

家兔血浆中克林霉素的 HPLC/UV 检测

施飞 李英伦 蒋智钢 (四川农业大学基础兽医系, 四川雅安 625014)

摘要 [目的] 采用 HPLC/UV 法检测家兔血浆中克林霉素。[方法] 血清样品经乙腈沉淀蛋白后, 用二氯甲烷提取。分析柱为 C₁₈ 反相柱, 流动相为 12.5 mmol/L 四丁基硫酸氢铵乙腈溶液-磷酸盐缓冲液 10 mmol/L Na₂HPO₄, 20 mmol/L KH₂PO₄, pH 值 3.50 (20/80), 柱温 40℃, 流速 1 ml/min。[结果] 在上述色谱条件下, 克林霉素血浆提取液与空白血浆中其它杂质分离良好。克林霉素血浆浓度标准曲线线性范围为 40~8 000 ng/ml, 血浆中定量检测限为 80 ng/ml (最低), 定性鉴定限为 40 ng/ml, 在 80~8 000 ng/ml 血浆浓度范围内具有良好的线性关系。总体回收率为 (93.50 ± 0.42)%, 变异系数低于 4.33%。在自动样器中存放 24 h、30℃ 保存以及反复冻融均对克林霉素的稳定性无显著影响。[结论] 该方法的选择性、灵敏度和色谱分辨率均很理想, 可作为检测血浆中克林霉素的一种标准方法。

关键词 克林霉素; 兔; 血浆; 反相高效液相色谱

中图分类号 S829.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)27-11777-03

Detection on Clindamycin in Rabbit Plasma by HPLC/UV

SHI Fei et al (Department of Basic Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014)

Abstract [Objective] The aim was to detect the clindamycin in rabbit plasma by HPLC/UV method. [Method] The serum samples were extracted by dichloromethane after the protein was deposited by acetonitrile. The analytical column was C₁₈ reversed phase column, the mobile phase was acetonitrile solution containing 12.5 mmol/L tetra-n-butylammonium hydrogen sulfate-phosphate buffer (contained 10 mmol/L Na₂HPO₄, 20 mmol/L KH₂PO₄, pH = 3.50) (20/80), the column temperature was 40℃ and the flow rate was 1 ml/min. [Result] Under the above chromatographic conditions, the clindamycin plasma extract was better separated from other impurity in the blank plasma. The linear range of the concentration standard curve of the clindamycin plasma was 40-8 000 ng/ml, the limit of quantification in the plasma was 80 ng/ml (lowest) and the limit of qualitative detection was 40 ng/ml. There was a good linearity in the plasma concentration range of 80-8 000 ng/ml. The overall mean recovery value was (93.50 ± 0.42)% and the coefficient of variation was lower than 4.33%. Storing in the automatic sampler for 24 h, preserving at 30℃, and repeated repeatedly freezing and thawing all had no significant influence on the stability of clindamycin. [Conclusion] The method all had ideal selectivity, sensitivity and chromatogram resolution and could be used as a standard method for detecting the clindamycin in the plasma.

Key words Clindamycin; Rabbit; Plasma; RP-HPLC

克林霉素是一种林可霉素类抗生素。通过用氯原子置换林可霉素 7 位上的羟基合成, 而这一置换恰恰极大地增强了其抗菌活性, 其主要抑菌机制为通过与细菌核糖体 50S 亚基结合而抑制细菌蛋白质的合成^[1]。它对革兰氏阳性菌、厌氧菌、支原体和部分原虫有抗菌活性。克林霉素被用于伴侣动物疾病的治疗, 如葡萄球菌性皮肤感染、骨髓炎、牙周疾病、细菌性前列腺炎和弓形体病^[2]。

