

• 临床药学 •

高效液相色谱法测定人血浆中左氧氟沙星浓度

邓 鸣, 刘建芳, 于 洋, 侯艳宁 (白求恩国际和平医院临床药理室, 石家庄 050082)

摘要: 建立测定人血浆中左氧氟沙星浓度的高效液相色谱法, 并应用于人体药代动力学研究。血浆样品中加入内标洛美沙星后用乙腈沉淀蛋白, 上清液用氮气吹干。色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱, 流动相为 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾缓冲液 (含三乙胺 0.3%, 磷酸调至 pH 3.20) - 乙腈 (83:17), 流速为 1.0 ml·min⁻¹。紫外检测波长 294 nm。血浆中内源性物质对样品测定无干扰。本方法线性范围为 0.05~5 μg·ml⁻¹ ($r=0.9991$), 最低定量浓度为 0.05 μg·ml⁻¹, 提取回收率大于 85%, 方法回收率为 99.7%~103.3%, 日内、日间 RSD 均小于 4%。本法简便、准确, 适用于左氧氟沙星药代动力学的研究。

关键词: 左氧氟沙星; 高效液相色谱法; 药代动力学

中图分类号: R969.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777 (2006) 07-0439-04

Determination of Levofloxacin in Human Plasma by HPLC

Deng Ming, Liu Jianfang, Yu Yang and Hou Yanning (Department of Clinical Pharmacology, Bethune International Peace Hospital, Hebei Province, Shijiazhuang, 050082)

ABSTRACT A HPLC method was established for the determination of levofloxacin in human plasma and for human pharmacokinetics study. The internal standard lomefloxacin was added in the plasma sample, and protein was precipitated with acetonitrile. The supernatant was evaporated by nitrogen stream. A Diamonsil C₁₈ column was used with 0.01 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate solution (contained 0.3% triethylamine, pH was adjusted to 3.20 with phosphoric acid) and acetonitrile (83:17) as mobile phase. The flow rate was 1.0 ml·min⁻¹ and the UV detection wavelength was 294 nm. The endogenous substance in plasma did not interfere with the determination of the samples. The linear range was 0.05~5 μg·ml⁻¹ ($r=0.9991$), and the limit of quantitation was 0.05 μg·ml⁻¹. The extraction recovery was more than 85% and the method recovery was 99.7~103.3%. Both within-day RSD and between-day RSD were less than 4%. The method was simple and accurate. It was suitable for the pharmacokinetic study of levofloxacin.

KEY WORDS levofloxacin; HPLC; pharmacokinetic

左氧氟沙星 (levofloxacin) 为日本第一制药株式会社开发的第三代喹诺酮类药物, 为氧氟沙星的左旋体, 其体外抗菌活性约为氧氟沙星的两倍, 左氧氟沙星具有抗菌谱广, 抗菌作用强, 而毒副作用小的特点, 对大多数肠杆菌科细菌有较强的抗菌活性, 临床用于治疗敏感菌引起的中、重度呼吸系统、泌尿系统、消化系统和皮肤软组织感染等。文献报道测定血浆中左氧氟沙星浓度的方法有 HPLC 法和微生物法^[1-5]。HPLC 法快速、准确、灵敏度高, 本文在参考文献^[3,4]的基础上, 建立了测定血浆中左氧氟沙星浓度的反相高效液相色谱-紫外

法, 并将此法应用于健康志愿者口服盐酸左氧氟沙星片的药代动力学研究。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱系统: 包括 G1311A 四元泵, G1329A 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1314A 紫外检测器, A.08.03 化学工作站 (美国安捷伦公司); PHS-3C 型精密 pH 计 (上海精密科学仪器有限公司); BP211D 型十万分之一天平 (德国 Sartorius 公司); XW-80A 旋涡混合器 (上海精科实业有限公司); 80-2 型离心机 (姜堰市新康医疗器械有限公司)。

