

离子对 HPLC 同时测定 5 种氟喹诺酮类药物

史志华¹, 赵永新^{2*}, 欧阳素英¹ (1. 湖南省怀化市第一人民医院临床药理学室, 湖南 怀化 418000 2. 湖南省怀化学院, 湖南 怀化 418000)

摘要:目的 建立一种离子对高效液相色谱快速分离和测定依诺沙星、环丙沙星、氟罗沙星、诺氟沙星、司帕沙星的方法。方法 采用 Hypersil ODS₂ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为 11 mmol·L⁻¹ 四丁基溴化铵溶液(含 0.5% 三乙胺)-乙腈(96:4) 用冰醋酸调 pH 为 4.2, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 280 nm。结果 在 20 min 内 5 种氟喹诺酮类药物(fluoroquinolones, FQS) 分离完全, 线性范围分别为依诺沙星和诺氟沙星为 4~100 μg·mL⁻¹, 环丙沙星和氟罗沙星为 5~90 μg·mL⁻¹, 司帕沙星为 8~100 μg·mL⁻¹ ($r > 0.9994$), 检测限依诺沙星和诺氟沙星为 0.8 μg·mL⁻¹, 环丙沙星为 1.0 μg·mL⁻¹, 氟罗沙星为 0.9 μg·mL⁻¹, 司帕沙星为 1.2 μg·mL⁻¹。结论 本方法简便快速、准确、重复性好。

关键词: 离子对高效液相色谱法; 依诺沙星; 环丙沙星; 氟罗沙星; 诺氟沙星; 司帕沙星

中图分类号: R917.101, R917.795 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2009)02-0162-04

Separation and Determination of Five Fluoroquinolone Antibiotics by Ion Pair-HPLC

SHI Zhihua¹, ZHAO Yongxin^{2*}, OUYANG Suying¹. (1. Department of Clinical Pharmacy, the First People's Hospital of Huaihua, Huaihua 418000, China; 2. Huaihua University, Huaihua 418000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an ion pair-HPLC with fast separation and determination of enoxacin, ciprofloxacin, fleroxacin, norfloxacin and sparfloxacin. **METHODS** Hypersil ODS₂ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was used with 11 mmol·L⁻¹ tetrabutylammonium bromide solution (0.5% triethylamine)-acetonitrile (96:4) pH4.2 used by acetic acid as the mobile phase with a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and UV wavelength was set at 280 nm. **RESULTS** Five fluoroquinolones have been separated completely in 20 minutes. The linear range of enoxacin and norfloxacin was 4 - 100 g·mL⁻¹, for ciprofloxacin and fleroxacin it was 5 - 90 g·mL⁻¹, for sparfloxacin it was 8 - 100 μg·mL⁻¹ ($r > 0.9994$). The detection limit of enoxacin and norfloxacin was 0.8

作者简介: 史志华, 男, 主管药师 Tel: 13548998666 E-mail: hyszhzh88@yahoo.com.cn * 通信作者 赵永新, 男, 主任药师
Tel: 13807451972 E-mail: zyx2145@yahoo.com.cn

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, for ciprofloxacin it was $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, for fleroxacin it was $0.9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, for sparfloxacin it was $1.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

CONCLUSION The method is simple, rapid, accurate and reproducible.

KEY WORDS: ion pair-HPLC; enoxacin; ciprofloxacin; fleroxacin; norfloxacin; sparfloxacin

氟喹诺酮类药物 (fluoroquinolones, FQS) 是近年来发展迅速并广泛应用于临床的新一代合成广谱抗菌类药物, 特别是最新研究表明一些 FQS 具有抗结核和抗肿瘤活性而越来越受到临床的重视。FQS 结构非常相似且具有酸碱两性, 本试验主要研究了 5 种 FQS: 依诺沙星、环丙沙星、氟罗沙星、诺氟沙星、司帕沙星。此类药物报道的分析方法很多, 但大多为单一药物的分析^[1-5]。本试验以离子对试剂为流动相, 优化了色谱系统, 对上述 5 种 FQS 获得了满意的分离, 为此类药物的质量控制和体内药物研究提供了新的有效方法。