现有生物样品中克林霉素的检测方法有微生物法^[3]、RIA(放射免疫性鉴定)^[4]、GLC(气相色谱)^[5]、HPLC/UV(高效液相色谱-紫外法)^[6-8]和 HPLC/MS(高效液相色谱-质谱法)^[15-18]。微生物法和 RIA 都不具特异性, 都不能克服时间和试剂对克林霉素含量的影响。La Follette 等提出了一种 HPLC/UV 法^[6]。但 Liu 等报道该法不具重复性, 并提出了一种匪夷所思的做法: 把 2 条柱子和 2 种流动串连起来提取人血浆样品中的克林霉素^[7]。Fieger-Büschges 等提出了一种采用固相萃取的简单方法, 但其色谱分析时间长达 21 min, 色谱分辨率也不高^[8]。HPLC/MS 的检测效果最好^[9-12], 但 HPLC/MS 仪并非所有实验室都能具有, 笔者采用 HPLC/UV 法检测家兔血浆中克林霉素。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 岛津 2010 液相色谱仪; 漩涡混合器; 离心机; 超速离心机; 氮气吹干仪; pH 计; 电子天平。克林霉素化学对照品 (87.2%, 中国药品生物制品检定所, 0422-9903); 盐酸克林霉素 (原粉, 84.1%); HPLC 级乙腈和二氯甲烷; 分析纯 NaOH; 色谱纯四丁基硫酸氢铵 (Darmstadt, Germany); 色谱

纯磷酸、磷酸二氢钾和磷酸氢二钠。

1.2 标准溶液 精确称取克林霉素对照品 10 ng 置 10 ml 容量瓶中, 用高效液相级水溶解并定容, 配制 1 ng/ml 作为母液。4℃ 避光保存, 备用。用乙腈对母液进行梯度稀释获得 0.1、1.0、10.0 μg/ml 中间标准溶液。所有中间标准溶液与母液相同条件保存。

移取适量的中间标准溶液入另外玻璃试管中, 40℃ 氮气缓慢吹干, 500 μl 流动相溶解配制 40~8 000 ng/ml 范围内的 9 种标准工作溶液。

1.3 验证对照样品 用配制标准溶液的程序配制 5 个水平 (80、200、800、2 000、8 000 ng/ml) 的对照验证样品: 精确移取适量中间标准溶液入干净玻璃试管, 40℃ 氮气吹干后 0.5 ml 空白兔血浆溶解, 漩涡混匀, 静置 30 min。准备成批的验证对照样品, 用于对准确性、精确性的验证和克林霉素在空白血清中的稳定性作评诂。

1.4 色谱条件 C₁₈ 反相柱 (VP-ODS, 150L × 4.6, 4012503); 流动相: 12.5 mmol/L 四丁基硫酸氢铵乙腈液-磷酸盐缓冲液 (20/80), 用 1 mol/L 的磷酸调节缓冲液 pH 值至 3.5。流速 1.0 ml/min; 检测波长 195 nm; 柱温: 40℃; 样品室温度 15℃; 进样 50 μl。

1.5 样品收集与制备 在给药之前和给药之后 10、20、30、45、60、120、240、360、480 及 720 min 采血。肝素钠抗凝, 立即以 4 000 r/min 离心 5 min, 收集血浆分析或贮于 -30℃。取样品血浆 0.5 ml, 加入乙腈 1.0 ml, 高速漩涡混匀 1 min, 5 000 r/min 离心 5 min。将上清液倾入另一试管中, 并向其中加入 0.4 mol/L NaOH 50 μl, 漩涡混匀后加入 6 ml 二氯甲烷, 高速漩涡混匀 1 min, 5 000 r/min 离心 10 min, 弃去表面水层, 取下层试样 5 ml 加入另一试管中, 40℃ 氮气吹干。用 500 μl 流动

