

HPLC法测定氯霉素滴眼液在兔眼房水中的质量浓度

聂 绩*,张 潜#,余凤玮,袁 野(重庆市渝北区人民医院,重庆 400112)

中图分类号 R927.2;R978.1*3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)07-0921-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.07.17

摘要 目的:测定氯霉素滴眼液在兔眼房水中的质量浓度。方法:在6只兔眼结膜囊内滴入氯霉素滴眼液100 μl,于滴眼后5、15、30、60、120、180 min取眼房水,加甲醇后涡旋、离心,高效液相色谱法测定上清液中氯霉素质量浓度。色谱柱为Hypersil ODS C₁₈,流动相为甲醇-0.34%磷酸二氢钾水溶液(55:45),检测波长为273 nm,流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,进样量为20 μl。结果:氯霉素检测质量浓度的线性范围为0.125~4 μg/ml($r=0.998\ 6, n=6$),方法回收率为91.28%~98.35%、提取回收率为88.89%~96.92%($n=3$),日内RSD为2.98%、日间RSD为3.34%($n=5$);各时间点眼房水样品中氯霉素质量浓度分别为0、(0.331±0.041)、(0.251±0.049)、(0.133±0.052)、(0.068±0.042)、(0.035±0.043) μg/ml。结论:本方法灵敏、结果准确,可用于兔眼房水中氯霉素质量浓度的测定。

关键词 高效液相色谱法;氯霉素滴眼液;兔;房水;质量浓度测定

Concentration Determination of Chloramphenicol Eye Drops in Aqueous Humor of Rabbits by HPLC

NIE Ji, ZHANG Qian, YU Feng-wei, YUAN Ye(Chongqing Yubei District People's Hospital, Chongqing 400112, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for content determination of Chloramphenicol eye drops in aqueous humor of rabbits. METHODS: 6 rabbits were given Chloramphenicol eye drops 100 μl via conjunctival sac; 5, 15, 30, 60, 120 and 180 min later, the aqueous humor was collected, and whirled and centrifuged with methanol. The concentration of chloramphenicol in supernatant was determined by HPLC. The determination was performed on Hypersil ODS C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.34% KH₂PO₄ (55:45) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 273 nm and column temperature was 30 ℃. The injection volume was 20 μl. RESULTS: The linear range of chloramphenicol was 0.125-4 μg/ml ($r=0.998\ 6, n=6$) with method recovery rate of 91.28%-98.35% and extraction recovery rate of 88.89%-96.92% ($n=3$). RSDs of inter-day and intra-day were 2.98% and 3.34% ($n=5$). The concentrations of chloramphenicol were 0, (0.331±0.041), (0.251±0.049), (0.133±0.052), (0.068±0.042) and (0.035±0.043) μg/ml at different time points. CONCLUSIONS: The method is sensitive and accurate, and can be used for the determination of chloramphenicol in aqueous humor of rabbits.

KEYWORDS HPLC; Chloramphenicol eye drops; Rabbits; Aqueous humor; Concentration determination

入血液循环,因此溶出度试验对本品不适用。至今为止,尚未见国内外报道关于本品作用机制且十分有效而完善的体外试验方法。加之本品组成不定,又无紫外吸收,使得常用的紫外、色谱等研究手段都不适用,因此,甚至国内外都鲜见关于本品结构性质的研究。笔者尝试考察本品的物理吸附能力与其药理作用之间是否具有联系,期望能对本品药效的体外评价研究起到抛砖引玉的作用。

笔者参考十分有限且不完善的文献,以及根据对本品结构和作用方式的猜想,初步选择黏度试验、沉降挂壁试验考察本品的物理吸附能力,拟通过考察这些指标的差异以推测和进一步探索其与药效差异的关系。当然,目前尚找不到科学依据说明这些试验是否能代表本品在体内的黏附情况。本次试验结果表明,不同厂家、不同剂型的枸橼酸铋钾的物理吸附能力无明显差异,初步预测其对溃疡组织面的覆盖能力无明显差异,因此推测本品的物理吸附能力与本品的药理作用之间无必然联系。

