RP-HPLC 法测定 Beagle 犬血浆中四环素

张煦喆,刘有平,关锋,王鑫,邸欣*

(沈阳药科大学药学院,沈阳 110016)

摘要 **目的:** 建立测定 Beagle 犬血浆中四环素的 RP-HPLC 分析方法。**方法:** Beagle 犬血浆样品经 0.01 mol·L^{-1}草酸酸化、乙腈沉淀蛋白处理后,采用 Diamonsil C_{18} 柱(200 mm × 4.6 mm,5 μm)分离,流动相为乙腈-0.01 mol·L^{-1}草酸溶液(15∶85),流速为 0.8 mL·min^{-1},检测波长为 350 nm,内标为土霉素。**结果:** 测定血浆中四环素的线性范围为 0.2 ~ 10 μg·mL^{-1};日内与日间精密度均小于 14.5%,准确度(RE)在 ±5.3% 以内。**结论:** 本方法简便、灵敏、准确,适用于 Beagle 犬血浆中四环素的分析测定。

关键词: 四环素;RP-HPLC 法;Beagle 犬;血浆

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-1793(2011)-03-0509-04

HPLC determination of tetracycline in Bealge dog plasma

ZHANG Xu-zhe, LIU You-ping, GUAN Feng, WANG Xin, DI Xin*

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract **Objective:** To develop an RP-HPLC method for the determination of tetracycline in Beagle dog plasma. **Methods:** After acidification with oxalic acid, plasma samples were precipitated with acetonitrile. Chromatographic separation was carried out on a Diamonsil C_{18} column (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) using a mobile phase of acetonitrile-0.01 mol·L^{-1} oxalic acid (15∶85). The flow rate was 0.8 mL·min^{-1} and the detection wavelength was 350 nm. Oxytetracycline was used as the internal standard. **Results:** The calibration curve for tetracycline was linear over the concentration range of 0.2-10 μg·mL^{-1}. The intra- and inter-day precision was less than 14.5% and the accuracy was within ±5.3%. **Conclusion:** The method is simple, sensitive, accurate and suitable for the preclinical pharmacokinetic studies of tetracycline in dog plasma.

Key words: tetracycline; RP-HPLC; Beagle dog; plasma concentration

幽门螺旋杆菌(Hp)是引起消化性溃疡和慢性活动性胃炎的重要致病原因之一,和胃癌的发病也有着密切的关系[1,2]。近年来 Hp 对甲硝唑、克拉霉素等的耐药性逐渐增多,四环素(tetracycline)(结构见图 1)以其无 Hp 耐药性和价格低廉的优点而重新受到重视,在欧美许多国家,四环素已成为根除 Hp 常用的铋剂三联疗法或四联疗法中的主要成员[3]。由胶体果胶铋、四环素和甲硝唑组成的复方胶体果胶铋胶囊是山西安特生物制药股份有限公司自主研发的一类新药,它主要用于由幽门螺旋杆菌感染引发的胃和十二指肠溃疡的治疗,目前该药正处于临床前研究阶段。本文旨在建立一种简便、灵敏、准确的 RP-HPLC 法测定 Beagle 犬血浆中的四环素,以便为复方胶体果胶铋胶囊中四环素在 Beagle 犬体内的药动学研究提供可靠的方法参考。

1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪,配备在线脱气机、四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、可变波长紫外检测器、Chemstation 工作站(美国 Agilent 公司);TG-328A 分析天平(上海天平仪器厂);TurboVap 蒸发仪(美国 Zymark 公司);LD5-2A 离心机(北京医用离心机厂);LG16-w 高速离心机(北京医用离心机厂);YKH-Ⅱ型快速液体混合器(江西医疗器械厂);SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪

* 通讯作者 Tel:(024)23986342;E-mail:dixin63@hotmail.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

器厂)。

四环素对照品(山西安特生物制药股份有限公司提供,HPLC 法测定纯度≥98 %);土霉素对照品(内标,中国药品生物制品检定所,纯度≥98%);乙腈(色谱纯,天津康科德科技有限公司);乙腈(分析纯,天津市大茂化学试剂厂);草酸(沈阳市试剂一厂);重蒸水(自制)。

2 溶液配制

精密称取四环素对照品 10.0 mg,置 10 mL 量瓶中,用甲醇 - 水(50∶50) 溶解并稀释至刻度,摇匀,配制成浓度为 1.0 mg·mL^{-1}的储备液;用甲醇 - 水(50∶50) 按一定比例稀释此储备液,配制成浓度为 0.8,2.0,4.0,8.0,20,40 μg·mL^{-1}的四环素对照品系列溶液,置于 4 ℃冰箱保存备用。