左氧氟沙星对照品 (中国药品生物制品检定所, 含量 97.2%); 谷氨酸洛美沙星 (内标, 河北省康平制药厂, 含量 98.8%); 盐酸左氧氟沙星片 (商品名: 昂利康, 浙江昂利康制药有限公司, 100mg/片, 批号 4T1G06)。

乙腈为色谱纯 (天津市康科德科技有限公司, 批号: 040928); 磷酸二氢钾 (天津石英钟厂霸州市化工分厂, 批号: 990506); 三乙胺、磷酸均为市售分析纯; 水为乐百氏纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

分析柱: Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5μm, 迪马公司); 保护柱: EXT-C₁₈ (4.6 mm × 12.5mm, 5μm, 安捷伦公司); 流动相: 0.01 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 (含三乙胺 0.3%, 用磷酸调至 pH 3.20) - 乙腈 (83:17), 流速: 1.0 ml · min⁻¹; 柱温: 30℃; 紫外检测波长: 294 nm; 进样量: 10 μl。

2.2 溶液制备

2.2.1 内标溶液

精密称取谷氨酸洛美沙星 20.00 mg, 置 100 ml 容量瓶中, 用水溶解并稀释至刻度, 配制成 200 μg · ml⁻¹ 的储备液。精密吸取 5 ml 置 100 ml 容量瓶, 加水稀释至刻度, 得 10 μg · ml⁻¹ 的内标溶液, 备用。

2.2.2 对照品溶液

精密称取左氧氟沙星对照品 51.42 mg, 置 50 ml 容量瓶中, 用水溶解并稀释至刻度, 配制成左氧氟沙星浓度为 1 mg · ml⁻¹ 的储备液。将该储备液用水稀释成 1、2、4、10、20、40、80、100 μg · ml⁻¹ 的系列溶液, 备用。

2.3 血浆样品处理

取血浆样品 0.4 ml, 加入 10 μg · ml⁻¹ 内标溶液 40 μl, 涡旋混匀, 加入乙腈 0.8 ml, 涡旋 1 min, 12000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 上清液在 60℃ 水浴中氮气吹干。残渣用流动相 100 μl 溶解, 涡旋 1 min, 4000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液进样 10 μl 分析。

2.4 方法专属性

取空白血浆 0.4 ml, 加水 60 μl, 自“加入乙腈 0.8 ml”始, 按“血浆样品处理”项下操作, 得色谱图 1-a; 取空白血浆 0.4 ml, 加入对照品溶液 20 μl, 按“血浆样品处理”项下操作, 得色谱图 1-b; 取健康受试者用药后的血浆样品 0.4

ml, 按“血浆样品处理”项下操作, 得色谱图 1-c。结果表明, 空白血浆中内源性物质不干扰左氧氟沙星的测定; 血浆中左氧氟沙星与内标物分离良好; 左氧氟沙星和内标的保留时间分别约为 4.5 min 和 5.6 min。

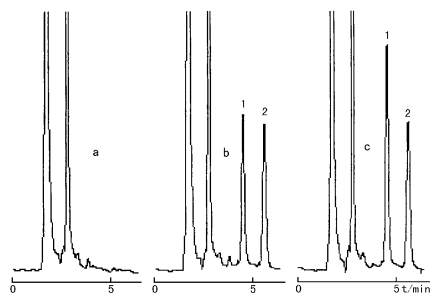


图 1 血浆 HPLC 色谱图

a 空白血浆; b 空白血浆加入左氧氟沙星内标
c 血浆样品加内标; 1 左氧氟沙星; 2 内标 (洛美沙星)

2.5 标准曲线制备

取空白血浆 0.4 ml, 加入左氧氟沙星对照品系列溶液 20 μl 和内标溶液 40 μl, 配制成左氧氟沙星浓度为 0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5 μg · ml⁻¹, 内标浓度均为 1 μg · ml⁻¹ 的含药血浆样品, 按“血浆样品处理”项下操作后进样分析, 以左氧氟沙星浓度 (C) 为横坐标, 左氧氟沙星与内标的峰面积比 (Y) 为纵坐标, 采用加权 (1/C²) 最小二乘法进行回归, 回归方程为: Y = 1.714C + 0.004250, r = 0.9991。结果表明, 血浆中左氧氟沙星浓度在 0.05~5 μg · ml⁻¹ 范围内线性良好。血浆中左氧氟沙星的最低定量浓度为 0.05 μg · ml⁻¹。

