

研究简报

甲鱼血液中诺氟沙星浓度的反相高效液相色谱测定法

RP-HPLC DETERMINATION OF PLASMA NORFLOXACTIN IN SOFT-SHELLED TURTLES

陈文银 管国华

(上海水产大学, 200090)

印春华

(复旦大学生命科学学院, 上海 200433)

Chen Wen-yin and Guan Guo-hua

(Shanghai Fisheries University, 200090)

Yin Chun-hua

(School of life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433)

关键词 反相高效液相色谱法, 诺氟沙星, 甲鱼

KEYWORDS reverse-phase high performe liquid chromatography (RP-HPLC), norfloxacin, *Trionyx sinensis*, soft-shelled turtle

诺氟沙星是一种常用的喹诺酮类抗菌药物[王金生, 1985], 通过抑制 DNA 旋转酶而杀菌。其杀菌活性由于氟化和接上呱嗪环而增强, 且价格便宜, 疗效好, 已被广泛应用于甲鱼 (*Trionyx sinensis*) 养殖中病菌的防治。测定诺氟沙星在甲鱼体内的血药浓度可以为考察其在甲鱼体内的吸收、分布、代谢、排泄等药代动力学过程, 研究和改善给药剂型和途径提供重要依据。目前, 测定诺氟沙星人体及家兔等动物体内的血药浓度方法有紫外分光光度法、高效液相色谱法、气相色谱法、液-质联用法, 而甲鱼的血药浓度测定方法尚未见报道。本文参考许丹科等[1990]、何跃生等[1990]、Ingrid NE[1987], 建立了反相高效液相色谱法并进行了方法学研究, 测定了甲鱼口服给药的血药浓度值。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

诺氟沙星原料(江苏泰兴制药厂),批号960921;诺氟沙星标准品(江苏泰兴制药厂),纯度99.68%;甲醇,HPLC级;其它试剂为AR级;水均为二次重蒸馏水。

磷酸盐缓冲液:称取6.7g磷酸二氢钾,加入2.8ml磷酸,用水稀释至1000ml。

诺氟沙星标准溶液(250 μ g/ml):精密称取诺氟沙星标准品25.0mg置100ml量瓶中,用0.01mol/L的氢氧化钠溶液溶解并稀释至刻度,置冰箱中保存。

1.2 动物与仪器

健康甲鱼,体重100g \pm 20g,由上海市祝桥养鳖场和泰兴市水产珍品养殖场提供;XW-80型旋涡混合器;SGIMADZU LC-10AT型泵;SHIMADZU SPD-10A型紫外检测器;SHIMADZU C-R64型色谱数据处理系统。

1.3 色谱条件

色谱柱:SHIM-PACK ODS分析柱(5 μ m)6.0mm \times 150mm及C₁₈预柱;流动相:甲醇-磷酸盐缓冲液0.5mol/L四丁基溴化铵(25:75:4);流速:0.8ml/min;检测波长:280nm;检测灵敏度:0.01AUFS;定量进样器体积:20 μ l。

1.4 血样处理

取健康甲鱼,禁食12h,颈静脉取血2ml,离心分离血浆,准确吸取0.5ml血浆于具塞离心管中,加二氯甲烷提取三次,每次3ml,以3000rpm离心5min,合并有机层,加入0.085%磷酸液1ml回提,旋涡振摇1min,3000rpm离心5min,取上层酸液20 μ l进样。

2 结果与讨论

2.1 色谱行为

在本文的色谱条件下,空白血浆的色谱峰(图1a),对诺氟沙星的色谱峰无干扰,且诺氟沙星与空白血浆中的杂质峰达到良好的分离(图1b)。比较参考文献可见,甲鱼血中的杂质与人或家兔完全不同,本方法能将血浆杂质与药物主峰完全分离。

2.2 重现性

取空白血浆0.5ml,加入诺氟沙星标准品0.5 μ g(2 μ l浓度为250 μ g/ml的诺氟沙星标准贮备液),旋涡混合,以下操作同“血样处理”,同法重复10次实验,平行测定后,计算诺氟沙星的峰