精密称取土霉素对照品 10.0 mg,置 10 mL 量瓶中,用甲醇 - 水(50∶50) 溶解并稀释至刻度,摇匀,配制成浓度为 1.0 mg·mL^{-1}的储备液;用甲醇 - 水(50∶50) 将此储备液稀释成浓度为 80 μg·mL^{-1}的内标溶液,置于 4 ℃冰箱保存备用。

3 血浆样品处理

取血浆样品 200 μL,分别加入甲醇 - 水(50∶50) 50 μL、内标溶液(80μg·mL^{-1}土霉素) 50 μL 和 0.01 mol·L^{-1}草酸溶液 100 μL,混匀;加入乙腈 1 mL,涡旋混合 1 min,离心(3500 r·min^{-1}) 5 min,分取上层溶液于另 1 个试管中,于 40 ℃水浴中氮气流吹干,加入乙腈 - 0.01 mol·L^{-1}草酸溶液(15∶85) 100 μL 溶解残留物,涡旋混合,离心(12000 r·min^{-1}) 1 min,取 20 μL 进行 HPLC 分析。

4 色谱条件

色谱柱:Diamonsil C_{18}柱(200 mm × 4.6 mm,5 μm);预柱:EasyGuard C_{18}保护柱(8 mm × 4.0 mm,5 μm);流动相:乙腈 - 0.01 mol·L^{-1}草酸溶液(15∶85);流速:0.8 mL·min^{-1};柱温:室温;检测波长:350 nm;进样量:20 μL。

5 分析方法确证

5.1 方法的专属性 分别取 6 只 Beagle 犬的空白血浆 200 μL,除内标溶液用甲醇 - 水(50∶50,) 代替外,其余按"血浆样品处理"项下方法操作,获得空白血浆样品的色谱图(见图 2 - A);取 Beagle 犬空白血浆 200 μL,加入一定浓度的四环素对照品溶液 50 μL,除不加甲醇 - 水(50∶50) 外,其余按"血浆样品处理"项下方法操作,获得相应的色谱图(见图 2 - B),四环素的保留时间约为 11.82 min,土霉素的保留时间约为 8.86 min;取 Beagle 犬给药后的血浆样品200 μL,按"血浆样品处理"项下方法操作,获得相应的色谱图(见图2 - C)。结果表明,四环素与内标土霉素能完全分离,甲硝唑(复方胶体果胶铋胶囊中的成分)和血浆中内源性物质不干扰四环素和内标的测定(甲硝唑在 5.5 min 前出峰)。

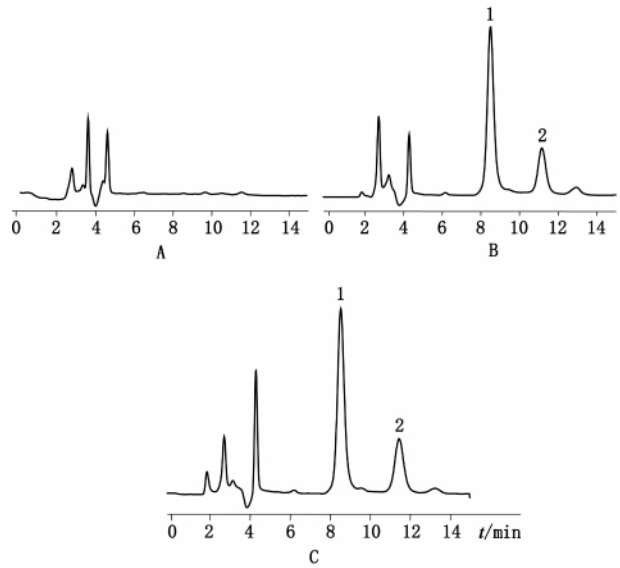

图 2 Beagle 犬血浆中四环素和内标土霉素的色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of tetracycline and oxytetracycline in Beagle dog plasma

A. 空白血浆(blank plasma) B. 空白血浆加入四环素和内标(blank plasma spiked with tetracycline and oxytetracycline) C. Beagle 犬给药后 2 h 的血浆样品(beagle dog plasma 2 h after an oral administration of compound colloidal bismmth pectin capsules)

1. 土霉素(oxytetracycline) 2. 四环素(tetracycline)

