

高效液相色谱法测定人血浆和脑脊液中左氟沙星浓度及药代动力学研究

罗顺德 雷嘉川* 张如鸿 蔡鸿生 李荣凌

(湖北医科大学附属医院临床药理研究室, 武汉 430060)

摘要 目的旨在测定左氟沙星药代动力学。用 RP-HPLC 法, 以环丙沙星为内标, 反相 C₁₈ 为分析柱, 10 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钾—10 mmol·L⁻¹ 溴化四丁铵—乙腈(45:45:10) 为流动相, 磷酸调至 pH 3.0, 检测波长 295 nm, 测定血浆和脑脊液中左氟沙星浓度, 平均回收率分别为 74.76% 和 82.43%, 日内日间误差小于 5%, 最低检测浓度血浆 10 μg·L⁻¹, 脑脊液 6 μg·L⁻¹。10 名开颅手术病人单次口服左氟沙星片 300 mg 的血液和脑脊液药代动力学特征均符合开放性一室模型。

关键词 高效液相色谱法; 左氟沙星; 药代动力学

左氟沙星(levofloxacin)为氟喹诺酮类抗菌药, 是氧氟沙星的 S-(-) 光学异构体, 体外抗菌活性是氧氟沙星的两倍, 有抗菌谱广、抗菌活性强并具有良好的体液和组织分布性^[1]。国外对左氟沙星在体液中药代动力学研究较多^[2,3], 但对左氟沙星在脑脊液中的药代动力学研究极少, 国内尚无。由于左氟沙星在化学结构上有亲水性的噁嗪环和有适度脂溶性的 N-甲基哌嗪, 故在脑膜发炎时, 左氟沙星可透过血脑屏障, 使脑脊液中左氟沙星浓度升高^[4,5]。本文建立了反相高效液相色谱法测定人血浆及脑脊液中左氟沙星的浓度, 并在 10 名开颅手术病人中进行了血液和脑脊液中的药代动力学研究。

材料与方 法

仪器与试剂 岛津 LC-9A 高效液相色谱仪, SPD-6AV 紫外检测器, SCL-6B 控制器, C-R4A 色谱数据处理机, NovaPak C₁₈ 色谱柱(150 mm×3.9 mm, 4 μm)。左氟沙星标准品(含量

100.1%), 左氟沙星片(100 mg/片), 均由日本第一制药株式会社提供; 环丙沙星(内标), 由湖北省药检所提供; 乙腈为色谱纯, 其它试剂均为分析纯。

色谱条件 流动相为 10 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钾—10 mmol·L⁻¹ 溴化四丁铵—乙腈(45:45:10), 磷酸调至 pH 3.0, 用前超声脱气 15 min, 流速 1.0 ml·min⁻¹, 检测波长 295 nm, 灵敏度 0.01AUFS, 柱温 30℃。

给药方法及样品采集 行开颅手术病人 10 例, 其中男性 7 例, 女性 3 例, 年龄 29~63 岁, 体重 52~69 kg, 肝肾功能正常, 治疗期间未用喹诺酮类抗菌剂。

受试者于服药前 1 d 禁食 12 h 后, 清晨 1 次口服左氟沙星片 300 mg, 服药后 2 h 进统一食谱的标准餐, 于服药后不同时间各取肘静脉血 2 ml, 离心 10 min, 取血浆置于 -20℃ 保存至测定, 另于服药后不同时间各取脑脊液 1 ml, 置于 -20℃ 保存至测定。

血浆, 脑脊液样品处理 取待测血浆(或脑脊液) 200 μl, 置 10 ml 离心管中, 依次加入内标溶液 50 μl(0.8 μg), 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 7.0) 1.0 ml, 二氯甲烷 5.0 ml, 充分振

荡混匀, 3000 r·min⁻¹离心 10 min, 弃去水层, 取二氯甲烷层 4.0 ml 置 5 ml 离心管中, 室温下氮气吹干, 残留物用 100 μl 流动相溶解, 取 20 μl 进样。

