HPLC 测定微球中盐酸左氧氟沙星的含量

蔡佳玉，孙树茂，孟永春，南开辉*(温州医学院附属眼视光医院，浙江 温州 325027)

摘要：目的 建立测定壳聚糖微球中盐酸左氧氟沙星含量的高效液相色谱法。**方法** 采用 Agilent 1200 型高效液相色谱仪，色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C_{18} (4.6 mm×150 mm，5 μm)，柱温：30 ℃，流速：1.0 mL·min^{-1}，流动相：0.04 mol·L^{-1} 磷酸溶液(三乙胺调 pH 值为 4)-乙腈(85∶15)，检测波长：293 nm。**结果** 盐酸左氧氟沙星浓度在 1.021~51.15 μg·mL^{-1} 内线性关系良好(r=0.999 6)，日内和日间精密度 RSD 均<2%(n=5)，平均加样回收率为 99.1%，RSD 为 0.72%。**结论** 本方法简便易行、灵敏度高、重复性好，结果准确可靠，适用于壳聚糖微球中盐酸左氧氟沙星含量测定。

关键词：盐酸左氧氟沙星；壳聚糖微球；高效液相色谱法

中图分类号：R917.101 **文献标志码：**B **文章编号：**1007-7693(2012)05-0437-04

Determination of Levofloxacin Hydrochloride in Microspheres by HPLC

基金项目：浙江省自然科学基金项目(Y2090914)；浙江省新苗人才计划(2010R413044)

作者简介：蔡佳玉，女，硕士生 Tel: (0571)85893117 E-mail: 13695898049 *__通信作者：__南开辉，男，博士，副研究员 Tel: (0577) 88833805 E-mail: nankh@163.com

CAI Jiayu, SUN Shumao, MENG Yongchun, NAN Kaihui* (*Hospital of Optometry & Ophthalmology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determination of levofloxacin hydrochloride in chitosan microspheres. **METHODS** The chromatographic analysis was performed on a ZORBAX Eclipse XDB-C_{18} column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) at 30 ℃. The mobile phase was a mixture of 0.04 mol·L^{-1} phosphoric acid (adjusted to pH 4 with triethylamine) and acetonitrile (85∶15). Flow rate was 1.0 mL·min^{-1} and UV detection wavelength was 293 nm. **RESULTS** Good liner relationship was obtained in the range of 1.021–51.15 μg·mL^{-1}(r=0.999 6). Both intra- and inter-day precision RSD were less than 2%(n=5). The average recovery rate was 99.1% with RSD of 0.72%. **CONCLUSIONS** The established method is sensitive, reliable and suitable for quantitative analysis of levofloxacin hydrochloride in chitosan microspheres.
KEY WORDS: levofloxacin hydrochloride; chitosan microspheres; HPLC

盐酸左氧氟沙星(levofloxacin hydrochloride)是第 3 代喹诺酮类广谱抗生素，为氧氟沙星左旋光学活性异构体，其抗菌活性约为氧氟沙星的 2 倍，对包括厌氧菌在内的革兰阳性菌及革兰阴性菌有较强的抗菌活性，对沙眼衣原体有良好的抑制作用，被用于治疗角膜炎、结膜炎、眼睑炎、麦粒肿、泪囊炎等眼部感染性疾病，是临床应用广泛的眼科抗菌药[1-2]。普通滴眼液点眼后由于眼部角膜屏障、泪液稀释、鼻泪管流失等因素，生物利用度较低[3]。缓控释微球有药物缓释作用，并可混悬在介质中用做滴眼剂，点眼后载药微球滞留在结膜囊内不易消除，可提高眼部用药的生物利用度[4]，是新型眼部给药系统研究的热点。本实验室采用生物可降解材料壳聚糖制备了包载盐酸左氧氟沙星的眼用微球，并对微球的载药量、包封率以及体外释药行为进行深入研究。建立稳定可靠的药物浓度检测方法，是研究其性能的先决条件，同时也为盐酸左氧氟沙星微球的质量控制提供保障。