5.2 标准曲线与定量下限 取空白血浆 200 μL,加入四环素标准对照品溶液 50 μL,配制成相当于四环素血浆浓度为 0.2,0.5,1.0,2.0,5.0,10 μg·mL^{-1}的对照品血浆,除不加甲醇 - 水(50∶50) 外,其余按"血浆样品处理"项下方法操作,每一浓度进行双样本分析。以待测物浓度(X,μg·mL^{-1}) 为横坐标,待测物与内标的峰面积比值(Y) 为纵坐标,用加权($W = 1/X^2$) 最小二乘法进行线性回归运算,得回归方程为:

$$Y = 1.092 \times 10^{-2} + 9.587 \times 10^{-1} X \quad r = 0.9968$$

结果表明,测定血浆中四环素的线性范围为 0.2 ~ 10 μg·mL^{-1}。

按上述方法配制相当于四环素血浆浓度为 0.2 μg·mL^{-1}的对照品血浆,共 6 份,依同法操作,求得该浓度下的日内精密度(RSD) 为 4.5 %,准确度(RE) 为 10.0 %。结果表明,测定血浆中四环素的定量下限可达 0.2 μg·mL^{-1}。最低检测限为

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

0.04 μg·mL^{-1}($S/N \geqslant 3$)。

5.3 精密度与准确度 取空白血浆 200 μL,按"标准曲线与定量下限"项下的方法配制低、中、高 3 个浓度(四环素血浆浓度分别为 0.5,2.0,8.0 μg·mL^{-1})的质量控制(QC)样品,每一浓度进行 6 样本分析,连续测定 3 d,根据当日标准曲线计算 QC 样品的测得浓度,将 QC 样品的测定结果进行方差分析,计算方法的精密度和准确度,结果见表 1。

表 1 测定 Beagle 犬血浆中四环素的精密度、准确度与回收率(n=6)

Tab 1 Precision, accuracy and recovery for the analysis of tetracycline in Beagle dog plasma

化合物(compound)	加入浓度(added concentration)/μg·mL^{-1}	精密度(precision) RSD / % 日内(intra-day)	精密度(precision) RSD / % 日间(inter-day)	准确度(relative error)/ %	回收率(recovery)/ %
四环素(tetracycline)	0.5	8.0	5.8	1.0	92.4
	2.0	5.7	10.3	-5.3	86.7
	8.0	6.5	14.5	-3.9	85.8
内标(internal standard)	20.0				80.4

5.4 提取回收率 取空白血浆 200 μL,按"标准曲线和定量下限"项下的方法配制低、中、高 3 个浓度(四环素血浆浓度分别为 0.5,2.0,8.0 μg·mL^{-1})的 QC 样品,每一浓度进行 6 样本分析;再用流动相配制相同浓度的四环素和内标混合标准溶液,分别进样分析。以每一浓度 2 种处理方法的峰面积的比值计算提取回收率,结果见表 1。

5.5 样品稳定性 考察了四环素血浆样品室温放置 4 h、经沉淀蛋白处理后室温放置 24 h、经历 3 次冷冻-解冻循环以及 -20 ℃冷冻放置 4 个月的稳定性。在每一项稳定性考察时,配制低、高 2 个浓度(0.5,8.0 μg·mL^{-1})的血浆样品,每一浓度进行 3 样本分析。结果表明,未经处理的血浆样品室温放置 4 h 稳定(RE 在 ±2.7 % 之内),预处理后的血浆样品室温放置 24 h 稳定(RE 在 ±4.0 % 之内),血浆样品经历 3 次冷冻-解冻循环稳定(RE 在 ±4.1 % 之内),血浆样品 -20 ℃冷冻放置 4 个月稳定(RE 在 ±1.3% 之内)。

6 分析方法应用

健康 Beagle 犬 6 只,雌雄各半,禁食 12 h,经口服给予复方胶体果胶铋胶囊(含盐酸四环素 375 mg),于服药前(0 h)和服药后的 0.5,0.75,1,2,3,4,6,8,12,24,48 h 经前肢静脉采血,置肝素抗凝试管中,离心(4000 r·min^{-1})10 min,分离血浆,按"血浆样品处理"项下方法操作,以随行标准曲线计算各时间点的血药浓度,绘制血药浓度-时间曲线,见图 3。

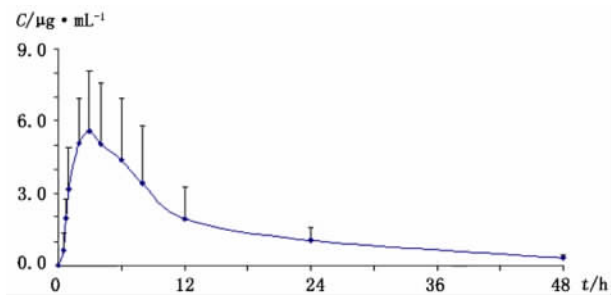

图 3 6 只 Beagle 犬口服复方胶体果胶铋胶囊(含盐酸四环素 375 mg)后的血药浓度-时间曲线

Fig 3 Plasma concentration-time curve of tetracycline after an oral administration of compound colloidal bismmth pectin capsule (containing 375 mg tetracycline) to six Beagle dogs

