

HPLC 检测大鼠血浆中莫西沙星浓度及其药动学研究

朱加银^a, 阚歆^b, 楼旦^c, 董洁^b, 胡国新^{b*} (温州医学院, a.实验动物中心; b.药学院; c.附属第二医院, 浙江 温州 325035)

摘要: 目的 建立 HPLC 测定大鼠血浆中的莫西沙星浓度的方法, 并进行体内药动学研究。方法 血浆样品采用二氯甲烷-液萃取法提取。色谱柱为 ZORBAX Edipse XDB-C₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为水-0.1%三氟乙酸-乙腈(40:35:25), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 296 nm, 柱温 30 ℃。结果 莫西沙星浓度在 0.05~10.00 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好($r=0.999\ 6$); 最低定量限为 0.05 μg·mL⁻¹; 低、中、高浓度的方法回收率为 99.3%~106.0%, 提取回收率为 88.1%~94.1%; 日内、日间精密度的 RSD 均<10%。在大鼠体内药动学过程符合二室模型。结论 方法简便、经济、准确, 可满足临床药动学研究的要求。

关键词: 莫西沙星; 高效液相色谱法; 血浆

中图分类号: R945.1; R917.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)08-0759-04

Determination of Moxifloxacin in Rat Plasma by HPLC and Its Application in Pharmacokinetic Study

ZHU Jiayin^a, KAN Xin^b, LOU Dan^c, DONG Jie^b, HU Guoxin^{b*} (Wenzhou Medical College, a.Laboratory Animal Center; b.School of Pharmacy; c.the Second Affiliated Hospital, Wenzhou 325035, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for the determination of moxifloxacin in rat plasma, and validated for pharmacokinetic study. **METHODS** The moxifloxacin was extracted from plasma by dichloromethane. Chromatographic separation was carried out on ZORBAX Edipse XDB-C₈ column(150 mm×4.6 mm, 5 μm) with water-0.1% trifluoroacetic acid-acetonitrile(40:35:25) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 296 nm and the column temperature was 30 ℃. **RESULTS** The linear range was 0.05–10.00 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 6$). The lowest detectable limit was 0.05 μg·mL⁻¹. The recovery of the method was 99.3%–106.0%, and the extraction recovery was 88.1%–94.1%. RSDs of inter- and intra-day precisions were both less than 10%. The profile of moxifloxacin *in vivo* fitted a two-compartment model. **CONCLUSION** The method is simple, economic and accurate, which could be used for the pharmacokinetic study of moxifloxacin.

KEY WORDS: moxifloxacin; HPLC; plasma

莫西沙星(moxifloxacin)系新型长效广谱抗菌药, 它在保持传统喹诺酮类药物的良好抗革兰阴性菌活性的基础上, 抗革兰阳性菌的活性得到增强, 对社区获得性呼吸道病原体均具有活性, 包括常见的肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌和较少见的金葡球菌与肺炎克雷伯杆菌以及呼吸道的非典型病原体如支原体、衣原体与军团菌, 临床地位较为重要^[1]。该药血药浓度的测定方法国内外已有报道^[2-10]。徐玉红等^[5-6]建立了HPLC测定人血浆中莫西沙星浓度的方法, 但保留时间为 7.6 min; 本试验建立的HPLC测定大鼠血浆中莫西沙星浓度的方法, 保留时间只有 3.6 min, 具有测定速度快、操作简便、试剂价廉等优点, 适用于莫西沙星的药动学研究。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100系列高效液相色谱仪(含G1315B二极管阵列检测器, 美国Agilent公司); AB204-A电子分析天平[梅特勒-托利多(上海)仪器公司]; XK96-B涡旋混合器(姜堰市新康医疗器械有限公司); D10型氮吹仪(杭州蓝焰科技有限公司); Milli-Q plus超纯水器(美国Millipore公司); TGL-16G高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试剂与药品

盐酸莫西沙星片(德国拜耳公司, 规格: 400 mg·片⁻¹, 批号: H20050166); 莫西沙星对照品(德国拜耳公司, 批号: C064Z211, 含量: 96%); 吡嗪酮对照品(上海睿星基因技术有限公司, 批号: 20080413, 含量>99%); 甲醇、乙腈、二氯甲烷(色谱纯, 天津市四友精细化学品有限公司); 三氟乙酸(色谱纯, 美国天地试剂公司); 水为超纯水。

