

荧光显微成像技术应用于生物样品中氧氟沙星的检测

刘颖, 余燕敏, 李慧, 李金淑

中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081

摘要 应用毛细流自组装成环荧光显微成像技术, 建立了溴化十六烷基三甲胺(Cetyltrimethylammonium bromide, CTMAB)- Al^{3+} -氧氟沙星(Ofloxacin, OFLX)三元荧光体系(CTMAB- Al^{3+} -OFLX)测定氧氟沙星的方法, 并实测鸡灌喂氧氟沙星药片后血液中药物浓度、人体尿液中氧氟沙星浓度及蜂蜜、氧氟沙星片剂、滴眼液中氧氟沙星的含量, 均得到满意结果。在 pH9.50 NH_3-NH_4Cl 缓冲介质和聚乙烯醇-124 存在下, 溴化十六烷基三甲胺- Al^{3+} -氧氟沙星三元配合物在疏水性玻璃表面上受热挥发形成的自组装环直径为 1.63 mm, 环线宽为 50 μm 。当点样体积为 0.20 μL , 氧氟沙星在 $3.30 \times 10^{-13} \sim 1.65 \times 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{ring}^{-1}$ ($0.60 \sim 2.98 \text{ mg} \cdot L^{-1}$) 范围内, 荧光强度与药物浓度有良好的线性关系 ($r=0.9992$), 检测限为 $4.10 \times 10^{-15} \text{ mol} \cdot \text{ring}^{-1}$ ($7.41 \mu g \cdot L^{-1}$)。此法用于鸡灌胃氧氟沙星 2 h 后血药中药物浓度的测定, 回收率为 96.4%~101.2%; 检测了三名健康志愿者服用氧氟沙星片剂后尿液中氧氟沙星的浓度, 发现服药后 3 h 尿液中药物浓度最高, 回收率在 98.2%~106.1%。应用于三种蜂蜜中氧氟沙星残留量的测定, 回收率为 98.2%~106.1%, 相对标准偏差小于 2.3%; 检测了氧氟沙星片剂、滴眼液中有效成分的含量, 与标示量相近, 回收率分别为 93.5%~101.5%和 95.8%~104.2%, RSD 为 3.5%和 3.6%。

关键词 自组装成环荧光显微成像技术; 氧氟沙星; 鸡血清; 人体尿液; 蜂蜜; 氧氟沙星片剂

中图分类号: O482.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)11-2981-06

引言

氧氟沙星系第三代喹诺酮类药物, 属于广谱抗菌药物, 对细菌、支原体及部分厌氧菌有效, 多用于呼吸系统感染与泌尿系统感染, 对革兰氏阳性菌、阴性菌均显示较大活性, 已成为食源性动物饲养中最重要的抗感染药物之一, 过量使用会导致在动物组织中产生残留^[1]。我国规定牛、鸡、猪、羊、兔等动物的肌肉、脂肪、肝、肾食品中喹诺酮类兽药最高残留限量 0.01~1.9 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 日本将最高残留限量控制在 0.05 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[2]。因此, 建立快速、准确、灵敏度高的检测 OFLX 在动物、食品和人体中残留量的新方法具有重要的学术意义和社会意义。目前报道的 OFLX 检测方法有高效液相色谱法^[3]、荧光分析法、电化学分析法^[4]、毛细管电泳法^[5]和微生物法^[6]等。自组装环(self-ordered ring, SOR)荧光显微成像技术是近年来发展起来的具有广泛应用前景的新技术, 已用于金属离子、蛋白质、盐酸小檗碱、四环素、米诺

环素、美他环素、依诺沙星等^[7-11]的测定。该方法具有灵敏度高、样品用量少、共存离子干扰小等优点。本文在前期工作的基础上, 应用 SOR 技术建立了 CTMAB- Al^{3+} -OFLX 三元荧光体系测定氧氟沙星的方法, 并实测鸡灌喂 OFLX 片剂后血液中的浓度、人体尿液中的浓度、蜂蜜、OFLX 片剂和滴眼液中的含量, 均得到满意结果。进一步拓宽了 SOR 技术在动物、食品和人体残留量检测及药物含量的测定, 为药物检测新方法的建立提供可信的理论依据。

1 实验部分

1.1 仪器

IX-81 倒置荧光显微镜(U 激发单元, 日本, Olympus 公司), DP controller(日本, Olympus 公司), Image-Pro Plus 6.0 图像处理软件(美国, Media Cybernetics 公司); Origin7.5 软件包; PB-10 酸度计(德国, 赛多利斯公司); G8023CSL-2C 格兰仕微波炉(广东, 格兰仕微波炉电器有限公司)

