

HPLC法测定肝切除患者体内异甘草酸镁的血药浓度

张宪祥^{1*},高源¹,卢云^{1#},张炳远²,吴力群²(1.青岛大学附属医院黄岛院区普外科,山东青岛 266555;2.青岛大学附属医院肝胆外科,山东青岛 266003)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)17-2342-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.17.13

摘要 目的:建立测定肝切除患者体内门静脉血和外周静脉血中异甘草酸镁浓度的方法,为进一步验证和评估异甘草酸镁的药动学特征及临床合理、安全用药提供参考。方法:选择我院2014年10月—2015年3月施行肝部分切除术的患者31例,于手术开始时给予静脉应用异甘草酸镁,用药后1h抽取患者门静脉血和外周静脉血,采用高效液相色谱-紫外检测法测定患者的血药浓度。结果:异甘草酸镁的保留时间为4.5 min,峰形良好,血浆内源峰对测定无干扰;异甘草酸镁血药浓度在0.55~55.00 mg/L范围内线性关系良好;最低定量浓度为0.55 mg/L。提取回收率为84.7%~87.1%,方法回收率为101.2%~105.4%,日内、日间精密度的RSD均<6%;肝切除患者应用异甘草酸镁1h后门静脉血药浓度明显高于外周静脉血药浓度(接近2倍),而且该浓度不受肝脏原发疾病和基础疾病(如肝硬化)的影响。结论:该测定方法具有操作简单、提取回收率高、准确度和灵敏度高等优点,能满足药动学研究的需要;肝切除患者术中应用异甘草酸镁后,在门静脉血中有较高的血药浓度,有利于其发挥保护肝细胞及改善肝功能的作用,适于在肝脏围术期使用。

关键词 异甘草酸镁;血药浓度;高效液相色谱法;药动学

Determination of Plasma Concentration of Magnesium Isoglycyrrhizinate in Patients Underwent Liver Resection by HPLC

ZHANG Xianxiang¹, GAO Yuan¹, LU Yun¹, ZHANG Bingyuan², WU Liqun²(1.Dept. of General Surgery, the Affiliated Hospital Huangdao Hospital District of Qingdao University, Shandong Qingdao 266555, China; 2.Dept. of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Shandong Qingdao 266003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the determination of plasma concentration of magnesium isoglycyrrhizinate in portal vein and peripheral venous blood of patients underwent liver resection, to further validate and evaluate pharmacokinetic characteristics, rational and safe use of drugs in the clinic. METHODS: 31 patients underwent liver resection in our hospital during Oct. 2014-Mar. 2015 were given magnesium isoglycyrrhizinate intravenously at the beginning of surgery. Portal vein and peripheral venous blood of patients were drawn at 1 hour after drug use, and HPLC-UV detection method was used to determine the plasma concentration of drug. RESULTS: The retention time of isoglycyrrhizinate magnesium was 4.5 min, which showed a good peak shape, and was not interfered with the determination by plasma endogenous peak. The plasma concentration ranged from 0.55 to 55.00 mg/L. The minimum quantitative concentration was 0.55 mg/L. The extraction recoveries were 84.7%-87.1%, and method recoveries were 101.2%-105.4%, and RSDs of intra-day and inter-day were less than 6%. Plasma concentration of magnesium isoglycyrrhizinate in portal vein blood was significantly higher than in peripheral vein blood of patients underwent liver resection (close to 2 times); and plasma concentration was not affected by primary liver diseases and underlying diseases such as cirrhosis. CONCLUSIONS: The method is simple and has high recovery rate of extraction, high accuracy and high sensitivity. It can meet the needs of pharmacokinetic study. After the application of magnesium isoglycyrrhizinate during liver resection, there is higher blood concentration of magnesium isoglycyrrhizinate in portal vein, which is beneficial to protect liver cells and improve liver function. It is suitable during perioperative period of liver.