1.3 实验动物

作者简介: 朱加银, 男, 实验师 Tel: (0577)86689908
E-mail: wzhhgx@yahoo.com.cn

E-mail: zjiayin@163.com

*通信作者: 胡国新, 男, 教授 Tel: (0577)86699574

SD大鼠, ♂, 由温州医学院实验动物中心提供, 许可证编号: SCXK(浙)2005-0019。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB-C₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温: 30 ℃; 流动相: 水-0.1% 三氟乙酸-乙腈(40:35:25); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 296 nm; 进样量: 20 μL。

2.2 溶液配制

莫西沙星对照品溶液: 精密称取莫西沙星对照品10.00 mg, 置于10 mL量瓶中, 用水溶解并定容, 混匀, 备用。内标溶液: 精密称取吡啡尼酮对照品10.00 mg, 置于10 mL量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 混匀, 备用。莫西沙星灌胃溶液: 取莫西沙星片剂10片, 置研钵中研细, 转移至100 mL量瓶中, 用水溶解并定容, 混匀, 滤过; 精密量取续滤液10 mL, 置于50 mL量瓶中, 用水溶解并定容, 混匀, 备用。

2.3 样品处理

取血浆200 μL, 加入吡啡尼酮(50 μg·mL⁻¹) 20 μL, 混匀后加入0.5%三氟乙酸溶液20 μL, 再加入二氯甲烷2.0 mL漩涡混匀1 min, 4 000 r·min⁻¹离心10 min, 转移下层有机相1.8 mL于50 ℃水浴条件下氮气流吹干, 用100 μL流动相复溶, 取上清液20 μL进样检测。

2.4 血浆样品的采集

9只健康SD大鼠, ♂, 禁食12 h, 不禁水, 按40 mg·kg⁻¹剂量灌胃给药莫西沙星, 分别于给药前和给药后0.083 3, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 3, 6, 12和24 h取大鼠尾静脉血0.5 mL, 置于肝素化试管中, 4 000 r·min⁻¹离心10 min后分离血浆, -40 ℃保存待测。

2.5 专属性试验

在试验条件下, 莫西沙星与内标吡啡尼酮能完全分离, 没有明显的内生杂质峰干扰, 莫西沙星与内标的保留时间分别为3.6 min与6.3 min。色谱图见图1。

2.6 标准曲线的绘制

空白血浆中加入莫西沙星对照品溶液适量, 再依次用空白血浆稀释成0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0和10.0 μg·mL⁻¹系列的浓度, 按“2.3”项下方法操作, 以莫西沙星与吡啡尼酮的峰面积之比为纵坐标Y, 以对应的浓度为横坐标X, 绘制

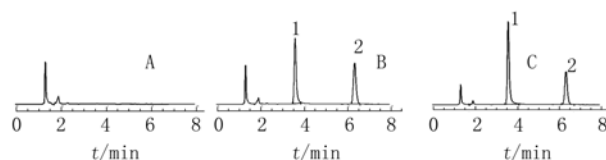


图1 盐酸莫西沙星的高效液相色谱图

A-空白血浆; B-空白血浆加莫西沙星及内标; C-样本+内标; 1-莫西沙星; 2-内标

Fig 1 HPLC chromatograms of moxifloxacin hydrochloride A-blank plasma; B-blank plasma spiked with moxifloxacin and internal standard (IS); C-sample+IS; 1-moxifloxacin; 2-IS

标准曲线。经最小二乘法线性回归, 得回归方程为 $Y=0.7278X-0.03(r=0.999\ 6)$, 线性范围: 0.05~10.0 μg·mL⁻¹, 本试验最低定量浓度为0.05 μg·mL⁻¹ (RSD=9.35%, $n=5$)。

