

## · 论著 ·

## 高效液相色谱荧光法测定血浆中左氧氟沙星的浓度及其生物等效性研究

杨小英<sup>a,b</sup>, 张文萍<sup>a,b</sup>, 王欣瑜<sup>a,b</sup>, 党宏万<sup>a,b</sup> (宁夏医科大学总医院, a. 药剂科; b. 临床药理研究室, 宁夏 银川 750004)

**[摘要]** **目的** 建立高效液相色谱(HPLC)荧光法测定血浆中左氧氟沙星的浓度,研究盐酸左氧氟沙星片在健康人体中的生物等效性。**方法** 采用随机交叉自身对照试验设计,24名健康男性受试者单次口服0.2g盐酸左氧氟沙星片受试制剂或参比制剂,分别于不同时间点采集肘静脉血,采用HPLC荧光法测定血浆中左氧氟沙星的药物浓度。利用DAS 2.0软件计算药动学参数,评价两制剂的生物等效性。**结果** 受试制剂与参比制剂的主要药动学参数 $t_{1/2}$ 、 $t_{max}$ 、 $\rho_{max}$ 、 $AUC_{0-36}$ 和 $AUC_{0-inf}$ 分别为(6.71±0.95)h和(6.60±1.00)h;(0.85±0.30)h和(0.79±0.28)h;(2 815.48±513.04)ng/ml和(3 185.59±674.29)ng/ml;(17 157.61±1 949.07)ng·h/ml和(17 425.06±2 447.80)ng·h/ml;(18 324.52±2 019.41)ng·h/ml和(18 540.41±2 523.08)ng·h/ml。两制剂主要药动学参数统计学分析无显著性差异。受试制剂与参比制剂 $AUC_{0-36}$ 、 $AUC_{0-inf}$ 和 $\rho_{max}$ 对数比值的90%置信区间分别为95.2%~102.5%、96.1%~102.2%和82.8%~94.9%。**结论** 受试制剂与参比制剂具有生物等效性,为生物等效制剂。

**[关键词]** 左氧氟沙星;高效液相色谱;生物等效性

**[中图分类号]** R945;R917

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2016)05-0428-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.05.012

## Determination of levofloxacin concentration in plasma of Chinese healthy volunteers by HPLC with fluorescence detection and bioequivalence study of levofloxacin hydrochloride tablets

YANG Xiaoying<sup>a,b</sup>, ZHANG Wenping<sup>a,b</sup>, WANG Xinyu<sup>a,b</sup>, DANG Hongwan<sup>a,b</sup> (General Hospital of Ningxia Medical University, a. Department of Pharmacy; b. Division of Clinical pharmacology, Yinchuan 750004, China)

**[Abstract]** **Objective** To develop a HPLC-fluorescence method to determine levofloxacin concentration in plasma for studying bioequivalence of levofloxacin hydrochloride tablet in Chinese healthy volunteers. **Methods** A single-dose of 0.2 g test or reference preparation was given to 24 healthy volunteers in a randomized crossover study. The concentrations of levofloxacin at different time points were determined by HPLC with fluorescence detection. The pharmacokinetic parameters were calculated using DAS 2.0 software program. **Results** The main pharmacokinetic parameters of the test and reference preparation,  $t_{1/2}$ ,  $t_{max}$ ,  $\rho_{max}$ ,  $AUC_{0-36}$  and  $AUC_{0-inf}$ , were respectively (6.71±0.95) h and (6.60±1.00) h, (0.85±0.30) h and (0.79±0.28) h, (2 815.48±513.04) ng/ml and (3 185.59±674.29) ng/ml, (17 157.61±1 949.07) ng·h/ml and (17 425.06±2 447.80) ng·h/ml, (18 324.52±2 019.41) ng·h/ml and (18 540.41±2 523.08) ng·h/ml. The statistical analysis showed that the main pharmacokinetic parameters between test and reference preparations were no significant differences. The 90% confidence interval of test and reference preparations  $AUC_{0-36}$ ,  $AUC_{0-inf}$  and  $\rho_{max}$  were 95.2%~102.5%, 96.1%~102.2% and 82.8%~94.9%. **Conclusion** The test and reference preparations were bioequivalent.

