HPLC 法测定健康人体血浆中左氧氟沙星浓度*

田俊生,杨佳凤,王跃飞,潘桂湘,高秀梅,张恒昆

摘要:[目的]建立测定人体血浆中左氧氟沙星的高效液相色谱(HPLC)法,并用于测定 20 名健康受试者单次口服 200 mg 盐酸左氧氟沙星片后 24 h 内血药浓度。[方法]血浆样品中加入内标替硝唑后用氯仿萃取,取氯仿层后用 0.01 mol/L 盐酸溶液反萃取,取酸水层进样。[结果]血浆中无内源性物质干扰样品测定,血药浓度线性范围为 0.025~6.0 mg/L(r=0.999 5),最低定量限为 0.025 mg/L,平均提取回收率大于 93.2%,批内和批间精密度峰面积(RSD)均小于 6.4%,准确度在 89.7%~103.1% 之间。[结论]本法专属性强,操作简便,结果准确,灵敏度高,适宜于血浆中左氧氟沙星浓度的测定。

关键词:HPLC;左氧氟沙星;血药浓度
中图分类号:R927.2 文献标识码:A 文章编号:1673-9043(2007)02-0081-03

Determination of levofloxacin in healthy human plasma by high performance liquid chromatography (HPLC) method

TIAN Jun-sheng, YANG Jia-feng, WANG Yue-fei, et al
(The TCM Research Centre of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

Abstract: [Objective] To establish a HPLC method for the determination of Levofloxacin in human plasma and to determine the concentration of Levofloxacin in human plasma after oral taking a single dose 200 mg of Levofloxacin tablet in 20 healthy volunteers. [Methods] Plasma sample was added with internal standard Tinidazole and extracted with chloroform. After taking out the layer of the chloroform it was extracted with 0.01 mol/L hydrochloric acid repeatedly and the acid solution was injected into the HPLC instrument for determination. [Results] There was no internal substance in plasma, which interfered with the determination of the samples. The linear range of medicine-containing blood was between 0.025~6.0 mg/L (r=0.999 5), the lowest quantified limit was 0.025 mg/L. The average recovery of extract was more than 93.2%. All the RSD of precision of intra or inter-batch was less than 6.4% and the accuracy was between 89.7%~103.1%. [Conclusions] The method has a good specificity, can be manipulated conveniently. The obtained result is correct with high sensitivity. So it is a suitable method for the determination of Levofloxacin.

Key words: HPLC; Levofloxacin; drug concentration in plasma

左氧氟沙星(LevofLoxacin)是氧氟沙星的左旋异构体,广泛用于敏感菌引起的呼吸系统、泌尿系统、消化系统和皮肤软组织等感染,且不良反应小。文献报道[1-2]测定左氧氟沙星血药浓度的方法有高效液相色谱(HPLC)法和微生物法,检测方法多用荧光法。笔者所建立的高效液相色谱-紫外(HPLC-UV)法测定健康受试者口服盐酸左氧氟沙星片后血药浓度的方法,适用性强,灵敏度高,结果准确可靠。

1 仪器与试药

Waters HPLC 系统:包括 Waters 600E 四元泵,717 自动进样器,2487 双波长紫外检测器以及在线脱气机,柱温箱等。十万分之一天平(METTLER TOLEDO),

* 基金项目:天津市委卫生局中医、中西医结合科研课题(2005072)。
作者单位:300193 教育部省部共建方剂学重点实验室,国家中药高新技术产业基地天津现代中药研究中心,天津中医药大学中医药研究中心
作者简介:田俊生(1980-),男,天津中医药大学 2004 级硕士研究生,主要从事药物分析研究。

精密 pH 计(METTLER TOLEDO EELTA320),旋涡混合器(XW-80A),高速离心机(美国 Tomos 公司)。

左氧氟沙星对照品(中国药品生物制品检定所),替硝唑(中国药品生物制品检定所),盐酸左氧氟沙星片(福建三爱药业)。

乙腈为 HPLC 级(天津康科德科技有限公司),水为超纯水(Milipore 制备),磷酸和三乙胺均为分析纯。

2　方法与结果

2.1　色谱条件　色谱柱:Hypersil ODS 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm,大连依利特公司);流动相:乙腈:0.025 mol/L 磷酸(三乙胺调 pH 值为 3.06)=19∶81;流速:1.2 mL/min;柱温:30 ℃;紫外检测波长:294 nm;进样量:20 μL。

