

HPLC法测定人胸腔积液中左氧氟沙星的浓度及其药动学研究[△]

苏碧雅*,张黎明,杨梅珍,邵发林*(天水市第一人民医院药剂科,甘肃天水 741000)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)11-1555-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.11.23

摘要 目的:建立测定人胸腔积液中左氧氟沙星浓度的方法,研究其药动学特征。方法:6名感染性胸腔积液患者静脉滴注左氧氟沙星0.4 g qd后,收集给药后0.5、1、2、4、8、12、24 h的胸腔积液,甲醇沉淀蛋白处理后,采用高效液相色谱法测定其中左氧氟沙星的浓度,色谱柱为Agilent ZORBAX SB-C₁₈,流动相为甲醇-0.02 mmol/L磷酸二氢钾缓冲液(含0.3%三乙胺,70:30, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为294 nm,柱温为35 ℃,进样量为20 μL,运用WinNonlin 5.2软件计算药动学参数。结果:该色谱条件下,左氧氟沙星的保留时间为4.9 min左右,峰形良好,基线平稳,胸腔积液中内源性物质对其测定无干扰,检测质量浓度的线性范围为0.625~20 μg/mL($R^2=0.998\ 9$),低、中、高质量浓度质控样品的相对回收率为(83.75±1.66)%~(87.73±2.43)%($n=3$),日内RSD为2.23%~4.96%($n=5$)、日间RSD为4.10%~4.78%($n=5$),准确度为(97.76±4.85)%~(100.87±2.25)%($n=5$),稳定性试验中测得浓度的RSD均小于5%($n=3$)。左氧氟沙星在患者体内的药动学参数: c_{max} 为(2.21±0.87) μg/mL、 $AUC_{0-24\ h}$ 为(37.31±11.94) μg·h/mL、 $t_{1/2}$ 为(4.50±0.21) h($n=6$)。结论:本方法简便、可靠、灵敏度高,可用于人胸腔积液中左氧氟沙星的浓度测定及其药动学研究。

关键词 高效液相色谱法;左氧氟沙星;胸腔积液;浓度测定

Determination of Levofloxacin Concentration in Human Pleural Effusion by HPLC and Its Pharmacokinetic Study

SU Biya, ZHANG Liming, YANG Meizhen, SHAO Falin(Dept. of Pharmacy, Tianshui First People's Hospital, Gansu Tianshui 741000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of levofloxacin concentration in human pleural effusion, to study its pharmaceutical characteristics. METHODS: Totally 6 patients with infectious pleural effusion received levofloxacin 0.4 g qd intravenous drip. Pleural effusion was collected at 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 and 24 hours after administration. After treated with methanol precipitation protein, HPLC was used to determine the concentration of levofloxacin. The determination was performed on Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.02 mmol/L KH₂PO₄ buffer (containing 0.3% triethylamine, 70 : 30, V/V at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 294 nm, and the column temperature was 35 ℃. The sample size was 20 μL. The pharmacokinetic parameters were calculated with WinNonlin 5.2 software. RESULTS: Under this chromatogram condition, retention time of levofloxacin was about 4.9 min, the peak shape was good, the baseline was stable, and the determination of endogenous substances in pleural effusion had no interference. The linear range of levofloxacin were 0.625-20 μg/mL ($R^2=0.998\ 9$). The relative recovery rates were (83.75 ± 1.66)% - (87.73 ± 2.43)% for low, medium and high concentration samples ($n=3$); RSDs of intra-day were 2.23% -4.96% ($n=5$); RSDs of inter-day were 4.10% -4.78% ($n=5$); the accuracy ranged (97.76 ± 4.85)% - (100.87 ± 2.25)% ($n=5$); RSD of concentration was no more than 5% in stability test ($n=3$) for low, medium and high quality control sample. The pharmacokinetic parameters of levofloxacin included c_{max} were (2.21 ± 0.87) μg/mL; $AUC_{0-24\ h}$ were (37.31 ± 11.94) μg·h/mL; $t_{1/2}$ were (4.50 ± 0.21) h. CONCLUSIONS: Established method is simple, reliable and sensitive, and can be used for the determination of levofloxacin concentration in human pleural effusion and its pharmacokinetic study.