数据处理 10 名受试者口服左氟沙星后的血药浓度-时间数据, 脑脊液药物浓度-时

间数据, 分别用 3P87 药代动力学程序在计算机上进行自动模型判别, 求得药代动力学参数。

结 果

1 色谱行为

在上述色谱条件下, 色谱图见图 1。

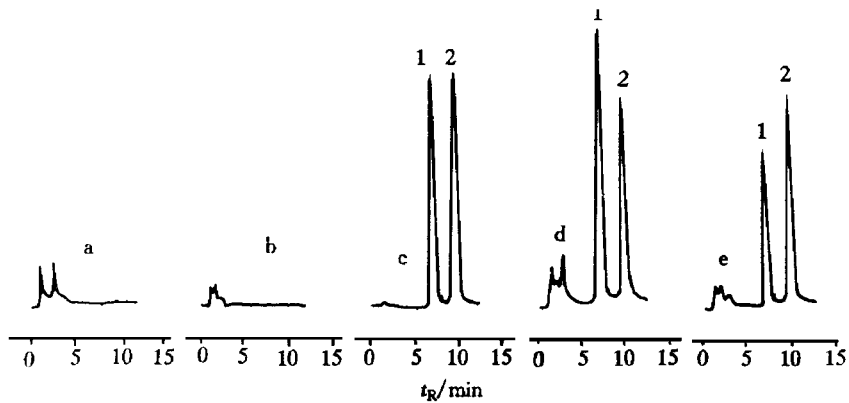


Fig 1 Representative chromatograms of blank plasma (a), blank cerebrospinal fluid (CSF) (b), standard sample (c), a plasma sample (d) and a CSF sample (e) 6 h after oral administration of 300 mg levofloxacin to patient. 1. Levofloxacin; 2. Internal standard (ciprofloxacin).

在此条件下, 左氟沙星峰与空白血浆(或空白脑脊液)中的杂质峰及内标峰达到良好分离, 左氟沙星和内标的保留时间分别为 6.52 min 和 9.17 min。

2 左氟沙星的血浆和脑脊液标准曲线

在空白血浆(或空白脑脊液)200 μl 中加入不同量左氟沙星工作液配成系列标准液(0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0 mg·L⁻¹), 分别加入内标液 50 μl(0.8 μg), 经预处理及色谱分离, 计算样品峰与内标峰面积之比(Y), 以 Y 为纵坐标, 样品浓度 C(mg·L⁻¹)为横坐标进行回归, 得标准曲线分别为血浆 Y = 0.004624 + 0.9273C(γ = 0.9999), 脑脊液 Y = 0.02093 + 0.8934C(γ = 0.9993)。最低检测浓度血浆为 10 μg·L⁻¹, 脑脊液为 6 μg·L⁻¹(S/N ≥ 3)。

3 回收率和精密度测定

在空白血浆(或空白脑脊液)200 μl 中加入不同量左氟沙星工作液, 配成 3 种不同浓度的溶液, 按前法提取进样, 用其峰面积与相应浓度的左氟沙星工作液直接进样得到的峰面积之比求算回收率, 其血浆平均回收率为 74.76%, 脑

脊液平均回收率为 82.43%, 结果见表 1。

Tab 1 Recovery of levofloxacin (n = 5, $\bar{x} \pm s$)

	Concentration /mg·L ⁻¹	Recovery /%	RSD /%
Plasma	0.2	74.20 ± 2.65	3.57
	1.0	74.34 ± 2.10	2.82
	3.0	75.73 ± 2.07	2.73
Cerebrospinal fluid (CSF)	0.2	81.44 ± 1.91	2.34
	1.0	82.50 ± 1.78	2.16
	3.0	83.35 ± 1.73	2.08