**[Key words]** levofloxacin; HPLC; bioequivalence

左氧氟沙星(levofloxacin)是氧氟沙星的S型光学活性异构体,系第三代喹诺酮类抗菌药物,对葡萄球菌、肺炎链球菌、大肠杆菌、结核杆菌等有较好的抗菌作用,主要用于治疗敏感细菌所致的呼吸道、

泌尿道、皮肤和软组织感染。其作用机制是通过抑制细菌DNA旋转酶的活性,阻止细菌DNA的合成和复制而导致细菌死亡。笔者建立了高效液相色谱荧光法对血浆中左氧氟沙星浓度进行测定,样品通过液-液萃取处理后进样分析,处理方法简便,灵敏度高,在此法基础上研究盐酸左氧氟沙星片两种制剂的药动学和相对生物利用度,并评价生物等效性,为临床用药提供药动学依据和质量保证。

**[作者简介]** 杨小英,本科,主任药师.研究方向:临床药学.Tel:(0951)6743031;E-mail:yxy-1970@163.com

**[通讯作者]** 党宏万,主任药师,硕士生导师.研究方向:药动学及临床药理学.E-mail:dhwbeining@163.com

## 1 仪器与试药

**1.1 仪器** 美国 Agilent 1200 高效液相色谱仪,配置四元泵,在线脱气机,自动进样器,柱温箱,荧光检测器;德国 Eppendorf 5804R 台式高速冷冻离心机;VORTEX-2 型涡旋混合器(美国 Scientific Industries, Inc.);OA-SYS 48 孔氮吹仪(美国 Organomation Associates, Inc.);梅勒特十万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

**1.2 试药** 受试制剂为浙江京新药业股份有限公司研制生产的盐酸左氧氟沙星片,规格 0.1 g/片(以左氧氟沙星计),批号:1101022;参比制剂为第一三共制药(北京)有限公司生产的左氧氟沙星片,规格 0.1 g/片(以左氧氟沙星计),批号:1008A06。左氧氟沙星化学对照品(批号:130455-201106,含量为 97.1%),内标物盐酸特拉唑嗪化学对照品(批号:100375-201103,含量为 92.3%)均购自中国食品药品检定研究院。

甲醇、乙腈(色谱纯,美国 Fisher);二氯甲烷(色谱纯,天津市凯信化学工业有限公司);磷酸二氢钾(分析纯,天津市大茂化学试剂厂);氢氧化钠(分析纯,北京化工厂);水为本实验室纯水发生器生产;空白血浆由本院输血科提供。

## 2 方法与结果

**2.1 研究对象** 24 名健康男性志愿者,年龄 20~28 岁,体重指数 19~23,试验前经病史询问、体格检查和实验室检查均无异常,非过敏性体质,无喹诺酮类药物过敏史,无影响药物代谢的其他因素,无烟酒嗜好,无吸毒史,试验前 2 周内未服用任何药物,试验前签署知情同意书。

**2.2 试验方案** 试验经医院药物临床试验伦理委员会批准,采用单剂量、双周期、开放、随机、自身交叉对照试验设计。24 名受试者于试验前一天入住 I 期病房,晚 10 时后禁食,试验当日晨抽取空白血后,根据服药时间表空腹口服受试制剂或参比制剂 0.2 g,200 ml 温开水送服。受试者服药后,2 h 内禁水,并在 4 h 和 10 h 后给予统一标准餐。受试者于 0 h(服药前)和服药后 0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、2、2.5、4、6、8、12、24、36 h 于上臂静脉取血一次,每次 4 ml,置于肝素抗凝试管中。3 000 r/min 离心 10 min,取血浆置 -70 °C 保存,待测。周期间清洗期为一周。

