

RP-HPLC 手性流动相添加剂法分析尿中氧氟沙星对映体

曾 苏 章 立* 刘志强

(浙江医科大学药物分析教研室, 杭州 310031)

提要 以 *L*-苯丙氨酸为配合剂, Cu^{2+} 为配合离子, 建立了一种简便的手性配合交换 RP-HPLC 拆分氧氟沙星对映体的方法, 该法已用于人尿中氧氟沙星对映异构体的分析。

关键词 氧氟沙星; 对映异构体; 手性配合交换; 反相高效液相色谱法

氧氟沙星(氟嗟酸, ofloxacin, OFLX)是一全合成抗菌药物, 其作用机理是抑制细菌的 DNA 促旋酶, 临床应用疗效显著。目前临床上使用的是氧氟沙星外消旋体, 即 *S*-(-)-和 *R*-(+)-两种光学异构体的混合物。研究表明, 对于革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌, *S*-(-)-OFLX 的抗菌活力是 *R*-(+)-OFLX 的 8~128 倍, 是氧氟沙星消旋体的 2 倍⁽¹⁾。为了研究氧氟沙星对映异构体的体内药代动力学行为, 需要同时测定生物体内的两种异构体^(2~5)。本文以 *L*-苯丙氨酸为配合剂, 以 Cu^{2+} 为配合离子, 建立了一种简便的手性配合交换 RP-HPLC 拆分氧氟沙星对映体的方法。

实 验 部 分

材料与仪器

氧氟沙星对照品(外消旋体 99.69%); 氧氟沙星胶囊(市售品); 盐酸环丙沙星(杭州民生药厂); *L*-苯丙氨酸(上海二军大); 无水硫酸铜(AR, 浙江兰溪化工厂)。

高效液相色谱仪 Beckman 110B 泵; Beckman 340 Organizer 进样器; Shimadzu RF-535 荧光检测器; Shimadzu C-R4A 色谱数据处理机; Shimadzu ODS 柱 15 cm × 6.3 mm, 10 μm; 自填 C_{18} 保护柱 5 cm × 4 mm, 10 μm; Hitachi F4000 荧光分光光度计; PE241 型自动旋光仪(Perkin Elmer 公司)。

色谱条件: 手性流动相添加剂(CMPA)溶液的配制: 称取 0.66 g *L*-苯丙氨酸和 0.32 g 无水硫酸铜溶于 500 ml 去离子水中(8 mmol/L *L*-苯丙氨酸, 4 mmol/L 硫酸铜, pH 3.5)。流动相: 甲醇—CMPA 溶液(14:86)。流速: 1 ml/min。进样量: 20 μl, 荧光检测波长: λ_{ex} 330 nm, λ_{em} 505 nm。

本文于 1993 年 7 月 13 日收到。

本文为卫生部青年科学研究基金资助项目和国家自然科学基金资助项目

* 现工作单位: 浙江省药品检验所, 杭州

结果与讨论

R-和 S-OFLX 的柱效与分离度

取空白尿样1 ml 加入 OFLX 和内标环丙沙星各4 μg , 混匀, HPLC 分析, 化合物的柱效及分离情况列于表1和图1。OFLX 与 Cu^{2+} 及氨基酸形成的三元配合物设想结构见图2。

Tab 1 The efficiency of column and resolution of OFLX enantiomers

	S-(-)-OFLX	R-(+)-OFLX	Ciprofloxacin
n/column	1841	1829	1806
R	1.75	2.14	
α	1.20	1.25	

n: Number of theoretical plates; R: Resolution between two peaks; α : Separation factor.

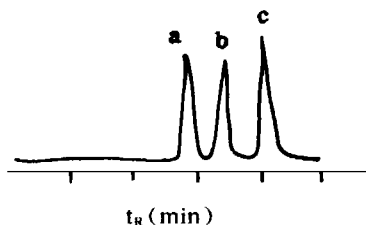


Fig 1 Chromatogram of OFLX enantiomers.

a. S-(-)-OFLX; b. R-(+)-OFLX;
c. Ciprofloxacin (IS).

