

# 离子对 RP-HPLC 法测定人尿中的左氧氟沙星

徐庆 姚彤炜 蒋惠娣 (杭州 310031 浙江大学湖滨校区药学院)

左氧氟沙星 (Levofloxacin, LVFX) 是第 4 代喹诺酮类药物,其抗菌谱广,作用强,目前广泛用于治疗呼吸道、泌尿道、肠道、皮肤、关节等多种系统的感染。人尿中 LVFX 的测定方法目前国内外已有紫外分光光度法、HPLC-荧光检测法、微生物法及高效液相色谱法<sup>[1-4]</sup>,本实验采用离子对 RP-HPLC 法测定尿药中 LVFX 的浓度,并建立了含中草药黄芪、黄芩的 LVFX 尿药浓度测定方法。方法简便,专属性好,结果可靠。

## 1 试剂与仪器

左氧氟沙星片(批号),左氧氟沙星标准品(纯度 > 99%)均为浙江新昌制药厂产品,黄芩、黄芪购自浙江中医学院药房,磷酸二氢钾、四丁基溴化铵、甲醇为色谱纯或分析纯。

LC-10ATVP 高效液相色谱仪(日本岛津),SPD10AVP 型紫外检测器,分离柱 ODS (15cm × 4.6 mmID),UPPER 色谱数据处理机。

## 2 实验方法与结果

2.1 标准溶液的配制 精密称取 LVFX 适量,以甲醇表 1 精密度测试结果

为溶剂配成 1 mg/ml 的标准储备液,于冰箱内 4℃ 保存,用时以流动相稀释成不同浓度的标准溶液。

2.2 HPLC 色谱条件 流动相:甲醇-0.01 M 磷酸盐缓冲液-0.5 M 四甲基溴化铵(20:80:4);流速 0.8 ~ 1.0 ml/min;检测波长:294 nm;进样量 20 μl。

2.3 LVFX 标准曲线的制备 分别精取 LVFX 储备液置 8 支具塞离心试管中,加入流动相,配成含量为 12.5, 20.0, 62.5, 125, 200, 300, 500 和 700 μg/ml LVFX 甲醇液,取 20 μl 在上述色谱条件下进样测定,得到相应峰面积(Y)对 LVFX 浓度(X)进行线性回归,得回归方程:  $Y = 38786.4X - 118722$ ,  $r = 0.9995$  ( $n = 3$ )。线性范围为 12.5 ~ 700 μg/ml,检出限 20 ng/ml。

2.4 精密度 分别精取空白尿样 1 ml,各加入 LVFX 标准溶液,使其浓度分别为 12.5, 125, 500 μg/ml,每个浓度各制备 5 管,样品经 3500 r/min 离心,0.45 μm 薄膜过滤后进样测定,计算日内差异,每天重新配制 3 个浓度,连续测定 5 d 计算日间差异,结果见表 1。

测定间隔	加入浓度/μg·ml <sup>-1</sup>	测得峰面积	加入浓度/μg·ml <sup>-1</sup>	测得峰面积	加入浓度/μg·ml <sup>-1</sup>	测得峰面积
0h	15.63	486738	125.0	4159811	500.0	19731952
1h	15.63	456697	125.0	4240044	500.0	19682838
2h	15.63	463887	125.0	4231752	500.0	19615420
3h	15.63	449201	125.0	4302421	500.0	19370160
4h	15.62	446604	125.0	4305280	500.0	19484136
RSD	3.49 %		1.26 %		0.76 %	
0d	15.63	498055	125.0	4159711	500.0	19614520
1d	15.63	433712	125.0	4372200	500.0	19647430
2d	15.63	481714	125.0	4379996	500.0	19077344
3d	15.63	472662	125.0	4282510	500.0	20153882
4d	15.62	444234	125.0	4428785	500.0	20185096
RSD	5.71 %		2.45 %		2.31 %	

2.5 样品回收率精密吸取 LVFX 标准溶液,加入到空白尿样中,配制成浓度为 12.5,125 和 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 LVFX 尿溶液,进样测定,峰面积与 LVFX 加到流动相中测定出的峰面积相比,计算绝对回收率,结果见表 2。

表 2 回收率测定结果/  $n = 3$

加和量 / $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	测得峰 面积	测得量 / $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	加样回收 率/ %	平均回收 率/ %	RSD / %
15.63	486738				
15.63	456697	15.06 $\pm$ 0.43	96.35		
15.63	449201				
125.0	4353227				
125.0	4240044	113.9 $\pm$ 1.73	91.2	96.23 $\pm$ 4.29	4.45
125.0	4231752				
500.0	19484136				
500.0	19370166	505.5 $\pm$ 3.18	101.1		
500.0	19615420				