作者简介 施飞 (1976-), 男, 四川雅安人, 硕士, 助教, 从事兽医药理学研究。

收稿日期 2008-02-19

相溶解剩余物,旋涡混匀15 s,12 000 r/min 离心10 min 后避开表面脂质层和下层沉淀物将澄清液移入样品瓶,待测。

1.6 测定 通过测定8个水平标准工作溶液,采用最小二乘法回归分析以峰高对相应克林霉素浓度作图获得标准曲线。为了覆盖整个浓度范围(40~8 000 ng/ml),采用了2条标准曲线:低浓度标准曲线(40~2 000 ng/ml)用于检测浓度低于1 000 ng/ml 的溶液;高浓度标准曲线(400~8 000 ng/ml)用于检测浓度高于1 000 ng/ml 的溶液。未知样品克林霉素含量由后面相关峰高和相应标准曲线结合预处理中的稀释度和整体平均回收率通过方程计算:

$$x = (y - b) / a$$

式中, x 表示所采1 ml 样中克林霉素的纳克数; y 表示峰高; a 表示斜率; b 表示截距。

2 结果与分析

2.1 盐酸克林霉素血浆提取液和空白血浆色谱图 在上述色谱条件下,克林霉素血浆提取液与空白血浆中其他杂质可得到良好分离,见图1、2和3。

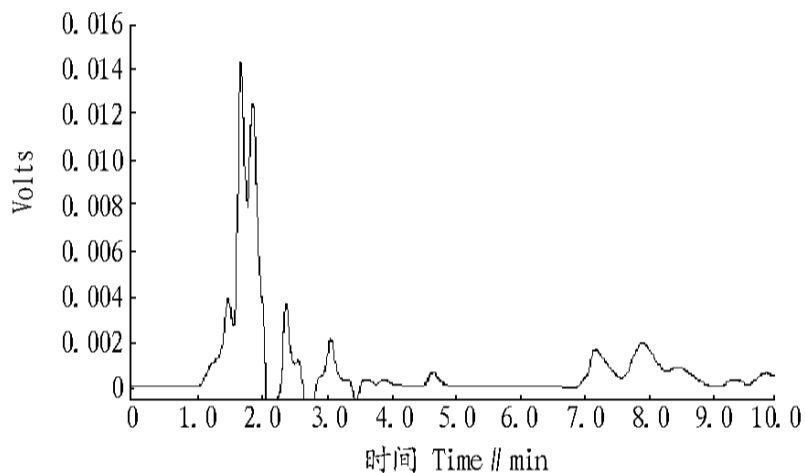


图1 典型的空白兔血浆色谱图

Fig.1 Typical chromatogram of blank rabbit plasma

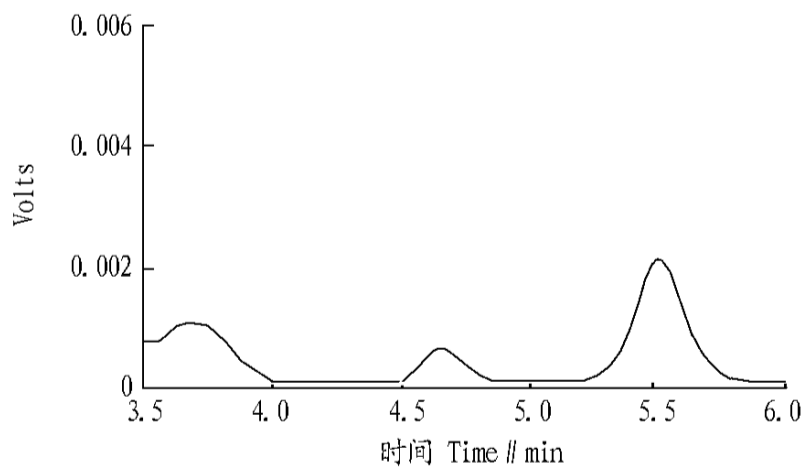


图2 加入800 ng/ml 克林霉素的血浆样品色谱图

Fig.2 The chromatogram of plasma sample with adding 800 ng/ml dindanyin

2.2 标准曲线及线性 用6个已知浓度(40~1 200 ng/ml)的标准溶液对低浓度标准曲线作了验证,而用另5个已知浓度(400~8 000 ng/ml)的标准溶液对高浓度标准曲线作了验证,从而覆盖了整个检测范围,都为5个重复。结果2条标准曲线都高度直线相关。低浓度标准曲线为: $y = (3.180 \pm 0.018)x - 2.100, r^2 = 0.9999$,标准曲线截距 $P = 0.855$ 。高浓度标准曲线为: $y = (3.100 \pm 0.028)x + 48.000, r^2 = 1.000$,标准曲线截距 $P = 0.676$ 。2条标准曲线截距 $P > 0.05$ 。

