

# 超高效液相色谱法测定大鼠血浆中左氧氟沙星质量浓度\*

邱妍川<sup>1</sup>, 刘阳<sup>1</sup>, 钟玲<sup>2</sup>, 杨宗发<sup>1△</sup>

(1. 重庆医药高等专科学校, 重庆 401331; 2. 重庆药友制药有限责任公司, 重庆 401121)

**摘要:**目的 建立测定大鼠血浆中左氧氟沙星质量浓度的超高效液相色谱(UPLC)法方法 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液-乙腈(75:25, V/V), 流速为 0.3 mL/min, 柱温为 30℃, 进样量为 1 μL, 检测波长为 294 nm。结果 左氧氟沙星质量浓度在 0.20~15.00 μg/mL 范围内与对照品和内标的峰面积之比线性关系良好,  $r=0.9994(n=7)$ 。检测限为 0.20 μg/mL, 日内、日间精密性及稳定性试验的 RSD 均小于 8% ( $n=6$ )。结论 该方法专属性强, 灵敏度高, 准确性好, 检测速度快, 适用于大鼠血浆中左氧氟沙星的药代动力学研究。

**关键词:**左氧氟沙星; 超高效液相色谱法; 大鼠; 药代动力学

中图分类号: R965; R978.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)14-0014-03

## Determination of Levofloxacin in Rat Plasma by UPLC

QIU Yanchuan<sup>1</sup>, LIU Yang<sup>1</sup>, ZHONG Ling<sup>2</sup>, YANG Zongfa<sup>1</sup>

(1. Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing, China 401331; 2. Yao Pharma Co., Ltd., Chongqing, China 401121)

**Abstract: Objective** To establish a UPLC method for concentration determination of levofloxacin in rat plasma. **Methods** The chromatographic column was Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> column(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was 0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate buffer-acetonitrile(75:25, V/V), the flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 30℃, the sample size was 1 μL and the detection wavelength was 294 nm. **Results** The levofloxacin showed good linear relationship with peak area in the range of 0.20-15.00 μg/mL,  $r=0.9994(n=7)$ . The limit of detection(LOD) was 0.20 μg/mL and RSDs of the intra-precisions and inter-precisions and stability tests were all lower than 8% ( $n=6$ ). **Conclusion** The method is specific, sensitive, accurate and fast, which is suitable for studying the pharmacokinetics of levofloxacin in rat plasma.

**Key words:** levofloxacin; UPLC; rats; pharmacokinetics

左氧氟沙星可用于治疗呼吸道、泌尿道、皮肤和软组织感染<sup>[1-3]</sup>。其市售口服剂型以片剂、胶囊剂为主, 将其制成新剂型胃漂浮缓释微丸, 可延长药物在胃中的停留时间, 使药物在胃中充分释放, 提高胃部疾病的局部疗效; 同时, 因该剂型可增加药物在胃及小肠上部的吸收, 稳定血药浓度, 故可提高其口服生物利用度<sup>[4-6]</sup>。为进一步提高该制剂疗效, 本研究中给予大鼠灌胃自制左氧氟沙星胃漂浮缓释微丸, 并建立了测定大鼠血浆中左氧氟沙星质量浓度的超高效液相色谱(UPLC)法。现报道如下。

### 1 动物、仪器与试剂

#### 1.1 动物

清洁级 SD 大鼠, 雌雄各半, 6 周龄, 体质量为 150~200 g, 饲料为基础饲料, 由重庆医科大学实验动物中心提供, 使用许可证号为 SYXK(渝)2017-0023。

#### 1.2 仪器

1290 型超高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); XS205DU 型十万分之一电子天平(瑞士梅特勒托利多公司); IKA Vortex Genius 3 型涡漩混合仪(德国 IKA 公司);

移液器(德国 Eppendorf 公司); Allegra X-22R Centrifuge 型多功能台式高速低温离心机(美国 Beckman 公司)。

#### 1.3 试剂

左氧氟沙星对照品(批号为 130455-201607, 纯度 97.3%), 环丙沙星对照品(批号为 130451-201203, 纯度 84.2%), 均购自中国食品药品检定研究院; 左氧氟沙星原料药(浙江国邦药业有限公司, 批号为 160809, 纯度 >99%); 左氧氟沙星胃漂浮缓释微丸(自制); 甲醇、乙腈均为色谱纯, 磷酸二氢钾为分析纯, 水为去离子水。

### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 配置同填料类型的保护柱; 流动相: 0.05 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液-乙腈(75:25, V/V); 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 30℃; 进样量: 1 μL; 检测波长: 294 nm。