**2.3 色谱条件** 色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse XDB C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm);保护柱: XDB

C<sub>18</sub> (4.6 mm × 12.5 mm, 5 μm);流动相: 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH=3.0,含 0.01% 三乙胺)-乙腈(82:18, V/V);流速:1.0 ml/min;柱温: 25 °C;检测波长:激发波长 295 nm,发射波长 490 nm;进样量:10 μl。

### 2.4 溶液的配制

**2.4.1 左氧氟沙星溶液** 精密称取左氧氟沙星对照品 10.37 mg,置 25 ml 棕色容量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,配成浓度为 402.77 μg/ml 的左氧氟沙星母液,4 °C 冰箱内保存备用,临用时用甲醇稀释。

**2.4.2 内标溶液** 精密称取盐酸特拉唑嗪对照品 10.45 mg,置 25 ml 棕色容量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,配成浓度为 385.81 μg/ml 的盐酸特拉唑嗪母液,4 °C 冰箱内保存备用。临用前用 pH 为 7.0 的磷酸缓冲溶液稀释成浓度为 1 543.2 ng/ml 的盐酸特拉唑嗪内标溶液。

**2.4.3 质量控制(QC)溶液** 精密吸取 1 ml 左氧氟沙星母液,用甲醇稀释 5 倍,得浓度为 80.55 μg/ml 的储备液 I。将储备液 I 用不同比例的甲醇稀释成浓度为 21.48、2.237 5、0.559 5 μg/ml 的左氧氟沙星质量控制溶液。分别吸取 20 μl,加空白血浆 100 μl,配制成高、中、低 3 种浓度的 QC 样品(血浆浓度分别为 4 296、447.5、111.9 ng/ml)。

**2.5 血浆样品处理和测定** 吸取血浆样品 100 μl 置 2 ml 离心管中,加入内标溶液 200 μl 和甲醇溶液 20 μl,涡旋 30 s,加入 1 ml 二氯甲烷,涡旋 1 min,4 °C 条件下 14 000 r/min 离心 10 min,弃去水层,吸取下层液于 37 °C 条件下氮气吹干,残渣用 100 μl 流动相复溶,涡旋 1 min,复溶后 4 °C 条件下 14 000 r/min 离心 10 min,取上清液 10 μl 进样分析。

**2.6 方法特异性** 在本实验所采用的色谱条件下,空白血浆、空白血浆加左氧氟沙星(浓度为 447.5 ng/ml)和内标盐酸特拉唑嗪、受试者服药后的血浆样品色谱图,见图 1。左氧氟沙星的保留时间约为 3.1 min,内标物盐酸特拉唑嗪的保留时间约为 4.4 min,由图可见空白血浆中无内源性杂质的干扰,保证样品测定的灵敏度和准确性。

**2.7 标准曲线和定量下限** 配制浓度为 55.95、111.9、223.8、447.5、895、2 685、5 370 ng/ml 的系列血浆标准溶液,按“2.5”项下操作,进样 10 μl,记录色谱图;以左氧氟沙星浓度(X)为横坐标,左氧氟沙星与内标的峰面积比值(Y)为纵坐标,求得直线回归方程为  $Y=2.265X+0.005776$ , $r=0.9999$