收稿日期: 2010-08-09, 修订日期: 2011-02-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(20767004, 21177163), 国家民委科研项目(09ZY011), 中央民族大学“985 工程”项目(MUC 98504-14, MUC 98507-08), 中央民族大学“211 工程”项目(MUC 021211306), 高等学校学科创新引智计划(B08044), 中央高校基本科研业务费专项资金(0910KYZY45), 中央民族大学 2009 年度研究生“自主科研项目”(2009kyqnyjs23)资助

作者简介: 刘颖, 女, 1963 年生, 中央民族大学生命与环境科学学院教授 e-mail: liuying430@yahoo.com.cn

公司); GL-88B 旋涡混合器(江苏, 海门其林贝尔仪器制造有限责任公司)。

1.2 试剂

OFLX 储备液: 称取 0.002 0 g OFLX 标准品(中国药品生物制品检定所), 滴加 0.1 mol · L⁻¹ 盐酸至 OFLX 溶解, 用三次蒸馏水定容至 50 mL 棕色容量瓶, 配成 1.10 × 10⁻⁴ mol · L⁻¹ 的储备液, 避光保存于 0~4 °C 冰箱中, 用时稀释成 1.10 × 10⁻⁵ mol · L⁻¹ 工作液; 1.10 × 10⁻⁵ mol · L⁻¹ CTMAB 溶液; 1.00 × 10⁻⁴ mol · L⁻¹ AlCl₃ 溶液; pH 9.50 NH₃-NH₄Cl 缓冲溶液; 1.00% (w/v) 聚乙烯醇-124 (PVA-124), 甲醇, 三氯甲烷。所用试剂均为分析纯, 实验用水为三次蒸馏水。

1.3 试样的制备

1.3.1 鸡血清试液

将 0.1 g OFLX 片剂(北京双鹤药业股份有限公司, 规格: 0.1 g · 片⁻¹, 下同)研磨成粉末并用温开水溶解, 将体重 2.5 kg 本地健康鸡空腹 12 h 后, 按 40 mg · kg⁻¹ 剂量灌胃给药, 2 h 后从鸡翅膀下静脉取血 2~3 mL, 收集于真空采血管中, 以 4 000 r · min⁻¹ 离心 10 min。取上清液 0.5 mL 于干净试管中, 用 0.5 mL 甲醇沉淀蛋白二次(4 000 r · min⁻¹ 离心 10 min), 待蛋白沉淀完全后, 将此上清液作为分析试液, 用时移取 50 μL 进行测定。

1.3.2 人体尿液

三名健康志愿者空腹 12 h, 按照服药说明各自服用 3 片 OFLX 片剂, 服药后在 0~6 h 内按一定的时间间隔接取尿液, 离心 10 min (2 000 r · min⁻¹), 移取上清液 1 mL 稀释 100 倍作为分析试液, 用时移取 100 μL 进行测定。

1.3.3 蜂蜜试液

分别称取洋槐蜜(北京百花蜂产品科技发展有限公司, 批号: QS111126010033)、枣花蜜(北京优联格瑞食品有限责任公司, 批号: QS111226010003) 和荆花蜜(汪氏蜂蜜园, QS360026010001) 三种蜂蜜各 1.0 g 于 10 mL 比色管中, 用 pH 9.50 NH₃-NH₄Cl 缓冲溶液定容至 10 mL, 在旋涡混合器上混匀, 将此溶液转移至 250 mL 分液漏斗中, 加 30 mL 氯仿, 振荡 10 min, 静置 5 min。在有机层加入 20 mL 0.1 mol · L⁻¹ NaOH 溶液, 振荡 10 min, 静置 5 min, 取水层溶液 50 μL 进行测定。

1.3.4 OFLX 片剂试液

按照文献[12]精确称取 OFLX 片剂 1.949 2 g(相当于含 OFLX 1.0 g), 在研钵中研磨均匀, 精确称取 0.003 9 g(相当于含 OFLX 0.2 g)于小烧杯中, 滴加 0.1 mol · L⁻¹ 盐酸溶解, 用水定容至 100 mL 容量瓶。移取上述溶液 1.0 mL 稀释 10 倍作为分析试液。

1.3.5 氧氟沙星滴眼液试液

移取 OFLX 滴眼液(武汉五景药业有限公司, 规格: 5 mL : 15 mg, 按 C₁₈H₂₀FN₃O₄ 计) 1 mL, 稀释 100 倍制成 OFLX 滴眼液分析试液, 移取 75 μL 进行测定。

