

固相萃取—反相 HPLC 荧光法快速测定血浆中左氧氟沙星的含量

王乃毅¹, 段李禾², 白小红³ (1. 山西职工医学院分析化学教研室, 太原 030012; 2. 山西医科大学附属二院, 太原 030001; 3. 山西医科大学药学院, 太原 030001)

摘要:目的 建立固相萃取—反相 HPLC 荧光法快速测定人血浆中左氧氟沙星的方法。方法 采用 C_{18} 固相萃取小柱萃取血浆中的左氧氟沙星。色谱柱为 ODS-BP 柱 ($5\ \mu\text{m}$, $250\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$), 流动相为含 $1.31\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ L-异亮氨酸和 $0.80\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CuSO_4 的水溶液-甲醇 (80:20), 激发波长为 $280\ \text{nm}$, 发射波长为 $504\ \text{nm}$, 流速为 $0.8\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。结果 该方法在 $1.0 \sim 20\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好 ($r=0.9976$), 最小检测限 $1\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 萃取回收率和方法回收率分别为 89.12% 和 109.47%, 高、中、低 3 个浓度的日内 RSD 为 3.2%, 日间 RSD 为 1.4%。结论 该法血样处理简单, 干扰小, 灵敏度高, 精密度好, 可用于该药物的快速测定。

关键词: 左氧氟沙星; 固相萃取; 高效液相色谱荧光法; 药物滥用

中图分类号: R917.101; R978.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2007)07-0633-03

Quick Determination of Levofloxacin in Human Plasma by Solid Phase Extraction and RP-HPLC with Fluorometry

WANG Nai-yi¹, DUAN Li-he², BAI Xiao-hong³ (1. Department of Analytical Chemistry, Shanxi Medical College for Continuing Education, Taiyuan 030012, China; 2. The No. 2 Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 3. Pharmaceutical College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To set up a new method to quickly determine Levofloxacin in human plasma by SPE and RP-HPLC with fluorescence detection. **METHODS** To extract the Levofloxacin in human plasma by SPE with C_{18} SPE column, then to determine the quantities of the Levofloxacin by RP-HPLC. The chromatography column used was a ODS-BP column ($5\ \mu\text{m}$, $250\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$). And

作者简介: 王乃毅, 男, 硕士, 讲师 Tel: (0351) 8895104 E-mail: wangnaiyi@126.com

the mobile phase was made up of the water solution (including L-isoleucine ($1.31 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) and CuSO_4 ($0.80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) and methanol (80: 20). The excitation and emission wavelengths were 280 nm and 504 nm. The flow rate was $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. **RESULTS** The linear range of the method was $1.0 \sim 20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, and r value was 0.9976 the detection limits was $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (S: N = 3: 1); and the extraction recovery and the method recovery were 89.12% and 109.47% respectively; the within-day RSD was 3.2%; the between-day RSD was 4%. **CONCLUSION** The method is simple in the pretreatment of the bio-samples its sensitive and precise And it can be applied to rapid determinations of Levofloxacin

KEY WORDS Levofloxacin; solid phase extraction; HPLC with fluorimetry; drug abusement

1 引言

左氧氟沙星 (Levofloxacin, LVFX) 是发展迅速的新一代全合成氟喹诺酮类抗菌素^[1]。该药物具有抗菌作用强、生物利用度高、不良反应小、组织分布广等特点, 在临床上被广泛应用^[2]。但是同时, 其被滥用的现象也十分严重, 严重危害了人体健康。因此, 对于人体内该药物的监测就非常重要。

有关 HPLC 法测定左氧氟沙星的方法很多^[3-5], 但流动相采用含 $1.31 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ L-异亮氨酸和 $0.80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ CuSO_4 的水溶液-甲醇 (80: 20) 的报道较少。而且采取固相萃取技术对其血样进行预处理的文献也不多见。本实验利用 C_{18} 固相小柱萃取血浆中左氧氟沙星, 并采取反相 HPLC 荧光法测定左氧氟沙星在血浆中的含量使测量结果更可靠、准确, 测量方法灵敏度更高^[6-7], 更简便、快速, 测定结果令人满意, 为该药物的体内监测提供了新的有效方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

日本岛津高效液相色谱仪 (Shimadzu LC-10AT_{VP} Liquid Chromatograph, CTO-10A Column Oven, RF-10A_{XL} Fluorescence Detector, 20 μL 定量进样环), AccuBOND C_{18} 固相萃取小柱 ($100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 安捷伦公司), N-2000 双通道色谱工作站 (浙江大学智能信息工程研究所), 800 型离心沉淀器 (上海手术器械厂), XW-80A 型混旋器 (上海医科大学仪器厂)。