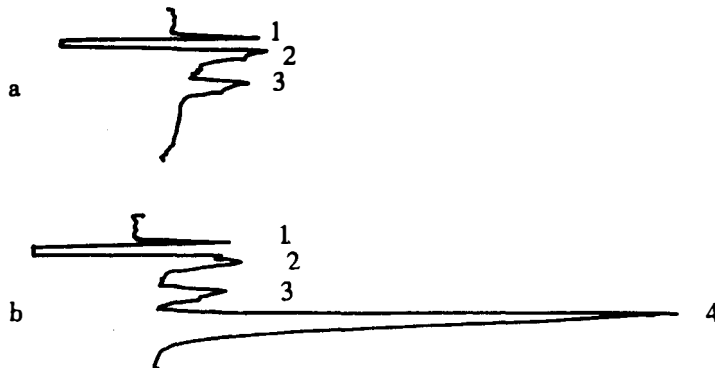


图1 甲鱼血浆的色谱图

Fig. 1 Plasma chromatograph in turtles

1. 2. 3血浆杂质峰; 4. 诺氟沙星峰。

面积,结果其RSD为1.8%。表明本方法的重现性较好。

2.3 标准曲线和检测限

分别量取1、2、4、8、12、16、20 μ l的诺氟沙星标准贮备液,用流动相稀释至1ml后分别进样测定,以诺氟沙星峰面积对浓度进行回归计算,得标准曲线为: $C = 3.3514 \times 10^{-5}A + 0.0156$, $r = 0.9999$ 。最低检测限为0.25 μ g/ml。

2.4 回收率

取空白血浆0.5ml,分别加入2、5、10、20、40、60 μ l浓度为50 μ g/ml的诺氟沙星标准贮备液,旋涡混合,以下操作同“血样处理”,进行测定,用回归方程计算其浓度,得血浆中诺氟沙星的平均回收率为98.9%,RSD为4.65%。

2.5 精密度

在上述色谱条件下,分别进行日内和日间精密度试验,其RDS分别为3.21%和3.96%,表明本方法精密度较好,完全符合生物样品的测定要求。

2.6 甲鱼体内诺氟沙星血药浓度的测定

取诺氟沙星原料,用1%CMC-Na溶液配制成5mg/ml的混悬液,用于给药。

取健康甲鱼60只,禁食12h,随机分成10组,每组6只,分别口服灌胃给予诺氟沙星5mg/100g体重,于给药后0.167,0.5,1,1.5,2,4,6,8,12和24h颈静脉取血2ml,离心分离血浆,每一时间点各取一组动物。

准确吸取0.5ml血浆于具塞离心管中,按“血样处理”项下操作,测得口服诺氟沙星在甲鱼体内的血药浓度值,绘制药-时曲线(图2)。从图中可以看出口服诺氟沙星在甲鱼体内能维持较长时间的有效血药浓度,具有较好的药代动力学特性。

诺氟沙星在人体或家兔体内的吸收较差,甲鱼体内药物的吸收、分布、代谢、排泄等药代动力学行为与人及家兔等动物有较大差异。因此,用反相高效液相色谱法测定甲鱼血中诺氟沙星,对甲鱼体内药代动力学的研究及甲鱼疾病防治、给药剂量和途径的选择提供依据。

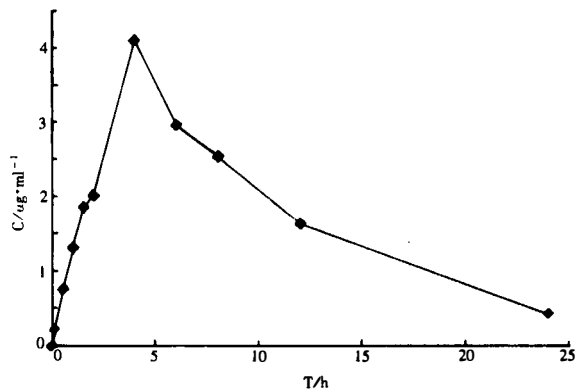


图2 甲鱼体内诺氟沙星血药浓度-时间曲线
Fig. 2 Plasma norfloxacin level-time curve in turtles

参 考 文 献

- [1] 王金生,1985.国外药学(抗生素分册),6(6):446-448.
- [2] 许丹科等,1990.反相离子对色谱法测定人血中氟哌酸.药物分析杂志,10(5):265-267.
- [3] 何跃生等,1990.氟哌酸注射液和胶囊剂在家兔体内的药代动力学研究.中国医药工业杂志,21(11):494-495.
- [4] Ingrid, NE, 1987. Assay of ciprofloxacin and norfloxacin in serum and urine by high performance liquid chromatography. *Chromatog*, 416:207-212.