

LC-MS/MS 测定患者血浆中莫西沙星的浓度

龚莹, 李贺, 刘炜, 李力^{*}(浙江医院药剂科, 浙江省老年医学重点实验室, 杭州 310013)

摘要: 目的 采用 LC-MS/MS 测定患者血浆中莫西沙星浓度, 并进行血药浓度监测。方法 血浆样品用乙腈沉淀蛋白后, 以普瑞巴林为内标, 选用 ZORBAX SB C₁₈(2.1 mm×100 mm, 3.5 μm)色谱柱, 以乙腈-水(均含 0.1%甲酸)为流动相梯度洗脱, 流速为 0.30 mL·min⁻¹, 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μL, 总分析时间为 4.0 min; 采用电喷雾离子化源, 正离子方式, 多反应监测扫描方式进行监测。结果 血浆中莫西沙星浓度线性范围为 10~5 000 μg·mL⁻¹ ($r=0.997\ 8$), 定量下限为 10 ng·mL⁻¹; 质控样品准确度为 94.2%~107.1%; 日内、日间 RSD<15%; 样品和内标提取回收率在 82.4%~89.8%。结论 该方法快速、灵敏、准确, 专属性强, 重复性好, 适用于莫西沙星临床血药浓度测定。

关键词: 莫西沙星; 液质联用法; 血药浓度

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2018)06-0797-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.06.003

引用本文: 龚莹, 李贺, 刘炜, 等. LC-MS/MS 测定患者血浆中莫西沙星的浓度[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(6): 797-800.

Determination of Moxifloxacin in Patients Plasma by LC-MS/MS

GONG Ying, LI He, LIU Wei, LI Li^{*}(*Department of Pharmacy, Zhejiang Hospital, Zhejiang Provincial Key Lab of Geriatrics, Hangzhou 310013, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an LC-MS/MS method for determination of moxifloxacin in patients plasma and applied to drug monitoring. **METHODS** The plasma samples were precipitated with acetonitrile, with pregabalin as an internal standard. The separation was achieved on ZORBAX SB C₁₈ column(2.1 mm×100 mm, 3.5 μm) and eluted with linear gradient using acetonitrile and water (both contain 0.1% formic acid) at the flow rate of 0.30 mL·min⁻¹, the injection volume was 10 μL and the column temperature was 30 °C. The total time of the analysis was 4.0 min. Detection of the analytes were achieved using positive ion electrospray ionization (ESI) in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. **RESULTS** The linear calibration curve of moxifloxacin obtained concentration range of 10~5 000 ng·mL⁻¹ ($r=0.997\ 8$), with the lower limit of quantitation (LLOQ) of 10 ng·mL⁻¹. The accuracy of quality control sample was 94.2%~107.1%. Intra-day and inter-day relative standard deviations were both <15%. The extraction recovery of low, middle and high concentrations was 82.4%~89.8%, respectively. **CONCLUSION** The established method is rapid, sensitive, accurate, specific and reliable, and it is suitable for the study of therapeutic drug monitoring of moxifloxacin.

KEYWORDS: moxifloxacin; LC-MS/MS; plasma drug concentration

莫西沙星为第 4 代喹诺酮类广谱抗菌药物, C-7 位上氮双环结构加强了对革兰阳性菌的抗菌作用, 甲氧基则加强了对厌氧菌的作用。莫西沙星对常见的呼吸道病原菌, 青霉素敏感和耐药的肺炎链球菌、嗜血杆菌属、卡他莫拉菌属以及肺炎支原体、肺炎衣原体和肺炎军团菌等均较敏感^[1], 且对头孢菌素类、糖肽类、大环内酯类和四环素类耐药的耐药机制并不影响莫西沙星的抗菌活性。同时莫西沙星良好的组织和体液分布特征, 使其在临床抗感染治疗中具有重要地位^[2]。莫西沙星通常具有良好的耐受性, 在临床使用过程中最