2.6 提取回收率

配制低、中、高 3 个浓度 (分别为 0.1、0.5、4 μg · ml⁻¹) 的血浆样品各 6 份, 按“2.3”项下方法处理后进样测定, 记录左氧氟沙星的峰面积 A_s; 另取上述 3 个浓度的左氧氟沙星对照品溶液各 20 μl, 分置 3 个试管中, 60℃ 下氮气吹干, 用流动相 100 μl 溶解, 进样测定, 记录左氧氟沙星的面积 A_{sd}; 求算血浆中左氧氟沙星的提取回收率 (R = A_s/A_{sd} × 100%), 结果见表 1。3 个浓度血浆样品中左氧氟沙星的平均提取回收率为 88.3%。

表 1 血浆样品中左氧氟沙星的提取回收率 (n = 6)

加入量 (μg · ml ⁻¹)	提取回收率 (%)	RSD (%)
0.1	89.0 ± 3.3	3.7
0.5	90.5 ± 3.6	4.1
4.0	85.4 ± 1.8	2.1

2.7 精密度与方法回收率

配制低、中、高 3 个浓度 (分别为 0.1、0.5、4 μg · ml⁻¹) 的血浆样品, 按“2.3”项处理后进样, 每个浓度 6 份, 重复 4 d 测定, 并与标准曲线同时进行, 计算测得浓度, 与理论浓度对照, 采用单因素方差分析法求得本法的精密度^[6], 用 RSD 表示。方法回收率用测定浓度的平均值与理论浓度比值的百分数表示, 结果见表 2, 日内 RSD < 2.7%, 日间 RSD < 3.5%, 方法回收率为 99.7% ~ 103.3%, 满足生物样品分析方法的要求。

表 2 精密度和方法回收率

加入量 (μg · ml ⁻¹)	测得量 (μg · ml ⁻¹)	日内 RSD (%)	日间 RSD (%)	方法回收率 (%)
0.1	0.100 ± 0.002	2.3	2.1	99.7 ± 2.2
0.5	0.499 ± 0.014	2.6	3.4	99.9 ± 2.7
4.0	4.131 ± 0.080	2.0	1.2	103.3 ± 2.0

2.8 稳定性试验

配制低、中、高 3 个浓度 (分别为 0.1、0.5、4 μg · ml⁻¹) 的血浆样品, 每个浓度 2 份, 分别考察其在室温、冻融循环、-20℃保存以及处理后在室温条件下的稳定性, 以当日随行标准曲线计算血浆样品中左氧氟沙星的浓度, 将测定浓度的平均值与理论浓度对照, 结果相对偏差 RE < ±5.0%, 表明血浆样品在室温放置 24 h、冻融 3 次、-20℃保存 3 周以及处理后在室温放置 24 h 的条件下都是稳定的。

2.9 药动学研究

2.9.1 受试对象

24 名健康男性志愿者, 年龄 (21 ± 1) 岁, 体重 (64 ± 5) kg; 试验前进行病史询问和体格检查, 心电图、胸透、肝功、肾功、血常规、尿常规检查等均正常。受试者试验前两周及试验期间未服用其它任何药物, 试验期间禁烟酒及含咖啡因的饮料。受试者了解试验目的、方法、意义以及可能发生的不良反应后, 签署知情同意书。试验方案经白求恩国际和平医院伦理委员会批准。