* 药师,硕士。研究方向:缓控释制剂。电话:023-61800287。
E-mail:nie1ji@163.com

通信作者:主治医师,硕士。研究方向:药理学。电话:023-61802519。E-mail:405995984@qq.com

参考文献

- [1] 崔荣丽,董秀云,刘秀敏.含铋药物对胃黏膜的保护作用及其机制的研究[J].北京医学,2006,28(12):749.
- [2] 唐承薇,刘新才.胶体铋的药效学研究[J].重庆医科大学学报,1997,17(1):63.
- [3] 陆美珍.胶体次枸橼酸铋的作用方式[J].天津药学,1982,4(4):54.
- [4] 董秀云,王立新,周丽,等.胃黏膜保护剂的作用及其机制的研究[J].中华消化杂志,2002,22(9):526.
- [5] 于芝颖,张海英,李玉珍.4厂家铋制剂的质量评价[J].中国医院药学杂志,2006,26(1):80.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:523-524、附录15-16、附录42-44、附录85-87.
- [7] United States Pharmacopeial Convention. USP[S]. 34ed. Philadelphia: National Publishing, 2011:2 051.
- [8] 毕雪艳.火焰原子吸收法测定胶体果胶铋胶囊中铋的含量[J].药物分析杂志,2007,27(11):1 783.

(收稿日期:2014-03-25 修回日期:2014-12-24)

(编辑:刘 萍)

氯霉素(Chloramphenicol)是一种广谱抗生素,抗菌作用强,是治疗沙眼和结膜炎等眼部疾病最常用的抗生素之一。市售的氯霉素滴眼液滴入眼部,迅速被消除或溢出眼外,发挥药效的不到5%的药物。为保证药效,需要多次给药,每日用药3~5次,每次1~2滴。有文献报道了采用高效液相色谱(HPLC)法测定氯霉素滴眼液等制剂中氯霉素含量的方法^[1-3],但关于氯霉素生物样本中药物浓度测定和药动学国内鲜见报道,且氯霉素局部用药浓度非常低,比如检测药物在眼部的浓度非常困难,因此建立灵敏、精确的检测方法是非常必要的。氯霉素主要透过血-眼屏障到达房水,发挥药效作用^[4],故笔者采用HPLC法测定兔眼房水中氯霉素质量浓度,为其在兔眼房水中的药动学研究提供检测方法。

1 材料

1.1 仪器

LC-2010A HT HPLC仪(日本岛津公司);TGC-16G快速离心机(上海安亭科学仪器厂,离心半径:8 cm,下同);XW-80A旋涡混合器(上海精科实业有限公司)。

1.2 药品与试剂

氯霉素滴眼液(四川泰华堂制药有限公司,批号:20100302,含量:0.25%);氯霉素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:130555-200602,纯度:99.5%);甲醇(江苏汉邦科技有限公司,色谱纯);磷酸二氢钾(成都金山化工试剂厂,分析纯)。

1.3 动物

健康新西兰白兔6只,无眼疾,体质量2~3 kg,♀♂不限,由重庆医科大学动物实验中心提供,实验动物使用许可证号为SCXK(渝)2010-0015。

2 方法与结果

2.1 样品采集

用微量进样器在6只兔眼结膜囊内滴入100 μl市售氯霉素滴眼液,被动闭合30 s。滴眼后分别于5、15、30、60、120、180 min抽取房水约100 μl,置于-20℃冰箱中冷冻保存,备用。

2.2 样品处理

精密量取房水样品100 μl,加200 μl甲醇,涡旋30 s,12 000 r/min离心10 min,取上清液20 μl,注入液相色谱仪,记录峰面积。

2.3 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Hypersil ODS C₁₈(200 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.34%磷酸二氢钾(55:45,V/V),流速:1.0 ml/min;检测波长:273 nm;柱温:30℃;进样量:20 μl。取空白房水、兔眼滴药15 min后的房水样品、空白房水和氯霉素对照品溶液的混合液(配制氯霉素质量浓度为0.50 μg/ml),按照“2.2”项下方法处理后,分别取20 μl注入液相色谱仪,记录色谱,见图1。

