

# HPLC-MS/MS 测定人血浆中妥舒沙星的浓度

邹尚荣<sup>1</sup>, 王明礼<sup>1</sup>, 尚德为<sup>2</sup>, 张明<sup>2</sup>, 倪晓佳<sup>2</sup>, 叶林森<sup>3</sup>, 温预关<sup>2\*</sup> (1.广州市第八人民医院药剂科, 广州 510060; 2.广州医科大学附属广州市脑科医院, 广州 510370; 3.安徽医科大学, 合肥 230032)

**摘要:** 目的 建立快速、灵敏测定人体血浆中妥舒沙星浓度的高效液相色谱-串联质谱方法。方法 采用 Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 3.5 μm), 乙腈(含 0.1%甲酸)-5 mmol·L<sup>-1</sup> 甲酸铵水溶液(36 : 64)为流动相等度洗脱, 流速为 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 40 °C。采用多重反应监测(MRM)对妥舒沙星(*m/z* 405.2→387.2)和内标环丙沙星(*m/z* 332.2→314.2)的测定。结果 妥舒沙星的线性范围为 6~2 000 ng·mL<sup>-1</sup>, 回归方程为  $y=0.1835x+1.4619 \times 10^{-4}$ ,  $r=0.9962$ , 最低定量下限为 6 ng·mL<sup>-1</sup>( $S/N>5$ ), 日内、日间 RSD 均<10%, 高(1 800 ng·mL<sup>-1</sup>)、中(750 ng·mL<sup>-1</sup>)、低(15 ng·mL<sup>-1</sup>)浓度标准血样的平均回收率分别为 97.5%, 103.3%, 105.9%。结论 该方法灵敏、准确、简单、快速, 可用于妥舒沙星的临床血药浓度监测和药动学研究。

**关键词:** 妥舒沙星; 血药浓度; 高效液相色谱-串联质谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)07-0846-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.07.019

## Determination of Tosufloxacin in Plasma by HPLC-MS/MS

ZOU Shangrong<sup>1</sup>, WANG Mingli<sup>1</sup>, SHANG Dewei<sup>2</sup>, ZHANG Ming<sup>2</sup>, NI Xiaojia<sup>2</sup>, YE Linmiao<sup>3</sup>, WEN Yuguan<sup>2\*</sup> (1.Department of Pharmacy, Guangzhou Eighth People's Hospital, Guangzhou 510060, China; 2.Guangzhou Brain Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510370, China; 3.Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a rapid and sensitive HPLC-MS/MS method for tosofloxacin in plasma. **METHODS** Tosufloxacin was extracted with acetonitrile and the residues were analyzed with a HPLC-MS/MS system used Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> column(4.6 mm×150 mm, 3.5 μm) with the mobile phase consisted of acetonitrile (0.1% formic acid) with 5 mmol·L<sup>-1</sup> ammonium formate(36 : 64), with a flow rate of 0.5 mL·min<sup>-1</sup> and temperature of 40 °C. Multiple reaction monitoring(MRM) using the precursor to production combinations of *m/z* 405.2→387.2 and *m/z* 332.2→314.2 was performed to detect tosofloxacin and the internal standard, respectively. **RESULTS** The calibration curves for tosofloxacin had good linearity within the range of 6~2 000 ng·mL<sup>-1</sup>,  $r=0.9962$ . The limits of quantitation for tosofloxacin was 6 ng·mL<sup>-1</sup>. The intra-day and inter-day precision of variation was <10%. The average recoveries for high-, middle-, low-dose of tosofloxacin(1 800, 750, 15 ng·mL<sup>-1</sup>) were 97.5%, 103.3% and 105.9%, respectively. **CONCLUSION** The method provides a sensitive, accurate, precise and reliable analytical procedure for clinical monitoring of tosofloxacin plasma and its pharmacokinetic studies.