2.7 精密度和回收率试验

取空白血浆, 加入莫西沙星, 配成莫西沙星浓度为0.1, 0.5和5.0 μg·mL⁻¹的低、中、高浓度的质控样品, 各5份, 按“2.3”项下方法处理后进样, 与对应浓度的标准样品进样所得峰面积相比, 计算提取回收率; 以血浆样品标准曲线测得量与莫西沙星加入量之比求算方法回收率。结果见表1。同上配制莫西沙星浓度为0.1, 0.5和5.0 μg·mL⁻¹的质控样品各5份, 按“2.3”项下方法处理后进样, 一日内测定5次, 连续测定5 d, 日内、日间RSD结果见表1。

表1 精密度和回收率试验结果($n=5$)

Tab 1 Test results of precision and recovery($n=5$)

浓度/ μg·mL ⁻¹	精密度(RSD/%)		回收率/%	
	日内	日间	提取回收率	方法回收率
0.1	5.76	6.02	88.1±6.08	106.0±5.56
0.5	4.82	4.34	90.6±4.44	99.3±5.20
5.0	4.06	3.23	94.1±3.96	101.4±4.82

2.8 稳定性考察

考察莫西沙星血浆样品(浓度分别为0.1, 0.5和5.0 μg·mL⁻¹)室温(25 ℃)放置6 h、预处理后室温放置24 h、冻融3次和-40 ℃冻存30 d的稳定性, 结果莫西沙星浓度无明显变化, RSD均<10%($n=5$)。

2.9 血样测定

按“2.4”项下方法采集血样, 测定了9只SD大鼠灌胃给药莫西沙星后各个时间点的血药浓度, 并绘制平均药-时曲线, 见图2。经DAS 2.0药动学程序进行拟合分析, SD大鼠灌胃给药莫西沙星后的体内药动学过程符合二室模型, 结果见表2。

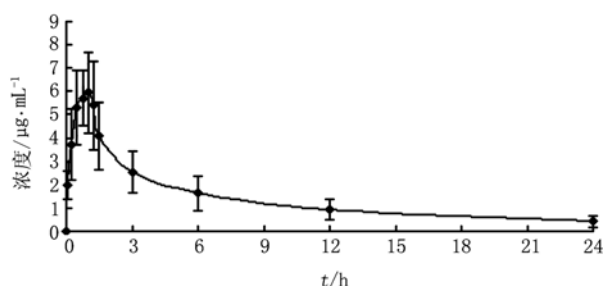


图2 莫西沙星平均血浆药物浓度-时间曲线

Fig 2 Concentration-time curve of moxifloxacin

表2 莫西沙星的主要药动学参数(n=9)

Tab 2 Main pharmacokinetic parameters of moxifloxacin (n=9)

参数	$\bar{x} \pm s$
$T_{1/2}/h$	8.957 ± 5.696
T_{max}/h	0.944 ± 0.243
$C_{max}/\mu g \cdot mL^{-1}$	6.965 ± 1.052
$AUC_{0-t}/\mu g \cdot h \cdot mL^{-1}$	34.350 ± 9.590
$AUC_{0-\infty}/\mu g \cdot h \cdot mL^{-1}$	41.241 ± 12.220

3 讨论

3.1 流动相的选择

通过调整流动相构成成分,包括水、三氟乙酸、乙腈、甲醇与磷酸二氢钾,及其体积比,考察寻找合适的流动相。结果表明流动相使用较低pH值的三氟乙酸溶液和乙腈时,能够获得理想的色谱峰;而流动相使用其他成分时,峰形很差,出现双峰、拖尾峰,甚至保留时间也不稳定。最终确定流动相为水-0.1%三氟乙酸-乙腈(40:35:25)。

3.2 柱温的选择

考察了柱温20, 25, 30和35℃对色谱分离的影响,结果显示30℃柱温时,分离效果最好。

3.3 内标物的选择

考察了左氧氟沙星、卡马西平等8种物质为内标。结果显示,左氧氟沙星、环丙沙星、氧氟沙星、氨茶碱与血样中杂质的保留时间相近,都在2 min左右;卡马西平与阿司匹林没有出峰,原因可能是样品处理方法或者色谱条件对其影响很大;地塞米松的保留时间虽然比较理想,在5.4 min,但是它的峰面积相对来说却很小,也不适宜作为内标物。吡啡尼酮在本试验色谱条件下与莫西沙星分离完全,峰形良好,与血浆中其他内源性物质互不干扰,是较为合适的内标物。

