

RP-HPLC法测定人血浆中莫西沙星的浓度

黄娟*, 雍小兰, 冯仕银, 王蓝天, 杜晓琳, 李楠(成都军区总医院临床药学科, 成都 610083)

中图分类号 R978.1;R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)42-3978-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.42.15

摘要 目的: 建立测定人血浆中莫西沙星浓度的方法。方法: 血浆样品采用萃取法处理后进行反相高效液相色谱(RP-HPLC)法分析, 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₁₈, 流动相为乙腈-水(含 0.05% 三氟醋酸, 22:78), 流速为 1.0 ml/min, 紫外检测波长为 296 nm(0~2.5 min)、256 nm(2.5~4.5 min)、296 nm(4.5~8.0 min), 柱温为 25 °C, 进样量为 20 μl。结果: 莫西沙星与内标的保留时间分别为 6.2 min 和 3.4 min。莫西沙星血药浓度在 0.05~10 μg/ml 范围内线性关系良好($r=0.999\ 6$), 定量下限为 0.05 μg/ml, 日内、日间 RSD 分别低于 3.96%、4.72%, 低、中、高 3 个质量浓度及内标的提取回收率分别为 72.13%、84.12%、85.85% 和 97.31%。结论: 该检测方法简便、准确、专属性强, 适用于临床莫西沙星的血药浓度检测及 I 期临床试验。

关键词 莫西沙星; 血浆; 反相高效液相色谱法; 血药浓度; 药动学

Determination of Moxifloxacin Concentration in Human Plasma by RP-HPLC

HUANG Juan, YONG Xiao-lan, FENG Shi-yin, WANG Lan-tian, DU Xiao-lin, LI Nan(Dept. of Clinical Pharmacy, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of moxifloxacin concentration in human plasma. METHODS: After extracted, plasma sample was analyzed by RP-HPLC. The determination was performed on Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (0.05% TFA, 22:78) at the flow rate of 1.0 ml/min. UV detection wavelengths were set at 296 nm (0-2.5 min), 256 nm (2.5-4.5 min) and 296 nm (4.5-8.0 min), respectively. The column temperature was 25 °C and injection volume was 20 μl. RESULTS: The retention time of moxifloxacin and internal standard were 6.2 min and 3.4 min, respectively. The linear range of moxifloxacin were 0.05-10 μg/ml ($r=0.999\ 6$). The lower limit of quantitation (LLOQ) was 0.05 μg/ml. Intra-day and inter-day RSD were below 3.96% and 4.72%. The extraction recovery of low, medium, high concentration and internal standard were 72.13%, 84.12%, 85.85% and 97.31%. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and specific, and suitable for the determination of moxifloxacin plasma concentration and I phase clinical test.

KEYWORDS Moxifloxacin; Plasma; RP-HPLC; Blood concentration; Pharmacokinetics

本研究建立了化学发光法测定人尿液中 UA 含量的新方法, 该方法无需对样品进行分离, 可直接检测; 尿液无需特殊处理, 直接稀释后, 其中的 UA 可以选择性地猝灭 AA 与荧光素-表面活性剂-铜离子混合物在碱性条件下产生的化学发光。本方法采用化学发光结合流动注射技术测定人尿液中 UA 含量, 分析结果与医院实验室的检查结果具有很好的一致性。本法分析系统设备简单, 操作简便, 结果可靠, 能对尿液中 UA 含量进行快速测定, 可用于监测由于代谢紊乱和使用药物所引起的 UA 异常, 为临床诊断和处方提供依据。

参考文献

- [1] 何金昌. 尿液分析与临床诊断[M]. 深圳: 海天出版社, 1993: 7, 26.
- [2] 卫生部医政司. 全国临床检验操作规程[M]. 3版. 南京: 东南大学出版社, 2005: 232.
- [3] 施政, 刘健, 申屠建中, 等. 高效液相色谱法定量尿酸、黄嘌呤和次黄嘌呤在人体血清中的浓度[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18(5): 532.
- [4] 江雅平, 刘欧, 徐国宾, 等. 反相高效液相色谱紫外法检测人血清尿酸[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(4): 244.