盐酸左氧氟沙星的检测方法较多，主要有紫外分光光度法[5]、HPLC 紫外检测法[6-8]和 HPLC 荧光检测法[9-10]。本研究采用 HPLC 紫外检测法测定微球中盐酸左氧氟沙星的含量，通过流动相选择及比例调整，对微球中盐酸左氧氟沙星的含量测定进行方法学考察，期望获得简便易行、精密度高、重复性好、能准确测定微球中盐酸左氧氟沙星含量的 HPLC 测定方法，为载药微球的性能研究奠定基础。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent)，包括 G1311A 四元泵、G1316A 柱温箱、G1329A 自动进样器、G1315D 二极管阵列检测器、化学工作站(Agilent chemstation. Rev. B.04.01.[481])；Discovery DV215CD 型电子天平(OHAUS，美国)；SG2 型 pH 计(德国 Mettler Toledo)；Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore)。

盐酸左氧氟沙星对照品(Sigma，含量≥98%，批号：20100318)；盐酸左氧氟沙星壳聚糖微球(实验室自制，批号：20100611，20100824A，20100824B，20100824C)；乙腈(色谱纯，德国 Merck)；磷酸(色谱纯，美国 Tedia)；三乙胺(色谱纯，美国 Tedia)；流动相用水为超纯水(Milli-Q 超纯水仪自制)。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

2.1.1 对照品储备液的配制 精密称取盐酸左氧氟沙星对照品 10.21 mg，置 10 mL 量瓶中，加入甲醇溶解并定容至刻度，得盐酸左氧氟沙星浓度为 1.021 mg·mL^{-1} 的对照品储备液。

2.1.2 供试品溶液的配制 称取盐酸左氧氟沙星微球冻干粉末 50.94 mg，置 50 mL 量瓶中，加入 0.1 mol·L^{-1} 盐酸水溶液超声处理 30 min，微球溶解，放至室温后定容，0.22 μm 微孔滤膜过滤。量取 1 mL 滤液置于 10 mL 量瓶，以流动相定容，即得供试品溶液。

2.1.3 空白样品溶液的制备 按照盐酸左氧氟沙星微球制备工艺制备空白壳聚糖微球，按“2.1.2”项下方法制成空白样品溶液。

2.2 色谱条件与专属性试验

色谱柱：ZORBAX Eclipse XDB-C_{18} (4.6 mm×150 mm，5 μm，美国 Agilent)；流动相：0.04 mol·L^{-1} 磷酸溶液(三乙胺调 pH 值为 4)-乙腈(85∶15)，检测波长：293 nm，流速：1.0 mL·min^{-1}，柱温：30 ℃，进样体积：20 μL。在此色谱条件下，盐酸左氧氟沙星峰形良好，理论板数>5 000，保留时间为 4.18 min。空白样品溶液、对照品溶液、供试品溶液的 HPLC 图谱见图 1，辅料及其他杂质不影响盐酸左氧氟沙星的检出。

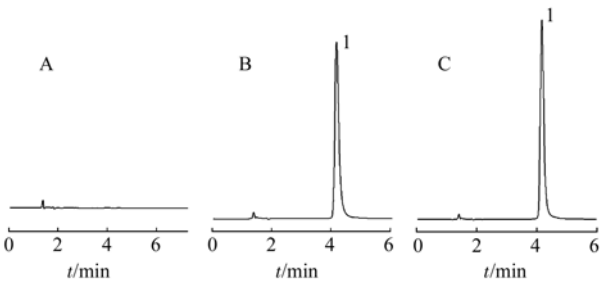

图 1 高效液相色谱图

A–空白样品溶液；B–对照品溶液；C–供试品溶液；1–盐酸左氧氟沙星

Fig 1 HPLC chromatograms

A–blank sample; B–reference substance; C–sample; 1–levofloxacin hydrochloride

2.3 线性试验

以流动相稀释盐酸左氧氟沙星对照品储备液，得盐酸左氧氟沙星浓度为 1.021，2.042，5.105，10.21，20.42，40.84，51.15 μg·mL^{-1} 的对照品溶液。按“2.2”项下色谱条件分别进样测定，以峰面积为纵坐标(Y)，以对所对应的盐酸左氧氟沙星浓度(X)为横坐标进行加权线性回归。盐酸左氧氟沙星在 1.021~51.15 μg·mL^{-1} 内线性关系良好，加权($1/X^2$)线性回归方程为 Y=78.503 4X–33.695 2 (r=0.999 6)。取对照品溶液稀释进样，按 S/N=3 为检测限，测得盐酸左氧氟沙星检测限为 5 ng·mL^{-1}，按 S/N=10 为定量限，测得盐酸左氧氟沙星定量限为 10 ng·mL^{-1}(n=6，RSD=1.32%)。