2.6 方法专属性 以空白尿样、空白尿分别加 100 $\mu\text{l}$  LVFX 黄芩、黄芪、空白尿 + LVFX + 黄芩、空白尿 + LVFX + 黄芩(LVFX 浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、黄芩、黄芪均为 7g 生药加 200g 水提取液)分别测定,结果见图 1。

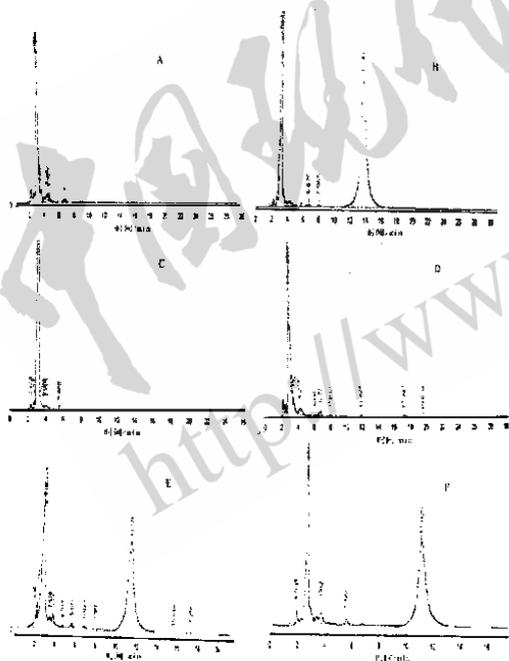


图 1

A - 空白尿; B - 空白尿 + LVFX; C - 空白尿 + 黄芩; D - 空白尿 + 黄芩; E - 空白尿 + 黄芩 + LVFX; F - 空白尿 + 黄芩 + LVFX

2.7 受试者尿样的测定 健康志愿者 8 名,年龄 20 ~ 42 岁,平均 25 岁,体重 46 ~ 56kg,平均 51.8kg,受试前

2 周禁服任何药物,试验时分别在 1, 8 和 15d 服用 LVFX 片 200mg、LVFX 片 200mg + 黄芩 7g、LVFX 片 200mg + 黄芪 7g, LVFX 用 200ml 水送服,黄芩和黄芪分别用 200ml 水煎煮服用,收集 1, 2, 4, 6, 8, 12 和 24h 尿液,准确记录尿量,取适量依法测定尿浓度,计算累积排药量  $X_0^{0-24}$ , 结果见图 3。

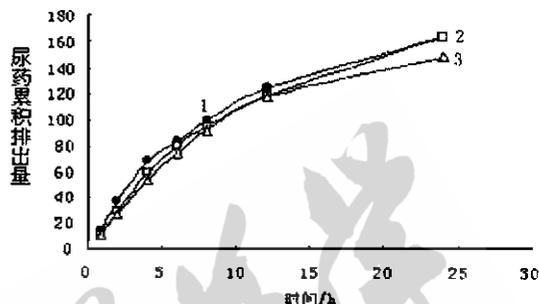


图 2 8 名志愿者服用 LVFX(1 - 系列 1)、LVFX + 黄芩(2 - 系列 2)、LVFX + 黄芪(3 - 系列 3)后尿药排出量-时间曲线

### 3 讨论

本研究采用离子对 RP-HPLC 法测定健康人尿中 LVFX 的浓度,并建立了中草药黄芩、黄芪中测定 LVFX 的方法,实验采用甲醇-磷酸盐缓冲液(0.01 M)-四丁基溴化胺(0.5 M)为 80:20:4 的比例作流动相, LVFX 与黄芪、黄芩杂质得到良好分离,分离度  $> 1.5$ , 线性范围为 12.5 ~ 700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $r = 0.9995$ , 尿中回收率为 91.2% ~ 101.1%, 测定波长为 294nm, 在此条件下,空白尿、黄芩、黄芪对 LVFX 测定无干扰。本方法简单快速,专属性好,可用于左氧氟沙星、左氧氟沙星与黄芩、左氧氟沙星与黄芪合用时的尿样进行药代动力学研究。

### 参考文献

- 徐庆,朱卡林,马明铭.紫外分光光度法测定人尿中左氧氟沙星.浙江医科大学学报,1998,27(2): 88.
- Rybak MJ, Bailey EM, Reddy VN. Clinical evaluation of teicoplanin fluorescence polarization immunoassay. Antimicrob Agents Chemother, 1991, 35: 1586.
- Beringer PM, Holtom PR, Rho JP. Comparing the newest fluoroquinolones: levofloxacin and sparfloxacin. Formulary, 1997, 32: 926.
- Wong FA, Juzwin SJ, Flor SC, et al. Rapid stereospecific high-performance liquid chromatographic determination of levofloxacin in human plasma and urine. J Pharm Biomed Anal, 1997, 15(6): 765.

收稿日期:1999-07-16