KEYWORDS HPLC; Levofloxacin; Pleural effusion; Concentration determination

喹诺酮类抗菌药物是人工合成的含4-喹诺酮基本结构的抗菌药,属浓度依赖型抗菌药,第三代喹诺酮类抗菌药物对革兰氏阳性、阴性菌均有较明显的抗菌后效

应^[1]。左氧氟沙星是临床常用的治疗肺部感染的抗菌药物,在耐药结核杆菌感染的治疗中也被广泛使用,其给药方案多参照血液中的药动学参数制订。有关左氧氟沙星血药浓度的高效液相色谱法(HPLC)已有很多报道^[2-4],但血浆中的内源性杂质与胸腔积液不同,故左氧氟沙星血药浓度监测的HPLC法并不能直接用于左氧氟沙星胸腔积液样品的检测,且血浆中左氧氟沙星的药动

△基金项目:甘肃省自然科学基金资助项目(No.1310RJZA096)

*主管药师,硕士。研究方向:临床药学。电话:0938-8220982。

E-mail:subiyasophia@163.com

#通信作者:主任医师。研究方向:呼吸内科。E-mail:343589263

@qq.com

学研究也并不能准确反映肺组织中左氧氟沙星的分布情况,因此对感染部位的药物浓度进行测定,具有更大的临床意义。但目前国内尚无文献报道人用左氧氟沙星后,左氧氟沙星在肺部的药动学特征。胸腔积液(Pleural effusion)是以胸膜腔内病理性液体积聚为特征的一种常见的临床症候,对该类患者胸腔积液中左氧氟沙星的药动学进行研究,再根据检测结果结合药动学/药效学理论以及病原菌最低抑菌浓度(MIC)综合分析,能指导临床医师更合理、准确地使用左氧氟沙星,保证用药有效性和安全性。故本文采用HPLC外标法,用甲醇沉淀胸腔积液中蛋白质后,测定左氧氟沙星的含量。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260液相系统,包括二极管阵列检测器(美国Agilent公司);TD4B台式低速自动平衡离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司);XW-80A旋涡混合器(上海青浦沪西仪器厂);UPD-I-10T小型纯水机(四川优普超纯科技有限公司);MD200-2氮吹仪(杭州瑞诚仪器有限公司);Eppendorf移液器(德国Eppendorf公司);AUY220分析天平(日本岛津公司)。

1.2 药品与试剂

左氧氟沙星对照品(中国食品药品检定研究院,批号:130455,纯度:97.1%);甲醇为色谱纯;其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 胸腔积液来源

本文选择的研究对象为我院呼吸内科收治的6名感染性胸腔积液患者,所采集的胸腔积液为渗出液,研究患者入选标准为(1)肺部感染患者;(2)经胸部CT检查,胸腔积液量达到250 mL以上,可以行胸腔穿刺置管引流术者;(3)静脉滴注左氧氟沙星注射液进行抗感染治疗,给药剂量为0.4 g qd的患者;(4)配合度良好,能保证按时取样的患者。排除标准为(1)单纯性结核性胸腔积液患者;(2)单纯性肿瘤性胸腔积液患者;(3)其他原因不明的胸腔积液患者。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.02 mmol/L磷酸二氢钾缓冲液[含0.3%三乙胺,70:30(V/V)];流速:1.0 mL/min;柱温:35℃;检测波长:294 nm;进样量:20 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取左氧氟沙星对照品10 mg,置于25 mL量瓶中,加入甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得400 μg/mL的左氧氟沙星甲醇贮备液,置于4℃冰箱保存。临用前将该贮备液用甲醇逐级稀释成质量浓度分别为0.625、1.25、2.5、5、10、20 μg/mL的系列对照品溶液即可。

2.3 胸腔积液样品的前处理方法

取胸腔积液样品500 μL,置于离心管中,加甲醇2 000 μL,涡旋混合3 min,4 000 r/min离心15 min后,取上清液于另一离心管中,在相同条件下二次离心,取上清液,用氮吹仪挥干甲醇后,加入500 μL甲醇复溶,涡旋混合均匀后用0.25 μm的微孔滤膜滤过,置于自动进样分析小瓶中,吸取20 μL进样分析。

2.4 专属性考察

取对照品溶液,按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。另取6名感染性胸腔积液患者使用左氧氟沙星前抽取的胸腔积液的混合液(简称空白胸腔积液)、空白胸腔积液+对照品、胸腔积液样品(给药后1 h),按照“2.3”项下方法处理后,再按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。