2.9.2 给药方案及血样采集

24 名男性健康受试者于试验前 12 h 吃清淡晚餐后禁食, 试验当日清晨 8 时空腹口服盐酸左氧氟沙星片 200 mg, 用 200 ml 温开水送服。服药 2 h 后统一饮水, 4 h、10 h 后统一进餐。于服药前及服药后 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、4、6、8、12、24 h 分别从上肢肘静脉取血 3 ml, 置肝素抗凝管中放置 1 h, 3000 r · min⁻¹ 离心 10 min 分离血

浆, 置 -20℃ 下冻存备用。

2.10 数据处理

用本法测定受试者服药后血浆中左氧氟沙星的浓度, 24 名健康受试者口服单剂量盐酸左氧氟沙星片 200 mg 后的平均血药浓度-时间曲线见图 2。T_{max}、C_{max} 取实测值; 以消除相 lnC-t 直线回归斜率 λ 计算 T_{1/2}, T_{1/2} = 0.693/λ; 以梯形法计算 AUC_{0-t}, AUC_{t-∞} = C_t/λ, AUC_{0-∞} = AUC_{0-t} + AUC_{t-∞}。24 名健康受试者的药代动力学参数计算结果见表 3。

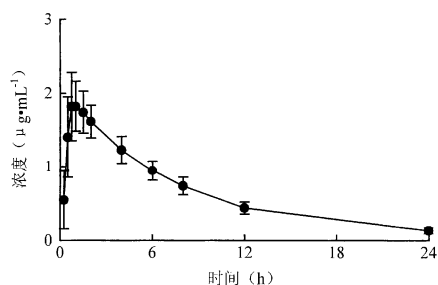


图 2 24 名健康志愿者口服单剂量盐酸左氧氟沙星片 200mg 后的平均血药浓度-时间曲线

表 3 24 名健康受试者口服单剂量盐酸左氧氟沙星片 200 mg 后的药动学参数

参数	结果
C _{max} (μg · ml ⁻¹)	2.05 ± 0.37
T _{max} (h)	1.07 ± 0.42
T _{1/2} (h)	6.40 ± 0.66
AUC _{0-24h} (μg · h · ml ⁻¹)	15.37 ± 2.20
AUC _{0-∞} (μg · h · ml ⁻¹)	16.63 ± 2.59

3 讨论

本文建立了测定人血浆中左氧氟沙星的高效液相色谱法, 实验表明, 此法的回收率及日内、日间的精密度结果均符合生物样品分析的要求, 为左氧氟沙星的药代动力学研究提供了可靠的方法。

由于左氧氟沙星的水溶性比其它喹诺酮类药物高 10 倍以上, 故无法用常规的有机溶剂提取法提取血浆药物, 本实验采用乙腈沉淀血浆蛋白, 并进行吹干浓缩, 提高了灵敏度, 且干扰少, 内标提取回收率高, 完全满足左氧氟沙星的药代动力学研究。

文献报道流动相多采用磷酸-乙腈或磷酸盐-甲醇, 加入离子对试剂。本实验在磷酸盐-乙腈系统中加入三乙胺, 可使峰拖尾现象明显改善; 且试剂均成本较低, 简单易得。缓冲盐浓度、缓冲盐与有机溶剂的比例和 pH 值对保留时间和分离度有影响, 随着缓冲盐浓度、比例或 pH 值增高, 保留时

临床常用药物引起的幻觉

刘瑞琴, 杨继章, 杨树民 (河北医科大学第一医院, 石家庄 050031)

中图分类号: R994.11 文献标识码: B 文章编号: 1002-7777(2006)07-0442-04

幻觉是一种虚幻的知觉^[1], 是在没有现实刺激作用于感觉器官时出现的知觉体验, 可表现为幻视、幻听、幻嗅、幻味、幻触等。某些临床常用药物在使用过程中或突然停药后也可引起幻觉, 本文查阅了1994年1月~2005年6月国内文献报道的药物引起幻觉的文章作一综述, 为临床合理用药提供参考。