常见不良反应的发生率与其他氟喹诺酮类药物基本一致。但近年来随着莫西沙星在临床的广泛应用, 新的不良反应屡有报道, 其安全性不容忽视, 需根据患者不同情况(包括年龄、体质、基础疾病、过敏史等因素), 制定个体化用药方案。血药浓度测定可以为临床治疗效果预测和不良反应评价提供参考。有关莫西沙星的血药浓度测定方法国内外已有报道, 但采用的方法多为 HPLC, 专属性和灵敏度较差。因此本试验在相关文献的基础上^[3-4], 采用 LC-MS/MS 测定人血浆中莫西沙星的浓度, 旨在为临床提供一种血样处理相对简单、条件易

基金项目: “重大新药创制” 国家科技重大专项(2013ZX09303005); 浙江省自然科学基金(LQ15H310003)

作者简介: 龚莹, 女, 博士, 药师 Tel: (0571)81595229 E-mail: hihitiger@126.com *通信作者: 李力, 男, 博士, 副主任药师 Tel: (0571)81595229 E-mail: ronaldoli2001@163.com

于满足、分析时间短、检测灵敏度高的测定方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

API4000+型三重四极杆质谱仪(美国 Applied Biosystems 公司); Agilent 1260 液相系统(包括 G1312B 型四元输液泵, G1329A 型自动进样器, G1316A 型柱温箱和 G1379A 型脱气机, 美国 Agilent 公司); Centrifuge 5415R 低温离心机(德国 Eppendorf); MULTIVAP-48 氮吹仪(美国 Jnc. 公司); AL104 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多)。

1.2 药品和试剂

甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯, Merck 公司); 莫西沙星(拜耳制药有限公司, 纯度: 96.7%; 批号: R-1004-02G); 内标普瑞巴林(中国药品生物制品检定研究院, 纯度: 99.80%; 批号: 101106-201001)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 3.5 μm); 流动相: 乙腈(含 0.1% 甲酸, A)-水(含 0.1% 甲酸, B); 梯度洗脱(0~1 min, 40%A; 1~2 min, 85%A; 2~3 min, 90%A; 3~4 min, 40%A); 流速: 0.30 mL·min⁻¹; 柱温: 30 ℃。

2.2 质谱条件

电喷雾电离源(electrospray ionization, ESI); 正离子方式检测; 雾化气: 482.7 kPa; 气帘气: 206.9 kPa; 碰撞气: 34.5 kPa; 辅助气: 482.7 kPa; 离子源电压: 5 000 V; 温度为 450 ℃; 扫描方式为多反应监测(multi reaction monitoring, MRM), 莫西沙星和内标去簇电压(declustering potential, DP)分别为 55, 50 V; 碰撞能量(collision energy, CE)为 30, 25 eV; 用于定量分析的离子对分别为 m/z 402.2→261.0(莫西沙星)和 m/z 160.3→142.1(内标), 扫描时间为 200 ms。

2.3 系列对照品溶液和内标溶液的配制

2.3.1 系列对照品溶液的配制 取莫西沙星约 10 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配成 200 μg·mL⁻¹ 的储备液。用甲醇依次稀释储备液, 得到莫西沙星浓度分别为 0.10, 0.20, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50 μg·mL⁻¹ 的对照品系列溶液, 于冰箱(4 ℃)内保存备用。

2.3.2 质控溶液的配制 取莫西沙星约 10 mg, 精密称定, 置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配成浓度为 100 μg·mL⁻¹ 的储备液。

用甲醇依次稀释储备液, 得到莫西沙星浓度分别为 0.10, 0.25, 4.0, 40 μg·mL⁻¹ 的质控溶液, 于冰箱(4 ℃)内保存备用。

2.3.3 内标溶液的配制 取普瑞巴林对照品约 10 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配成浓度为 100 μg·mL⁻¹ 的普瑞巴林储备液。用甲醇配成 2.0 μg·mL⁻¹ 内标溶液, 于冰箱(4 ℃)内保存备用。

2.4 血浆样品的处理

血浆样本在室温下解冻, 吸取 100 μL 至 1.5 mL 离心管中, 加入 2 μg·mL⁻¹ 内标溶液 5 μL, 加乙腈 400 μL, 涡流混合 2 min, 振荡 5 min, 离心 15 min(13000 r·min⁻¹), 取上清液 10 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

