

高效液相色谱法测定人子宫、输卵管及血清中氧氟沙星浓度

朱国东*, 魏菁, 梁蔚文, 谢梅青

(中山医科大学孙逸仙纪念医院医学研究中心, 广东广州 510120)

摘要: 目的 建立人组织及血清中氧氟沙星含量的 HPLC 测定方法。方法 采用 Hypersil C₁₈ 柱分离, 流动相为乙腈-0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液-0.5 mol·L⁻¹ 四丁基溴化铵(9:91:4, pH 2.5), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 在 UV 294 nm 处测定; 样品经匀浆或用液氮冷冻研磨至粉末状, 用 1% 曲拉通-100 溶解, 乙酸乙酯-异丙醇(9:1) 提取, HPLC 测定。结果 氧氟沙星浓度在 0.2 ~ 8.0 μg·mL⁻¹ 与峰高比呈线性关系, 最小检测限 40 ng·mL⁻¹, 用本法对 20 例妇产科病人进行药物浓度测定, 取得了满意的结果。结论 此方法适用于人体组织中氧氟沙星浓度的测定, 口服后氧氟沙星在人体组织中有良好的分布。

关键词: 氧氟沙星; 子宫; 输卵管; 血清; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2002)02 - 0134 - 04

氧氟沙星为第 3 代喹诺酮类药物^[1], 其血清中的药物浓度监测方法比较成熟^[2-9], 但组织中的测定方法在国内外未见报道。本文建立一种全新的测定氧氟沙星的方法, 针对不同的样本采取不同的处理方法, 特别是应用了 1% 曲拉通-100, 取得较高的提取效率, 适用于任何组织, 同时对妇科须行子宫附件切除的患者的氧氟沙星组织浓度进行测定, 以确定氧氟沙星在子宫及输卵管的分布, 以及与血药浓度的关系, 为临床用药提供指导。

材料与 方法

药品及试剂 氧氟沙星对照品, 内标物诺氟沙星由日本第一制药厂提供; 乙腈为色谱纯; 四丁基溴化铵购自 Sigma 公司; 其他试剂为分析纯; 曲拉通购自 Sigma 公司。

仪器 美国 Waters 公司高效液相系统(510 型泵, 486 可变波长紫外检测器), Ultra turrax T25 组织匀浆器。

受试者 20 名患者, 入选病例标准为 16 岁以上须行子宫附件切除, 体重 50 ~ 60 kg, 心肝肾功能正常者。

给药方案 入选病人分为两组, 每组 10 人, 在

术前 3 h 给药(氧氟沙星, 商品名为可乐必妥, 100 mg/片), 剂量分别为 300 和 500 mg, 服药前, 取空白血样, 手术中取卵巢组织和输卵管组织各 1 g, 置于 -30 °C 冰箱保存, 同时取血液样本 2 mL, 离心, 分离血清, -30 °C 冰箱保存, 备用。

色谱条件 大连伊特利 Hypersil ODS2 C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm), 流动相^[2]: 乙腈-0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾缓冲液-0.5 mol·L⁻¹ 四丁基溴化铵(9:91:4, 用浓盐酸调至 pH 2.5), 流速 1.0 mL·min⁻¹, UV 294 nm 检测。

子宫组织的预处理 取组织 0.5 g, 剪碎, 加入 1% 曲拉通 2.5 mL, 再加入 0.4 mg·mL⁻¹ 诺氟沙星内标液 25 μL, 混匀, 匀浆, 转速 13 000 r·min⁻¹。再在 -80 °C 冰冻 5 min, 解冻, 冰冻解冻再反复两次, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min。取上清液, 用 10 mol·L⁻¹ 氢氧化钠调至 pH 12, 加入乙酸乙酯 2 mL 及硫酸铵 3 g, 用旋涡混匀器振荡 2 min, 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上层液体在 50 °C 下真空干燥。残渣加入流动相 150 μL, 取 40 μL 进样。

