

RP-HPLC 法测定兔眼房水中头孢匹胺钠

张 毅¹, 刘美欣¹, 连大祥²

(1. 天津市眼科医院, 天津 300020; 2. 天津医科大学, 天津 300010)

摘要:目的 建立用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定家兔眼房水中头孢匹胺钠的方法。方法 将给予头孢匹胺钠后抽取的兔眼房水经去蛋白处理后,采用 RP-HPLC 分析。流动相为磷酸二氢钾溶液(0.05 mol/L)-甲醇(73:27),检测波长 254 nm,体积流量 1.0 mL/min,柱温 30 ℃。结果 头孢匹胺钠在 0.12~2.50 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好($r=0.9999$),平均回收率为(94.30 \pm 0.96)%,RSD<4%。结论 本法准确,重现性好,适用于眼房水中头孢匹胺钠的分析。

关键词:高效液相色谱法;房水;头孢匹胺钠;测定

中图分类号:R969.1

文献标识码:A

文章编号:1674-5515(2010)03-0224-02

Determination of Cefpiramide in rabbit ocular aqueous by RP-HPLC

ZHANG Yi¹, LIU Mei-xin¹, LIAN Da-xiang²

(1. Tianjin Eye Hospital, Tianjin 300020, China; 2. Tianjin Medical University, Tianjin 300010, China)

Abstract: **Objective** To establish a RP-HPLC method to determine the Cefpiramide level in rabbit ocular aqueous. **Methods** The proteins in samples were removed by precipitation. The RP-HPLC method was performed by using sodium dihydrogen phosphate (aqueous solution, 0.05 mol/L) and methanol in a ratio of 73:27 as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min. The wavelength of detection was 254 nm and column temperature was at 30 ℃. **Results** The calibration curves were linear over the range of 0.12~2.5 $\mu\text{g/mL}$ and with a correlation coefficient of 0.9999. The average recovery was (94.30 \pm 0.96)% and the RSD less than 4%. **Conclusion** The HPLC method is accurate and reliable for the determination of ocular Cefpiramide in rabbit eyes.

Key words: RP-HPLC; ocular aqueous; Cefpiramide; determination

头孢匹胺钠属头孢菌素类抗生素,它对革兰阳性菌和阴性菌具有广谱抗菌活性,尤其对绿脓杆菌具有很强的抗菌作用。为了研究头孢匹胺钠在眼部的药代动力学及其在眼科临床应用的疗效,笔者参考有关文献^[1-2],对兔房水中头孢匹胺钠的量进行了反相高效液相色谱(RP-HPLC)测定,建立了一种精确、有效的兔房水中头孢匹胺钠测定方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

LC-10Avp 高效液相色谱仪,UV-2450 紫外分光光度计,均为日本岛津产品;AG135 分析天平,瑞士梅特勒产品;XW-80A 旋涡混合器,LG16-W 离心机,韩国 LG 产品。甲醇为市售色谱纯,磷酸二氢钾为分析纯。

1.2 药品

注射用头孢匹胺钠,山东瑞阳制药有限公司,批号 06121201;头孢匹胺对照品,山东瑞阳制药有限公司,批号 4-546。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 ODS-C₁₈ 柱,流动相为磷酸二氢钾溶液(0.05 mol/L)-甲醇(73:27),检测波长 254 nm,体积流量 1.0 mL/min,柱温 30 ℃,进样量 20 μL 。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取头孢匹胺对照品适量,用流动相稀释成 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、5.00 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

选用新西兰家兔(由中国医学科学院试验动物研究所繁殖。出售许可证编号为 SCXK11000006;动物

饲养观察室为Ⅱ级;合格证:津实设施准字第012号),体质量2.0~2.5 kg。将头孢匹胺钠用注射用生理盐水溶解后,按照50 mg/kg自兔耳缘静脉缓慢推注。于用药后30、60、90、120、150、180 min抽取兔眼房水。精密量取房水样品150 μ L,加入甲醇150 μ L、流动相75 μ L,旋涡振荡2 min,12 000 r/min离心15 min,取上清液进样。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2”项下不同质量浓度的对照品溶液各75 μ L,置于离心试管中,精密加入空白房水及甲醇各150 μ L,按照“2.3”项下方法处理,旋涡振荡2 min,12 000 r/min离心15 min,取上清液进样。以头孢匹胺的质量浓度为横坐标(X),以相应的峰面积积分值为纵坐标(Y),进行线性回归,得回归方程 $Y=8\,928.5X-160.71$, $r=0.999\,9$,表明头孢匹胺在0.12~2.50 μ g/mL线性关系良好。最低检测限为0.12 μ g/mL。