- [5] 胡坪, 王瑞娟, 王月荣, 等. HPLC法测定人尿中尿酸含量[J]. 分析实验室, 2011, 30(5): 50.
- [6] 付海莹, 王建秀, 邓留. 基于石墨烯和室温离子液体复合物溶胶修饰的玻碳电极制备尿酸电化学传感器[J]. 分析化学, 2014, 42(3): 441.
- [7] 常艳兵, 刘艳玲, 何琼. Pt-Au 合金纳米管修饰玻碳电极的尿酸酶传感器的研制[J]. 分析科学学报, 2013, 29(4): 515.
- [8] 孙娜, 王宗花, 夏建飞, 等. 聚对氨基苯磺酸/石墨烯复合修饰电极对尿酸的选择性灵敏测定[J]. 分析测试学报, 2012, 31(7): 853.
- [9] 马艳蓉. 尿酸在普鲁士蓝修饰电极上的电化学动力学性质研究[J]. 宁夏工程技术, 2010, 9(2): 128.
- [10] 樊雪梅, 王书民, 赵夏, 等. 尿酸在聚磺基水杨酸修饰玻碳电极上的电化学行为及其应用[J]. 理化检验: 化学分册, 2009, 45(8): 910.
- [11] 刘梅, 何云华, 吕九如. 高锰酸钾-甲醛-尿酸化学发光体系的研究[J]. 分析化学, 2005, 33(4): 535.
- [12] 瞿鹏, 李保新, 章竹君. 反向流动注射抑制化学发光法测定尿酸[J]. 理化检验: 化学分册, 2004, 40(8): 470.

(收稿日期: 2014-03-03 修回日期: 2014-04-27)

* 执业药师。研究方向: 药物分析。电话: 028-86570439。E-mail: huangjuanchi@qq.com

盐酸莫西沙星为第四代新型喹诺酮类超广谱抗菌药物,其抗菌谱覆盖了全部呼吸道主要致病菌,主要用于慢性支气管急性加剧者、社区获得性肺炎以及急性细菌性鼻窦炎。莫西沙星具有良好的药动学特性,口服吸收良好,生物利用度高,具有良好的组织穿透力^[1],目前已广泛应用于临床。测定动物和人血浆中的莫西沙星浓度的方法已有报道^[2-3],但本试验选择氟康唑为内标,性质稳定、提取回收率高;流动相简单,不含磷酸缓冲盐;经液-液萃取样品干净,回收率稳定,具有一定的优越性。该反相高效液相色谱(RP-HPLC)法具有操作简便、准确、灵敏度高、专属性强、重复性好、试剂便宜等优点,适用于莫西沙星的临床血药浓度测定和药动学研究以及I期临床试验。

1 材料

1.1 仪器

Agilent1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);AB135-S 十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);Thermo ST16R 型冷冻离心机(美国热电公司,离心半径:16 cm);涡旋混合器(北京踏锦科技有限公司);-80 °C 低温冰箱(中国海尔公司);Turbo Vap LV 型浓缩仪(美国 Caliper 公司);Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司)。

1.2 药品与试剂

盐酸莫西沙星对照品(德国拜耳公司,纯度:96.2%,批号:R-1004-01G);内标:氟康唑对照品(中国食品药品检定研究院,纯度:99.9%,批号:100314-200503);甲醇、乙腈均为色谱纯,二氯甲烷、乙醚为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(含 0.05% 三氟醋酸,22:78);流速:1.0 ml/min;检测波长:296 nm(0~2.5 min)、256 nm(2.5~4.5 min)、296 nm(4.5~8.0 min);柱温:25 °C;进样量:20 μl。在该试验条件下,莫西沙星与内标能完全分离,不受血浆内源性杂质干扰,莫西沙星与内标的保留时间分别为 6.2 min 与 3.4 min。色谱图见图 1。