输卵管的预处理 取组织 0.5 g, 剪碎, 置于研钵中, 用液氮冷却, 同时用研磨棒捣碎, 研磨至粉末状, 加入 1% 曲拉通 4 mL 和 0.4 mg·mL⁻¹ 诺氟沙星内标液 25 μL, 混匀, 转移至试管中。在 -80 °C 冰冻 5 min, 解冻, 冰冻解冻再反复两次, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min。取上清液, 用 10 mol·L⁻¹ 氢氧化钠调至 pH 12, 加入乙酸乙酯 3 mL 及硫酸铵 5 g, 旋涡混匀 2 min, 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上层液

收稿日期: 2001-04-29。

作者简介: 朱国东(1974-), 男, 药剂师, 硕士研究生。

* Tel: (020) 81332093, E-mail: zgd@263.com

体在 50 °C 下真空干燥。残渣加入流动相 150 μL, 取 40 μL 进样。

血清标本 取血清 0.5 mL, 加入 0.4 mg·mL⁻¹ 诺氟沙星内标液 25 μL, 氯仿 2 mL, 振摇混匀 2 min, 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取下层液体在 50 °C 下真空干燥, 残渣加入流动相 150 μL, 取 40 μL 进样。

结 果

1 高效液相色谱谱图

在上述色谱条件下, 服药病人血清、输卵管及子宫组织中氧氟沙星和内标诺氟沙星的色谱谱图见图 1。

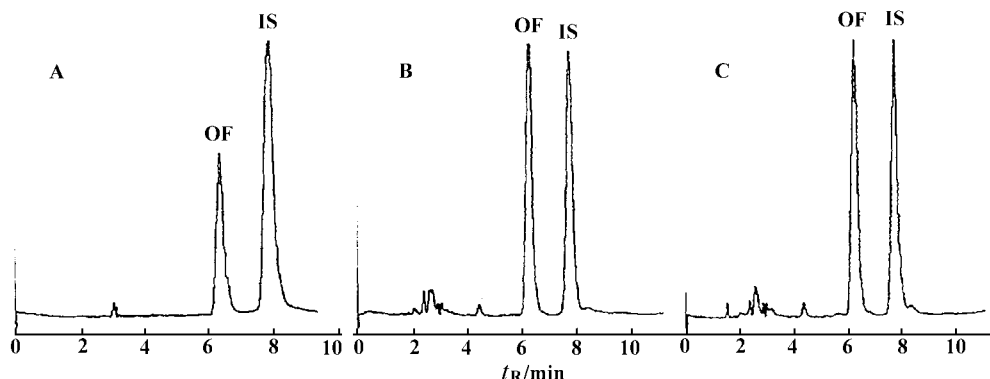


Figure 1 Chromatograph of ofloxacin in patient serum (A), fallopian tube (B) and uterus (C). OF: ofloxacin ($t_R = 6.33$ min); IS: norfloxacin (internal standard, $t_R = 7.85$ min)

2 标准曲线

精密称取氧氟沙星对照品, 蒸馏水溶解, 配制 0.004, 0.008, 0.020, 0.040, 0.080, 0.160 mg·mL⁻¹ 的系列标准溶液, 取标准液 25 μL, 分别加入子宫组织空白样本 0.50 g, 输卵管组织空白样本 0.50 g 及血液空白样本 0.5 mL, 药物浓度相当于 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 μg·mg⁻¹ (或 μg·mL⁻¹), 按上述样品处理方法操作, 以浓度(C)为横坐标, 峰高比(R)为纵坐标进行回归, 得标准曲线, 子宫: $C = -0.24 + 5.50R, \gamma = 0.9999$; 输卵管: $C = -0.28 + 6.32R, \gamma = 0.9998$; 血清: $C = -0.34 + 6.00R, \gamma = 0.9998$ 。