1 致幻药物

1.1 抗微生物药

1.1.1 抗生素类

阿莫西林: 张庆霞^[2]报道1例静脉滴注阿莫西林病例。患者女, 17岁, 因感冒、上呼吸道感染就诊。平素体健, 无药物过敏史, 青霉素皮试(-)。给予阿莫西林钠2.0g加入生理盐水250ml, 静脉滴注, qd。连续用药3d患者产生幻视、抑郁。自行停药2d后恢复正常。续用同批号药物, 症状再现。改用盐酸林可霉素注射液1.2g加入生理盐水250ml静脉滴注, 日1次, 未再出现上述症状。

头孢氨苄: 沙士义等^[3]报道1例, 女, 9岁, 因扁桃体肿大, 服用头孢氨苄缓释片, 0.5g, bid, 用药当夜患儿出现幻视, 停药后症状消失。2月后

又因上呼吸道感染再次服用该药, 剂量同前, 当夜再次出现幻视, 停药后症状消失。

头孢克洛(希刻劳): 周丽娟^[4]报道1例, 男, 2岁8个月, 因急性中耳炎对症治疗, 服用希刻劳混悬剂, 第2次用药3h后患儿出现幻觉, 持续4h。9h后第3次服用, 0.5h后幻觉复现。经胞二磷胆碱、青霉素钠盐、能量合剂输液, 同时停用希刻劳, 2d后症状基本消失。

头孢曲松钠: 刘德林^[5]报道1例, 男, 96岁, 因肺部感染入院, 根据药敏实验结果选用头孢曲松钠注射液4.0g加5%葡萄糖生理盐水200ml稀释后静脉滴注。1h滴完, 患者出现情感激动、幻视, 经检查排除老年性神经精神病, 未予特殊处理, 6h后症状消失。次日用药后精神症状再现。停药换氧哌嗪青霉素治疗, 无不良反应。

庆大霉素: 赵明玉^[6]报道1例, 男, 64岁, 因急性肠炎口服黄连素0.2g, bid, 静滴5%葡萄糖盐水1000ml加庆大霉素24万U治疗。第2天输液将结束时, 患者出现幻视。注射地西洋10mg入睡, 醒后少有片断记忆。第3天继续输入上述液体, 症状复现, 即刻停止输液。

间延长, 通过考察流动相组分及pH值对测定结果的影响, 结果发现, 磷酸二氢钾溶液浓度为0.01 mol·L⁻¹、比例为83%, pH 3.20时可得最佳峰形, 且内标与左氧氟沙星分离度好。

药动学结果表明, 左氧氟沙星口服吸收、分布迅速, 消除较慢。本试验所得的主要药代动力学参数与国外文献报道基本一致^[7,8]。

参考文献:

[1] Coguic AL, Dault RB, Rinotti RF, et al Determination of ofloxacin in plasma and urine by liquid chromatography [J]. J Chromatogr, 1988, 434 (1): 320

[2] 李昌军, 杨昆, 董伟林. HPLC 荧光法测定血液中左氧氟沙星浓度 [J]. 中国药学杂志, 2002, 37 (8): 633

[3] 张莉, 李家泰, 赵彩云, 等. 国产左氧氟沙星片剂健康人体

生物等效性研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2001, 17 (3): 199

[4] 陈勇川, 董慧, 代青, 等. 反相高效液相色谱法测定生物样品中左氧氟沙星的含量 [J]. 中国抗生素杂志, 1998, 23 (5): 342

[5] 乔海灵, 张莉蓉, 郭玉忠, 等. 3种左氧氟沙星的药动学和相对生物利用度研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2000, 20 (7): 396

[6] Causon R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis [J]. J Chromatogr B, 1997, 689: 175

[7] Nakashima M, Uematsu T, Kanamaru M, et al Phase I study of levofloxacin (S) - (-) - ofloxacin [J]. Jpn J Clin Pharmacol Ther, 1992, 23 (3): 515

[8] Shu - Chean Chien, Mark C Rogge, Lee G. Gisclon, et al. Pharmacokinetic profile of levofloxacin following once-daily 500 mg oral or intravenous doses [J]. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 1997, 11: P2256