2.5 线性关系考察

取质量浓度为0.625、1.25、2.5、5、10、20 μg/mL的对照品溶液,各500 μL,分别置于离心管中,用氮吹仪挥干甲醇后,加入空白胸腔积液500 μL,涡旋15 s混合均匀,配成含左氧氟沙星质量浓度分别为0.625、1.25、2.5、5、10、20 μg/mL的系列质控样品,每个浓度平行做3份,按照“2.3”项下方法处理后,再按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,重复3次,取平均值。以左氧氟沙星峰面积(*A*)为纵坐标,质量浓度(*c*)为横坐标,进行回归分析。

2.6 检测限与定量下限考察

将质量浓度为0.625 μg/mL的对照品溶液,逐级稀释后,按照“2.1”项下色谱条件进样测定,以信噪比为3:1,确定左氧氟沙星的检测限;以标准曲线的最低点为左氧氟沙星的定量下限。

2.7 相对回收率试验

取质量浓度为1.25、10、15 μg/mL的对照品溶液,各500 μL,分别置于离心管中,用氮气仪挥干甲醇后,加入空白胸腔积液500 μL,制成质量浓度分别为1.25、10、15 μg/mL的质控样品,每个浓度平行做3份,按照“2.3”项下方法处理后,再按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积 A_1 。取空白胸腔积液适量,按照“2.3”项下方法处理后,加入对照品溶液制备成相应质量浓度的溶液,再按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积 A_2 。以 A_1/A_2 计算相对回收率。

2.8 精密度与准确度试验

取质量浓度为1.25、10、15 μg/mL的对照品溶液,各500 μL,分别置于离心管中,用氮气仪挥干甲醇后,加入空白胸腔积液500 μL,制成质量浓度分别为1.25、10、15 μg/mL的质控样品,每个浓度平行做5份,按照“2.3”项下方法处理后,再按照“2.1”项下色谱条件进样,同一天内测定3次考察日内精密度;每天测定1次,连续测定3

d, 考察日间精密度; 将测得峰面积代入回归方程计算左氧氟沙星的浓度, 以实测值/加入值计算准确度。

2.9 稳定性试验

取质量浓度为 1.25、10、15 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液, 各 500 μL , 分别置于离心管中, 用氮气仪挥干甲醇后, 加入空白胸腔积液 500 μL , 制成质量浓度分别为 1.25、10、15 $\mu\text{g/mL}$ 的质控样品, 每个浓度平行做 15 份, 取 3 份按“2.3”项下方法处理后立即进样分析; 3 份室温下放置 4 h 后按“2.3”项下方法处理后进样分析; 3 份按“2.3”项下方法处理后再置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 12 h 后进样分析; 3 份于冰箱中冷冻保存 4 周后取出融化, 再按“2.3”项下方法处理后进样分析; 3 份反复冻融 3 次后再按“2.3”项下方法处理后进样分析, 考察稳定性。

2.10 药动学考察

按“2.3”项下方法处理 6 名感染性胸腔积液患者静脉滴注左氧氟沙星 0.4 g qd 后 0.5、1、2、4、8、12、24 h 的胸腔积液, 再按照“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 代入回归方程计算浓度。使用 GraphPad 软件绘制胸腔积液中左氧氟沙星的药-时曲线, 将上述浓度数据代入 WinNonlin 5.2 软件计算药动学参数。

3 结果

3.1 专属性

在“2.1”项色谱条件下, 左氧氟沙星的保留时间为 4.9 min 左右, 峰形良好, 与前后邻近峰能有效分离, 胸腔积液中内源性物质对其测定无干扰, 基线平稳。色谱图见图 1。

3.2 线性关系

得回归方程为 $A=40.71c+1.6403$ ($R^2=0.9989$), 胸腔积液中左氧氟沙星检测质量浓度的线性范围为 0.625~20 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.3 检测限与定量下限

胸腔积液中左氧氟沙星的检测限为 0.156 $\mu\text{g/mL}$, 定量下限为 0.625 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.4 相对回收率