1.4 试验方法

在 1.5 mL 微量试管中依次加入 125 μL CTMAB 溶液、一定量 OFLX 工作液、50 μL AlCl₃ 溶液、50 μL pH 9.50 NH₃-NH₄Cl 缓冲溶液以及 30 μL PVA-124, 用蒸馏水定容至 0.5 mL。每加一种试剂均需旋涡混匀, 放置 15 min。在二氯二甲硅烷处理过的疏水性载玻片表面上, 用微量进样器移取一定体积溶液点样, 然后置于微波炉中大火烘干 1.5 min, 在倒置荧光显微镜下采集 SOR 图像, 测定荧光强度 I_{\max} , 同时测定试剂空白的荧光强度 I_{\max}^0 , 作样品荧光强度 ($\Delta I_{\max} = I_{\max} - I_{\max}^0$) ~ OFLX 浓度(c)的线性拟合方程, 并进行相关分析。

2 结果与讨论

2.1 成环特征

图 1(a) 为 CTMAB-Al³⁺-OFLX 三元体系在 pH 9.50 NH₃-NH₄Cl 缓冲溶液中 SOR 俯视图, 环呈蓝色, 当液滴体积为 0.50 μL, 环直径为 1.63 mm, 环线宽为 50 μm。

图 1(b) 为 OFLX 荧光强度径向分布, 将峰 a 和峰 b 荧光强度 (I) 分别对径向距离 (pixels) 进行高斯拟合, 得高斯拟合曲线(图 2)

$$I_a = 27.38 + \frac{537.23}{\sqrt{\pi/2}} e^{-2(x-68.17)^2/5.72^2} \quad (x_a^2 = 2.35)$$

$$I_b = 27.24 + \frac{593.40}{\sqrt{\pi/2}} e^{-2(x-434.58)^2/6.27^2} \quad (x_b^2 = 2.27)$$

χ^2 值反映拟合符合程度, 由于两个 χ^2 相近, 表明溶质在环线上的径向分布符合高斯分布。同时 a 和 b 两峰的半峰宽分别为 $\sigma_a = 5.72$, $\sigma_b = 6.27$, 说明环线上 OFLX 分布较均匀。

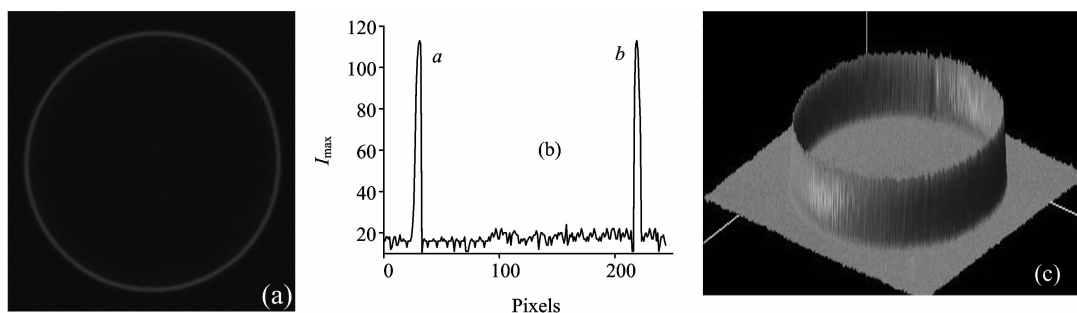


Fig. 1 SOR image of OFLX (a), fluorescence intensity (b) and 3D-SOR image (c)

OFLX: 1.65 × 10⁻⁶ mol · L⁻¹; AlCl₃: 1.00 × 10⁻⁵ mol · L⁻¹; CTMAB: 2.75 × 10⁻⁶ mol · L⁻¹; pH 9.50 的 NH₃-NH₄Cl 缓冲溶液: 150 μL; PVA-124: 0.60%; 4 × objective lens was used

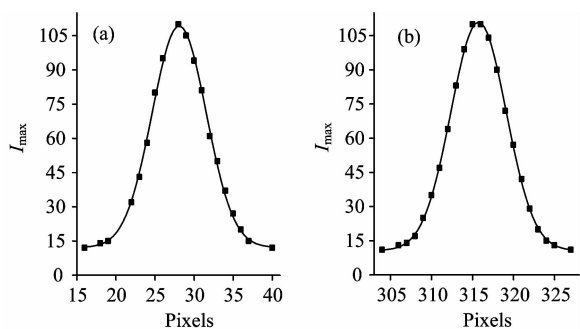


Fig. 2 Gaussian fitting of peak a and b

2.2 试验条件的优化

2.2.1 pH 的选择

不同酸度介质影响 OFLX 的荧光强度^[13]。试验了不同 pH 值的 $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ 缓冲溶液, 结果发现, 使用 pH 9.50 $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ 缓冲溶液作为反应介质时, ΔI_{max} 最大且恒定 (图 3), 当加入 50 μL 缓冲溶液, ΔI_{max} 最大, 但当缓冲溶液用量再增大时, 背景值亦会增加, 故实验选择加入 50 μL pH 9.50 $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ 缓冲溶液。