左氧氟沙星、环丙沙星标准品 (均来自中国药品生物制品检定所), 左氧氟沙星胶囊 (规格 $0.1 \text{ g}/\text{粒}$, 江苏扬子江药业有限公司, 04070402), L-异亮氨酸 ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$, Bio Basic Tnc 1009S03), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (北京化工厂), 血浆 (太原市红十字血液中心), 重蒸水 (山西医科大学自制), 其他试剂均为分析纯试剂。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制 左氧氟沙星标准溶液: 精密称取左氧氟沙星标准品适量, 用水溶解稀释配成 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准贮备液, 于冰箱内 4°C 保存。内标溶液: 精密称取环丙沙星标准品适量, 用水溶解稀释配成 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准贮备液, 于冰箱内 4°C 保存。

2.2.2 色谱条件 色谱柱: ODS-BP 柱 ($5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$) (中国大连依利特公司); 流动相: 含 $1.31 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 异亮氨酸和 $0.80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸铜的水溶液-甲醇 (80: 20), pH 3.3 流速: $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 激发波长: 280 nm, 发射波长: 504 nm; 柱温: 40°C ; 进样量: 20 μL 。

2.3 血浆样品前处理

将固相萃取小柱依次用 1 mL 甲醇和 1 mL 水活化。移取 0.5 mL 血浆加入已活化的固相萃取小柱中, 在离心机中 $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 用 1 mL 20% 的甲醇溶液冲洗小柱, 以 $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 最后用 1 mL 100% 的甲醇溶液冲洗小柱, 以 $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 收集最后一次甲醇洗脱液, 在 60°C 水浴氮气流下吹干, 加 100 μL 流动相溶解残渣, 在旋涡混合仪上混匀 2 min, 取 20 μL 进样。

3 结果与讨论

3.1 色谱行为

在上述色谱条件下, LVFX 与内标物环丙沙星得到良好的分离, 保留时间分别为 6.3 min 和 10.8 min, 血浆中内源性物质对 LVFX 无干扰。色谱图如下 (图 1)。

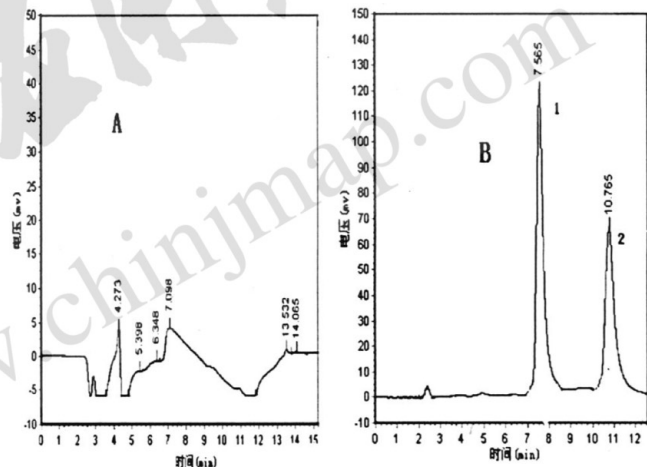


图 1 色谱图

A: 空白血浆; B: 空白血浆加内标物; 1 左氧氟沙星; 2 内标物 (环丙沙星)

Fig 1 Chromatogram of plasma

A: blank plasma B: blank plasma spiked with LVFX and internal Standard 1: LVFX; 2: internal standard (CPEX)

3.2 工作曲线

分别精密移取空白血浆 0.5 mL, 置于 5 支 10 mL 具塞试管中, 分别加入左氧氟沙星标准溶液适量, 加水稀释至 5.0 mL, 使每管药物浓度分别为 1.0, 2.0, 4.0, 10.0 和 $20.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 然后各取 0.5 mL, 按照“2.3”步骤对血样样品进行处理和色谱分析, 计算 LVFX 峰面积与内标物峰面积之比 (Y), 并以此比值 (Y) 对 LVFX 浓度 (X) 进行线性回归。线性方程为 $Y = -12.34 + 12.50X$ ($r = 0.9976$)。

3.3 检测限

当信噪比 $S/N = 3$ 时,测得最低检测浓度分别为 $1\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3.4 回收率试验

3.4.1 萃取回收率 分别在空白血浆中加入 LVFX 适量,配成 $1.0\ 4.0\ 20.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆样品,均取 0.5 mL 加入 SPE 小柱,按“2.3”项操作进样分析。配制相应浓度的对照品溶液,均取 0.5 mL ,氮气挥干,用流动相 0.5 mL 溶解残渣,进样分析。计算萃取回收率,萃取回收率 = $A_{\text{萃取}}/A_{\text{未萃取}}$ 。

3.4.2 方法回收率 分别在空白血浆中加入 LVFX 适量,配成 $1.0\ 4.0\ 20.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆样品,均取 0.5 mL 加入 SPE 小柱,按照“2.3”步骤操作,计算回收率。

表 1 回收率试验 ($n = 5$)

浓度 $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	萃取回收率		方法回收率	
	回收率 $\%$	RSD $\%$	回收率 $\%$	RSD $\%$
1.0	88.30 ± 3.26	3.7	118.76 ± 1.63	1.4
4.0	89.83 ± 3.09	3.4	103.70 ± 1.45	1.4
20.0	89.52 ± 2.82	3.2	105.96 ± 0.85	0.8