**KEY WORDS:** tosofloxacin; plasma concentration; HPLC-MS/MS

基金项目: 广东省医学科研基金(A2013523); 广东省自然科学基金面上项目(8151037001000001)

作者简介: 邹尚荣, 男, 硕士, 副主任药师 Tel: (020)83710515 E-mail: 627bgs@163.com \*通信作者: 温预关, 男, 硕士, 主任药师 Tel: (020)81268052 E-mail: wenyuguande@163.com

甲苯磺酸妥舒沙星(tosufloxacin tosylate)是合成的广谱、第3代氟喹诺酮类抗菌药物,1990年首先在日本上市,具有抗菌谱广、抗菌活性强的特点,对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、厌氧菌的抗菌活性明显较环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星等同类药物强<sup>[1]</sup>。国内外文献报道其检测方法主要采用HPLC<sup>[2-7]</sup>,但因前处理操作繁琐、检测时间较长、杂质干扰大等,不利于批量样品的检测。为便于开展临床血药浓度监测和药动学研究,本试验建立了以环丙沙星为内标的测定人血浆中妥舒沙星浓度的高效液相色谱-串联质谱方法。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),包括 G1379B 自动脱气机, G1310A 自动调配四元泵, G1329A 自动进样器, G1316A 可调柱温箱; Agilent 6410 Triple Quad LC/MS(美国 Agilent 公司); XW-80A 型旋涡混合器(原上海医科大学仪器厂); BP110S 型电子分析天平(德国 Sartorius); MIKRO12-24 型高速离心机(德国 Hettich); 111 型真空干燥箱(德国 MMM-GROUP); MILLI-Q 超纯水机(法国 Millipore)。

### 1.2 药物与试剂

甲苯磺酸妥舒沙星对照品(珠海经济特区生物化学制药厂,批号:171239-201106,含量为99.4%);内标物为环丙沙星对照品(中国食品药品检定研究院,批号:30451-200302,供含量测定用,含量为100%)。乙腈为色谱纯(德国默克公司,批号:70169);甲酸铵为质谱纯(美国 Sigma 公司,批号:101027672);甲酸为色谱级(德国默克公司,批号:3226794);水为重蒸去离子水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱与质谱条件

**2.1.1 色谱条件** 色谱柱: Agilent Eclipse plus C<sub>18</sub> (4.6 mm×150 mm, 3.5 μm); 流动相: 乙腈(含0.1%甲酸)-5 mmol·L<sup>-1</sup>甲酸铵水溶液(36:64); 流速: 0.5 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温: 40 °C; 进样量: 2 μL。

**2.1.2 质谱条件** 电喷雾电离源(ESI),正离子化,毛细管电压4 000 V,喷雾气压力0.345 MPa,干燥气体流速10 L·min<sup>-1</sup>,干燥气体温度350 °C。扫描方式为多重反应监测(MRM),妥舒沙星(*m/z* 405.2→387.2),碰撞能量22 eV,裂解电压160 V,四级杆捕捉时间0.2 s,电子倍增器300 V;内标物

环丙沙星(*m/z* 332.2→314.2),碰撞能量11 eV,裂解电压160 V,四级杆捕捉时间0.2 s,电子倍增器200 V。质谱裂解图见图1。

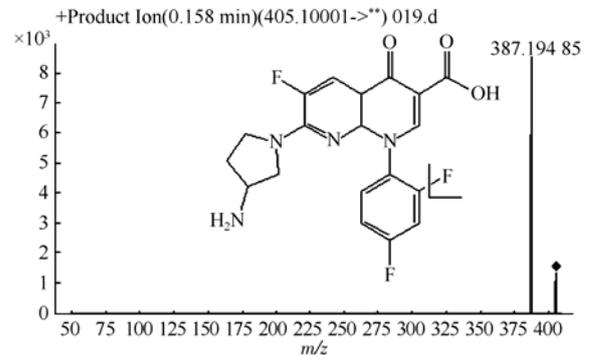


图1 妥舒沙星裂解图

Fig. 1 Mass spectra and chemical structures for tosufloxacin

### 2.2 标准溶液的配制

精密称取甲磺酸妥舒沙星对照品22.2 mg(含妥舒沙星15.1 mg),置于10 mL量瓶中,用流动相溶解并定容至刻度,即配制成浓度为1.5 mg·mL<sup>-1</sup>的妥舒沙星贮备液,贮存于4 °C冰箱避光保存,备用。试验前按试验所需稀释成相应浓度的标准工作液。另称取环丙沙星10.1 mg,配制成质量浓度为1.0 mg·mL<sup>-1</sup>的内标环丙沙星溶液。