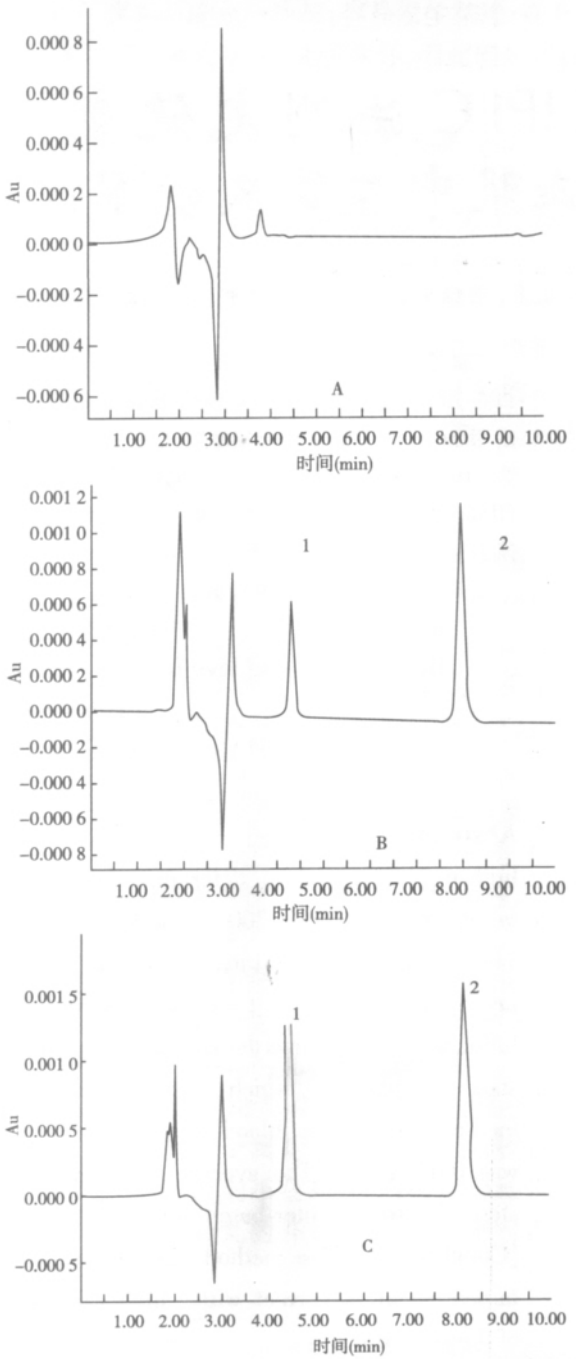
2.2　标准溶液制备

2.2.1　对照品溶液　精密称取左氧氟沙星对照品适量,加甲醇配制成浓度为 0.1 g/L 的对照品储备液,备用。

2.2.2　内标溶液　精密称取内标替硝唑适量,加甲醇配制成 0.5 g/L 的内标储备液,然后再配制成 0.2 g/L 的内标溶液,备用。

2.3　血浆样品处理　取血浆样品 0.2 mL,精密加入内标溶液 0.02 mL,涡旋混匀,加入氯仿 0.8 mL,涡旋 1 min,12 000 r/min 离心 10 min,取氯仿层 0.4 mL 于 eppondorf 管中,加入 0.4 mL 0.01 mol/L 盐酸溶液,涡旋 30 s,12 000 r/min 离心 5 min,取酸水层直接进样 20 μL。

2.4　方法专属性实验　在本实验条件下,血浆中无内源性干扰物质影响测定,左氧氟沙星与内标替硝唑峰形良好,分离度良好,保留时间分别为 4.3 和 8.0 min。见图 1。



A 空白血浆;B 空白血浆中加入左氧氟沙星和替硝唑;C 血浆样品加替硝唑;1 左氧氟沙星;2 替硝唑

图 1　血浆样品 HPLC 色谱图

2.5　标准曲线制备　取 0.1 g/L 的对照品储备液适量,稀释成 0.25、0.5、1.0、4.0、10.0、20.0、40.0 和 60.0 mg/L 的系列对照品溶液,平行操作 3 份,进样 20 μL 测定,记录左氧氟沙星峰面积,以峰面积(Y)为纵坐标,浓度(C)为横坐标,得回归方程,Y=87 408X-600.5(r=0.998 8),结果表明对照品溶液配制准确,可以用于制备校正曲线。

2.6　校正曲线制备　取空白血浆样品 0.2 mL,加入内标溶液 0.02 mL 和系列对照品溶液 0.02 mL,配制成浓度为 0.025、0.05、0.1、0.4、1.0、2.0、4.0 和 6.0 mg/L 的含药血浆样品,按‘2.3 血浆样品处理’项下操作,测定,以左氧氟沙星与内标峰面积比值(Y)为纵坐标,以左氧氟沙星浓度(C)为横坐标,得回归方程 Y=1.036 5X-0.000 2(r=0.999 5),结果表明血浆中左氧氟沙星在 0.025~6.0 mg/L 范围内线良性好。

2.7　最低定量限　取空白血浆 0.2 mL 5 份,各加入内标溶液 0.02 mL 和浓度为 0.25 mg/L 左氧氟沙星对照品溶液 0.02 mL,按‘2.3 血浆样品处理’项下操作,测定,结果血浆中左氧氟沙星最低定量限为 0.025 mg/L,其峰面积(RSD)值为 2.25%,符合生物