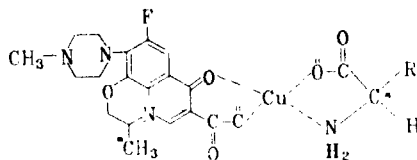


Fig 2 Proposed structure of ligand complex of OFLX and L-phenylalanine with Cu^{2+} .

空白尿样分析表明在各化合物出峰处无干扰。

分别收集流动相洗脱的组分, 调至 pH 7, 用二氯甲烷提取3次, 浓缩至1 ml, 用旋光仪测得柱后馏分的前一个峰为 S-(-)型, 后一个峰为 R-(+)型。流动相 pH 从3.4变化到4.0对 OFLX 对映体的分离度影响不大(分离度为1.68~1.75)。由于流动相 pH < 2易损坏柱子, 而 pH > 4则硫酸铜易析出, 因此, pH 一般控制在3.5左右。为防止盐类析出, 沉积于柱上和 HPLC 系统中, 每次分析完后, 需用大量去离子水冲洗整个系统, 彻底除去残留于系统中的流动相。

线性范围和最低检出限

取空白尿样1 ml, 加入环丙沙星200 μg 作为内标, 分别加入 OFLX 对照品1.2, 3.2, 8.0, 16.0, 40.0, 100.0, 200.0和1000.0 μg , 混匀后, HPLC 分析, 以各对映体与内标的峰面积比(Y)对各对映体浓度(X, $\mu\text{g}/\text{ml}$)进行线性回归。回归方程: S-OFLX: $Y = 0.0101X + 0.0144$; R-OFLX: $Y = 0.0128X + 0.0287$ 。

S-和 R-OFLX 在0.6~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度范围内线性良好。

按逐步稀释法测得此方法的最低检出量为0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (信噪比 > 3); 最低定量浓度为0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (信噪比 > 10, 相对标准偏差 < 12.0%)。

回收率试验

分别取空白尿样1 ml 和去离子水1 ml, 加入内标以及 OFLX 对照品1.2, 8.0 μg , 混匀, HPLC 分析, 按下列公式计算方法回收率, 结果列于表2。

$$\text{回收率}\% = [A_{\text{OFLX}}/A_{\text{IS}}]_{\text{尿}} / [A_{\text{OFLX}}/A_{\text{IS}}]_{\text{水}} \times 100\%$$

Tab 2 Recovery for assay of enantiomers of OFLX in spiked human urine ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Amount added ($\mu\text{g/ml}$)	Amount measured ($\mu\text{g/ml}$)		Recovery (%)	
	<i>S</i> -(-)-OFLX	<i>R</i> -(+)-OFLX	<i>S</i> -(-)-OFLX	<i>R</i> -(+)-OFLX
0.60	0.59 \pm 0.029	0.605 \pm 0.028	98.34 \pm 4.88	100.8 \pm 4.70
4.00	4.056 \pm 0.283	4.10 \pm 0.365	101.4 \pm 7.08	102.5 \pm 9.13

结果显示,方法的平均回收率 *S*-OFLX 为99.87 \pm 5.98,*R*-OFLX 为101.6 \pm 6.92。OFLX 在水和有机溶剂中溶解度均很小,我们曾尝试分别用氯化钠、醋酸铵饱和样品,再分别用二氯甲烷、乙酸乙酯、氯仿或苯作为提取溶剂进行萃取,但回收率均在45%以下,故本文未采用有机溶剂提取法,而是直接采用过滤后的尿样进行分析。

精密度的试验

取空白尿样1 ml,加入内标环丙沙星200 μg 和 OFLX 对照品3.2,8.0 μg ,混匀后,HPLC 测定,计算天内及天间的重现性和精密度,结果列于表3。

Tab 3 Precision and accuracy for assay of enantiomers of OFLX in spiked human urine ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Target concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Mean measured concentration ($\mu\text{g/ml}$)	
	<i>S</i> -(-)-OFLX	<i>R</i> -(+)-OFLX
Within day		
1.60	1.53 \pm 0.12	1.53 \pm 0.10
4.00	4.13 \pm 0.08	4.17 \pm 0.07
Between days		
1.60	1.58 \pm 0.06	1.56 \pm 0.04
4.00	4.14 \pm 0.07	4.14 \pm 0.04