### 2.3 样品处理方法

取空白离心管中,加入1.0 mg·mL<sup>-1</sup>的环丙沙星溶液和流动相各20 μL,含药血浆0.2 mL置2 mL离心管中快速振荡5 s,加乙腈0.5 mL,快速涡旋1 min,16 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,吸取上清液0.5 mL,进样2 μL。

### 2.4 专属性试验

取空白血浆0.2 mL置2 mL的离心管中,除不加内标外,按“2.3”项下方法操作,进样2 μL,获得空白血浆样品的色谱图,见图2A;将一定浓度的标准溶液和内标溶液加入空白血浆中,按“2.3”项下方法操作获得空白血浆加入药物标准工作液和内标的色谱图,妥舒沙星、环丙沙星的出峰时间分别约为3.393 min和2.826 min,见图2B;健康受试者服药后血浆样品按“2.3”项下方法依法操作的色谱图见图2C。结果表明,空白血浆中内源性物质不干扰妥舒沙星及内标环丙沙星的测定。

### 2.5 标准曲线的制备与线性范围、定量下限

取空白血浆0.2 mL,分别加入浓度为60,150,1 500,7 500,15 000,18 000和20 000 ng·mL<sup>-1</sup>的妥舒沙星对照品溶液20 μL,振荡5 s,使血浆

药物浓度分别相当于 6, 15, 150, 750, 1 500, 1 800 和 2 000 ng·mL<sup>-1</sup>, 其余项按“2.3”项下方法处理。经高效液相色谱-串联质谱分析, 以妥舒沙星峰面积与内标环丙沙星峰面积之比(y)为纵坐标, 以血浆中妥舒沙星浓度与内标物环丙沙星浓度之比(x)为横坐标, 用加权最小二乘法(权重系数为 1/χ<sup>2</sup>)进行回归计算, 血浆中妥舒沙星浓度在 6~2 000 ng·mL<sup>-1</sup> 内呈良好的线性关系, 线性方程为: y=0.183 5x+1.461 9×10<sup>-4</sup>, r=0.996 2(n=7)。结果表明, 血浆中妥舒沙星浓度的线性范围为 6~2 000 ng·mL<sup>-1</sup>, 线性关系良好, 满足人体内血药浓度范围测定。

血浆样品妥舒沙星标准曲线下限浓度为 6 ng·mL<sup>-1</sup>(S/N>5), 平行对 5 个浓度为 6 ng·mL<sup>-1</sup> 的含药血浆样品处理后进行色谱分析, 其方法回收率平均为 88.41%, RSD 为 6.58%。