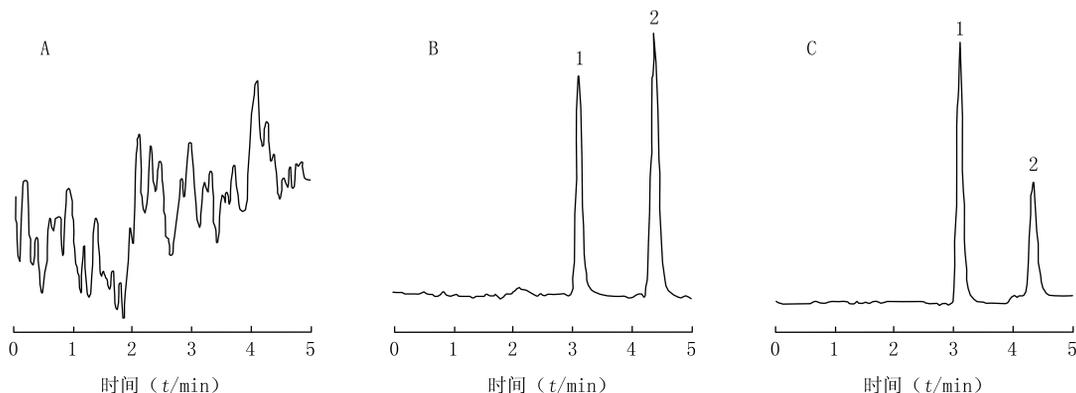


图1 HPLC 色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆加左氧氟沙星(浓度为 447.5 ng/ml)和内标盐酸特拉唑嗪;  
C. 受试者服药后 4 h 血浆样品; 1. 左氧氟沙星; 2. 盐酸特拉唑嗪

( $n=7$ ), 左氧氟沙星线性范围为 55.95~5 370 ng/ml。该方法的定量下限为 55.95 ng/ml。

**2.8 精密度和准确度** 配制低、中、高(左氧氟沙星血浆浓度分别为 111.9、447.5、4 296 ng/ml)3 种浓度的 QC 样品各 5 份,按“2.5”项下操作,分别于日内测定及连续 5 d 测定,计算日内、日间精密度和准确度。结果表明,该方法日内、日间精密度和准确度均符合要求。

**2.9 回收率试验** 取左氧氟沙星(低、中、高)3 种浓度的 QC 溶液各 5 份 20  $\mu$ l 和浓度为 3 858 ng/ml 的盐酸特拉唑嗪溶液 80  $\mu$ l,涡旋 1 min,4  $^{\circ}$ C 条件下 14 000 r/min 离心 10 min,取上清液 10  $\mu$ l 进样分析,得面积 S1。取空白血浆 100  $\mu$ l 15 份,分别加入左氧氟沙星(低、中、高)3 种浓度的 QC 溶液各 5 份 20  $\mu$ l 和浓度为 1 543.2 ng/ml 的盐酸特拉唑嗪内标溶液 200  $\mu$ l 混合,涡旋 30 s,加入 1 ml 二氯甲烷,涡旋 1 min,4  $^{\circ}$ C 下 14 000 r/min 离心 10 min,弃去水层,吸取下层液于 37  $^{\circ}$ C 条件下氮气吹干,残渣用 100  $\mu$ l 流动相复溶,涡旋 1 min,复溶后 4  $^{\circ}$ C 下 14 000 r/min 离心 10 min,取上清液 10  $\mu$ l 进样分析,得面积 S2,以 S2/S1 比值计算左氧氟沙星和内标的提取回收率。3 种浓度下左氧氟沙星的提取回收率分别为(80.02 $\pm$ 10.99)%、(86.39 $\pm$ 1.64)%、(84.59 $\pm$ 3.54)%,盐酸特拉唑嗪的提取回收率为(90.21 $\pm$ 7.88)%,符合生物样品分析要求。

**2.10 稳定性试验** 配制低、中、高(111.9、447.5、4 296 ng/ml)3 种浓度的左氧氟沙星 QC 样品,分别考察左氧氟沙星血浆样品室温放置 12 h、-70  $^{\circ}$ C 保存 15 d、血浆样品处理后 4  $^{\circ}$ C 放置 24 h、血浆样品反复 3 次冻融试验的稳定性,每一浓度制备 5 份。结果显示所有样本测定浓度与理论浓度的相对误差均不超过 $\pm$ 15%,稳定性良好。