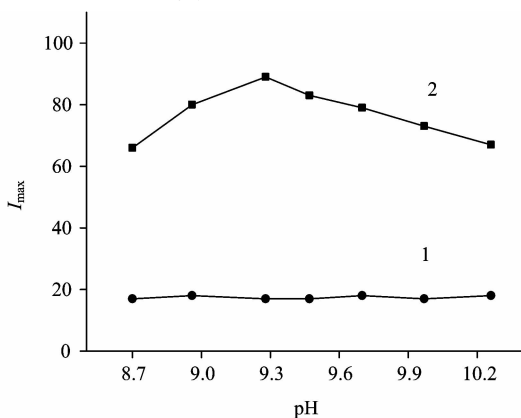


Fig. 3 Effect of pH

OFLX: $1.10 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; AlCl_3 : $1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; PVA-124: 1.0%; CTMAB: $1.10 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; droplet volume: 0.50 μL , $4\times$ objective lens was used

1: blank solution; 2: OFLX solution

2.2.2 PVA-124 用量的影响

PVA-124 能够改变疏水性固载表面的性质, 是决定荧光物质成环好坏的一个重要因素。由图 4 可知, 当 PVA-124 用量较小或较大时, 成环荧光强度都不是最大, 且 PVA-124 用量较大时成环不清晰。当 PVA-124 浓度为 0.60% 时, 荧光强度最大且成环效果最佳, 故实验选择 30 μL 1.00% 的 PVA-124。

2.2.3 表面活性剂用量的影响

CTMAB 对荧光体系起着物理增敏的作用, 实验考查了 CTMAB 在不同用量时的荧光强度 (图 5)。当加入 125 μL 浓度为 $1.10 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CTMAB 工作液时, ΔI_{max} 最大且恒定。故实验选用 CTMAB 工作液 125 μL 。

2.2.4 Al^{3+} 与 OFLX 络合比的确定

用等摩尔系列法测定了 Al^{3+} 和 OFLX 反应的络合比, 保持 Al^{3+} 和 OFLX 总浓度为 $2.00 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 改变 Al^{3+} 和 OFLX 的浓度比。结果表明, Al^{3+} 和 OFLX 的络合比

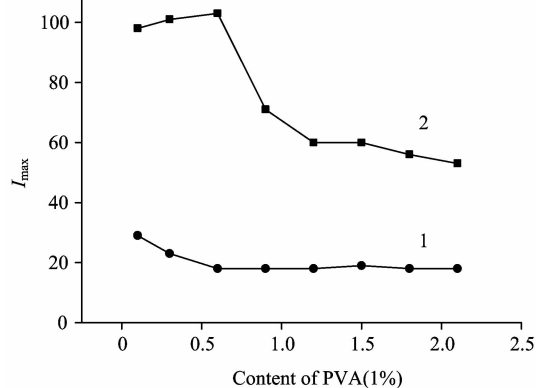


Fig. 4 Effect of content of PVA

OFLX: $1.10 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; AlCl_3 : $1.00 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; CTMAB: $1.10 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 9.50 $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ buffer solution: 50 μL ; droplet volume: 0.50 μL , $4\times$ objective lens was used

1: blank solution; 2: OFLX solution

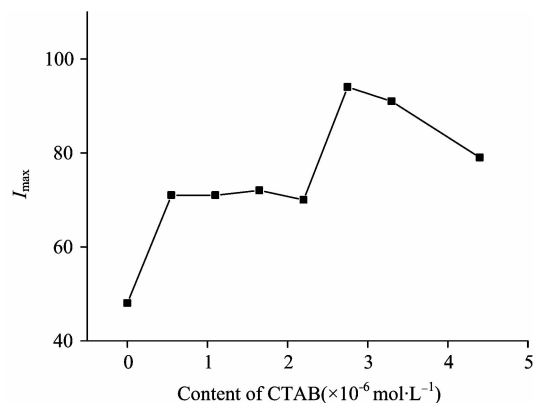


Fig. 5 Effect of content of CTMAB

OFLX: $1.10 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; AlCl_3 : $1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 9.50 $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ buffer solution: 50 μL ; PVA-124: 0.60%; droplet volume: 0.50 μL , $4\times$ objective lens was used