由图1可知,在该色谱条件下,氯霉素的保留时间约为5.50 min,且房水中的杂质对氯霉素的测定无干扰。

2.4 对照品溶液的制备

精密称取氯霉素对照品适量,用甲醇溶液稀释配制成质量浓度分别为0.25、0.5、1、2、4、8 μg/ml的氯霉素对照品溶液,备用。

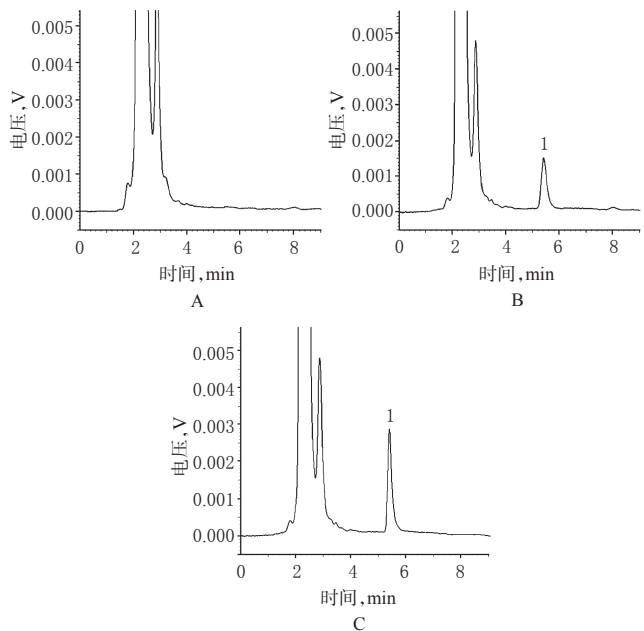


图1 高效液相色谱图

A. 空白房水;B. 房水样品;C. 空白房水+氯霉素对照品;1. 氯霉素

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank aqueous humor; B. aqueous humor sample; C. blank aqueous humor+chloramphenicol control; 1. chloramphenicol

2.5 标准曲线的绘制

精密吸取空白房水100 μl,加入适量“2.4”项下氯霉素对照品溶液,配制氯霉素质量浓度分别为0.125、0.25、0.5、1、2、4 μg/ml的系列样品,涡旋30 s,12 000 r/min离心10 min,取上清液20 μl,注入液相色谱仪,记录峰面积。以峰面积(*A*)为纵坐标、质量浓度(*c*)为横坐标进行线性回归分析,得回归方程为 $A=36\ 674c+288.70$ ($r=0.998\ 6, n=6$)。结果表明,氯霉素检测质量浓度的线性范围为0.125~4 μg/ml;信噪比为10时的定量限为0.02 μg/ml。

2.6 精密度的试验

精密量取空白房水100 μl,加入适量“2.4”项下氯霉素对照品溶液,配制质量浓度分别为0.25、0.50、1.00 μg/ml的样品,各3份,按“2.2”项下方法处理后,取20 μl注入液相色谱仪,测定峰面积。每日测定5次考察日内精密度的,连续测定5 d考察日间精密度的。结果,日内RSD为2.98%($n=5$),日间RSD为3.34%($n=5$)。

2.7 回收率试验

精密量取空白房水100 μl,加入适量“2.4”项下氯霉素对照品溶液,配制质量浓度分别为0.25、0.50、1.00 μg/ml的样品,各3份,按“2.2”项下方法处理后,取20 μl注入液相色谱仪,记录峰面积,代入回归方程计算浓度。以测得量与加入量之比计算方法回收率,以测定峰面积与相同质量浓度的对照品溶液直接进样得到的峰面积之比计算提取回收率,结果见表1。

2.8 稳定性试验

精密量取空白房水100 μl,加入适量“2.4”项下氯霉素对照品溶液,配制质量浓度分别为0.25、0.50、1.00 μg/ml的样品,各3份,于-20℃冷冻24 h,溶解,反复冻融3次。按“2.2”项下方法处理后,取20 μl注入液相色谱仪,测定峰面积,考察稳定

性。结果峰面积的RSD依次为4.00%、3.92%、4.02%，表明样品溶液在-20℃下反复冻融3次可稳定保存。

表1 回收率试验结果(n=3)

Tab 1 Result of recovery test(n=3)

加入量, μg/ml	测得量, μg/ml	方法回收率		提取回收率	
		测得值,%	RSD,%	测得值,%	RSD,%
0.25	0.246	98.35	3.73	93.75	2.67
	0.228	91.28		91.33	
	0.238	95.09		88.89	
0.50	0.465	93.00	2.49	91.74	1.83
	0.487	97.40		93.56	
	0.484	96.80		94.54	
1.00	0.949	94.95	1.54	96.92	2.15
	0.977	97.73		93.83	
	0.955	95.50		92.91	

2.9 样品测定

取“2.1”项下各时间点取的房水样品,按“2.2”项下方法处理后,取20 μl注入液相色谱仪,记录峰面积,代入回归方程计算。房水样品中氯霉素的质量浓度测定结果见表2。

表2 房水样品中氯霉素的质量浓度测定结果(μg/ml)

Tab 2 Concentration determination results of chloramphenicol in aqueous humor(μg/ml)

时间,min	第1只	第2只	第3只	第4只	第5只	第6只	$\bar{x} \pm s$
5	0	0	0	0	0	0	0
15	0.325	0.322	0.346	0.308	0.325	0.359	0.331±0.041
30	0.232	0.225	0.283	0.264	0.258	0.241	0.251±0.049
60	0.133	0.097	0.153	0.142	0.158	0.115	0.133±0.052
120	0.069	0.051	0.093	0.088	0.053	0.052	0.068±0.042
180	0.017	0.039	0.055	0.061	0.017	0.023	0.035±0.043