## 2.11 药动学

**2.11.1 血药浓度-时间曲线** 24 名受试者口服 0.2 g 受试制剂和参比制剂后左氧氟沙星的平均血药浓度-时间曲线,见图 2。

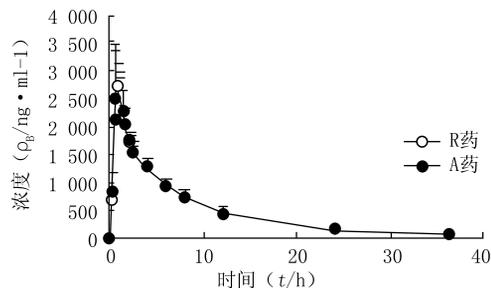


图2 24 名受试者口服受试制剂(A)与参比制剂(R)后左氧氟沙星平均药-时曲线图

**2.11.2 药动学参数** 用 DAS 2.0 软件计算 24 名受试者口服受试制剂和参比制剂后的主要药动学参数,结果见表 1。

表1 主要药动学参数( $\bar{x}\pm s, n=24$ )

药动学参数	受试制剂	参比制剂
$t_{1/2}$ (h)	6.71 $\pm$ 0.95	6.60 $\pm$ 1.00
$t_{max}$ (h)	0.85 $\pm$ 0.30	0.79 $\pm$ 0.28
$\rho_{max}$ (ng/ml)	2 815.48 $\pm$ 513.04	3 185.59 $\pm$ 674.29
$AUC_{0\sim 36}$ (ng $\cdot$ h/ml)	17 157.61 $\pm$ 1 949.07	17 425.06 $\pm$ 2 447.80
$AUC_{0\sim inf}$ (ng $\cdot$ h/ml)	18 324.52 $\pm$ 2 019.41	18 540.41 $\pm$ 2 523.08

**2.12 生物等效性评价** 因素方差分析显示受试制剂和参比制剂单剂口服给药后主要药动学参数制剂间和周期间无显著性差异。受试制剂与参比制剂  $AUC_{0\sim t}$ 、 $AUC_{0\sim \infty}$  和  $\rho_{max}$  对数比值的 90% 置信区间分别为 95.2%~102.5%、96.1%~102.2% (等效

(下转第 440 页)

题,把握这些热点问题,为我国在这些研究方向上产出优秀科研成果提供有力保障,同时也能提高期刊的影响力。因此,在办刊方向和论文收录上,我国期刊一定要能够紧跟当今药理毒理学研究的前沿热点,通过大力报道药理毒理学热点研究成果,为我国的药理毒理学期刊制造影响力和影响范围,提高全球科学家对我国期刊的关注度。此外,从刊载热点论文的期刊分析中,本研究也发现,少部分杂志的影响因子并不是很高,如 BRIT J PHARMACOL、REGUL TOXICOL PHARMACOL,但由于其专业性较强,所以尽管影响因子不高却仍然受到了该专业内科学家的重视,影响范围和影响力并不小,其所发表的论文成为了热点论文,在全球药理毒理学研究领域仍占据了一定地位。而我国的期刊无论中文还是英文,在国际上的影响力均较低,即便是进入 SCI 的期刊其影响因子也普遍偏低<sup>[5]</sup>。因此,我国药理毒理学期刊应紧抓当前药理毒理学研究热点,多报道热点研究相关专题,切实提升我国药理毒理学期刊在国际学术研究中的地位。

综上所述,本研究通过对 ESI 数据库国际药理毒理学研究领域热点论文的分析,认为我国药理毒理学热点论文的篇数排名相对靠前,但国际影响力

欠缺。一方面,还需要我国科研工作者增加药理毒理学热点问题探索的原创性研究与自主性研究,多向国外的相关期刊尤其是影响因子高的期刊投稿;另一方面,对于我国药理毒理学期刊来说,需要进一步加大对药理毒理学热点研究问题的追踪和报道,以进一步提高学术影响力和影响范围。