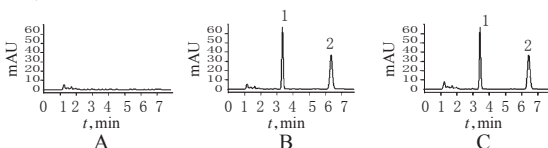


图1 高效液相色谱图

A. 空白血浆;B. 空白血浆+2.0 μg/ml 莫西沙星溶液+内标(200 μg/ml 氟康唑对照品)溶液;C. 给药后 2 h 的血浆样品;1. 氟康唑;2. 莫西沙星

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma+2.0 μg/ml mofloxacin+200 μg/ml internal standard; C. plasma sample 2 h after medication; 1. fluconazole; 2. mofloxacin

2.2 溶液的配制

(1)对照品贮备液:准确称取盐酸莫西沙星对照品 5.46 mg(相当于莫西沙星 5.0 mg)于 5 ml 量瓶中,用甲醇-水(1:1)定容,得莫西沙星贮备液。(2)内标溶液:准确称取氟康唑对照品 40.31 mg 于 10 ml 量瓶中,用甲醇-水(1:1)定容,得内标贮备液;取内标贮备液,用甲醇-水(1:1)稀释,配制成 200 μg/ml 的内标溶液,于 4 °C 下保存,备用。(3)萃取剂:乙醚-二氯甲烷(3:2)。

2.3 血浆样品的处理

精密吸取血浆 200 μl,加入 10 μg/ml 内标氟康唑溶液 100 μl,混匀后加入萃取剂 4 ml,涡旋混匀 5 min。于 3 200 r/min 离心 10 min,转移上层有机相于尖底试管中,30 °C 水浴氮气流吹干。残渣用甲醇-水(1:1)100 μl 复溶,进样 20 μl。

2.4 线性关系及定量下限考察

取空白血浆配制成含莫西沙星分别为 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、10.0 μg/ml 的系列标准血浆样品,其余按“2.3”项下方法处理,记录色谱。以莫西沙星峰面积与内标峰面积的比值(y)与对应浓度(x)进行线性回归,得回归方程: $y=94.02x-0.005$ ($r=0.9996$)。结果表明,莫西沙星血药浓度在 0.05~10 μg/ml 范围内线性关系良好,定量下限为 0.05 μg/ml。定量下限的精密度 RSD 和回收率分别为 1.87% 和 108.79% ($n=5$)。

2.5 精密度试验

配制莫西沙星为 0.2、2.0、8.0 μg/ml 的低、中、高 3 个质量浓度的质控血浆样本,各 6 份,按“2.3”项下方法处理,根据当日标准曲线计算日内精密度;连续测定 3 d,计算日间精密度,结果见表 1。结果表明,本试验所建立的方法的精密度与准确度均达到试验要求。

表1 精密度及回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of precision and recovery tests($n=6$)

质量浓度, μg/ml	日内精密度		日间精密度		方法回收率, %	提取回收率, %
	测得量,μg/ml	RSD,%	测得量,μg/ml	RSD,%		
0.2	0.19	3.96	0.19	4.72	92.66±3.67	72.13±1.22
2.0	2.09	2.84	2.11	4.10	104.37±2.96	84.12±1.53
8.0	8.84	3.75	8.86	2.85	110.52±4.14	85.85±2.85

2.6 回收率试验

配制莫西沙星为 0.2、2.0、8.0 μg/ml 的低、中、高 3 个质量浓度的质控血浆样本,各 3 份,按“2.3”项下方法处理,测定所得莫西沙星峰面积与对应质量浓度对照品溶液直接进样所得峰面积相比,计算提取回收率;根据当日标准曲线求得实测质量浓度,以实测值与理论值相比计算方法回收率,结果见表 1。其中,内标的提取回收率为 97.31%。

2.7 稳定性试验

配制莫西沙星为 0.2、2.0、8.0 μg/ml 的低、中、高 3 个质量浓度的质控血浆样本,按“2.3”项下方法处理。分别考察了血浆样本室温放置 8 h、反复冻融 3 次以及 -80 °C 冷冻放置 30 d 的稳定性,结果见表 2。结果表明,在上述稳定性考察条件下,莫西沙星的质量浓度均保持稳定,未出现明显变化。