结果显示, 质控样品中左氧氟沙星的相对回收率均

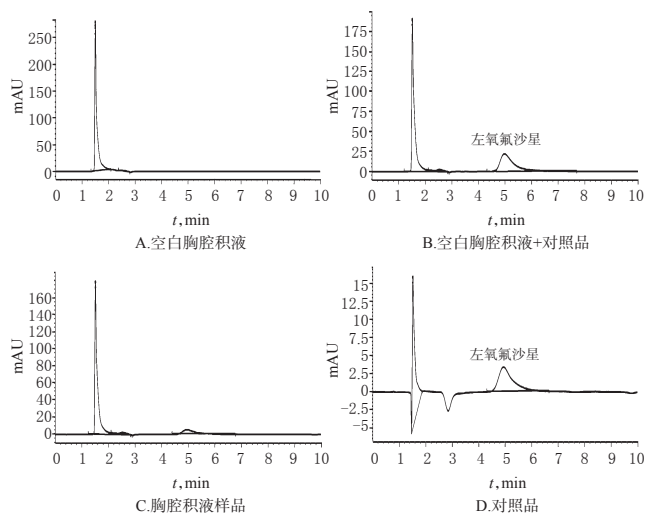


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

在 80% 以上, 符合相关要求规定。相对回收率结果见表 1。

表 1 相对回收率结果 ($n=3$)

Tab 1 Results of relative recovery rate ($n=3$)

加入浓度, $\mu\text{g/mL}$	测得浓度, $\mu\text{g/mL}$	平均回收率, %	RSD, %
1.25	1.04 ± 0.05	83.75 ± 1.66	2.08
10.00	8.57 ± 0.06	85.70 ± 1.85	2.44
15.00	13.16 ± 0.17	87.73 ± 2.43	3.43

3.5 精密度和准确度

结果显示, 测得浓度的日内、日间 RSD 均小于 5%, 准确度在 $(97.76 \pm 4.85)\%$ ~ $(100.87 \pm 2.25)\%$ 范围内, 均符合相关规定。精密度与准确度结果见表 2。

表 2 精密度与准确度结果 ($n=5$)

Tab 2 Results of precision and accuracy ($n=5$)

质量浓度, $\mu\text{g/mL}$	日内精密度		日间精密度		准确度, %
	测得浓度, $\mu\text{g/mL}$	RSD, %	测得浓度, $\mu\text{g/mL}$	RSD, %	
1.25	1.22 ± 0.06	4.96	1.22 ± 0.06	4.74	97.76 ± 4.85
10.00	9.97 ± 0.42	4.25	10.14 ± 0.42	4.10	99.68 ± 4.24
15.00	15.13 ± 0.34	2.23	14.93 ± 0.71	4.78	100.87 ± 2.25

3.6 稳定性

结果显示, 测定浓度的 RSD 均小于 5%, 质控样品的稳定性良好。稳定性结果见表 3。

表 3 稳定性结果 ($n=3$)

Tab 3 Results of stability ($n=3$)

质量浓度, $\mu\text{g/mL}$	处理后立即测定		放置 4 h 后处理测定		处理后 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 12 h 测定		冷冻 4 周后处理测定		反复冻融 3 次后处理测定	
	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, %	测得浓度, $\mu\text{g/mL}$	RSD, %	测得浓度, $\mu\text{g/mL}$	RSD, %
1.25	1.28 ± 0.02	1.20	1.25 ± 0.06	4.81	1.23 ± 0.05	3.73	1.23 ± 0.05	3.29	1.21 ± 0.05	3.72
10.00	10.06 ± 0.11	1.11	9.80 ± 0.48	4.90	9.76 ± 0.44	4.53	10.00 ± 0.33	3.32	10.17 ± 0.41	4.07
15.00	14.87 ± 0.12	0.85	15.02 ± 0.19	1.23	15.24 ± 0.42	2.77	14.58 ± 0.60	4.08	15.10 ± 0.09	0.57

3.7 药动学

胸腔积液中左氧氟沙星的药-时曲线见图 2, 药动学参数见表 4。

4 讨论

4.1 检测波长的确定

2015 年版《中国药典》记录的左氧氟沙星 HPLC 法中紫外检测波长为 294 nm 和 238 nm^[5]。本文前期研究发现, 检测波长为 294 nm 时胸腔积液内源性物质对左氧

氟沙星出峰干扰最小,灵敏度较高,所以本文最终选取294 nm作为左氧氟沙星的检测波长。

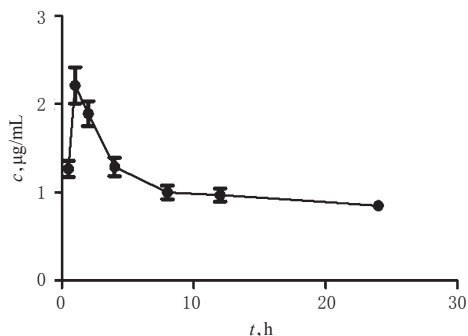


图2 胸腔积液中左氧氟沙星的药-时曲线

Fig 2 Plasma concentration-time curve of levofloxacin in pleural effusion

表4 胸腔积液中左氧氟沙星的药动学参数(n=6)