表3数据表明,本文所建立的 OFLX 对映体测定方法具有良好的精密度和重现性。

人尿中 *R*-和 *S*-OFLX 对映异构体的测定

三名男性正常健康自愿者,22~23岁,口服氧氟沙星胶囊1粒(300 mg),2 h 后进食,收集0~2,2~4,4~6,6~8,8~10,10~12,12~16,16~24 h 的尿样,过滤后,取滤液100~400 μl ,加入内标环丙沙星200 μg ,混匀后,依法注射20 μl 进入 HPLC 分析,用回归方程计算结果,数据采用配对 *t* 检验,结果见表4。

结果表明,服用单剂量氧氟沙星消旋体后,*S*-和 *R*-OFLX 对映异构体在不同时间内尿中的 *S*/*R* 值不同,在10 h 内,*S*/*R* 值 $<$ 1,10~12 h,*S*/*R* 值约等于1,12 h 后,*S*/*R* 值 $>$ 1,当到达24 h,*S*-/*R*-OFLX 的比值为1.15。可见,氧氟沙星两个对映体在人体内可能呈现立体选择性代谢。关于氧氟沙星在生物转化过程中是否经历了从 *R* 型向 *S* 型的转变以及服用单个纯对映体后的药代动力学行为有待进一步研究。

Tab 4 Urinary excretions of OFLX enantiomers after an oral dose of (±)-OFLX (300 mg) to three healthy volunteers ($\bar{x} \pm s$)

Time(h)	Amount of urinary excretions (mg)			P
	S-(-)-OFLX	R-(+)-OFLX	S/R in urine	
0~2	18.25±8.80	20.74±9.78	0.88±0.02	<0.05
2~4	23.79±5.67 (42.04±13.83)	26.60±6.21 (47.34±15.05)	0.89±0.03	<0.02
4~6	15.32±1.55 (57.36±13.23)	16.94±1.76 (64.28±14.37)	0.90±0.01	<0.01
6~8	18.57±8.36 (75.93±17.85)	19.45±9.24 (83.73±19.87)	0.96±0.03	NS
8~10	10.25±2.34 (86.18±16.68)	10.49±2.26 (94.22±18.56)	0.98±0.02	<0.05
10~12	7.55±2.55 (93.72±19.09)	7.45±2.37 (101.66±20.81)	1.01±0.03	NS
12~16	10.55±0.49 (104.27±18.60)	10.00±0.28 (111.5±20.42)	1.06±0.02	<0.05
16~24	7.62±4.12 (111.9±21.74)	6.57±3.38 (118.1±22.81)	1.15±0.03	<0.05
Excretions%	74.59	78.75		

Values in parentheses are cumulative urinary excretions of OFLX enantiomers. NS. No significant difference.

参 考 文 献

- Hayakawa I, et al. Synthesis and antibacterial activities of optically active ofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;29:163.
- 曾苏. 手性色谱学与手性药物分析. 现代应用药学 1993;10(5):4.
- Lam S. Chiral ligand exchange chromatography. In: Lough W J, ed. *Chiral Liquid Chromatography*. New York: Beackie, 1989:83~184.
- Lim H K, et al. Stereoselective disposition; enantioselective quantitation of MDMA and three of its metabolites by GC/ECNICI MS. *Biol Mass Spectr*, 1993;22:403.
- 曾苏,等. 体内手性药物的测定方法. 国外医药—制剂、合成药、生化药分册. 1994;15:54.

QUANTIFICATION OF THE ENANTIOMERS OF OFLOXACIN IN HUMAN URINE BY RP-HPLC WITH CHIRAL MOBILE PHASE ADDITIVE

S Zeng, L Zhang and ZQ Liu

(*School of Pharmacy, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310031*)

ABSTRACT The method for determination of *S*-(-) and *R*-(+)-ofloxacin(OFLX) in human urine by RP-HPLC with a chiral mobile phase additive is described. *L*-phenylalanine was used as the chiral additive, Cu^{2+} as the ligand ion and fluorescence for detection. This chiral ligand exchange chromatography has been applied to reveal the enantioselective disposition of ofloxacin in human volunteers.

Key words Ofloxacin; Enantiomers; Chiral ligand exchange; RP-HPLC