#### 2.2 溶液制备

称取左氧氟沙星对照品 20.55 mg, 精密称定, 置 100 mL 容量瓶中, 加入适量甲醇, 超声使溶解, 再用甲醇定容, 摇匀, 作为对照品溶液。称取环丙沙星对照品

\*基金项目: 重庆市卫生计生委医学科研项目[2015MSXM098]。

第一作者: 邱妍川, 硕士研究生, 副教授, 研究方向为药学, (电子信箱)32444271@qq.com。

△通信作者: 杨宗发, 硕士研究生, 教授, 研究方向为药物制剂学, (电子信箱)465849653@qq.com。

10.12 mg, 精密称定, 置 100 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 作为内标贮备液, 精密移取 5 mL 置 50 mL 容量瓶中, 加甲醇定容, 作为内标溶液。

### 2.3 血样处理

取 6 只 SD 大鼠, 试验前禁食 12 h, 灌胃自制左氧氟沙星胃漂浮缓释微丸 (40 mg/kg)。分别于给药后 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 时眼眶取血 0.3 mL, 置肝素化塑料离心 (EP) 管中, 5000 r/min 离心 10 min, 取血浆, 置 -20 °C 冰箱中低温保存。精密量取大鼠血浆 100 μL, 置 1.5 mL EP 管中, 加入内标溶液 50 μL 和甲醇 300 μL, 涡旋 0.5 min, 1.2 × 10<sup>4</sup> r/min 离心 5 min, 取上清液, 氮气吹干, 加入流动相 100 μL 使残渣溶解, 即得空白血浆样品。

### 2.4 方法学考察

**专属性试验:** 分别取空白血浆样品, 空白血浆 + 对照品 + 内标, 给药 12 h 后的血浆样品 + 内标进样, 记录色谱图。结果见图 1。可见, 左氧氟沙星与内标环丙沙星分离良好, 保留时间分别为 3.0 min 和 3.9 min, 血浆中内源性物质不干扰左氧氟沙星的分离和测定, 表明专属性良好。

**线性关系考察:** 精密量取不同质量浓度的左氧氟沙星对照品溶液各 50 μL, 置不同的 1.5 mL EP 管中, 氮气吹干, 加入空白血浆 100 μL, 配成含左氧氟沙星分别为 0.20, 0.50, 1.00, 5.00, 10.00, 12.00, 15.00 μg/mL 的含药血浆样品, 照 2.3 项下方法处理样品后按 2.1 项下色谱条件进样分析, 以血浆质量浓度 (C) 为横坐标、左氧氟沙星与内标的峰面积之比 (R) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程  $R = 12.018C + 0.848$ ,  $r = 0.9994$  ( $n = 7$ )。结果表明, 血浆中左氧氟沙星质量浓度的线性范围为 0.20 ~ 15.00 μg/mL。大鼠血浆中左氧氟沙星检测限为 0.20 μg/mL, RSD 为 4.6% ( $n = 7$ )。

**相对回收率试验:** 分别用 2.3 项下处理好的空白血浆样品与对照品溶液配制高、中、低质量浓度和定量限质量浓度 (12.00, 5.00, 0.50, 0.20 μg/mL) 的血浆样品, 按 2.1 项下色谱条件进样分析, 按线性回归方程计算各质量浓度的实测值。质量浓度实测值除以理论值的

百分比即为相对回收率。结果见表 1。

表 1 回收率试验结果 ( $n = 6$ )

质量浓度 (μg/mL)		$\bar{X}$ (%)		RSD (%)	
相对	提取	相对	提取	相对	提取
12.00	12.00	99.67	85.44	3.6	5.5
5.00	5.00	98.56	83.45	2.3	3.9
0.50	0.50	99.88	80.61	3.7	2.7
0.20	0.20	96.57	81.04	5.3	5.2