KEYWORDS Magnesium isoglycyrrhizinate; Plasma concentration; HPLC; Pharmacokinetics

异甘草酸镁是从天然植物甘草中提取的甘草酸经过碱催化异构化后成盐精制而得^[1],是第四代甘草酸制剂,其化学结构

见图1。药效学研究表明,异甘草酸镁对D-氨基半乳糖引起的大鼠急性肝损伤具有防治作用,能预防和控制动物血清转氨

- 的变化[J].护理研究,2013,27(4):339.
- [9] 韩华中,杨俊.含不同类型脂肪乳剂肠外营养液的稳定性及影响因素[J].肠外与肠内营养,2013,20(4):245.
- [10] 陈莲珍,何铁强.肠外营养液规范化配置和稳定性探讨[J].中国药房,2012,23(33):3155.

* 主治医师,硕士。研究方向:普通外科。电话:0532-82919521。E-mail:xianxiang1115@163.com

通信作者:主任医师,博士。研究方向:普通外科。电话:0532-82919521。E-mail:cloudylucn@126.com

- [11] 李荣辉,谭鸿毅,杨双,等.复方氨基酸(19)注射液配制的全静脉营养液稳定性研究及临床应用[J].中南药学,2012,10(3):168.
- [12] 高声传,刘莹,张萍萍,等.全肠外营养液中不溶性微粒的考察[J].解放军药学学报,2014,30(1):52.
- [13] 韦曦,陈秀强,刘丽珍.电解质对全静脉营养液中脂肪乳剂稳定性的影响[J].广西医学,2009,31(9):1256.

(收稿日期:2015-12-30 修回日期:2016-03-28)

(编辑:张元媛)

酶升高,减轻肝细胞变性、坏死及炎症细胞浸润;对四氯化碳(CCl₄)引起大鼠慢性肝损伤和半乳糖胺/弗氏全佐剂(Gal/FCA)诱发大鼠慢性免疫性肝损伤具有治疗效果,能降低血清转氨酶及血浆一氧化氮(NO)水平,减轻肝组织炎症活动度及纤维化程度,减轻肝组织损害^[2-3]。本研究通过测定肝切除患者门静脉血和外周静脉血的异甘草酸镁浓度,建立了一种测定人体异甘草酸镁血药浓度的方法,并比较肝切除患者门静脉血和外周静脉血异甘草酸镁血药浓度的差异,为进一步验证和评估异甘草酸镁的药动学特征及临床合理、安全用药提供参考。

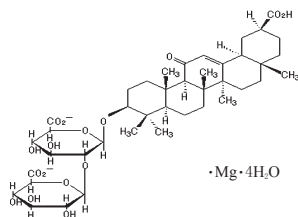


图1 异甘草酸镁化学结构式

Fig 1 Structural formula of magnesium isoglycyrrhizinate

1 材料

1.1 仪器

2690型高效液相色谱系统(HPLC),包括996型二极管阵列检测器(美国Waters公司);Sigma 2-16k型高速冷冻离心机(德国Sigma公司)。

1.2 药品与试剂

异甘草酸镁注射液(江苏正大天晴药业股份有限公司,批准文号:国药准字H20140092,批号:140819104,规格:10 ml:50 mg);异甘草酸镁对照品(江苏正大天晴药业股份有限公司,批号:YGM100303,纯度:99.2%);甲醇、冰醋酸为色谱纯;三乙胺为分析纯;水为纯化水。

1.3 研究对象

选择2014年10月—2015年3月于我院施行肝部分切除术的患者31例,包括原发性肝癌19例、胆石病9例、肝血管瘤1例、肝局灶性结节性增生1例、肝囊肿1例。其中,男性15例,女性16例,男女性别比为1:1.1,平均年龄为(51.8±9.0)岁,平均体质量为(65.5±11.2)kg,平均身高为(165.9±7.8)cm。术前肝功能评估均为Child-Pugh分级标准A级,且术前血清丙氨酸转氨酶(ALT)≤2倍正常值;术前无急性肝炎,心、肺、肾功能不全及其他全身系统疾病;术中最低收缩压≥60 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Venusil MP-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温:室温;流动相: 甲醇-水-冰醋酸-三乙胺(75:25:2:1.5, V/V);流速: 1 ml/min;检测波长: 245 nm;进样量: 40 μl。