2.3 盐酸克林霉素在兔体内的药代动力学 兔4只,平均体重为1.75 kg,口服20 ng/kg 体重的盐酸克林霉素,给药后

分别在不同的时间点采血,肝素钠抗凝,4 000 r/min 离心5 min,分离血浆-30 保存。按上述方法提取测定血药浓度,其平均血药浓度-时间曲线见图4。

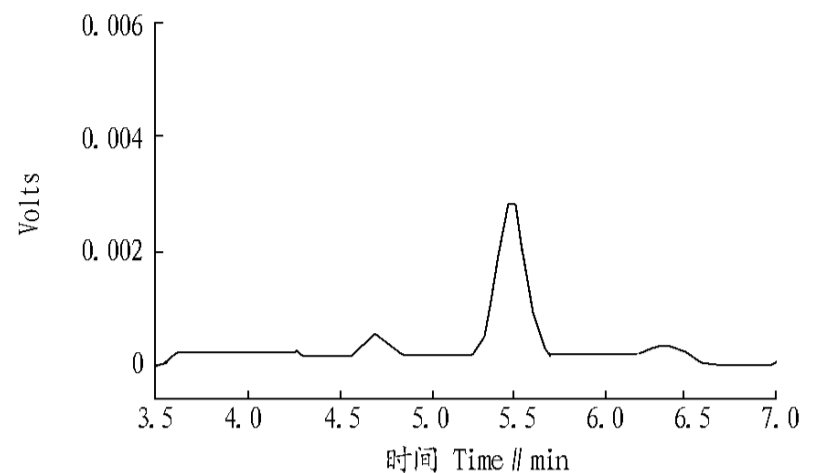


图3 兔一次口服20 ng/kg.b.w 后血浆样品的典型色谱图

Fig.3 The typical chromatogram of plasma sample from rabbits after once oral administration with 20 ng/kg.b.w dindanyin hydrochloride

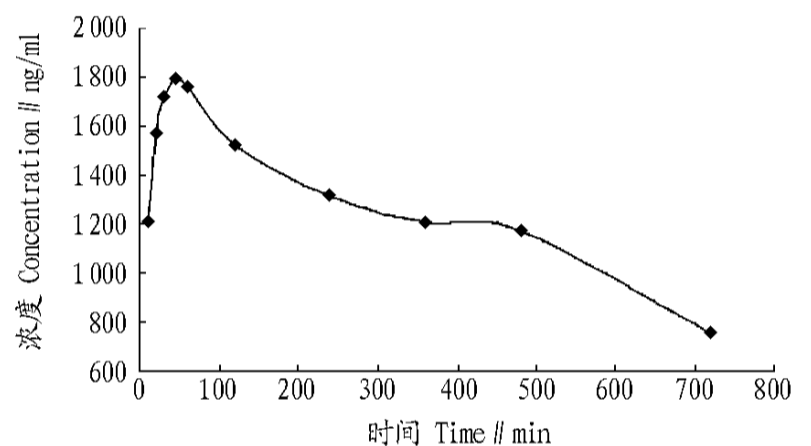


图4 4只兔血浆中的药一时曲线

Fig.4 The concentration-time curve of dindanyin hydrochloride in the plasma of 4 rabbits

2.4 定性检测极限和定量检测极限 定性检测极限即标准曲线中能检测到的最低克林霉素浓度。定量检测极限是经检验准确性和精确性均符合要求的最低已知克林霉素浓度水平。在验证过程中有24个重复($n = 24$),80 ng/ml 偏差为4.67%,变异系数为3.88%。根据公认的标准百分偏差和变异系数小于20%得出定量检测极限是80 ng/ml。