Tab 4 Pharmacokinetic parameter of levofloxacin in pleural effusion (n=6)

药动学参数	$\bar{x} \pm s$
C_{max} , $\mu\text{g/mL}$	2.21 ± 0.87
AUC_{0-24} , $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$	37.31 ± 11.94
$t_{1/2}$, h	4.50 ± 0.21

4.2 柱温的选择

在HPLC法检测中,提高柱温可以降低流动相的黏度、增加样品在流动相中的溶解度、缩短样品的保留时间,故控制柱温可调整待测物质出峰时间。经过对不同柱温的测试,比较了柱温为25、30、35℃时左氧氟沙星的吸收峰的峰形、拖尾因子及与其他峰的分离度等,同时考虑到柱温过高可能缩短色谱柱寿命、影响生物样品的稳定性,故最终柱温定为35℃。

4.3 蛋白沉淀剂的选择

甲醇和乙腈为HPLC检测最常用的两种有机流动相,选择甲醇和乙腈为蛋白沉淀剂可以最大程度的减少溶剂效应的影响,故本研究选择蛋白沉淀剂时分别试用了乙腈和甲醇。结果发现,乙腈和甲醇作为蛋白沉淀剂均能满足相关要求,但考虑到甲醇毒性较乙腈低,故选择甲醇作为本实验的蛋白沉淀剂。体外药物分析时一般采用外标法,体内药物分析因提取步骤烦琐,都采用内标法进行校正,但因为本方法仅使用4倍体积甲醇沉淀蛋白,无提取等烦琐步骤,而且仪器稳定性、方法的精密度均良好,故选择用外标法进行定量测定。

4.4 方法实用性

左氧氟沙星为临床常用的喹诺酮类抗菌药物,抗菌谱广,可用于治疗铜绿假单胞菌引起的感染^[6]、鲍曼不动杆菌引起的感染^[7],也可与其他抗结核药物联用用于治疗耐药结核菌感染^[8]。左氧氟沙星在治疗肺部、胆系、泌尿系、肠道等部位感染中使用广泛,其在肺组织中浓度高,是治疗肺部感染的常用抗菌药物,但目前对左氧氟沙星肺部的药动学研究多停留在动物实验阶段^[9]。本研究以甲醇和磷酸二氢钾缓冲液为流动相,以甲醇为沉淀剂,建立测定患者胸腔积液中左氧氟沙星浓度的HPLC法,样品处理方便,出峰速度快,10 min即可完成1个样品分析,分析成本较低,适用于临床左氧氟沙星胸腔积液浓度测定及左氧氟沙星的肺部药动学研究。

参考文献

- [1] BLASI F, TARAIA P, COSENTINI R, et al. Therapeutic potential of the new quinolones in the treatment of lower respiratory tract infections[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2003, 12(7):1165-1177.
- [2] 刘芳群,鲁虹.高效液相色谱法测定人血浆中左氧氟沙星的浓度[J]. *中南药学*, 2012, 10(10):734-736.
- [3] 高淑丽,刘丽华,王川平,等. 2种盐酸左氧氟沙星胶囊的人体生物等效性研究[J]. *中国药房*, 2007, 18(26):2030-2032.
- [4] 施爱明,潘杰,华雯妍,等. LC-MS/MS法测定人血浆中左氧氟沙星浓度[J]. *药学进展*, 2008, 32(5):228-231.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:二部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社, 2015:154.
- [6] 李湘燕,薛峰,杨维维,等.亚抑制浓度的左氧氟沙星对铜绿假单胞菌毒力因子表型及基因表达的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2013, 29(5):355-357.
- [7] 晏奎,温汉春,陈一强,等.磷霉素联合左氧氟沙星对鲍曼不动杆菌生物膜的体外研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(4):276-278.
- [8] 陈启亮,陈亮,尹建军.含左氧氟沙星及卷曲霉素方案治疗耐多药肺结核近期疗效分析[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2003, 26(8):454-457.
- [9] 罗成,孔令希,何海霞,等.痰热清注射液对左氧氟沙星在大鼠血液和肺组织中分布的影响[J]. *中国抗生素杂志*, 2014, 39(4):S3-S8.

(收稿日期:2019-01-24 修回日期:2019-04-24)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊, 欢迎投稿、订阅