测定方法同回收率试验, 每天测同浓度平行 5 次, 连续测 5 d, 计算日内及日间误差, 结果见表 2。

Tab 2 Results of precision (n = 5)

	Concentration /mg·L ⁻¹	RSD / %	
		Within day	Between day
Plasma	0.2	3.25	3.47
	1.0	2.64	2.56
	3.0	2.48	2.60
CSF	0.2	2.27	2.48
	1.0	1.94	2.11
	3.0	2.07	2.16

4 药代动力学研究结果

将 10 名受试者口服左氟沙星后的血药浓度-时间数据和脑脊液浓度-时间数据分别用 3P87 药代动力学程序在计算机上进行自动模型判别,以实测值与理论值的相关性及 AIC 最小为判别标准,结果显示在血液和脑脊液中均符合一房室口服模型,见图 2,其药代动力学参数见表 3。

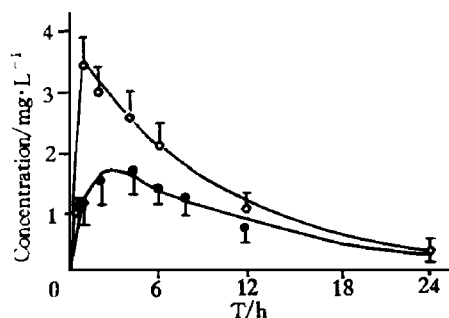


Fig 2 Mean concentration - time curves of levofloxacin in plasma ($\circ - \circ$) and CSF ($\bullet - \bullet$) after oral administration of 300 mg levofloxacin to 10 patients.

Tab 3 Mean pharmacokinetic parameters in plasma and CSF after oral administration of 300 mg levofloxacin to 10 patients

Parameter	Value	
	Plasma	CSF
$Ke(h^{-1})$	0.12 ± 0.04	0.11 ± 0.04
$T_{1/2}(h)$	6.05 ± 1.68	6.95 ± 1.88
$T_{max}(h)$	1.05 ± 0.29	3.56 ± 1.24
$C_{max}(mg \cdot L^{-1})$	3.67 ± 0.42	1.68 ± 0.25
$AUC(mg \cdot h \cdot L^{-1})$	33.43 ± 7.32	23.70 ± 5.62
$CL_s(L \cdot h^{-1})$	9.46 ± 2.53	13.70 ± 5.11
$V_d(L)$	77.49 ± 7.39	126.61 ± 13.20

讨 论

左氟沙星有较强的荧光性质,国外一般用 HPLC-荧光检测法^[2,6],本实验试用了紫外检测器,由于样品处理过程中用了萃取、吹干浓缩步骤,所以仍能达到较高的灵敏度,最低检测浓度血浆为 $10 \mu g \cdot L^{-1}$,脑脊液为 $6 \mu g \cdot L^{-1}$ 。样品处理过程中,血浆 pH 及提取溶剂的种类对

提取回收率均有很大影响,调节血浆 pH 7 提取率最高,比较了二氯甲烷、氯仿、醋酸乙酯、正己烷等溶剂后,发现二氯甲烷回收率最高,且溶剂容易挥干。

根据对 10 例病人药时数据进行线性拟合的结果,左氟沙星在血液及脑脊液内的配置均符合开放性一室模型。血液中药代动力学结果与健康人非常相似^[7]口服给药后左氟沙星的血浆浓度迅速升高, T_{max} 为 1.05 ± 0.29 h,本研究中 V_d 为 77.49 ± 7.39 L 较健康人 V_d 53.48 ± 13.40 L 高,提示左氟沙星在开颅手术病人体内有更广泛的分布,有更多的药物透过血脑屏障进入脑脊液和脑组织。脑脊液药理学研究结果表明:左氟沙星自血液进入脑脊液再消除的过程符合一级动力学消除过程,达峰时间为 3.56 ± 1.24 h,消除半衰期为 6.95 ± 1.88 h,脑脊液 AUC_{0-24h} 为血液 AUC_{0-24h} 的 70.89%,脑脊液最高浓度为 1.68 ± 0.25 $mg \cdot L^{-1}$,24 h 脑脊液中药物浓度仍为 0.35 ± 0.11 $mg \cdot L^{-1}$,该值超过引起中枢神经系统创伤或手术后感染大部分病原菌 MIC_{90} 值^[1,5],这对治疗中枢神经系统感染具有重要的临床意义。