2.2 标准溶液的制备

准确称取异甘草酸镁对照品550 mg,置于100 ml量瓶中,加纯化水至刻度,即得5 500 mg/L的异甘草酸镁贮备液,置4℃冰箱中保存;将贮备液用纯化水逐级稀释,制成质量浓度分别为5.5、11.0、27.5、110.0、275.0、550 mg/L的异甘草酸镁标准液。

2.3 血浆样品处理

精密抽取血浆0.5 ml,加入甲醇5 ml,涡旋振荡2 min,以离心半径12 cm、转速18 000 r/min离心15 min(10℃),经微孔滤膜滤过,吸取上清液,置于40℃电热恒温水浴锅内,氮气(N₂)流吹干;残渣精密加入流动相200 μl,涡旋振荡2 min,取40 μl进样。

2.4 血浆标准曲线制备

精密抽取空白血浆0.5 ml,分别加入不同质量浓度的异甘

草酸镁标准液40 μl,使之成质量浓度分别为0.55、1.10、2.75、11.00、27.50、55.00 mg/L的系列血浆样品,按“2.3”项下方法操作,记录色谱图,应用外标法,以测得的样品峰面积(Y)对血浆样品浓度(C)进行直线回归,绘制异甘草酸镁在血浆样品中的标准曲线。

2.5 方法学评价

2.5.1 回收率试验 取空白血浆适量,加入适量异甘草酸镁标准液制成0.55、11.00、55.00 mg/L梯度质量浓度的样品,按“2.3”项下方法操作,将所得的样品峰面积(Y)代入标准曲线方程,将测定值与理论值相比即为方法回收率。另外,用流动相配制相应质量浓度的异甘草酸镁溶液,不经提取直接取40 μl进样,以此为标准,将两组峰面积进行比较,计算提取回收率。

2.5.2 精密度试验 取空白血浆适量,加入异甘草酸镁标准液使之成0.55、11.00、55.00 mg/L梯度质量浓度的样品,按“2.4”项下方法操作,各浓度日内重复测定5次,并连续测定5 d,计算日内、日间精密度。

2.5.3 样品冻存稳定性试验^[4] 按“2.4”项下方法,配制0.55、11.00、55.00 mg/L梯度质量浓度的血浆样品,分别在即时、-20℃冻存1周及1个月后进行测定。

2.6 临床给药方案

所有研究对象于手术开始(切皮)时给予异甘草酸镁注射液150 mg,加入10%葡萄糖注射液250 ml中静脉滴注(糖尿病患者按相应比例给予胰岛素),在0.5~1 h内滴注完。用药后约1 h抽取门静脉血和外周静脉血各4 ml,置于抗凝管中(至门静脉取血前,患者静脉滴注量控制在500~1 000 ml,未输入胶体液)。以转速3 000 r/min离心10 min,分取血浆,保存于-20℃冰箱中待测。

2.7 统计学方法

所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 10.0软件对数据进行统计分析,采用t检验及相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 色谱行为

研究结果显示,异甘草酸镁的保留时间为4.5 min,峰形良好,血浆内源峰对测定无干扰。异甘草酸镁标准品、异甘草酸镁血浆标准品及肝切除患者静脉滴注异甘草酸镁后的血浆样品色谱图见图2。

3.2 线性关系及最低定量浓度

血浆中异甘草酸镁浓度线性关系良好,加权直线回归方程(权重因子为1/C²,C为血药浓度)为: $Y = 23.23C - 1.219$ ($r = 0.9910$)。结果表明,异甘草酸镁血药浓度在0.55~55.00 mg/L范围内线性关系良好。最低定量浓度为0.55 mg/L。

3.3 回收率、精密度及样品冻存稳定性试验结果

高、中、低梯度浓度的方法回收率为98.7%~108.2%,提取回收率均>81%(见表1)。高、中、低梯度浓度的日内精密度RSD均<5.8%,日间精密度RSD均<5.9%(见表2)。不同浓度的血浆样品于-20℃冻存1个月及冻融2次均未见降解。