3.5 精密度试验

3.5.1 日内精密度 取 0.5 mL 空白血浆若干份,分别加入 LVFX 标准溶液适量,加水稀释,配制成 $1.0\ 4.0$ 和 $20.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 3 种浓度的溶液,然后在同日内每种样品分别取样 5 次,按“2.3”步骤操作,测其日内精密度。

3.5.2 日间精密度 按上法配制血浆样品,每日分别取高、中、低浓度,按“2.3”项下操作,测定 1 次,连续 5 d 测其日间精密度。

表 2 精密度试验 ($n = 5$)

浓度 $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	日内		日间	
	平均值 $\pm\text{SD}$ $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD $\%$	平均值 $\pm\text{SD}$ $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD $\%$
1.0	1.197 ± 0.058	4.8	1.163 ± 0.020	1.7
4.0	4.138 ± 0.099	2.4	4.047 ± 0.065	1.6
20.0	20.922 ± 0.477	2.3	20.156 ± 0.183	0.9

3.6 生物样本血药浓度测定

健康志愿者 3 名,分别 $po\ 100\text{ mg}$ 左氧氟沙星,24 h 内在 13 个时间点静脉取血,离心后,收集上层血浆 0.5 mL ,再按“2.3”项下操作,分别测定其不同时间点的各药物的血药浓度。药时曲线见图 2。

3.7 讨论

3.7.1 固相萃取条件选择 在对固相萃取条件进行选择时,我们考察了洗脱液的种类、浓度及用量、离心转速及离心时间,最后确定了最佳条件,即:用 100% 甲醇作洗脱液,用量 1 mL ,以 $1500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min 。还考察了 SPE 小柱的使用次数,发现该种 SPE 小柱至少可以重复使用 5 次以上,回收率变化不大。本实验将固相萃取与 HPLC 技术联合应用于氟喹诺酮类药物的血样分析,操作更简单,测定结果更准确。

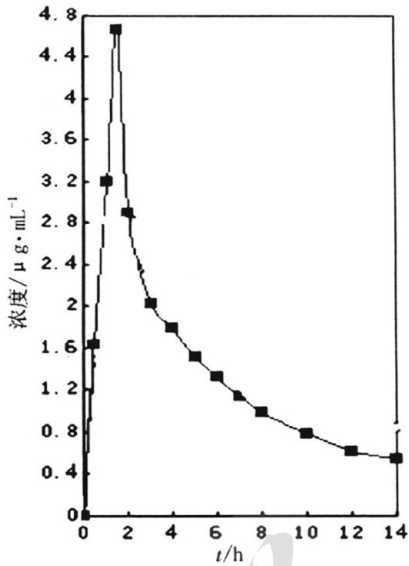


图 2 左氧氟沙星药时曲线

Fig 2 Concentrations of LVFX—Time Curves

3.7.2 色谱条件的考察 本实验首次采用含 $1.31\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ L-异亮氨酸和 $0.80\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ CuSO}_4$ 的水溶液——甲醇 (20:80) 作为流动相,并系统考察了色谱条件,建立了优化的色谱系统,为左氧氟沙星的快速准确分析提供了行之有效的方法。

3.7.3 检测器 左氧氟沙星在其结构上具有苯环和共轭双键,故本实验采用荧光检测器,灵敏度更高。并考察了左氧氟沙星的最大激发及发射波长,最后确定激发波长为 280 nm ,发射波长为 504 nm 。

4 结论

该法血样处理简单,杂质少,干扰小,灵敏度高,准确度高,精密度好,可用于左氧氟沙星的快速测定,为左氧氟沙星的体内监测提供了新的有效方法。

参考文献

[1] 梁沛,秦永超,江祖成,等.反相高效液相色谱法同时测定四种氟喹诺酮类药物[J].分析实验室,2000,19(3):56-59
[2] 杜黎明,卫洪清,张俊燕,等.反相高效液相色谱法同时测定 6 种氟喹诺酮类药物[J].色谱,2003,21(5):503-506
[3] 夏东亚,郭涛,张立军,等.高效液相色谱法测定左氧氟沙星血药浓度[J].解放军药学学报,2002,18(3):176-178
[4] 叶巧旦.用手性拆分法测定氧氟沙星中左氟沙星含量[J].现代实用医学,2004,16(2):94
[5] 李昌军,杨昆,董伟林.HPLC 荧光法测定血液中左氧氟沙星浓度[J].中国药杂志,2002,37(8):75
[6] 黄作君,李中东,施孝金,等.固相萃取技术及其在体内药物分析中的应用[J].药学服务与研究,2004,4(3):250-252
[7] 王新春,阳长明,侯世祥,等.固相萃取—高效液相色谱法在生物样品分析中的应用与发展[J].中国医院药学杂志,2001,21(12):747

收稿日期:2007-03-14