1 仪器与试剂

Shimadzu LC-10AD 高效液相色谱仪, SPD-10AV 紫外可见检测器, 江申色谱处理系统, PXSJ-216 型离子分析仪, TU-1901 双光束紫外分光光度仪 (上海普析仪器设备有限公司), 80-1 离心沉淀机 (姜堰市新康医疗器械有限公司)。

依诺沙星 (批号: 0453-9901, 纯度: 91.1%)、诺氟沙星 (批号: 130450-200304, 纯度: 97.8%)、环丙沙星 (批号: 130451-200302, 纯度: 84.9%)、氟罗沙星 (批号: 130458-200301, 纯度: 99.1%)、司帕沙星 (批号: 130461-200501, 纯度: 99.8%) 对照品均购自中国药品生物制品检定所, 乙腈、甲醇为色谱纯为美国天地公司产品, 四丁基溴化铵、乙酸、三乙胺为分析纯, 水为去离子水。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil ODS₂ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相: 11 mmol · L⁻¹ 四丁基溴化铵溶液 (含 0.5% 三乙胺)-乙腈 (96:4) 用冰醋酸调 pH 为 4.2, 柱温 40 °C, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 280 nm。进样量 20 μL。

2.2 试剂的配制

标准溶液的配制: 精密称取依诺沙星、诺氟沙星、环丙沙星、氟罗沙星、司帕沙星对照品适量, 分别溶于甲醇后置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 得依诺沙星 78 mg · L⁻¹、诺氟沙星 52 mg · L⁻¹、环丙沙星 40 mg · L⁻¹、氟罗沙星 50 mg · L⁻¹、司帕沙星 50 mg · L⁻¹ 的标准储备液, 实验中移取一定量的标准储备液配成混合标准溶液。

四丁基溴化铵溶液: 称取 3.46 g 四丁基溴化铵, 溶于 900 mL 水中, 用水定容为 990 mL 后, 用冰醋酸调 pH 至 4.2, 续加水至 1 000 mL 得 11 mmol · L⁻¹ 四丁基溴化铵溶液。

2.3 生物样品的处理

血清对照品的制备: 取空白血清 100 μL, 加入混合标准品 100 μL 震荡混合 15 s 得血清对照品。

血清样品的处理: 取血清样品 100 μL, 加入 10% 三氯醋酸 50 μL 震荡混合 30 s, 离心 (3 000 r · min⁻¹, 离心半径 = 5 cm) 5 min, 取上清液 20 μL 进样。

3 结果与讨论

3.1 色谱图

在最佳实验条件下, 5 种药物在 20 min 内完全分离, 色谱图见图 1。

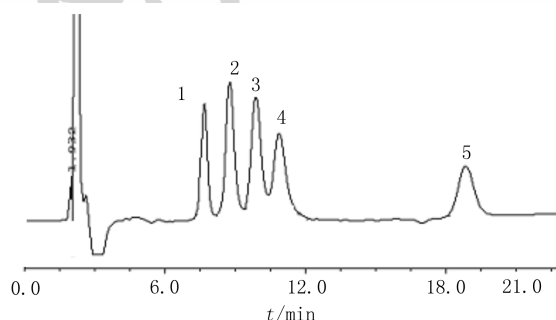


图 1 混合对照品色谱图

1-依诺沙星; 2-氟罗沙星; 3-诺氟沙星; 4-环丙沙星; 5-司帕沙星

Fig 1 Chromatogram of a mixture of stanards

1-enoxacin; 2-fleroxacin; 3-norfloxacin; 4-ciprofloxacin; 5-sparfloxacin

3.2 色谱条件的优化

3.2.1 色谱柱的选择 高效液相色谱法测定氟喹诺酮类药物时, 使用最广泛的是 C₁₈ 柱子, 本试验采用 KF-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 7 μm) 和 Hypersil ODS₂ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱进行实验, 结果 Hypersil ODS₂ 柱能在 20 min 内完全分离, 而用 KF-C₁₈ 柱时, 环丙沙星和诺氟沙星分离不好, 峰大部分重叠, 故选用 Hypersil ODS₂ 柱。