3 精密度

取 0.08 mg·mL⁻¹ 氧氟沙星对照溶液 25 μL 及 0.4 mg·mL⁻¹ 内标液 25 μL, 分别加入子宫组织空白样本 0.50 g ($n = 5$), 输卵管组织空白样本 0.50 g ($n = 5$) 及血液空白样本 0.5 mL ($n = 5$), 药物浓度相当于 4 μg·g⁻¹ (或 μg·mL⁻¹), 以下步骤按上述方法进行测定, 计算相对回收率及 RSD 分别为子宫组织: 102.9%, 3.2%; 输卵管: 103.4%, 3.6%; 血清: 101.8%, 2.9%。

4 回收率

取 0.08 mg·mL⁻¹ 氧氟沙星对照溶液 25 μL 及 0.4 mg·mL⁻¹ 内标液 25 μL, 按“精密度”项下操作, 以提取后的色谱峰峰高与未经提取直接进样的色谱峰峰高之比, 考察样品及内标的提取回收率分别为: 子

宫 ($n = 5$), 83.6%, 56.0%; 输卵管 ($n = 5$), 75.5%, 49.3%; 血清 ($n = 5$): 93.0%, 67.0%。

5 曲拉通-100 对回收率及精密度的影响

取 0.08 mg·mL⁻¹ 氧氟沙星对照溶液 25 μL 及 0.4 mg·mL⁻¹ 内标液 25 μL, 加入子宫组织空白样本 0.50 g, 分别以水 2.5 mL ($n = 5$) 及 1% 曲拉通-100 2.5 mL ($n = 5$) 溶解, 按“子宫组织的预处理”项下操作, 以提取后的色谱峰峰高与未经提取直接进样的色谱峰峰高之比, 考察样品及内标的回收率及 RSD。水提取液: 氧氟沙星, 43.3%, 8.9%; 内标, 14.5%, 7.7%。1% 曲拉通-100 提取液: 氧氟沙星, 83.6%, 3.2%; 内标, 56.0%, 3.9%。

6 测定结果

氧氟沙星在子宫及输卵管组织的浓度均远高于血清, 而子宫与输卵管药物浓度无显著差别, 且有良好的分布, 结果见表 1。

Table 1 Concentration of ofloxacin in women serum and tissue ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Dose/ mg	Serum/ μg·mL ⁻¹	Fallopian tube/ μg·g ⁻¹	Uterus/ μg·g ⁻¹
300	1.8 ± 0.6	4.8 ± 1.5	4.6 ± 1.4
500	3.4 ± 1.4	5.9 ± 2.1	6.6 ± 2.2

讨 论

子宫组织及输卵管的处理方法不同,子宫组织属于肌肉组织,输卵管属于韧性及粘连性很强的组织,子宫组织在高转速的匀浆器能制成很好的匀浆(组织经匀浆后浮在液体上层),但输卵管经高速匀浆后,仍为条状或块状的组织,沉淀在液体下层,很难制成匀浆,曾考查了其他方法。酸水解法、氧化法可能会破坏药物的结构,枯草杆菌法可行但成本太高。最后使用了液氮法,将液氮倒入研钵中,将组织冻结成脆性很大的物质,用研钵棒轻敲即可敲碎,再研磨成粉末状,从而达到了匀浆的效果。

文献^[2-7]一般多用氯仿进行有机溶剂提取,但由于组织溶液的乳化作用很强烈,需加入大量的无机盐防止乳化,氯仿和无机盐都处于下层,使氯仿回收困难,且回收量远低于加入量,故采用乙酸乙酯进行提取。

氧氟沙星及内标物在碱性情况下提取率较高,加入 $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠 1 滴(约 0.04 mL)调节至 pH 12,可用 pH 试纸测试,并不需太准确,因下一步加入大量硫酸铵可形成缓冲能力很强的溶液,其 pH 值约为 7.5。