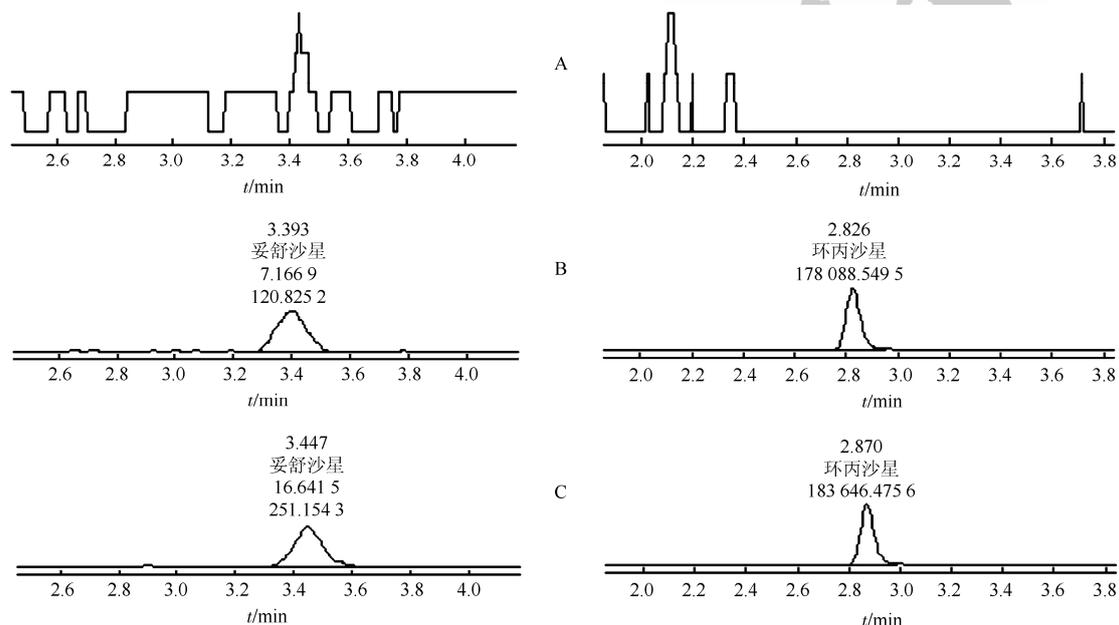


图 2 HPLC-MS/MS 法测定血浆中妥舒沙星的典型色谱图

A-空白血浆; B-空白血浆+妥舒沙星(6 ng·mL<sup>-1</sup>)+环丙沙星(100 ng·mL<sup>-1</sup>); C-受试者血浆样品+环丙沙星(100 ng·mL<sup>-1</sup>)

Fig. 2 HPLC-MS/MS chromatograms of tosoflaxacin in plasma

A-blank plasma; B-blank plasma spiked with tosoflaxacin(6 ng·mL<sup>-1</sup>) and ciprofloxacin(100 ng·mL<sup>-1</sup>); C-plasma sample spiked with ciprofloxacin(100 ng·mL<sup>-1</sup>) in healthy volunteer

## 2.7 回收率与精密度试验

按“2.5”项下方法分别配制低(15 ng·mL<sup>-1</sup>)、中(750 ng·mL<sup>-1</sup>)和高浓度(1 800 ng·mL<sup>-1</sup>)的妥舒沙星血浆溶液各 15 份, 分为 3 批, 每批 5 份, 并与每批的标准曲线同时进行, 按“2.3”项下方法处理后取 2 μL 进样, 计算质控样品的测得浓度, 与配制浓度对照, 求得本法的准确度和精密度。根据分析物提取回收率的含义: 从生物样本基质中回收得

## 2.6 介质效应考察

取 9 管空白血浆各 0.2 mL 平分为 3 组, 每组 3 管, 除不加标准系列溶液和内标外, 按“2.3”项下方法处理后, 分别加入低(150 ng·mL<sup>-1</sup>)、中(7 500 ng·mL<sup>-1</sup>)、高浓度(18 000 ng·mL<sup>-1</sup>)的妥舒沙星 20 μL 和内标环丙沙星(1 000 ng·mL<sup>-1</sup>)20 μL。以此种处理方法测得的妥舒沙星和内标峰面积与空白试管中加入 0.7 mL 流动相后, 再加入相应浓度的妥舒沙星和内标各 20 μL 混匀后测得的峰面积的比值计算百分比。结果显示, 低(150 ng·mL<sup>-1</sup>)、中(7 500 ng·mL<sup>-1</sup>)和高浓度(18 000 ng·mL<sup>-1</sup>)的妥舒沙星和内标环丙沙星(1 000 ng·mL<sup>-1</sup>)的介质影响百分比分别为 107.6%, 104.8%, 112.9% 和 101.9%, RSD 分别为 3.0%, 3.0%, 2.4%和 8.0%。结果表明, 介质影响百分比没有统计学差异, 可认定介质效应不影响药物的含量测定。