3.4 样品处理方法的选择

沉淀法分别考察了70%高氯酸、10%三氟乙酸与乙腈处理样品发现有比较明显的杂峰出现,故

采用萃取法处理样本。目前文献报道的以液-液萃取法处理莫西沙星血浆样品的有三氯甲烷-异丙醇^[11]、乙酸乙酯^[12]等,但本试验重复这些方法时发现莫西沙星的回收率都不高。原因可能是莫西沙星见光容易分解,在空气中也不稳定。因此本试验采取0.5%的三氟乙酸来酸化血浆样品,再通过二氯甲烷液-液萃取的方法来提高莫西沙星的回收率。在选择三氟乙酸浓度的过程中,尝试过以浓度分别为1%, 0.8%, 0.5%的三氟乙酸来酸化,结果发现以浓度为0.5%的三氟乙酸效果最好。

3.5 采血时间点的确定

预实验采血时间为给药前,给药后0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4.5, 5.5, 6, 8, 12, 24 h发现:①大鼠在0.25 h时就已经有比较高的峰面积,所以在给药后增加一个0.083 h的采血时间点;②大鼠血药浓度的达峰时间 T_{max} 在1.0 h左右,考虑到总采样点为12个点,在达峰时间点附近增加2个采血时点0.75 h与1.25 h。经调整后的采血时间点为0.083 h, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 3, 6, 12, 24 h。结果理想,能够满足药动学参数的要求。

3.6 结语

本试验建立的HPLC测定大鼠血浆中莫西沙星浓度的方法,具有结果准确、测定速度快、操作简便、试剂价廉等优点。通过莫西沙星在大鼠体内的药动学研究,可以为临床用药提供参考。

REFERENCES

- [1] MENG J J. Recent progress on application of a new antibiotic moxifloxacin [J]. J Microbiol(微生物学杂志), 2007, 27(5): 98-101.
- [2] HE D H, YU J P. Determination of moxifloxacin in human serum by RP-HPLC [J]. J China Pharm(中国药房), 2007, 18(32): 2506-2507.
- [3] BOUBAKAR B B, RENAUD E, DOMINIQUE D, et al. Determination of moxifloxacin in growth media by high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr B, 2001, 754(1): 107-112.
- [4] ZHANG Y K, ZHANG Z Q, YANG T, et al. Pharmacokinetics of moxifloxacin hydrochloride and sodium chloride injection in Beagle dogs [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2010, 41(4): 273-275.
- [5] XU Y H, LI Y Z, LI D, et al. Pharmacokinetics of moxifloxacin hydrochloride tablets in healthy volunteers [J]. J China Pharm(中国药房), 2010, 21(10): 898-901.
- [6] XU Y H, LI Y Z, TANG L J, et al. Determination of moxifloxacin in human plasma by HPLC [J]. Chin J Clin Pharm(中国临床药理学杂志), 2010, 19(3): 149-152.
- [7] CHEN X H. Determination of gatifloxacin and moxifloxacin in whole blood by HPLC coupled with fluorescence detection [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2009, 26(5):

412-414.

- [8] KART H V, MICHAEL G B, JAMES T S. Determination of moxifloxacin in human plasma by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2002, 30(4): 961-968.
- [9] PRANGER A D, ALFFENAAR J W, WESSELS A M, et al. Determination of moxifloxacin in human plasma, plasma ultrafiltrate, and cerebrospinal fluid by a rapid and simple liquid chromatography-tandem mass spectrometry method [J]. J Anal Toxicol, 2010, 34(3): 135-141.
- [10] LABAN-DJURDJEVIĆ A, JELIKIĆ-STANKOV M,

DJURDJEVIĆ P, et al. Optimization and validation of the direct HPLC method for the determination of moxifloxacin in plasma [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2006, 844(1): 104-111.

- [11] GU J, LI Y Z. Study on pharmacokinetic interaction of doxofylline and moxifloxacin in rats [J]. Chin Pharm J(中国药杂志), 2003, 38(4): 285-289.
- [12] SEVGI T U. High-performance liquid chromatography assay for moxifloxacin: pharmacokinetics in human plasma [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43(1): 320-324.

收稿日期: 2010-11-11