曲拉通-100 能更好的破碎细胞,在提取细胞 DNA 和 RNA 中,作为一种非离子型的细胞破碎剂已被广泛运用。提取细胞中的药物,用反复冻融法破碎细胞是必须的。在应用中发现曲拉通-100 作为表面活性剂,能增加诺氟沙星及氧氟沙星在乙酸乙酯的溶解度,提高乙酸乙酯对诺氟沙星及氧氟沙星的提取效率,同时精密度亦有明显增加。可能是因为曲拉通-100 很难挥发,可吸附药物,减少药物的挥发损失。

实验结果表明氧氟沙星在人体子宫、输卵管有良好的分布,可很好地治疗子宫、输卵管等处的细菌感染。

REFERENCES:

- [1] Tanaka K, Iwamoto M, Maesaki S, *et al.* Laboratory and clinic studies on levofloxacin [J]. *Jpn J Antibiot*, 1992, **45** (5): 548 - 550.
- [2] Xu DK, Ding AZ, Yuan YS, *et al.* Determination of ofloxacin in human plasma and studies of its pharmacokinetics using HPLC method [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1992, **27** (6): 462 - 466.
- [3] Le Coguic A, Bidault R, Farinotti R, *et al.* Determination of ofloxacin in plasma and urine by liquid chromatography [J]. *J Chromatogr*, 1988, **434**: 320 - 323.
- [4] Wang SJ, Zhong J, Pan L. Enantioselective assay of the optical isomers of ofloxacin in rat [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1995, **30**(8): 485 - 489.
- [5] Guo LY, Li QS, Liu CX. Bioequivalence study of the two kinds of ofloxacin tablets in healthy volunteers [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1998, **29**(6): 433 - 436.
- [6] Lockley MR. The pharmacokinetics and tissue penetration of ofloxacin [J]. *J Antimicrob Chemother*, 1984, **14**(7): 647 - 650.
- [7] Zhang D, Zang JZ, Bianba CJ, *et al.* Determination and pharmacokinetics study of ofloxacin in human plasma by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1998, **18**(5): 308 - 311.
- [8] Qiu X, Wang HG, Wang P, *et al.* Quantitative determination of ofloxacin capsules by high performance liquid chromatography [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 1998, **15**(3): 202 - 203.
- [9] Shen JP, Huang SF, Ding T. Comparison between the two tablets of ofloxacin's pharmacokinetic on healthy volunteer [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 1996, **16**(12): 549 - 553.

DETERMINATION OF OFLOXACIN IN HUMAN FALLOPIAN TUBE, UTERUS AND SERUM BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

ZHU Guo-dong, WEI Jing, LIANG Wei-wen, XIE Mei-qing

(Medical Research Center of Memorial Hospital,
SUN Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish a method for determination of the concentration of ofloxacin in human fallopian tube, uterus and serum. **METHODS** The separation was performed on a Spherisob C₁₈ column (Hypersil, 250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm) with a mobile phase of acetonitrile-0.01 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate-0.5 mol·L⁻¹

tetrabutylammonium bromide (9: 91: 4 , pH 2.5) . The flow rate was $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and detection was at 294 nm . The samples were homogenated or ground to powder after freezing with liquid nitrogen . 1 %triton-100 and certain volume of ethylacetate-isopropanol (10: 1) were added , shaken and centrifuged . Then the entire organic layer was transferred to a tube and vacuum dried . The residue was reconstituted in the mobile phase for HPLC . **RESULTS** There was a linear relationship between the peak area ratio and the ofloxacin concentration over the range of $0.2 \sim 8.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The limits of detection was $40 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. Using this method to determine the ofloxacin concentrations in relevant organs as well as in the plasma of patients of the Department of Gynecology , and achieved satisfactory results . **CONCLUSION** The method can be applied to assay the ofloxacin concentration in human tissues . Ofloxacin was well distributed in woman fallopian tube , uterus and serum after single oral administration .

KEY WORDS: ofloxacin ; uterus ; fallopian tube ; serum ; HPLC