3.4 肝切除患者异甘草酸镁血药浓度

经研究显示,肝切除患者在静脉滴注异甘草酸镁1 h后门静脉血和外周静脉血药浓度比较,差异有统计学意义。门静脉血药浓度明显高于外周静脉血药浓度(见表3);术前血清转氨酶与门静脉血和外周静脉血中异甘草酸镁无相关性($P > 0.05$)(详见表4);在有无肝癌、有无肝硬化的组间比较,门静脉血药浓度均明显高于外周静脉血药浓度,差异有统计学意义($P < 0.05$)(见表5、6)。表明异甘草酸镁在门静脉和外周静脉的血药浓度与患者的术前转氨酶水平、术前有无肝硬化及原发疾病情况均没有关系。

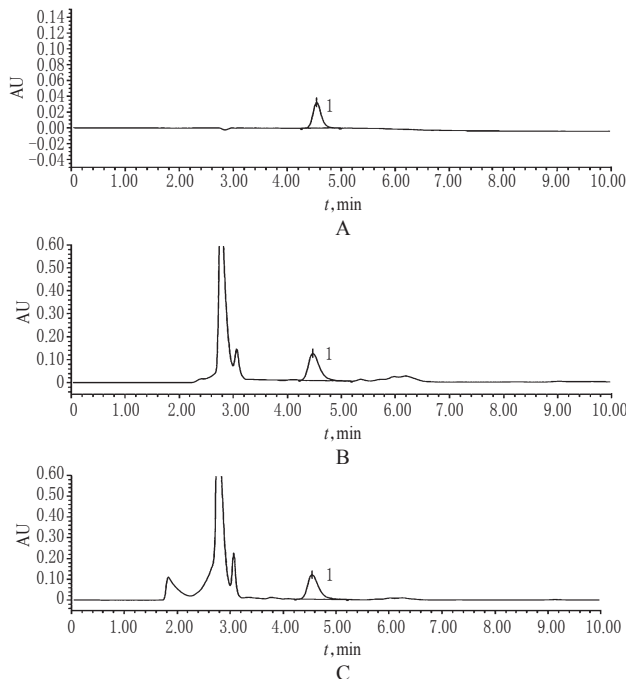


图2 异甘草酸镁高效液相色谱图

A.异甘草酸镁标准品;B.异甘草酸镁血浆标准品;C.肝切除患者血浆样品;1.异甘草酸镁

Fig 2 HPLC chromatograms of magnesium isoglycyrrhizinate

A.magnesium isoglycyrrhizinate standard control;B.magnesium isoglycyrrhizinate plasma standard samples; C.magnesium isoglycyrrhizinate plasma samples of patients with liver resection; 1.magnesium isoglycyrrhizinate

表1 回收率试验结果(n=3)

Tab 1 Results of recovery test(n=3)

样品浓度,mg/L	提取回收率,%		方法回收率,%	
	$\bar{x} \pm s$	RSD	$\bar{x} \pm s$	RSD
0.55	84.7 ± 3.3	3.24	101.2 ± 2.5	3.11
11.00	86.5 ± 2.8	4.68	103.3 ± 3.1	4.21
55.00	87.1 ± 3.4	5.31	105.4 ± 2.8	5.29

表2 精密度的试验结果(n=3)

Tab 2 Results of precision test(n=3)

样品浓度,mg/L	日内精密度		日间精密度	
	$\bar{x} \pm s, \text{mg/L}$	RSD, %	$\bar{x} \pm s, \text{mg/L}$	RSD, %
0.55	0.53 ± 0.03	4.32	0.54 ± 0.01	4.54
11.00	9.99 ± 0.05	5.79	10.15 ± 0.16	5.84
55.00	54.9 ± 1.4	5.31	54.2 ± 1.8	5.26

表3 门静脉血和外周静脉血中异甘草酸镁血药浓度比较(n=31, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Comparison of plasma concentration of magnesium isoglycyrrhizinate in portal vein and peripheral venous blood(n=31, $\bar{x} \pm s$)