2.5 血样的采集

6 例老年肺炎感染患者连续给药 3 d 后, 于第 4 天给药前 30 min 内在静脉输注的对侧前臂采集 2 mL 静脉血于肝素钠抗凝的采血管中, 3 000 r·min⁻¹, 4 ℃离心 10 min 后, 分离血浆, 置于-80 ℃保存待测。

2.6 方法学验证

2.6.1 专属性试验 分别取 6 份不同来源的空白血浆、标准血浆样品(加入内标溶液), 按“2.4”项下方法处理, 进样分析, 结果见图 1。结果表明, 峰形良好, 血浆中内源性物质不干扰莫西沙星和内标的测定。

2.6.2 标准曲线和定量下限 分别取莫西沙星对照品系列溶液各 10 μL 于 1.5 mL EP 管中, 常温氮气挥干后, 加入 100 μL 血浆, 制成相当于浓度为 10, 20, 200, 500, 1 000, 2 000, 5 000 ng·mL⁻¹ 模拟血浆样品, 自加入内标溶液开始, 按“2.4”项下方法操作, 每一浓度进行双样本分析, 记录色谱图。以待测物浓度 x (ng·mL⁻¹)为横坐标, 待测物与内标物峰面积比值 y 为纵坐标, 用加权($W=1/x^2$)最小二乘法进行回归运算。结果表明莫西沙星的线性回归方程为 $y=2.74 \times 10^{-3}x-1.56 \times 10^{-4}$, $r=0.9978$; 莫西沙星在 10~5 000 ng·mL⁻¹ 内线性关系良好, 定量下限为 10 ng·mL⁻¹, 连续测定 5 份样本, 平均回收率为 94.2%, RSD 为 8.75%。

2.6.3 精密度和准确度 分别配制莫西沙星的定量限、低、中、高(10, 25, 400, 4 000 ng·mL⁻¹) 4 个浓度的血浆样本。按“2.4”项下方法处理样本, 每一浓度进行 5 样本分析, 连续测定 3 d。根据当

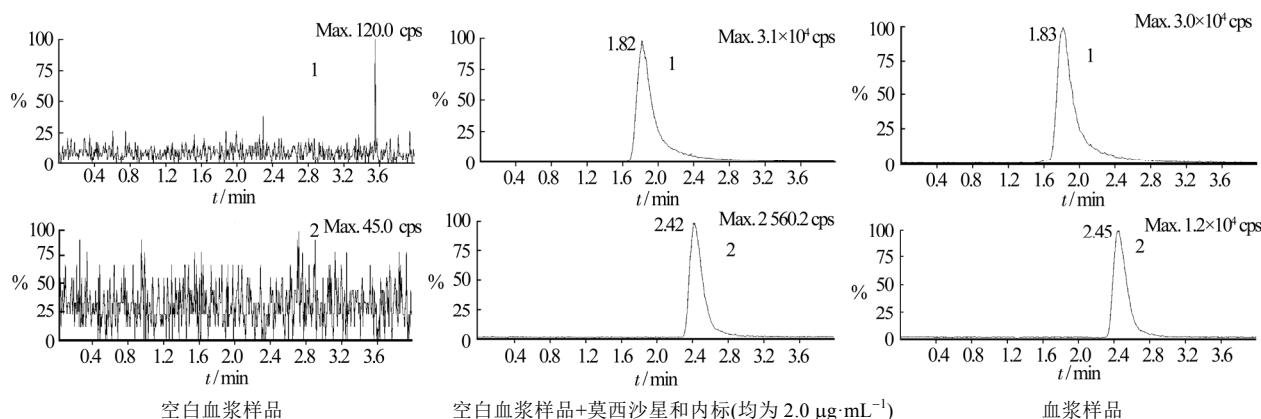


图1 血浆样品的典型 LC-MS/MS 色谱图

1-内标; 2-莫西沙星。

Fig. 1 Typical LC-MS/MS chromatograms in plasma

1-IS; 2-moxifloxacin.

