龄 (a)	临 床 诊 断	用 药 情 况	血 药 浓 度 ($\mu\text{g/ml}$) [*]	
				前 (0h)	后 (2h)
男	68	慢性支气管炎发作	300mg静滴Bid, 4d	0.830	1.917
男	49	肺 炎	300mg静滴Bid, 3d	0.268	1.294
男	60	慢支急性发作	300mg静滴Bid, 4d	0.434	1.725
男	70	肺心病伴肺部感染	300mg静滴Bid, 4d	0.437	1.831

* 再次用药前(0h)及用药结束后2小时抽取血样

分子中既有碱性基团又有酸性基团。从血清中提取 CPFX 时, 碱化剂的选择将影响其提取率。以 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液、饱和碳酸氢钠溶液、磷酸盐缓冲液(pH 7—8)等为碱化剂进行的试验表明: pH 7.4 磷酸盐缓冲液为碱化剂效果较好。另外, 溶液 pH 值的改变影响 CPFX 的荧光强度。对不同 pH 磷酸盐缓冲液(pH 2.0、2.5、3.0、4.0、5.0)的考察结果表明: 在药物浓度、环境温度等条件不变的情况下, CPFX 在 pH 3.0 的磷酸盐缓冲液中荧光强度最大。故本文分别选择 pH 7.4、pH 3.0 磷酸盐缓冲液为碱化剂及测定溶剂。

3.2 温度对 CPFX 的荧光稳定性有较大影响。随着温度升高, 荧光强度逐渐减弱。故本实验环境温度控制为 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

3.3 本法与高效液相色谱法及微生物法相比, 具有操作简便、分析速度快等优点, 适用于环丙沙星血

药浓度的快速分析。

致谢: 本文承蒙伍浩主任药师审阅并给于指导, 特此致谢

参 考 文 献

- 1 张风琴, 宋坤改, 林赴田. 环丙氧喹酸药代动力学性能的研究. 中国抗生素杂志, 1991, 16(3): 203
- 2 姚 冰, 于 宏. 高效液相色谱法测定人血清中环丙沙星的含量. 药物分析杂志, 1992, 12(5): 270
- 3 肖永红, 王其南, 钱元恕等. 环丙沙星药代动力学和体外抗菌活性研究. 中国抗生素杂志, 1992, 17(4): 293
- 4 孙海鹭、张丽梅、谢 松等. 反相高效液相色谱法测定环丙沙星血药浓度及其在患者体内的药动学研究. 中国药理学杂志, 1993, 28(5): 285

收稿日期: 1993-09-06

Determination of Ciprofloxacin Concentration in Serum by Spectrofluorometry

Zhang Shantang, Hu Qiaohua, Qu Jian, Cao Lejie

(Department of Clinical Pharmacy, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001)

Abstract A spectrofluorometric method was used for determination of ciprofloxacin concentration in serum. Its fluorescence was measured at λ_{em} 447 nm and λ_{ex} 275 nm. The linear range was 0.05–3.00 $\mu\text{g/ml}$ and the average recovery rate was $99.98 \pm 1.99\%$ ($n=7$). The lowest determination level of ciprofloxacin in serum was 0.03 $\mu\text{g/ml}$. The coefficients of variation within one day and between days were below 3% and 5% respectively. This method was easy and rapid for clinical determination of ciprofloxacin concentration in serum.

Key words Ciprofloxacin Spectrofluorometry Serum concentration