2.5 回收率试验

精密称取头孢匹胺对照品适量,用流动相稀释成0.50、2.00、5.00 μ g/mL的对照品溶液,取不同质量浓度的对照品溶液各75 μ L于离心试管中,精密加入空白房水及甲醇各150 μ L,按照“2.3”项下样品预方法处理,旋涡振荡2 min,12 000 r/min离心15 min,取上清进样。结果见表1。

表1 头孢匹胺回收率测定结果($n=6$)

| 进样 ρ / (μ g \cdot mL $^{-1}$) | 测得 ρ / (μ g \cdot mL $^{-1}$) | 回收率 /% | 平均回收 率/% | RSD /% |
|---|---|-----------|-------------|-----------|
| 2.512 5 | 2.373 0 | 94.45 | | |
| 1.005 0 | 0.955 9 | 95.11 | 94.29 | 0.96 |
| 0.251 2 | 0.234 4 | 93.31 | | |

2.6 精密度试验

按照与“2.5”项相同的处理方法,取上清液进样,测日内精密度,结果见表2。

表2 日内精密度测定结果($n=6$)

| 进样 ρ /(μ g \cdot mL $^{-1}$) | RSD/% |
|---|-------|
| 2.51 | 1.38 |
| 1.00 | 2.46 |
| 0.25 | 3.97 |

2.7 样品的测定

取对照品溶液及供试品溶液,用时取空白房水,按照“2.3”项下方法处理,旋涡振荡2 min,12 000 r/min离心15 min,取上清液进样。结果头孢匹胺钠的保留时间为11.2 min,理论塔板数为2 563,分离度为4.86,表明该方法能够很好地排除兔眼房水

中内源性物质对头孢匹胺钠测定的干扰,符合《中国药典》中头孢匹胺钠测定项下对色谱条件的要求。结果见图1,其药-时曲线见图2。

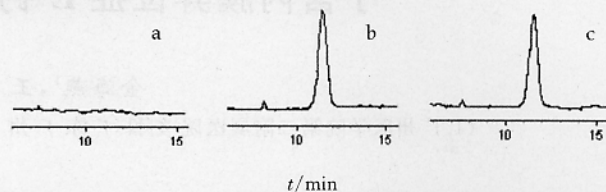


图1 空白房水(a)、对照品加房水(b)、供试品(c)HPLC图

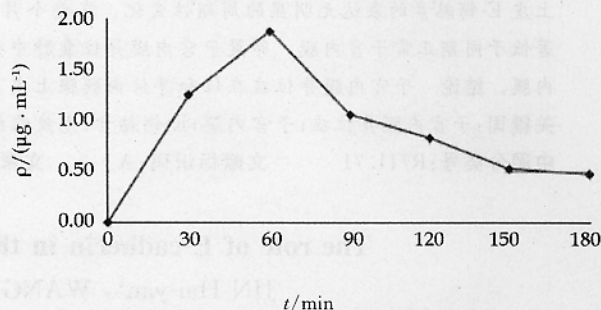


图2 兔眼房水中头孢匹胺钠的药-时曲线

3 讨论

3.1 检测波长的确定

用紫外分光光度计对头孢匹胺钠进行扫描,发现在254 nm和273 nm波长处均有较大吸收,但在273 nm波长处房水中的内源性物质对头孢匹胺钠的测定干扰较大,故确定检测波长为254 nm,与文献中检测波长一致^[2]。采用磷酸盐配制流动相,与文献中的流动相乙腈-甲醇-10 μ mol/L醋酸钠(11:0.5:88.5)^[1]比较,分离度更好。

3.2 蛋白沉淀剂的选择

采用甲醇为沉淀剂,比例为1:1,蛋白沉淀完全。此前笔者也曾试用乙腈沉淀蛋白,发现乙腈对测定有干扰。

本实验建立的用RP-HPLC测定兔眼房水中头孢匹胺钠的方法,回收率、精密度及线性范围均满足药物分析的要求,可用于眼科临床的药代动力学分析。

参考文献

- [1] 施耀国,张 菁,孔维佳. 头孢匹胺临床药物动力学研究[J]. 中国抗生素杂志,2000,25(4):294-297.
- [2] 陈志刚,甄健存,张同合. HPLC测定血浆和尿液中头孢匹胺的浓度[J]. 中国药理学杂志,2000,35(11):765-767.

(收稿日期 2010-03-19)