日标准曲线计算质控血浆样本的测定浓度, 根据质控样品结果计算本法的精密度和准确度, 结果见表 1。结果表明, 日内、日间 RSD 均 $<15\%$, 准确度均在 $94.2\%\sim 107.1\%$ 内。结果表明, 本试验所建立的 LC-MS/MS 测定莫西沙星方法的日内和日间精密度符合生物样品的测定要求。

表 1 方法精密度和准确度的测定结果

Tab. 1 Determination of precision and accuracy

质控样品浓度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	日内($n=5$)		日间($n=3$)	
	准确度/%	RSD/%	准确度/%	RSD/%
10	94.2	8.75	95.4	9.69
25	98.3	4.51	102.0	7.88
400	102.4	5.05	107.1	7.26
4 000	94.5	6.37	98.8	10.12

2.6.4 提取回收率 取低、中、高 3 个浓度的质控样品, 按“2.4”项下方法操作, 每一浓度进行 6 样本分析, 获得相应峰面积(A)。同时另取空白血浆 $100\ \mu\text{L}$, 加入 $400\ \mu\text{L}$ 乙腈, 涡流混合 $2\ \text{min}$, 振荡 $5\ \text{min}$, 离心 $15\ \text{min}$ ($13\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 取上清液于另一试管中, 分别加入低、中、高浓度质控溶液(莫西沙星溶液浓度分别为 0.25 , 4.0 , $40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和内标溶液, 涡流混合 $2\ \text{min}$, 振荡 $5\ \text{min}$, 离心 $15\ \text{min}$ ($13\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 进行 LC-MS/MS 分析, 获得相应峰面积(B)。以每一浓度 2 种处理方法的峰面积比值计算回收率, 计算公式为 $A/B\times 100\%$, 结果见表 2。

2.6.5 基质效应 分别取 6 个不同来源的受试者空白血浆 $100\ \mu\text{L}$, 加入乙腈 $400\ \mu\text{L}$, 涡流混合 $2\ \text{min}$, 振荡 $5\ \text{min}$, 离心 $15\ \text{min}$ ($13\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),

取上清液于另一试管中, 加入低、中、高浓度质控溶液(莫西沙星溶液浓度分别为 0.25 , 4.0 , $40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和内标溶液, 涡流混匀, 取 $10\ \mu\text{L}$ 进行 LC-MS/MS 分析, 获得相应峰面积(A)。同时另取 $100\ \mu\text{L}$ 水代替空白血浆, 按上述处理, 获得相应峰面积(B)。以每一浓度 2 种处理方法的峰面积比值计算基质效应, 计算公式为 $A/B\times 100\%$ 。以分析物和内标的基质效应比值计算内标归一化的基质效应, 结果见表 2。

表 2 基质效应和提取回收率测定结果

Fig. 2 Determination of matrix effect and extraction recovery

分析物	QC 浓度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	基质效应/%	提取回收率/%	RSD/%
莫西沙星	25.0	93.5 ± 7.04	84.8 ± 2.48	2.93
	400	96.8 ± 6.39	88.6 ± 3.35	3.78
	4 000	104.5 ± 5.96	89.8 ± 3.96	4.41
内标		105.6 ± 9.07	82.4 ± 3.58	4.34

2.6.6 稳定性考察 考察莫西沙星储备液室温放置 $6\ \text{h}$ 及 $-20\ ^\circ\text{C}$ 放置 $30\ \text{d}$ 的稳定性。将新鲜配制与放置不同时间样品进行分析, 采用外标法进行计算。在上述条件下的偏差为 $0.67\%\sim 4.12\%$, 结果表明莫西沙星储备液在上述储存条件下稳定性良好。

配制 $25, 400, 4\ 000\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质控血浆样本, 每个浓度平行配制 5 份, 分别考察样品室温放置 $12\ \text{h}$, 处理后自动进样器($4\ ^\circ\text{C}$)放置 $12\ \text{h}$, 反复冻融 3 次, 于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 环境中放置 $20\ \text{d}$ 后的稳定性。在上述条件下, 莫西沙星质控样品的准确度为 $89.4\%\sim 106.3\%$, RSD 为 $4.8\%\sim 10.1\%$, 表明莫西沙星在上述条件下稳定。