7 讨论

四环素的色谱分析具有一定的难度,这主要是因为四环素分子结构中的酚羟基和烯醇基能与血浆或色谱柱中的金属离子络合,也能与色谱柱上残存的硅醇基等发生吸附作用,因而常常导致分析重现性较差、色谱峰拖尾等[4]。

四环素为酸、碱两性物质,其在酸性溶液中较稳定,在碱性溶液中易破坏,故四环素的色谱分析一般选择在酸性流动相条件下进行,通常控制流动相的 pH 在 2~3 之间。参考有关文献,本实验最初尝试了以乙腈-0.1% 磷酸盐缓冲溶液为流动相,结果发现,随着分析样品数量的增加,四环素与内标的色谱峰形逐渐变差,并且两者的峰面积迅速减小,这主要是由于四环素与色谱系统中的金属离子发生络合作用而导致的;改用乙腈-0.01 mol·L^{-1}草酸溶液为流动相,草酸能与色谱系统中的许多金属形成络合物,故可保护四环素不受金属离子的干扰。本实验最终采用乙腈-0.01 mol·L^{-1}草酸(15∶85)为流动相,在保证甲硝唑和血浆中内源性物质不干扰四环素和内标测定的前提下,使四环素与内标的保留时间尽可能短,同时可获得良好的色谱峰形。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

由于四环素的色谱分析需在酸性流动相条件下进行,因此要求内标也需在酸性条件下稳定。实验中尝试了与四环素结构相似的土霉素、多西环素等作内标,发现多西环素的保留时间过长,而土霉素与四环素结构只相差 1 个羟基,其保留时间与四环素相近,并可与四环素完全分离,另外其提取回收率也与四环素相近,故最终选择土霉素作为内标。

关于四环素血药浓度的测定方法,国内外文献报道较少。J. P. Sharma 等[5] 将血浆中的四环素先转变成四环素 – 钙络合物后以乙酸乙酯提取,然后再用高氯酸萃取,样品预处理操作烦琐,分析方法的定量下限仅为 1.5 μg·mL^{-1}。J. Hermansson 等[6] 采用三氟醋酸直接沉淀蛋白法处理血浆样品,虽然操作简便,但将处理后的强酸性上清液直接进样,会导致色谱柱寿命显著降低。本实验以乙腈为蛋白沉淀剂,并加入一定量的草酸,其作用为与血浆中金属离子络合,使四环素游离出来,提高了提取回收率。草酸的加入还提高了血浆的酸度,使四环素分子处于稳定状态。

本文中对 Beagle 犬血浆中四环素浓度的测定方法简便、灵敏,经全面的方法学确证,适用于复方胶体果胶铋胶囊中四环素在 Beagle 犬体内的药动学研究。

参考文献

1 Robert MG, Robert MH, David YG. The gastric cardia in Helicobacter pylori infection. *Hum Pathol*, 1994, 25(9): 915

2 Hironori Yoshiyama, Teruko Nakazawa. Unique mechanism of Helicobacter pylori for colonizing the gastric mucus. *Microbes Infect*, 2000, 2(1): 55

3 Murat Akyildiz, Sinan Akay, Ahmet Musoglu. The efficacy of ranitidine bismuth citrate, amoxicillin and doxycycline or tetracycline regimens as a first line treatment for helicobacter pylori eradication. *Eur J Int Med*, 2009, 20(1): 53

4 LÜ Hai – tao(吕海涛), CHEN Feng(陈峰), JIANG Yue(姜悦). Determination of oxytetracycline, doxycycline, trtracycline and chlortrtracycline in tetracycline antibiotics by HPLC. *Phys Test Chem Anal Part B: Chem Anal*(理化检验 – 化学分册), 2007, 43(1): 18

5 Sharma JP, Perkins EG, Bevill RF. Reversed – phase high – performance liquid chromatographic determination of tetracyclines in urine and plasma. *J Chromatogr*, 1977, 134(2): 441

6 Hermansson J. Rapid determination of tetracycline and lumecycline in human plasma and urine using high – performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1982, 232(2): 385

(本文于 2010 年 4 月 26 日收到)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net