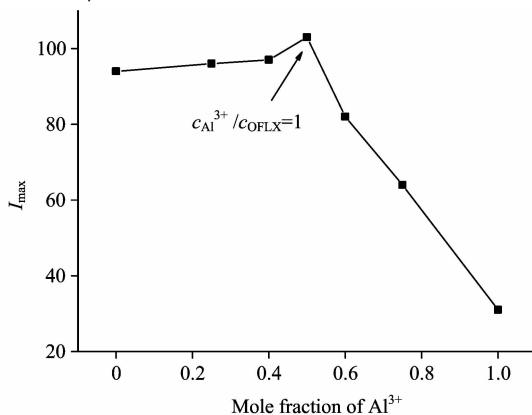


Fig. 6 Molar ratio of Al^{3+} -OFLX

OFLX: $1.10 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; AlCl_3 : $1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; CTMAB: $2.75 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 9.50 $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ buffer solution: 50 μL ; PVA-124: 0.60%; droplet volume: 0.50 μL , $4\times$ objective lens was used

为 1:1(图 6)。

2.2.5 试剂加入顺序

在 CTMAB-Al³⁺-OFLX 三元体系中, 试剂加入的顺序会影响体系的形成和稳定性。按 CTMAB, Al³⁺, OFLX 和 NH₃-NH₄Cl 缓冲溶液以及 PVA-124 的顺序依次加入试剂时, 三元体系形成自组装环的 ΔI_{\max} 明显增强。

2.2.6 反应时间的选择

试验了 CTMAB-Al³⁺-OFLX 体系反应时间与荧光强度的关系, 结果如图 7。从图中可以看出, 当反应时间达到 15 min 时, CTMAB-Al³⁺-OFLX 三元体系络合反应完全, 荧光强度达到最大, 且在 15~45 min 内体系 I_{\max} 稳定且最大, 故实验选择 15 min 作为反应最佳时间。

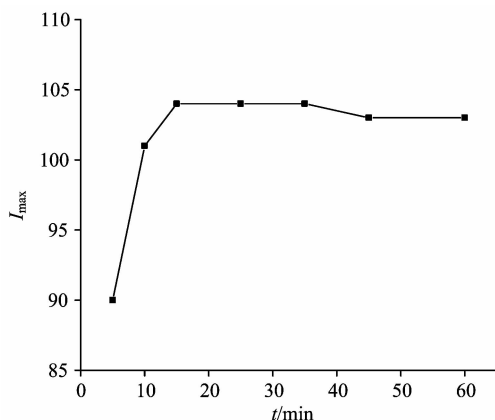


Fig. 7 Effect of reaction time

OFLX: $1.10 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; AlCl₃: $1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; CTMAB: $2.75 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 9.50 NH₃-NH₄Cl buffer solution: 50 μL ; PVA-134: 0.60%; droplet volume: 0.50 μL , 4 \times objective lens was used

2.3 共存物质干扰

在实际测样中, 共存物质的干扰是一个非常重要的问题。试验了在药物制剂、食品以及生物样品中共存的一些物质, 在 $1.65 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ OFLX 存在时的影响(见表 1)。从表中可见, 在测定误差小于 $\pm 10\%$ 范围内, K⁺、NH₄⁺、Cl⁻、Ca²⁺、Mg²⁺、Ba²⁺、Cu²⁺、尿素、麦芽糖、甘氨酸、赖

氨酸、维生素 C 以及甲醇的允许存在量为 OFLX 的 1 000 倍, Na⁺、Zn²⁺、葡萄糖、维生素 B₅ 的允许存在量为 OFLX 的 100 倍, Fe³⁺ 的允许存在量为 OFLX 的 10 倍。而与 OFLX 结构相似的药物左氧氟沙星和加替沙星, 允许存在的浓度分别为 1.10×10^{-7} 和 $1.00 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Table 1 Influence of coexistent foreign substances

共存物质	浓度 / (mol · L ⁻¹)	ΔI 变化 / %	共存物质	浓度 / (mol · L ⁻¹)	ΔI 变化 / %
K ⁺ , Cl ⁻	1.0×10^{-3}	-0.9	葡萄糖	1.0×10^{-4}	+0.9
Na ⁺ , Cl ⁻	5.0×10^{-4}	-1.9	麦芽糖	1.0×10^{-3}	+8.5
NH ₄ ⁺ , Cl ⁻	1.0×10^{-3}	+2.9	淀粉 ^a	1.0×10^{-3}	+0.1
Ca ²⁺ , Cl ⁻	1.0×10^{-3}	-2.0	HSA ^b	10.0	-1.0
Mg ²⁺ , Cl ⁻	1.0×10^{-3}	-1.0	SDS	1.0×10^{-5}	+1.3
Ba ²⁺ , Cl ⁻	1.0×10^{-3}	-2.9	甘氨酸	1.0×10^{-3}	-4.8
Zn ²⁺ , Cl ⁻	1.0×10^{-4}	-6.5	赖氨酸	1.0×10^{-3}	+1.0
Cu ²⁺ , SO ₄ ²⁻	1.0×10^{-3}	-4.5	维生素 B ₅	1.0×10^{-4}	-2.8
Fe ³⁺ , Cl ⁻	1.0×10^{-5}	-8.5	维生素 C	1.0×10^{-3}	-2.8
左氧氟沙星	1.1×10^{-7}	+1.1	尿素	1.1×10^{-3}	-0.9
加替沙星	1.0×10^{-7}	+1.0	甲醇	1.0×10^{-3}	-0.5