### 【参考文献】

- [1] 贺德方.中国高影响力论文产出状况的国际比较研究[J].中国软科学,2011,(9):94-99.
- [2] 王 侠,孙晓希,曹洪欣,等.基于 SCIE 的高校科研文献产出评估模式与实证探讨[J].医学综述,2013,19(4):725-727.
- [3] 丁佐奇,王明华.基于 ESI 的植物动物学研究领域热点论文分析及对编辑组稿的启示[J].中国科技期刊研究,2014,25(11):1384-1390.
- [4] 王 辉.关于天然药物研究的现状及发展趋势[J].中国实用医药,2014,9(9):255-256.
- [5] 邓 颖,岳 瑞,郭焕芳,等.SCI 高影响因子的药理学和药理学类期刊的稿源分析[J].中国科技期刊研究,2012,23(1):69-71.

[收稿日期] 2015-05-21 [修回日期] 2015-11-03

[本文编辑] 顾文华

(上接第 430 页)

标准为 80.0%~125.0%)和 82.8%~94.9%(等效标准为 70.0%~143.0%), $t_{max}$  非参数检验结果显示两制剂间无显著性差异,提示受试制剂与参比制剂生物等效。受试制剂的相对生物利用度为 (99.3±9.9)%。

### 3 讨论

文献报道血浆左氧氟沙星的检测多采用 HPLC-UV 法<sup>[1]</sup>、HPLC-荧光法<sup>[2,3]</sup>,定量方法有内标法,也有外标法,血浆样品处理方法有沉淀蛋白法<sup>[3,4]</sup>、液-液萃取法<sup>[2]</sup>等。本实验在上述研究基础上,建立了一种简单、快捷、灵敏的测定方法。以盐酸特拉唑嗪为内标物,与被测物左氧氟沙星保留时间接近,无干扰;选择的液-液萃取方法,左氧氟沙星和内标盐酸特拉唑嗪的提取回收率高,所需样本量少,检测限低;选择 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH=3.0,含 0.01% 三乙胺)-乙腈 (82:18, V/V) 为流动相,被测物与内标物峰形锐,分离度好,检测时间短,5 min 能完成一个样品的检测,大大缩短分析时间。

本研究显示,健康志愿者单剂量口服 200 mg 盐酸左氧氟沙星片后,受试制剂和参比制剂主要药

动力学参数与文献<sup>[1,4]</sup>报道接近。受试制剂与参比制剂的主要药动力学参数相似,两种制剂之间差异无统计学意义,相对生物利用度为 (99.3±9.9)%;本研究结果用 DAS 程序进行双单侧  $t$  检验,判定两种制剂具有生物学等效性。

整个试验过程在医护人员的监护下顺利完成,24 名受试者无 1 例因不良反应而终止试验,无严重不良事件发生。

### 【参考文献】

- [1] 郭小瑞,毕开顺,陈晓辉.盐酸左氧氟沙星胶囊的人体生物等效性研究[J].中国现代应用药学杂志,2007,24(2):130-132.
- [2] Zhou ZL, Yang M, Yu XY, et al. A rapid and simple high-performance liquid chromatography method for the determination of human plasma levofloxacin concentration and its application to bioequivalence studies [J]. Biomed Chromatogr, 2007, 21(10):1045-1051.
- [3] 钱 妍,赵春景,张桂蓉,等.盐酸左氧氟沙星胶囊的人体生物等效性研究 [J].重庆医科大学学报,2007,32(1):59-62.
- [4] 谢林利,陈勇川,唐 敏,等.盐酸左氧氟沙星片生物等效性研究 [J].中国药业,2009,18(16):22-24.

[收稿日期] 2015-02-26 [修回日期] 2015-06-10

[本文编辑] 顾文华