到分析物质的响应值除以纯标准品产生的响应值, 以从血浆中提取回收得到美普他酚和曲马多峰面积除以相应浓度的标准溶液峰面积计算提取回收率。结果妥舒沙星低(15 ng·mL<sup>-1</sup>)、中(750 ng·mL<sup>-1</sup>)和高浓度(1 800 ng·mL<sup>-1</sup>)和内标的提取回收率分别为 97.5%, 103.3%, 105.9%和 106.2%, 可见低、中、高 3 种浓度药物的提取回收率对测定的结果影响程度基本一致。提取回收率和精密度见表 2。

表 2 提取回收率与日内、日间精密度的( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Recovery rate, within-batch and inter-batch precision( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

加入量/ ng·mL <sup>-1</sup>	日内精密度		日间精密度		提取回收率	
	测得量/ng·mL <sup>-1</sup>	RSD/%	测得量/ng·mL <sup>-1</sup>	RSD/%	回收率/%	RSD/%
15	14.6±1.3	8.6	14.8±0.9	6.3	97.5±5.0	5.1
750	729.7±19.5	2.7	722.0±31.3	4.3	103.3±1.5	1.5
1 800	1 855.92±104.3	5.6	1 853.38±119.8	6.5	105.9±0.8	0.7

## 2.8 稳定性考察

**2.8.1 溶媒稳定性试验** 分别取低(15 ng·mL<sup>-1</sup>)、中(750 ng·mL<sup>-1</sup>)和高浓度(1 800 ng·mL<sup>-1</sup>)的妥舒沙星流动相溶液(均含 1 000 ng·mL<sup>-1</sup> 环丙沙星)各 20 μL, 每个浓度 9 份样品分析, 分为 3 组, 每组每个浓度 3 个样品。考察样品分别经冰箱 4 °C 放置 1, 2 和 3 d 的稳定性, 低、中、高 3 个浓度样品检测结果 RSD 为 4.1%~4.9%。

**2.8.2 血浆样品稳定性试验** 按“2.5”项下方法分别配制低(15 ng·mL<sup>-1</sup>)、中(750 ng·mL<sup>-1</sup>)和高浓度(1 800 ng·mL<sup>-1</sup>)的质控血浆样品, 每个浓度 21 份样品, 分为 7 组, 每组每个浓度 3 个样品。考察样品分别经室温放置 1 h 和 24 h, 处理后进样前 1, 24 h, -20 °C 冻存 1, 7, 14 d 和冻融 1 次、3 次的稳定性, 结果表明低、中、高 3 个浓度样品在各条件下的检测结果如下: 室温放置 24 h 的 RSD 分别为 1.8%~7.6%; 血浆处理后进样前条件下的 RSD 分别为 0.7%~3.6%; -20 °C 冻存的 RSD 分别为 6.9%~7.9%; 冻融 3 次的 RSD 分别为 4.5%~5.4%。结果表明, 在上述条件中, 低(15 ng·mL<sup>-1</sup>)、中(750 ng·mL<sup>-1</sup>)和高浓度(1 800 ng·mL<sup>-1</sup>)的质控血浆样品的 RSD 均<15%。

## 2.9 临床应用

选择 2 名男性受试者, 单次口服 0.3 g 甲磺酸妥舒沙星片, 用 250 mL 温开水送服。服药前及服药后 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 h 各取静脉血 2 mL, 用肝素管抗凝, 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 分离血浆后处理进样, 得 2 名受试者血药浓度-时间曲线, 见图 3。

## 3 讨论

目前, 国内外有 HPLC-荧光法<sup>[2]</sup>、HPLC-紫外法<sup>[3-5]</sup>和 HPLC-柱切换法<sup>[6-7]</sup>测定妥舒沙星血药浓度的报道, 大多存在着前处理过程繁琐、流动相配制过程复杂、杂质干扰多、检测时间长等情况。本试验采用 HPLC-MS/MS 测定人血浆中的妥舒沙