^a 淀粉浓度: mg · mL⁻¹; ^b HSA 浓度: $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; HSA: 人血清蛋白; SDS: 十二烷基硫酸钠; OFLX: $1.65 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; AlCl₃: $1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; CTMAB: $2.75 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 9.50 NH₃-NH₄Cl 缓冲溶液: 50 μL ; PVA-124: 0.60%; 液滴体积: 0.50 μL , 使用 4 倍镜头

2.4 线性范围及检出限

在实验确定的最佳成环条件下, 得到了 SOR 荧光强度 (I_{\max}) 与环上氧氟沙星浓度 (m) 的线性关系(表 2)。当液滴体积为 0.20 μL 时, OFLX 的线性范围为 $3.30 \times 10^{-13} \sim 1.65 \times 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{ring}$ ($1(0.60 \sim 2.98 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}, r=0.999 2)$), 检测限为 $4.10 \times 10^{-15} \text{ mol} \cdot \text{ring}^{-1}$ ($7.41 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。

2.5 样品测定

2.5.1 鸡血清

取 1.3.1 中的鸡血清试液进行测定和加标回收实验(表 3), 结果表明, 甲醇沉淀蛋白后对荧光测定几乎没有干扰, 用于鸡血清中氧氟沙星含量的测定得到满意结果。

Table 2 Analytical parameters of SOR method

液滴体积/ μL	线性范围/(mol · ring ⁻¹)	线性回归方程(m , mol)	相关系数(r)	检测限(3σ , mol · ring ⁻¹)
0.20	$3.30 \times 10^{-13} \sim 1.65 \times 10^{-12}$	$I_{\max} = -6.43 + 1.6 \times 10^{14} m$	0.999 2($n=7$)	4.10×10^{-15}
0.30	$9.90 \times 10^{-14} \sim 1.12 \times 10^{-12}$	$I_{\max} = -2.32 + 9.7 \times 10^{13} m$	0.999 9($n=10$)	6.70×10^{-15}
0.50	$2.75 \times 10^{-13} \sim 2.20 \times 10^{-12}$	$I_{\max} = -32.80 + 5.4 \times 10^{13} m$	0.999 7($n=6$)	2.76×10^{-14}

液滴组成: OFLX: $1.65 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; AlCl₃: $1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; CTMAB: $2.75 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 9.50 NH₃-NH₄Cl 缓冲溶液: 50 μL ; PVA-124: 0.60%; 0.2 μL 液滴体积用 10 倍镜头, 其余用 4 倍镜头

Table 3 The Results of OFLX in chicken serum samples

鸡血清	测定值($n=3$)/(mg · L ⁻¹)	加标量/($\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收量/($\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率(% , $n=4$)	RSD/%
1	31.8	0.28, 0.56, 0.85, 1.14	0.28, 0.56, 0.83, 1.13	97.6~100.1	1.1
2	28.9	0.28, 0.56, 0.85, 1.14	0.28, 0.55, 0.86, 1.15	98.2~101.2	1.3
3	33.2	0.28, 0.56, 0.85, 1.14	0.27, 0.56, 0.86, 1.15	96.4~101.2	2.2

AlCl₃: $1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; CTMAB: $2.75 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 9.50 NH₃-NH₄Cl 缓冲溶液: 50 μL ; PVA-124: 0.60%; 液滴体积: 0.30 μL , 使用 4 倍镜头

2.5.2 人体尿液

OFLX 在体内经氧化、还原、水解和结合等反应, 通过血浆、肾、肺进行转化, 90% 以上的 OFLX 从肾脏以原形排除, 主要经肾小球滤过和肾小管分泌。由于肝脏的代谢有限, 生物氧化程度较少, 体内消除较慢, 半衰期为 3.6~6.7 h, 在尿液中浓度较高。取 1.3.2 节尿样, 在实验优化条件下分别进行尿液中 OFLX 浓度的测定, 结果如图 8 所示。从图看出, 3 个被检人在服药 3 h 后, 尿液中 OFLX 浓度都达到峰值。取服用 OFLX 片剂 3h 后的 3 个尿样进行加标回收实验, 得到满意结果(表 4)。