2.4 精密度试验

选取低、中、高 3 种质量浓度的盐酸左氧氟沙星对照品溶液，按“2.2”项下色谱条件进样分析，1 d 内重复测定 5 次，考察日内精密度；连续测定 5 d，考察日间精密度，结果见表 1。

表 1 精密度试验结果(n=5，$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Intra- and inter-day precision of levofloxacin hydrochloride(n=5，$\bar{x}\pm s$)

浓度/μg·mL^{-1}	日内精密度		日间精密度	
	浓度/μg·mL^{-1}	RSD/%	浓度/μg·mL^{-1}	RSD/%
2.04	2.22±0.02	1.15	2.06±0.02	1.00
10.21	10.16±0.09	0.94	10.04±0.13	1.38
40.84	41.29±0.15	0.38	41.54±0.16	0.39

2.5 重复性试验

取同一批号盐酸左氧氟沙星壳聚糖微球(批号：20100611)，按“2.1.2”项下方法平行配制供试品溶液 6 份。按“2.2”项下色谱条件进样分析，根据测得盐酸左氧氟沙星色谱峰峰面积积分计算，结果 RSD 为 0.87%。

2.6 稳定性试验

取按“2.1.2”项下方法配制的同一供试品溶液，室温放置，分别在 0，2，4，8，12 h 进行测定，根据测得的盐酸左氧氟沙星色谱峰峰面积积分计算，结果 RSD 为 0.23%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 加样回收率试验

称取盐酸左氧氟沙星微球冻干粉末约 50 mg，置 50 mL 量瓶中，加入 0.1 mol·L^{-1} 盐酸水溶液超声处理 30 min，微球溶解，放至室温后定容，分别量取 1 mL 溶液置于 15 个 25 mL 量瓶中。精密量取盐酸左氧氟沙星对照品储备液 0.16，0.20，0.24 mL 各 5 份，分别置于上述 25 mL 量瓶中，用流动相定容，摇匀，0.22 μm 微孔滤膜滤过，按“2.2”项下色谱条件进行测定，计算回收率，结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果(n=5，$\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Spiked recoveries of levofloxacin hydrochloride(n=5，$\bar{x}\pm s$)

已知量/μg	加入量/μg	测得量/μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
192.88	163.36	355.64±1.49	99.63±0.91		
192.88	204.20	393.63±1.67	98.31±0.82	99.13±0.71	0.72
192.88	245.04	436.50±1.93	99.42±0.79		

2.8 微球载药量与包封率的测定

称取样品，按 2010 年版中国药典二部附录中“微囊微球及脂质体制剂指导原则”规定进行微球载药量与包封率测定，按“2.1.2”项下方法下制备供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件进行分析，测定盐酸左氧氟沙星含量，计算微球的载药量与包封率，结果见表 3。

表 3 盐酸左氧氟沙星微球载药量与包封率(n=3)

Tab 3 Drug-loading and entrapment efficiency of microspheres(n=3)

批号	载药量/%	包封率/%
20100611	19.18±0.23	95.93±1.19
20100824A	17.30±0.11	86.53±0.53
20100824B	17.77±0.44	88.84±2.18
20100824C	17.35±0.50	86.77±2.50

3 讨论

文献报道对壳聚糖微球载药量与包封率的测定常采用研磨消解法[11]或溶菌酶[12]破坏壳聚糖微球结构，过程较复杂。由于壳聚糖易溶于酸性溶液并在酸性条件下发生降解，本实验用 0.1 mol·L^{-1} 盐酸水溶液溶解壳聚糖微球萃取盐酸左氧氟沙