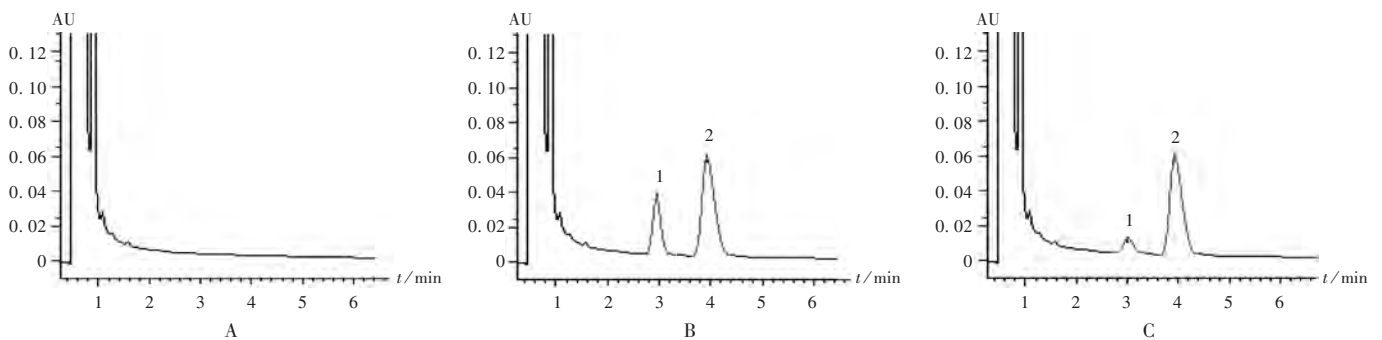
**提取回收率试验:** 精密量取不同质量浓度的左氧氟沙星对照品溶液 50 μL, 置不同 EP 管中, 氮气吹干, 加入空白血浆 100 μL, 按 2.3 项下方法处理, 制得高、中、低质量浓度及定量限质量浓度水平 (12.00, 5.00, 0.50, 0.20 μg/mL) 的提取回收率供试品溶液。按 2.1 项下的色谱条件进样分析, 结果平均提取回收率介于 80.61% ~ 85.44% ( $n = 6$ ), 详见表 1。

**精密度试验:** 精密吸取空白血浆 100 μL, 置 1.5 mL EP 管中, 加入对照品贮备液及甲醇适量, 制成含左氧氟沙星分别为 12.00, 5.00, 0.50, 0.20 μg/mL 的高、中、低及定量限 4 个质量浓度水平的血浆样品, 每个质量浓度配制 6 份, 按 2.3 项下方法处理, 进样 1 μL, 同一样品, 1 d 内测定 6 次, 计算日内变异; 同一样品, 每天测定 1 次, 连续测定 6 d, 计算日间变异。结果见表 2。

表 2 精密度试验结果 ( $n = 6$ )

质量浓度 (μg/mL)	日内变异		日间变异	
	测得浓度 (μg/mL)	RSD (%)	测得浓度 (μg/mL)	RSD (%)
12.00	10.41	3.8	10.36	2.7
5.00	4.21	4.2	4.24	5.5
0.50	0.41	5.4	0.41	4.9
0.20	0.16	7.5	0.16	6.9

**稳定性试验:** 依法制备高、中、低质量浓度的血浆样品, 分别考察室温放置 12 h, -20 °C 条件下冷冻 12 d, 血浆样品 3 次冻融后再处理的稳定性。结果显示, 测得左氧氟沙星质量浓度与真实质量浓度的偏差均小于 15%, 表明样品在 3 种条件下均能保持稳定。详见表 3。



1. 左氧氟沙星 2. 环丙沙星 (内标)

A. 空白血浆样品 B. 空白血浆 + 对照品 + 内标 C. 给药 12 h 后血浆样品 + 内标

图 1 超高效液相色谱图

表3 稳定性试验结果(n=6)

质量浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	室温		冷冻		冻融	
	测得浓度( $\mu\text{g/mL}$ )	RSD(%)	测得浓度( $\mu\text{g/mL}$ )	RSD(%)	测得浓度( $\mu\text{g/mL}$ )	RSD(%)
12.00	10.52	2.5	10.34	6.0	10.22	5.7
5.00	4.29	2.1	4.27	3.1	4.25	5.9
0.50	0.41	5.7	0.42	7.4	0.41	6.8

## 2.5 药-时曲线与药代动力学参数

灌胃给予大鼠自制左氧氟沙星胃漂浮缓释微丸,其平均药-时曲线见图2。以3P87软件计算药代动力学主要参数。结果半衰期( $t_{1/2}$ )为 $(7.51 \pm 1.04)\text{h}$ ,药-时曲线下面积( $AUC_{0-\infty}$ )为 $(119.73 \pm 11.34)\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{h})$ ,达峰时间( $t_{\text{max}}$ )为 $(2.62 \pm 0.79)\text{h}$ ,峰质量浓度( $C_{\text{max}}$ )为 $(7.91 \pm 1.45)\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

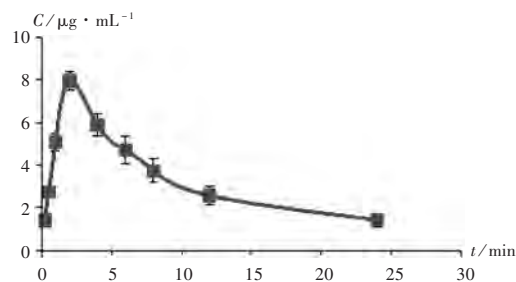


图2 平均药-时曲线(n=6)