3.2.2 流动相的优化 FQS 为两性离子, 同时含有氨基和羧基, 易和色谱柱的键合相发生硅醇化效应, 造成拖尾。采用乙腈-磷酸/三乙胺缓冲液作为流动相时^[5], 分离效果不理想, 诺氟沙星和环丙沙星无法完全分开。而乙腈-甲醇-Britton Robinson (BR) 缓冲液作流动相时^[6], 虽能完全分离, 但 BR 缓冲液为磷酸、乙酸、硼酸混合液, 成分复杂, 和乙腈、甲醇混

合时易析出结晶而造成流路堵塞。甲醇-枸橼酸 + 0.01% mol · L⁻¹ 醋酸铵 (25:75) 作流动相时^[7], 灵敏度太低, 检测限过大。本试验用 11 mmol · L⁻¹ 四丁基溴化铵溶液 (含 0.5% 三乙胺)-乙腈 (96:4) 用冰醋酸调 pH 为 4.2 作为流动相, 流动相中加入少量三乙胺, 可以减少硅醇化效应, 改善 FQS 峰形, 消除拖尾。乙腈可以提高分析速度及改善峰形, 可将 5 种 FQS 类药物完全分离, 且灵敏度高。

流动相的 pH 值对 FQS 的保留时间和分离度影响较大。本试验考察了 pH 值 2.8 ~ 5.0 时, 对保留时间和分离度的影响。发现在 pH 值为 3.2 左右时, 5 种 FQS 能分离, 但保留时间太长, 当 pH 值为 4.2 时, 5 种 FQS 能很好的分离, 保留时间适宜, 在 20 min 以内, 故本试验选用流动相 pH 为 4.2。

3.2.3 流速的选择

本试验考察了 0.7, 1.0, 1.2 mL · min⁻¹ 3 种流速, 流速太小, 出峰时间太长且易产生拖尾现象。流速太大, 影响分离度, 易导致峰重叠。本试验选用 1.0 mL · min⁻¹ 的流速, 出峰时间理想, 5 种 FQS 分离完全。

3.2.4 温度的影响

本试验考察了 30, 40, 50 °C 3 种温度, 温度越高, 出峰越快, 柱效越高。但高于 40 °C 后, 变化不太明显, 影响环丙沙星和诺氟沙星的分离, 且温度过高易使柱子键合相的流失而造成柱塌陷。故本试验把柱温设定为 40 °C。

3.2.5 检测波长的选择

用 TU-1901 双光束紫外分光光度计对 5 种 FQS 作紫外扫描, 发现在 280 nm 时, 司帕沙星的紫外吸收相对较大, 而其他 4 种药物吸收度变化不大。以便同时测定 5 种药物时能达到很好的效应, 本试验选用 280 nm 为紫外检测波长。

3.3 线性关系和检测限

精密移取一定量的标准混合储备液, 用甲醇稀释至 10 mL, 得到各药浓度为 2 ~ 100 μg · mL⁻¹ 的系列标准溶液, 分别取 20 μL 进样测定。以各药物浓度 (μg · mL⁻¹) 为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 线性范围分别为依诺沙星和诺氟沙星为 4 ~ 100 μg · mL⁻¹, 环丙沙星和氟罗沙星为 5 ~ 90 μg · mL⁻¹, 司帕沙星为 8 ~ 100 μg · mL⁻¹。线性关系良好, 具体关系如表 1 所示:

按信噪比为 3 计算, 5 种药物的最低检测限分别为: 依诺沙星和诺氟沙星为 0.8 μg · mL⁻¹, 环丙沙星为 1.0 μg · mL⁻¹, 氟罗沙星为 0.9 μg · mL⁻¹, 司

表 1 5 种药物的线性关系

Tab 1 Linear relationship of five drugs

药物	线性回归方程	相关系数(r)
依诺沙星	$Y = 26\ 520X - 18\ 432$	0.999 7
诺氟沙星	$Y = 43\ 256X - 26\ 748$	0.999 6
环丙沙星	$Y = 30\ 621X - 20\ 551$	0.999 7
氟罗沙星	$Y = 40\ 389X - 21\ 293$	0.999 5
司帕沙星	$Y = 29\ 583X - 19\ 543$	0.999 4