表2 稳定性试验结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Results of stability tests($\bar{x} \pm s, n=3$)

质量浓度, μg/ml	反复冻融		室温放置 8 h		-80 °C 冷冻放置 30 d	
	$\bar{x} \pm s, \mu\text{g/ml}$	RSD,%	$\bar{x} \pm s, \mu\text{g/ml}$	RSD,%	$\bar{x} \pm s, \mu\text{g/ml}$	RSD,%
0.2	0.19±0.00	1.41	0.19±0.00	1.81	0.19±0.00	0.62
2.0	2.12±0.07	3.17	2.11±0.05	2.27	2.13±0.04	1.68
8.0	8.76±0.10	1.15	8.62±0.42	4.86	8.65±0.41	4.70

2.8 样品测定

结核性胸膜炎患者静脉滴注盐酸莫西沙星注射液 400 mg,给药后 0.3、2、4 h 时采集前臂静脉血 3 ml,分离血浆,按“2.3”项下方法处理后进样测定,结果分别为 3.16、2.27、1.97 μg/ml。

3 讨论

目前血浆中莫西沙星浓度的测定方法主要有高效液相色谱

替考拉宁与阿米卡星在烧伤患者痂下组织液中的药动学研究

王旭宇*(长治医学院附属和平医院药剂科,山西 长治 046000)

中图分类号 R978.1;R969.1

文献标志码 A

文章编号 1001-0408(2014)42-3980-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.42.16

摘要 目的:考察替考拉宁和阿米卡星在早期严重烧伤患者痂下组织液(STF)中的药动学参数。方法:选取20名严重烧伤的患者为研究对象,在烧伤后24 h接受500 mg替考拉宁(10例)或400 mg阿米卡星(10例)静脉滴注,在滴注结束后1、2、4、8、24、48、96、144、192、240 h时收集STF样品;另取健康志愿受试者12例收集血清作对照组。用TDx免疫分析仪测定样品中抗生素浓度,并计算替考拉宁和阿米卡星药动学参数。结果:STF及血清中替考拉宁和阿米卡星药-时曲线均符合两室模型。替考拉宁在STF中的药动学参数为: $t_{1/2\alpha}$ (3.74±2.64)h、 $t_{1/2\beta}$ (92.18±11.73)h、 V_c (25.64±5.68)L、AUC(1 279.42±256.12) $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ 、CLs(0.404 8±0.078 8)L/h。阿米卡星在STF中的药动学参数为: $t_{1/2\alpha}$ (4.35±1.66)h、 $t_{1/2\beta}$ (80.04±9.52)h、 V_c (13.17±1.32)L、AUC(1 802.49±285.68) $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ 、CLs(0.227 2±0.038 3)L/h。结论:单剂量静脉滴注结束后24 h替考拉宁和阿米卡星在STF的浓度仍高于常见致病菌的最低抑菌浓度。提示在烧伤早期使用强效抗生素可在STF中获得有效而持久的抗菌浓度,有利于在创面基底和创周形成有效的抗生素屏障,防止烧伤创面感染性细菌侵入。

关键词 烧伤;痂下组织液;替考拉宁;阿米卡星

Pharmacokinetic Study of Amikacin and Teicoplanin in Sub-eschar Tissue Fluid of Burn Patients