## 3 讨论

在血样处理时,采用了加甲醇去除蛋白的方法,并与固液萃取法对比,发现均能较好地去除色谱中内源性杂质对左氧氟沙星测定的干扰,但固液萃取操作较复杂<sup>[7]</sup>,且成本更高,因此选择了前法;左氧氟沙星生物样品中药物质量浓度的测定方法采用了内标法,且选择结构相似的环丙沙星作为内标物,因环丙沙星具有相似的回收率,避免了处理过程中主药回收率偏低的问题。

目前,左氧氟沙星生物样品检测以高效液相色谱法居多<sup>[8-11]</sup>,但本试验中选用了超高效液相色谱法,左氧氟沙星出峰快,流动相流速低,大大缩短了检测时间,减少了流动相的使用,提高了试验效率,节约了成本。另外,有文献采用超快速液相色谱-串联质谱法进行检测,虽也缩短了检测时间,但成本过高,操作烦琐,因此选用UPLC法测定更具有优势<sup>[12-13]</sup>。

该分析测定中配备了高灵敏度检测器,检测器流通池光程为60 mm,比普通检测器的流通池光程大6倍,灵敏度大大提高。选用了Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>柱,左氧氟沙星色谱峰对称性好,峰宽较窄,柱效较高。本试验中还考察了不同流动相比对左氧氟沙星质量浓度检测的影响,当流动相中磷酸二氢钾缓冲液与乙腈的比例为75:25(V/V)时,分离情况最好。

综上所述,本研究中建立的UPLC法简单、快速、

灵敏、准确,适用于大鼠血浆中左氧氟沙星的药代动力学研究。

## 参考文献:

- [1] 杨小英,张文萍,王欣瑜,等. 高效液相色谱荧光法测定血浆中左氧氟沙星的浓度及其生物等效性研究[J]. 药学实践杂志, 2016,34(5):428-440.
- [2] LANDONI MF, ALBARELLOS GA. Pharmacokinetics of levofloxacin after single intravenous, oral and subcutaneous administration to dogs[J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2018,10:1-8.
- [3] IDREES N, ALMEQDADI M, BALAKRISHNAN VS, et al. Hemodialysis for treatment of levofloxacin-induced neurotoxicity[J]. Hemodialysis International, 2018,9:1-6.
- [4] CHANDEL A, CHAUHAN K, PARASHAR B, et al. Floating drug delivery systems: A better approach[J]. International Current Pharmaceutical Journal, 2012,1(5):119-127.
- [5] MISHRA J, DASH AK. Recent advances in gastro retentive drug delivery system: a review[J]. Mintage Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences, 2013,2(2):25-27.
- [6] 霍涛涛,陶春,姚枫枫,等. 胃滞留给药系统的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2017,26(4):420-426.
- [7] 钱智磊,张亮,周秋云,等. HPLC法测定结核病患者血浆中异烟肼、吡嗪酰胺、利福平和左氧氟沙星的质量浓度[J]. 西北药学杂志, 2014,29(5):578-581.
- [8] 孔令希,黄艳,邱峰,等. 红花注射液对盆腔炎模型大鼠子宫组织中左氧氟沙星分布的影响[J]. 第三军医大学学报, 2017,39(4):361-366.
- [9] 张春雨,杨丽杰,郭美华. 高效液相色谱法测定复方口腔扁平苔癣涂膜剂中左氧氟沙星含量[J]. 中国药业, 2012,21(10):43-44.
- [10] 周佳,秦升,肖和平,等. 微透析技术研究左氧氟沙星在大鼠脑和血中的药动学[J]. 中国药理学杂志, 2013,48(6):466-469.
- [11] QIN GD, XIAO MZ, ZHOU YD, et al. Tamsulosin alters levofloxacin pharmacokinetics in prostates derived from rats with acute bacterial prostatitis[J]. Asian J Androl, 2013, 15(2):254-260.
- [12] 王昌,贾正平,李文斌,等. UFLC-MS/MS法测定急进高原前后大鼠体内左氧氟沙星含量及其药代动力学差异[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2017,46(2):160-164.
- [13] LEGRAND T, VODOVAR D, TOURNIER N, et al. Simultaneous Determination of Eight  $\beta$ -Lactam Antibiotics, Amoxicillin, Cefazolin, Cefepime, Cefotaxime, Ceftriaxone, Cloxacillin, Oxacillin, and Piperacillin, in Human Plasma by Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016,60(8):4734-4742.

(收稿日期:2018-10-21)