2.6.7 残留效应 依次进样, 定量上、下限浓度及空白基质生物样本, 从而考察本方法的残留效应。实验过程中, 最高浓度校正标样后连续分析的 2 个空白基质样品在分析物保留时间处干扰峰响应均低于定量下限中分析物响应的 13%, 内标保留时间处的干扰峰的响应均低于零浓度样品中内标响应的 10%。结果表明, 残留可忽略, 不影响定量分析。

2.6.8 莫西沙星的血药浓度监测 收集 6 例笔者所在医院呼吸内科收住的社区获得性肺炎患者, 经临床医师确诊需要采用莫西沙星治疗(给药剂量 $400\text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$), 在第 4 天使用莫西沙星前 30 min 采集静脉血用于血药浓度检测。结果显示, 72, 74, 81, 67, 80, 70 岁患者莫西沙星浓度分别为 852, 869, 623, 1 418, 1 038, 548 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。其中 1 例患者的血药浓度为 $1.42\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 明显高于其他患者的稳态血药浓度, 该患者在用药过程中发生了癫痫。结合患者发生的不良反应和用药情况, 及时反馈给临床医师, 以便医师对治疗方案进行调整。患者剂量被调整为 $200\text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ 后, 未再出现类似不良反应。

3 讨论

本试验采用普瑞巴林作为内标, 其色谱保留行为、回收率以及质谱条件与待测物较接近, 且信号强, 稳定性好。采用梯度洗脱方法, 化合物峰形较好, 目标峰均出现在 $>1\text{ min}$, 可以较好避免血浆中内源性物质基质效应的干扰。与文献[5-6]报道的方法相比, 本方法可在 4 min 内可完成多个成分的定量分析, 快速、准确、灵敏, 干扰少, 能满足分析要求, 可用于莫西沙星的药动学研究。

莫西沙星的血浆蛋白结合率约为 45%, 可以很快分布到血管外间隙, 药时曲线下面积高 ($6\text{ mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$), 稳态时表观分布容积 V_{ss} 接近 $2\text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。已有文献报道, 一些患者在使用常规剂

量莫西沙星时, 发生神经系统、心脏系统及骨骼系统的不良反应, 可能与莫西沙星的血药浓度有关^[7-8]。因此在临床治疗时, 关注这些患者的莫西沙星血药浓度有助于在早期提示临床医师可能发生不良反应的情况, 帮助医师及早调整治疗方案, 降低患者不良反应发生率。

REFERENCES

- [1] BARRERA C M, MYKIETIUK A, METEV H, et al. Efficacy and safety of oral solithromycin versus oral moxifloxacin for treatment of community-acquired bacterial pneumonia: a global, double-blind, multicentre, randomised, active-controlled, non-inferiority trial (SOLITAIRE-ORAL) [J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16(4): 421-430.
- [2] KEES M G, SCHAEFTLEIN A, HAEBERLE H A, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamic evaluation of intravenous and enteral moxifloxacin in surgical intensive care unit patients [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013, 68(6): 1331-1337.
- [3] LABAN-DJURDJEVIC A, JELIKIC-STANKOV M, DJURDJEVIC P, et al. Optimization and validation of the direct HPLC method for the determination of moxifloxacin in plasma [J]. *J Chromatogr B*, 2006, 844(1): 104-111.
- [4] CHEN J M, WANG S H, ZHOU Y F, et al. Determination of moxifloxacin in human plasma using ultra performance liquid chromatography tandem quadrupole mass spectrometry [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2014, 31(12): 1503-1507.
- [5] WU M C, SHEN X W, LIN J, et al. Determination of fluconazole and moxifloxacin in situ forming of eye gel by HPLC [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2012, 29(6): 534-536.
- [6] 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.
- [7] WU M H, WENG S Q, XIAO L, et al. Systematic evaluation of nervous toxicity and mental disorders induced by moxifloxacin [J]. *Chin J Clin Pharmacol*(中国临床药理学), 2016, 32(9): 855-857.
- [8] 唐铭娟, 白楠, 梅和坤, 等. 连续给予健康受试者口服莫西沙星后其血药浓度与心脏 QTc 间期延长的量变关系评价 [C]. 中国药学会药物临床评价研究专业委员会 2015 年学术年会论文集, 2015: 248-257.

收稿日期: 2018-01-08

(本文责编: 蔡珊珊)