星浓度, 能大大降低杂质干扰, 检测时间仅需 3.6 min, 远低于文献[2-7], 流动相配制也较文献[2-4]简单, LLOD 为 6 ng·mL<sup>-1</sup>, 比 HPLC-柱切换法<sup>[6-7]</sup>的 0.1 μg·mL<sup>-1</sup> 和 HPLC-荧光<sup>[4]</sup>法的 10.8 g·mL<sup>-1</sup> 更低, 有利于痕量分析。

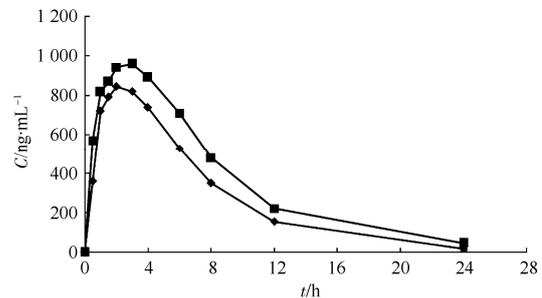


图 3 2 名健康受试者单次口服 0.6 g 甲磺酸妥舒沙星片后血药浓度-时间曲线

Fig. 3 The plasma concentration-time profiles of tosofloxacin tablets after a 0.6 g single-dose in two Chinese healthy volunteers

笔者曾尝试用蛋白沉淀法和乙腈、甲醇、正己烷等溶剂分别提取, 蛋白沉淀法与溶剂提取方法相比较, 提取率高, 且蛋白沉淀法的前处理方法简单方便, 能提高样品的处理效率, 便于进行大样本的妥舒沙星含量测定。相对于甲醇-水体系, 乙腈-水体系可以得到更优异的峰形, 试验发现, 随着水相提高, 提取回收率逐渐上升, 介质效应由抑制转为增强, 最终确定乙腈:水=36:64。加入 0.1% 的甲酸有利于 [M+H]<sup>+</sup> 的形成, 加入甲酸铵以改善峰型, 减少拖尾现象。通过对多种化合物的筛选, 最后选择与妥舒沙星的结构式相似的环丙沙星做内标物, 它们的出峰时间既相互靠近又不互相重叠。

结果表明, 本试验建立的高效液相色谱-串联质谱法能快速高效检测人血浆中妥舒沙星的浓度, 具有内源性物质干扰少、检测时间短、前处理方法简单、进样量小、定量下限低等优点, 为临床血药浓度检测和药动力学研究提供了一种操作

简单、快速、灵敏、高效且重复性好的方法。

## REFERENCES

- [1] CAO Y J, ZHANG Y Y, ZHANG J D, et al. *In vitro* and *in vivo* activity of tosufloxacin [J]. Chin J Antibiot(中国抗生素杂志), 1999, 4(24): 138-141.
- [2] ZHAO Y J, DING J S, ZHOU Y B, et al. Determination of tosufloxacin tosylate in human plasma by HPLC-fluorescence and its relative bioequivalence [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2010, 41(6): 444-447.
- [3] YU D Y, CAI Y M, TAN H Y, et al. Relative bioavailability of Tosufloxacin Tosylate Dispersible tablet in healthy volunteers [J]. J Clin Res(医学临床研究), 2007, 24(9): 1543-1545.
- [4] HUANG S Q. Determination of tosufloxacin in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatographic fluorometry [J]. Youjiang Med J(右江医学), 2010, 38(6): 675-678.
- [5] SHIBA K, SAKAMOTO M, NAKAZAWA Y, et al. Effect of drugs containing metal cations on absorption of tosufloxacin tosylate in healthy males [J]. Jap J Chemother, 1996, 44(6): 429-436.
- [6] TAKASHI Y, YASUO W, SHINZABUROU M, et al. Microbiological assay method for T-3262 concentration in body fluids [J]. Jap J Chemother, 1988, 36(Suppl 9): 137-142.
- [7] RUMIKO M, CHIZUKO N, NOBUO I, et al. Effects of aluminum hydroxide and famotidine on bioavailability of tosufloxacin in healthy volunteers [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42(2): 453-455.

收稿日期: 2013-10-21