参 考 文 献

- 1 单爱莲,吕媛,李家泰.左旋氧氟沙星和氧氟沙星的临床应用进展评价.中国临床药理学杂志,1997,13:115
- 2 Hiroaki H, Katsuhiko N. A study on the concentrations of levofloxacin in the gallbladder tissue and bile of patients. *Jpn J Antibiot*, 1992,45:253
- 3 Atsushi S. Levofloxacin. *Jpn J Antibiot*, 1994,47:309
- 4 田治明.新喹诺酮的药代动力学性质.国外医药抗生素分册,1995,16:60
- 5 唐建国.氟喹诺酮药物左氟沙星.国外医药抗生素分册,1996,17:380
- 6 Diane S, Happy A, Andrew T, et al. Pharmacokinetics and safety of levofloxacin in patients with human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994,38:799
- 7 孙春华,李可欣,曹国颖,等.健康受试者口服 Levofloxacin 的药动力学研究.中国药房,1995,6:23

DETERMINATION OF LEVOFLOXACIN IN PLASMA AND CEREBROSPINAL FLUID WITH HPLC AND ITS PHARMACOKINETICS IN PATIENTS UNDERGOING NEUROSURGICAL OPERATIONS

Luo Shunde(Luo SD), Lei Jiachuan(Lei JC), Zhang Ruhong(Zhang RH),
Cai Hongsheng(Cai HS) and Li Rongling(Li RL)

(*Clinical Pharmacology Laboratory, 1st Affiliated Hospital,
Hubei Medical University, Wuhan 430060*)

ABSTRACT A RP-HPLC method was developed to determine the concentrations of levofloxacin in plasma and cerebrospinal fluid and its pharmacokinetics were studied in patients undergoing neurosurgical operations. $C_{18}H_{37}$ column was eluted with the mobile phase consisting of $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4 - 10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} (\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{Br} - \text{CH}_3\text{CN}(45:45:10, \text{pH } 3.0)$ and the ultraviolet absorbance was monitored at 295 nm. Ciprofloxacin was used as internal standard. The mean recoveries were 74.76% in plasma and 82.43% in cerebrospinal fluid, with the lowest detectable limits of $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The RSD for the intra-day and inter-day were all less than 5%.

A single oral administration of 300 mg levofloxacin tablet was given to 10 patients undergoing neurosurgical operations. The pharmacokinetic parameters in blood and in cerebrospinal fluid could be described by one compartment open model. The pharmacokinetic parameters were: blood $K_e 0.12 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$, $T_{1/2} 6.05 \pm 1.68 \text{ h}$, $T_{\max} 1.05 \pm 0.29 \text{ h}$, $C_{\max} 3.67 \pm 0.42 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{AUC } 33.43 \pm 7.32 \text{ mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$, $CL_s 9.46 \pm 2.53 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, $V_d 77.49 \pm 7.39 \text{ L}$; cerebrospinal fluid $K_e 0.11 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$, $T_{1/2} 6.95 \pm 1.88 \text{ h}$, $T_{\max} 3.56 \pm 1.24 \text{ h}$, $C_{\max} 1.68 \pm 0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{AUC } 23.70 \pm 5.62 \text{ mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$, $CL_s 13.70 \pm 5.11 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, $V_d 126.61 \pm 13.20 \text{ L}$.

KEY WORDS RP-HPLC; Levofloxacin; Pharmacokinetics