2.5 准确性和精确性 该方法的准确性即回收率是衡量该分析方法的响应和样品中实际克林霉素含量的参数。通过加样回收试验对该方法作了评价。检出的回收率为93.62%~97.16%。通过以实测值对实际值作图得出总体回收率为93.50%。最小二乘线性回归分析表明实际值(x)和实测值(y)的关系可用以下方程描述: $y = (0.935 \pm 0.004)x + (17.420 \pm 13.420)$,SEM为 ± 0.004 ,该截距的P值为0.197(> 0.05)。而该曲线的斜率(93.5 ± 0.4)%即为该方法的总体回收率。通过连续3d对前述5个水平的样品进行分析评价,实测值变异系数在1.64%~4.33%范围内。说明该方法的精确性较高。

2.6 储存稳定性 对80、600和1 800 ng/ml 3个水平的空白加样样品进行提取,放置于自动采样器中,并于当时和24 h后2次测定。统计分析(配对t检验)结果中3个水平都为 $P > 0.05$,表明2次检测结果差异不显著。说明在自动采样器中存放24 h对克林霉素的稳定性无显著影响。向空白血浆中加入克林霉素,配成含克林霉素180、600和1 800 ng/ml 的

样品,6个重复,并于当时和-30℃保存4个月之后进行提取分析。统计分析(配对t检验)结果中3个水平都为 $P > 0.05$,表明2次检测结果差异不显著,说明在-30℃保存对克林霉素的稳定性无显著影响。向空白血浆中加入克林霉素,配成含克林霉素600和1800 ng/ml的样品,6个重复,并于当时和反复3次冻融之后进行提取分析。统计分析结果中2个水平都为 $P > 0.05$,表明2次检测结果差异不显著。说明反复冻融对克林霉素的稳定性无显著影响。

3 结论与讨论

3.1 提取与纯化 通过预试验证明,用有机溶剂沉淀蛋白优于用酸沉淀蛋白,因为用酸沉淀蛋白引入干扰过多,使得色谱分辨率降低。因为要使克林霉素成为易被提取状态必需在碱性条件下,所以接下来选用了50 μmol/L氢氧化钠溶液碱化。选用乙酸乙酯和二氯甲烷作为有机溶剂提取样品中的克林霉素。乙酸乙酯比水轻,易于移入另外玻璃试管中进行下一步操作。然而,用乙酸乙酯引入的干扰远大于用乙腈。而且在预试验中省去沉淀蛋白时也观察到了严重的干扰。而且用乙腈的回收率高于用乙酸乙酯。因此,首选程序为用二氯甲烷在碱性条件下提取。

3.2 色谱条件 因为四丁基硫酸氢铵的pKa与克林霉素相近,这是检测阳离子物质的最佳选择^[13],所以选用了四丁基硫酸氢铵。水相的pH值调到3.50,这低于其他大多数研究者所使用的水相的pH值^[6-7,14-15],但Hornedo-Nuez等则成功使用了用1 mol/L磷酸调节pH值到2.50的流动相^[16]。即使在这样的酸性环境下,硅烷醇仍然充分地处于电离状态。加入的离子对试剂对负电荷起到了屏蔽效应,减小了克林霉素和硅烷醇的相互静电吸引。另外,根据静电排斥原理,质子化了的克林霉素将被带正电荷的四丁基硫酸氢铵正离子排斥而被固定相吸附^[17]。通过改变有机相的比例和TBA的量反复试验得出了最佳流动相条件:12.5 mmol/L四丁基硫酸氢铵乙腈液-磷酸盐缓冲液(20:80)。新的色谱条件显著地改善了LC性能。克林霉素的保留时间为5.5 min,峰尖锐而对称,基线平稳,与其他未知物分离良好。保留时间的增加主要归因于四丁基硫酸氢铵和克林霉素组成的离子对构成以及所构成分子分子量的相对增大。据La Follette等报道,190~200 nm的光谱分析证明克林霉素在195 nm处吸收较高、干扰最小,同时基线平稳。所以选择了195 nm作为检测波长。总之,样品预处理和提纯使基线噪声和干扰降到最低,保证了较低的定量检测极限。验证过程中高而稳定的回收率使得采用外标法成为可能。该方法不仅经济,样品处理速度快,而且其选择性、灵敏度和色谱分辨率均很理想,可作为检测血浆中克林霉素兔的标准方法。

参考文献

[1] BOOTHE D W. Small animal clinical pharmacology and therapeutics[M]. W.B.