样品测定关于最低定量限的要求。

2.8　提取回收率　取空白血浆，配制成 0.05、0.4 和 4.0 mg/L 的左氧氟沙星低、中、高血浆样品各 5 份，按“2.3 血浆样品处理”项下操作，测定，记录左氧氟沙星峰面积为 As；另取上述 3 个浓度的对照品直接进样 20 μL 测定，记录峰面积为 Asd，则提取回收率计算公式为 R=As×4/Asd×100%，结果见表 1。结果表明 3 个浓度提取回收率平均值为 93.2%，符合生物样品测定关于提取回收率的要求。

表 1　提取回收率

血药浓度(mg/L)	提取回收率(%)	RSD(%)
0.05	90.5±1.8	2.0
0.40	96.2±1.7	1.8
4.00	92.3±1.4	1.6

2.9　精密度与准确度　取空白血浆，配制成 0.05、0.4 和 4.0 mg/L 的左氧氟沙星低、中、高血浆样品各 5 份，按“2.3 血浆样品处理”项下操作，测定，记录左氧氟沙星峰面积和内标峰面积，计算其比值，代入校正曲线中计算出测得浓度。精密度为测得浓度的变异性，并以 RSD 表示，准确度则用测得浓度的平均值与理论浓度比值的百分数表示。同法处理 3 批血浆样品测定，分别计算批内和批间精密度和准确度，结果见表 2。结果表明本法精密度和准确度均符合生物样品测定要求。

表 2　精密度和准确度

理论浓度 (mg/L)	测定浓度 (mg/L)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)	准确度 (%)
0.05	0.04±0.01	6.36	4.08	89.7±2.88
0.40	0.38±0.01	2.16	3.71	100.3±3.61
4.00	4.04±0.13	3.17	3.44	103.1±2.90

2.10　稳定性实验　取空白血浆，配制成 0.4 mg/L 的血浆样品，分别考察其在室温 24 h，反复冻融 3 次以及处理后样品室温放置 24 h 内的稳定性，结果 RSD 值均小于 5.9%，表明血浆样品在室温放置 24 h，反复冻融 3 次以及处理后 24 h 内稳定，符合生物样品测定关于稳定性的要求。

2.11　健康受试者血浆样品测定　取 20 名健康受试者血浆样品 0.2 mL，加入内标溶液 0.02 mL，按“2.3 血浆样品处理”项下操作，测定，结果见图 2。结果表明本法测定的盐酸左氧氟沙星片在体内符合二室代谢模型，达峰时间为 1.01 h，最大血药浓度为 1.75 mg/L，代谢半衰期为 6.26 h。

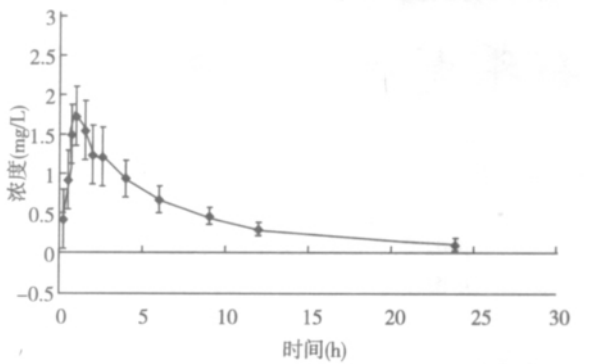


图 2　20 名健康受试者单次口服盐酸左氧氟沙星片后平均血药浓度-时间曲线

3　讨论

本研究血浆样品处理方法曾经试用了甲醇、乙睛、高氯酸沉淀蛋白法以及二氯甲烷、乙酸乙酯萃取，吹干后用流动相复溶，结果提取回收率较低，或者空白血浆中有干扰，而采用氯仿萃取，提取回收率则较高，空白血浆中也无内源性物质干扰样品测定。

左氧氟沙星易溶于中性氯仿，而不易溶于酸性氯仿中，因此本研究血浆样品处理方法采用中性氯仿萃取[3]，再用酸水反萃取，能够有效去除血浆中各种内源性干扰物质对样品测定的影响。

本研究色谱检测条件[4]中流动相曾试用了不同种类的缓冲盐及不同的配比，分离效果均不理想，而采用 0.3% 磷酸(H_3PO_4)，并用三乙胺调 pH 值为 3.06，左氧氟沙星和内标替硝唑分离度较好，无明显拖尾现象。

本研究建立了左氧氟沙星 HPLC-UV 测定方法，实验结果表明，该法操作简便，提取回收率高，批内及批间精密度准确度良好，符合生物样品测定要求，可用于左氧氟沙星血药浓度测定及其药动学等方面的研究。

参考文献：

[1] 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.
[2] 马越鸣，曾照宏，陈　波，等.盐酸左氧氟沙星胶囊人体生物利用度[J]. 中国临床药理学与治疗学，2000，5(4)：333-335.
[3] 肇丽梅，孙亚欣，于　宏，等.HPLC 法测定胆汁中左氧氟沙星的浓度[J]. 中国药学杂志，2006，41(9)：712-714.
[4] 任乔林.甲磺酸左氧氟沙星的药代动力学研究[J].中国抗生素杂志，1999，24(3)：205-208.

(收稿日期 2007-01-16)