由表2结果可知,兔眼滴药第15 min时,房水中的氯霉素质量浓度最高,之后房水中氯霉素的质量浓度逐渐降低。

3 讨论

据参考文献报道,用HPLC法可测定血液中氯霉素的含量^[6]。笔者采用该文中甲醇-1%乙酸(45:55, V/V)作为流动相测定兔眼房水中氯霉素的含量,该方法虽然能准确、灵敏地

测定房水中氯霉素质量浓度,但是氯霉素保留时间为7.2 min。而本文方法中氯霉素保留时间为5.5 min,与前者相比,本文检测更为快速。

与血液样品比较,氯霉素滴眼液滴眼后房水中的氯霉素质量浓度较低,且房水容量有限,可供采集的房水样品量较少,因此,对样品的处理和测定方法要求更高。氯霉素在甲醇中有良好的溶解性,故本文选择甲醇处理房水样品,沉淀房水中的蛋白质,去除杂质,提取房水中的氯霉素。参照文献[7],本研究曾考察了甲醇-0.34%磷酸二氢钾(60:40, V/V)作为流动相,结果发现,氯霉素易受房水中成分干扰,峰形较差。经筛选,最终选用甲醇-0.34%磷酸二氢钾(55:45, V/V)作为流动相较为适宜。

综上所述,本方法灵敏、结果准确,可用于兔眼房水中氯霉素的质量浓度测定,对氯霉素药动学研究有一定的意义。

参考文献

- [1] 刘照振,王俊秋,李文东. HPLC法测定复方氯霉素洗剂和氯柳酞中氯霉素的含量[J]. 中国药房, 2014, 25(20): 1910.
- [2] 谢楠,何晓英,张小明,等. HPLC测定氯霉素滴眼液中氯霉素及二醇物的含量[J]. 华西药学杂志, 2006, 21(1): 93.
- [3] 张向明. 反相高效液相色谱法测定氯霉素滴眼液含量[J]. 中国医院药学志, 2002, 22(25): 289.
- [4] 肖永红. 临床抗生素学[M]. 重庆: 重庆出版社, 2004: 93-94.
- [5] 梁文权. 生物药剂学与药物动力学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 85.
- [6] 施耀国,刘菁,张婴元,等. 氯霉素血浓度的高效液相色谱法监测[J]. 中国抗生素杂志, 1991, 16(3): 89.
- [7] 李湘斌,刘建平,唐帆,等. HPLC法同时测定地氯滴眼液中地塞米松磷酸钠及氯霉素含量[J]. 中南药学, 2004, 6(2): 148.

(收稿日期:2014-07-02 修回日期:2014-08-26)

(编辑:邹丽娟)

全国合理用药工作现场会在沈阳召开

本刊讯 2015年2月3日,全国合理用药工作现场会在沈阳军区总医院召开。会议组织观摩沈阳军区总医院临床用药管理工作,并开展经验交流。全面总结了合理用药管理工作,对落实2015年全国医疗管理工作会议、“进一步改善医疗服务行动计划”工作会议精神,推动今后一个时期的合理用药管理工作进行部署。国家卫生和计划生育委员会副主任马晓伟出席会议并讲话。

马晓伟指出,党中央、国务院高度重视医疗卫生工作。药物治疗是医疗服务的重要手段,也是群众医疗支出的重要组成部分。做好合理用药管理工作是落实全面建成小康社会任务的重点环节,是深化医改和公立医院改革的客观要求,也是建设人民满意的卫生计生事业、树立良好形象的重要举措。各地应当深刻认识合理用药管理工作的重要意义。

马晓伟强调,近一个时期,我委和地方各级卫生计生行政部门、各级各类医疗机构高度重视,采取一系列措施,推动合

理用药管理工作取得了较大成绩。但目前,工作形势依然严峻,用药费用仍保持较高增长幅度,合理用药水平有待进一步提高,常态化监管机制尚未完全形成。尤其是抗菌药物不合理使用导致的细菌耐药,使医疗质量安全面临极大挑战。下一步,要以抗菌药物管理为重点,抓好以下工作:

一是抗菌药物管理工作向基层和民营医疗机构延伸,实现医疗服务行业全覆盖。二是建立长效管理机制,严抓抗菌药物管理各项制度、指标要求落实情况。三是建立多学科参与、多部门联动的抗菌药物应用指导与管理网络,全面提高抗菌药物应用的管理水平。四是切实加强医德医风建设,抓好行业纠风工作。五是严格落实合理用药管理责任制,加大监督检查力度,确保工作实效。六是与抗菌药物管理相关部门建立联合机制,形成合力。七是统筹考虑,做好其他各类药物合理使用管理工作,全面推进合理用药管理。