Saunders Company, Philadelphia, 2001:170.

- [2] PRESCOTT J F, BAGGOT J D, WALKER R D. Anti microbial Therapy in Veterinary Medicine[M]. 3 ed Iowa State University Press, Ames, Iowa, 2000:229.
- [3] BAIZIAS G C, ADELIS G, KOUTSOVITI PAPADOPOULOU M. A new HPLC/UV method for the determination of clindamycin in rabbit blood plasma[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004, 35:545-545.
- [4] DUCKWORTH C, FISHER J F, CARTERS A, et al. Tissue penetration of clindamycin in diabetic foot infections[J]. J Anti Microb Chemother, 1993, 31(4):581-584.
- [5] GATTI G, FLAHERTY J, BURR J, et al. Comparative study of bioavailabilities and pharmacokinetics of clindamycin in healthy volunteers and patients with AIDS[J]. Anti Microb Agents Chemother, 1993, 37(5):1137-1143.
- [6] GREG LA FOLLETTE, JOHN GAMBERTOGLIO, JERI A, et al. Determination of clindamycin in plasma or serum by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection[J]. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1988, 431:379-388.
- [7] CHU MIN LIU, YI KAI CHEN, TSUNG HSIEN YANG, et al. High performance liquid chromatographic determination of clindamycin in human plasma or serum application to the bioequivalency study of clindamycin phosphate injections[J]. J Chromatogr B, 1997, 696:298-302.
- [8] HILTRUD FIEGER BÜSCHGES, GABRIELE SCHÜTZLER, VÉRONIQUE LARSIMONT, et al. Determination of clindamycin in human plasma by high performance liquid chromatography using coupled columns[J]. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1999, 724(2):281-286.
- [9] LIU YU, CHEN KAI CHAO, WENJU LIAO, et al. Determination of clindamycin in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry: application to the bioequivalence study of clindamycin[J]. J Chromatogr B, 1999, 724:287-294.
- [10] MARIENS LOBENHOFFER J, BANITT P. Sensitive and specific determination of clindamycin in human serum and bone tissue applying liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2001, 755(1/2):143-149.
- [11] CHERLET M, CROUBELS S, DE BACKER P. Quantitative determination of dexamethasone in bovine plasma and tissues by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry to monitor residue depletion kinetics[J]. J Mass Spectrom, 2002, 37:848-853.
- [12] RECHBERGER G N, FAULER G, WINDSCHIEDER W, et al. Quantitative analysis of clindamycin in human plasma by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry using di-N-ethylclindamycin as internal standard[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003, 17(2):135-139.
- [13] BAIZIAS G C, BOISGLOUN A, KOISAKI KOVAISI V P, et al. New simple liquid chromatographic method for the determination of trimethoprim, sulfadiazine and N4-acetylsulfadiazine in plasma of briles[J]. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2002, 769(2):253-259.
- [14] LANDIS B, GRANIME, NELSONS A. Determination of clindamycin in pharmaceuticals by high performance liquid chromatography using ion pair formation[J]. J Chromatogr, 1980, 202:99-106.
- [15] ORVAJ A, VANDENBEMPT K, DEPUYDT S, et al. Liquid chromatography method for separation of clindamycin from related substances[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1999, 20(5):745-752.
- [16] HORNEDO NUEZ A, GETEK T A, KORFMACHER WA. Simultaneous. High performance liquid chromatography of clindamycin and clindamycin phosphate with electrochemical detection[J]. Journal of Chromatography A, 1990, 503:217-225.
- [17] FLETOURIS DJ, BOISGLOUN A, PSOMASI E, et al. Trace analysis of albendazole and its sulphoxide and sulphore metabolites in milk by liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1996, 687(2):427-435.