WANG Xu-yu(Dept. of Pharmacy, The Affiliated Heping Hospital of Changzhi Medical College, Shanxi Changzhi 046000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To observe pharmacokinetic parameters of teicoplanin and amikacin in sub-eschar tissue fluid (STF) of the early stage of severe burn patients. METHODS: 20 patients with severe burn as subjects received 500 mg teicoplanin (10 cases) or 400 mg amikacin (10 cases) intravenously in 24 hours after injury; STF was collected at 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96, 144, 192 and 240 h after infusion as well as serum from 12 healthy volunteers. Antibiotic concentrations in samples were determined by using TDx immunoassay analyzer, and the pharmacokinetics parameters of teicoplanin and amikacin were calculated. RESULTS: The drug concentration-time curve for amikacin and teicoplanin in STF and blood were conformed to two-compartment model. The pharmacokinetic parameters of teicoplanin in STF were as follows: $t_{1/2\alpha}$ (3.74±2.64)h, $t_{1/2\beta}$ (92.18±11.73)h, V_c (25.64±5.68) L, AUC(1 279.42±256.12) $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, CLs(0.404 8±0.078 8)L/h. Those of amikacin in STF were: $t_{1/2\alpha}$ (4.35±1.66) h, $t_{1/2\beta}$ (80.04±9.52)h, V_c (13.17±1.32)L, AUC(1 802.49±285.68) $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, CLs(0.227 2±0.038 3) L/h. CONCLUSIONS: The concentrations of vancomycin and amikacin in STF are still higher than MIC of common pathogen 24 h after single dose intravenous dripping. The early use of potent antibiotics in the burn patients can obtain effective and lasting inhibitory concentrations and contribute to the formation of effective antibiotic barrier at wound base and around wound, so as to prevent bacterial invasion.

KEYWORDS Burn; Sub-eschar tissue fluid; Teicoplanin; Amikacin

荧光检测法^[3]、高效液相色谱紫外检测法^[4-7]和液-质联用法^[8]。与紫外检测相比,荧光检测法的应用范围较窄,对干扰非常敏感;液质联用法则成本高。故本试验采用了RP-HPLC法,选择氟康唑为内标。因为氟康唑的吸收波长为256 nm,莫西沙星吸收波长为296 nm,所以采用了分段改变波长的方法进行检测,二者的分离度符合要求,切换波长不影响检测。与文献^[2-6]相比,本试验的流动相简单,不含磷酸缓冲盐,莫西沙星出峰时间短,具有一定的优越性。

本试验选用乙醚-二氯甲烷作萃取剂,不用调酸碱度。与文献^[4-5]中使用的样本量相比,本试验所用血浆量更少,从0.5、1 ml减少到0.2 ml。文献^[5]中,健康志愿者单剂量口服400 mg莫西沙星后,血浆峰值浓度为(3.06±0.42) $\mu\text{g}/\text{ml}$,本试验的定量下限为0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$,能满足峰值浓度的1/20的要求,可应用于其药动学和生物等效性研究。

参考文献

[1] 孟静娟.新抗生素莫西沙星国内外研究应用最新进展[J].微生物学杂志,2007,27(5):98.

- [2] 张亚坤,张志清,吴瑕,等.盐酸莫西沙星片Beagle犬体内药代动力学[J].国外医药抗生素分册,2012,33(2):87.
- [3] 张钰宣,张波,付强.高效液相色谱法测定人血清和脑脊液中莫西沙星浓度[J].中国药理学杂志,2011,46(22):1 746.
- [4] 张吟,陈一农,陈文发.固相萃取-高效液相色谱法测定人血清中莫西沙星浓度[J].中国医院药学杂志,2007,27(4):481.
- [5] 徐玉红,李玉珍,李东,等.盐酸莫西沙星片的人体药动学研究[J].中国药房,2010,21(10):898.
- [6] 黄琳,余勤,梁茂植,等.RP-HPLC-UV法测定人血浆及痰液中的莫西沙星浓度[J].中国新药杂志,2009,18(15):1 419.
- [7] Sevgi TU. High-performance liquid chromatography assay for moxifloxacin: pharmacokinetics in human plasma[J]. J Pharm Biomed Anal,2007,43(1):320.
- [8] 陈漪,施家威,金米聪.液相色谱-离子阱质谱法测定人血清中莫西沙星浓度[J].中国临床药理学杂志,2009,18(6):345.

*主管药师。研究方向:临床药学。电话:0355-3021596

(收稿日期:2014-04-30 修回日期:2014-08-28)