帕沙星为 1.2 μg · mL⁻¹。

3.4 仪器精密度试验

精密吸取一定浓度的 FQS 标准溶液 20 μL, 连续进样 6 次, 结果峰面积的 RSD 分别为依诺沙星 1.65%、诺氟沙星 1.58%、环丙沙星 2.35%、氟罗沙星 1.52%、司帕沙星 2.89%。

3.5 重复性试验

依法配制一定浓度的 FQS 溶液 6 份, 进样测定, 5 种药物峰面积的 RSD 分别为依诺沙星 1.72%, 诺氟沙星 1.60%, 环丙沙星 2.43%, 氟罗沙星 1.59%, 司帕沙星 2.95%。

4 制剂和生物样品的测定

生物样品按“2.3”项下操作, 取处理后的生物样品和制剂样品, 在最佳实验条件下进样, 测定各药物的峰面积, 根据线性回归方程, 求出各药的含量, 结果见表 2。

表 2 样品中各药物的检测结果

Tab 2 Detection results of drugs in samples

药物名称	加入量 / μg · mL ⁻¹	测得量 / μg · mL ⁻¹	回收率/%	
依诺沙星	注射剂	20	21.49 ± 0.55	107.45
	血清	30	26.24 ± 0.32	87.47
诺氟沙星	注射剂	20	20.68 ± 0.58	103.42
	血清	30	26.09 ± 0.16	86.98
环丙沙星	注射剂	20	20.41 ± 0.40	102.07
	血清	30	24.80 ± 0.66	82.68
氟罗沙星	注射剂	20	20.58 ± 0.89	102.90
	血清	30	24.88 ± 0.52	82.93
司帕沙星	片剂	20	19.55 ± 0.28	97.73
	血清	30	23.76 ± 0.36	79.21

从上述结果中可以看出, 在血清中测定结果偏低, 可能是除去蛋白质过程中导致 FQS 的损失, 而制剂的测定结果比较理想。

5 结论

本试验采用离子对色谱法同时测定 5 种 FQS,

具有快速、简便、灵敏、准确等优点,避免了连续测定不同 FQS 更换流动相的麻烦。可为药品生产企业提高药品质量提供依据,特别是为药检部门快速检查鉴定,打击伪劣药品提供了可靠的方法,也可为本类药物临床体内药动学的研究提供参考。

REFERENCES

- [1] LI J, ZHENG L, ZHENG X M. RP-HPLC determination of enoxacin in saliva[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2002, 22(3):188-190.
- [2] ZHONG SH L, WANG X D, ZHONG G P, et al. The pharmacokinetics and bioequivalence of ciprofloxacin tablets in young healthy volunteers[J]. Guangdong Pharm J(广东药学杂志), 2003, 13(3):24-263.
- [3] ZHANG L L, YI Q Y, LI ZH Y, et al. Determination of metronidazole and norfloxacin in pikangling by RP-HPLC[J].

West China J Pharm Sci(华西药理学杂志), 2002, 17(5):367-368.

- [4] WANG J L, GAO H, LI K. Content determination of sparfloxacin by HPLC[J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2002, 16(9): 551-552.
- [5] LIU Y, XIE M X, DING L. Simultaneous determination of four fluoroquinolones in eggs by high performance liquid chromatography[J]. Chin J Anal Chem(分析化学). 2004, 32(3):352-355.
- [6] DU L M, WEI H Q, ZHANG J Y, et al. Determination of fluoroquinolone by high performance liquid chromatography[J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2003, 31(5):637-637.
- [7] LIANG Pei, QIN Yong-chao, JIANG Zu-cheng, et al. Separation and determination of four fluoroquinolone antibiotics by RP-HPLC [J]. Chin J Anal Lab(分析实验室), 2000, 19(3): 56-59.

收稿日期:2007-09-11