2.5.3 蜂蜜

蜂蜜中葡萄糖、果糖和麦芽糖的含量较高, 对 OFLX 三元配合物荧光有较大影响。但按 1.3.3 节方法处理蜂蜜后, 糖类的干扰几乎完全消除。在实验优化条件下对蜂蜜试液进行测定, 结果(表 5)表明, 此法用于蜂蜜中 OFLX 的含量测定是可行的。

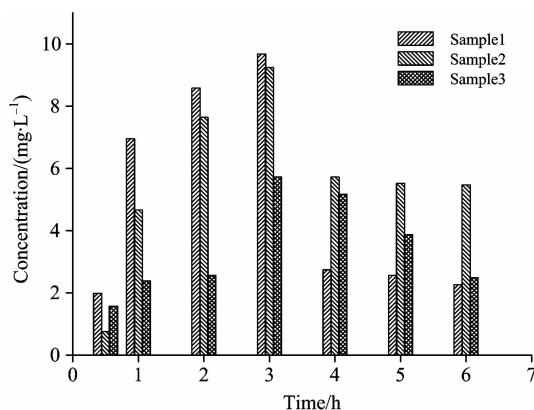


Fig. 8 OFLX concentration in three healthy volunteer's urine after oral administration-time curve

AlCl_3 : $1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; CTMAB: $2.75 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 9.50 $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ buffer solution; 50 μL ; PVA-124: 0.60%; droplet volume: 0.30 μL , 4 \times objective lens was used

Table 4 The determination of OFLX recoveries in the urine samples

样品	测定值($n=3$)/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	加标量/($\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收量/($\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率(%, $n=4$)	RSD/%
1	9.68	0.33, 0.66, 0.99, 1.32, 1.65	0.34, 0.69, 1.00, 1.33, 1.62	98.2~104.5	2.4
2	9.66	0.33, 0.66, 0.99, 1.32, 1.65	0.34, 0.65, 0.99, 1.36, 1.63	98.4~103.0	2.2
3	5.85	0.33, 0.66, 0.99, 1.32, 1.65	0.35, 0.65, 1.00, 1.36, 1.63	98.4~106.1	3.1

尿样: 服用 OFLX 片剂 3 h 的尿液; AlCl_3 : $1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; CTMAB: $2.75 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 9.50 $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ 缓冲溶液: 50 μL ; PVA-124: 0.60%; 液滴体积: 0.30 μL , 使用 4 倍镜头

Table 5 The analysis results of OFLX in the honey samples

样品	测定值($n=3$)/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	加标量/($\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收量/($\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率(%, $n=4$)	RSD/%
洋槐花蜜	ND	0.28, 0.57, 0.85, 1.14	0.29, 0.59, 0.90, 1.21	100.7~106.1	2.3
枣花蜜	ND	0.28, 0.57, 0.85, 1.14	0.29, 0.56, 0.87, 1.18	98.2~103.6	2.1
荆花蜜	ND	0.28, 0.57, 0.85, 1.14	0.29, 0.58, 0.88, 1.21	101.8~106.1	2.1

蜂蜜样品: 1.0 g; OFLX 浓度: $1.42 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; AlCl_3 : $1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; CTMAB: $2.75 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 9.50 $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ 缓冲溶液: 50 μL ; PVA-124: 0.60%; 液滴体积: 0.30 μL , 使用 4 倍镜头

Table 6 The determination of OFLX in the tablet and eye drops sample

样品	测定值($n=3$)/g	加标量/($\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收量/($\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率(%, $n=4$)	RSD/%
OFLX 片剂	0.1	0.33, 0.66, 0.99, 1.32	0.31, 0.65, 1.00, 1.34	93.5~101.5	3.5
OFLX 滴眼液	14.3	0.28, 0.56, 0.85, 1.14, 1.42	0.27, 0.58, 0.82, 1.13, 1.48	95.8~104.2	3.6

OFLX 片剂规格: 0.1 g(按 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_4$ 计); OFLX 滴眼液规格: 15 $\text{mg} \cdot 5 \text{ mL}^{-1}$ (按 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_4$ 计); AlCl_3 : $1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; CTMAB: $2.75 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 9.50 $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ 缓冲溶液: 50 μL ; PVA-124: 0.60%; 液滴体积: 0.30 μL , 使用 4 倍镜头

2.5.4 氧氟沙星片剂、滴眼液

分别对 1.3.4 节 OFLX 片剂试液和 1.3.5 节 OFLX 滴眼液试液进行测定(表 6)。结果表明, 测定结果与标示量吻合, 加标回收率为 93.5%~101.5% 和 95.8%~104.2%, RSD 小于 3.6%, 表明该方法实用、可行。

致谢: 本文在仪器使用过程中得到了中央民族大学中国少数民族传统医学研究院(国家民委-教育部重点实验室)崔箭院长、徐斯凡副院长和申刚义博士的大力支持和帮助, 在此表示衷心感谢!