星，操作简便，由表 2 的结果可知，该方法加样回收率可达 99%，大大简化了操作程序。

盐酸左氧氟沙星为两性化合物，本实验采用磷酸溶液与乙腈为流动相，出现拖尾现象，加入三乙胺调节磷酸溶液 pH 值，当 pH 为 4 时，盐酸左氧氟沙星的峰型良好。实验过程中通过对多种不同流动相比例进行比较，最终确定流动相为 0.04 mol·L^{-1} 磷酸溶液(三乙胺调 pH 值为 4)-乙腈(85∶15)，色谱分离效果良好，理论板数>5 000，盐酸左氧氟沙星保留时间为 4.18 min，与文献[13]报道盐酸左氧氟沙星保留时间 8.63 min 相比，使用本测定方法可缩短盐酸左氧氟沙星保留时间，大大提高分析速度。

通过改变药物剂型来提高药物生物利用度和改善治疗效果，是目前研究的一个热点，通常是把药物做成缓控释制剂。准确测定缓控释制剂的载药量和包封率及体外药物释放行为中药物浓度变化是对该种类型制剂进行深入研究的前提。使用紫外分光光度法测定微球药物浓度较为简便，但测定结果易受载体材料的影响，且精确度较低。本实验针对拟用于眼部的药物缓释微球的质量工艺研究，建立 HPLC 测定微球中盐酸左氧氟沙星含量的方法，在本色谱条件下，盐酸左氧氟沙星与载体材料分离完全，峰形尖锐对称，回收率与精密度实验结果符合定量分析要求。本方法专属性强，精密度高，重现性好，结果可靠，可用于盐酸左氧氟沙星壳聚糖微球的质量控制。

REFERENCES

[1] LIU Y, ZHAO H Y. Clinical investigation on levofloxacin eye drops in treatment of bacterial keratitis [J]. J Clin Exp Med(临床和实验医学杂志), 2010, 9(3): 190-191.

[2] SUN M, KONG D H, CHI C T. Clinical investigation on levofloxacin eye drops in treatment of bacterial conjunctivitis [J]. Proceed Clin Med(临床医药实践), 2010, 19(2): 84-85.

[3] BOURLAIS C L, ACAR L, ZIA H, et al. Ophthalmic drug delivery systems recent advances [J]. Prog Retin Eye Res, 1998, 17(1): 33-58.

[4] PAOLICELLI P, FUENTE M, SANCHEZ A, et al. Chitosan nanoparticles for drug delivery to the eye [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2009, 6(3): 239-53.

[5] SONG J J, LI Z F, LI J Q, et al. Content determination of levofloxacin mesylate for injection by UV spectrophotometry [J]. China Pract Med(中国实用医药), 2010, 5(27): 54-55.

[6] DAS A, MUKHERJEE J, DEY G, et al. Bioequivalence study of levofloxacin tablets in healthy Indian volunteers using HPLC [J]. Arzneimittelforschung, 2011, 61(1): 61-65.

[7] YE F Q, HU G X, QIU X J, et al. Study of the bioequivalence of levofloxacin hydrochloride capsules in healthy volunteers [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2006, 26(4): 431-434.

[8] WANG X M, XIONG H H, WANG Y N. Determination of isoniazid and levofloxacin in compound antituberculosis gel by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(6): 540-542.

[9] STURINI M, SPELTINI A, MARASCHI F, et al. Solvent-free microwave-assisted extraction of fluoroquinolones from soil and liquid chromatography fluorescence determination [J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(47): 7316-22.

[10] WATABE S, YOKOYAMA Y, NAKAZAMA K, et al. Simultaneous measurement of pazufloxacin, ciprofloxacin, and levofloxacin in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878(19): 1555-1561.

[11] LI K X, ZHAO X L, WANG D L. Determination of 5-FU content in microspheres by RP-HPLC [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2005, 22(6): 434-437.

[12] WANG B J, LI X Y. The preparation of tetramethylpyrazine phosphate loaded chitosan microspheres and the *in vitro* characterization [J]. J Jiangxi Univ TCM (江西中医学院学报), 2010, 22(5): 44-46.

[13] XU X W, YUAN L. Determination of levofloxacin hydrochloride by HPLC [J]. China Pharm(中国药业), 2010, 19(6): 28.

收稿日期：2011-08-04