References

- [1] Nelson J M, Chiller T M, Powers J H, et al. Clin. Infect. Dis., 2007, 44(7): 977.
- [2] LI Ya-li, XU Chuan-lai(李雅丽, 胥传来). Food Science(食品科学), 2007, 28(11): 628.
- [3] Samanidou V F, Demetriou C E, Papadoyannis I N. Anal. Biochem., 2003, 375(5): 623.

- [4] Magno A G T, Glauca M S, Valdir S F. *Microchem. J.*, 2005, 81: 209.
- [5] Hernández M, Borrull F, Calull M. *Electrophoresis*, 2002, 23(3): 506.
- [6] Sunderland J, Tobin C M, Hedges A J, et al. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2001, 47(3): 271.
- [7] Fan M K, Huang C Z, Li Y F. *Anal. Chim. Acta*, 2002, 453(1): 97.
- [8] Chen Y C, Huang C Z. *Talanta*, 2003, 59: 681.
- [9] Liu Y, Huang C Z, Li Y F. *Anal. Chem.* 2002, (74): 5564.
- [10] Huang C Z, Liu Y, Li Y F. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, 34: 103.
- [11] YANG Le, WANG Hong, LIU Ying(杨乐, 王红, 刘颖). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*, 2010, 38(7): 973.
- [12] Pharmacopoeia Committee of Ministry of Health, the People's Republic of China(中华人民共和国药典编委会). *The Pharmacopoeia of People's Republic of China(Part II)(中华人民共和国药典二部)*. Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2000. 712.
- [13] Shao B, Sun X J, Zhan J. *Chromatogr. A*, 2008, 1182: 77.

Determination of the Ofloxacin in the Biologic Samples by Fluorescence Microscopic Imaging Technique

LIU Ying, YU Yan-min, LI Hui, LI Jin-shu

College of Life and Environmental Science, Minzu University of China, Beijing 100081, China

Abstract The method of CTMAB- Al^{3+} -OFLX ternary complex fluorescence microscopic imaging technique was established for the determination of ofloxacin based on the capillary effect of solvent on solid supports, and the concentration in the serum after the chicken was burdened with ofloxacin tablet, the concentration in the human urines and the percentage composition in the honeys, ofloxacin tablets and eye-drops were measured with satisfaction, respectively. In the presence of pH 9.50 $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ buffer solution and PVA-124, CTMAB- Al^{3+} -OFLX ternary complex can form a self-ordered ring on the hydrophobic supports with the diameter of 1.63 mm and its ring belt width of 50 μm . When a 0.20 μL droplet was spotted, the fluorescence intensity of the ring had a favorable linear relation ($r=0.9992$) with the drug concentration in the range of $3.30 \times 10^{-13} \sim 1.65 \times 10^{-12}$ $\text{mol} \cdot \text{ring}^{-1}$ ($0.60 \sim 2.98 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and the limit of detection can reach 4.10×10^{-15} $\text{mol} \cdot \text{ring}^{-1}$ ($7.41 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) with three times of signal to noise ratio. This method has been applied to the average concentration of ofloxacin in the chicken serum with the recovery of 96.4%~101.2% after two hours of being burdened with ofloxacin tablet. Then the technique was applied to the determination of ofloxacin in the three healthy volunteer's urines after oral administration with recovery of 98.2%~106.1%. It was found that the concentrations of ofloxacin in urines were the highest after three hours of taking medicine; the result was similar to reports in the literature. The residues of ofloxacin in three different honey samples were satisfactorily determined with the recoveries of 98.2%~106.1%, and RSD was less than 2.3%. The contents of active constituent in tablet samples and eye-drops sample were determined with recoveries of 93.5%~101.5% and 95.8%~104.2%, and RSD was 3.5% and 3.6%, respectively, which were similar to marked values.

Keywords Self-ordered ring fluorescence microscopic imaging technique; Ofloxacin; Chicken serum; Human urine; Honey; Ofloxacin tablet

(Received Aug. 9, 2010; accepted Feb. 20, 2011)