标本	浓度,mg/L	t	P	r	P
外周静脉血	2.98 ± 1.46	4.797	0.000	0.107	0.566
门静脉血	4.99 ± 1.97				

4 讨论

异甘草酸镁的化学结构中存在着共轭体系,在紫外光谱区有吸收,最大吸收波长为250 nm。因此,采用HPLC-紫外检测法可以测定肝切除患者门静脉血和外周静脉血异甘草酸镁的血药浓度。本研究采用外标法测定血浆中异甘草酸镁浓

表4 术前血清转氨酶与门静脉血和外周静脉血中异甘草酸镁浓度的相关性

Tab 4 Relationship of preoperative serum transaminases with the concentration of magnesium isoglycyrrhizinate in portal vein and peripheral venous blood

项目	门静脉血		外周静脉血	
	r	P	r	P
ALT	-0.207	0.265	-0.093	0.617
天冬氨酸转氨酶(AST)	-0.159	0.392	-0.005	0.980

表5 术前有肝硬化的患者间与门静脉血和外周静脉血中异甘草酸镁浓度的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 5 Comparison of preoperative hepatic cirrhosis with the concentration of magnesium isoglycyrrhizinate in portal vein and peripheral venous blood($\bar{x} \pm s$)

项目	无肝硬化(n=17)	有肝硬化(n=14)	t	P
	门静脉血药浓度,mg/L	4.86 ± 1.73		
外周静脉血药浓度,mg/L	3.11 ± 1.62	2.83 ± 1.29	-0.519	0.608
t	3.431	3.302		
P	0.003	0.006		

表6 肝癌组与非肝癌组外周静脉血和门静脉血中异甘草酸镁浓度比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 6 Comparison of concentration of magnesium isoglycyrrhizinate in portal vein and peripheral venous blood of HCC and non-HCC($\bar{x} \pm s$)

项目	肝癌组(n=19)	非肝癌组(n=12)	t	P
门静脉血药浓度,mg/L	4.96 ± 2.06	5.02 ± 1.90	-0.081	0.936
外周静脉血药浓度,mg/L	2.73 ± 1.19	3.38 ± 1.80	-1.214	0.234
t	4.133	2.437		
P	0.001	0.033		

度,所选条件能完全分离血浆中的杂质和药物,峰形好,出峰时间在5 min左右,血样用甲醇沉淀血浆中的蛋白,N₂流吹干,用流动相复溶后,直接进样^[5-6]。该方法操作简便,提取回收率高,在样品成分复杂的条件下,HPLC的分离效果好,杂质干扰少,测定结果准确可靠,相对误差小;而紫外分光光度法、比色法等容易受样品中其他成分的干扰,故有较大偏差;而且,本方法的线性范围宽(0.55~55.00 mg/L),能满足药动力学研究的需要。本研究也存在不足之处,例如异甘草酸镁在血液中的代谢产物可能会对药物浓度测定有一定的干扰,在研究过程中并没有采取特殊的办法去避免代谢产物的干扰。

张喜全等^[7]报道的动物实验表明,异甘草酸镁吸收入血后主要分布在肝脏,给药1 h后肝组织药物浓度与血浆药物浓度几乎相同,其次为肠、肺、睾丸、肾及胃中分布极低,脑、心、脂肪、骨骼肌、脾及卵巢中药物浓度均低于检测限;给药3 h及7 h,血浆药物浓度迅速降低,是给药后1 h的12.3%和1.9%,而肝组织中的药物浓度下降缓慢,分别为给药1 h后的78.8%和77.3%,其他各主要组织/器官中均极低,基本无法检测出。表明肝是异甘草酸镁的特异性靶器官,对其他组织/器官亲和力较低。因此,当其在肝脏发挥治疗作用时,较少引起其他系统/器官的不良反应。

van Rossum TG等^[8]研究发现,静脉注射的甘草酸首先在肝细胞内由溶酶体中的β-D-葡萄糖苷酶代谢成3-单-葡萄糖苷甘草次酸,后者随胆汁排入肠内,由肠内细菌代谢成甘草次酸,再吸收入血,发挥药理作用并在肝脏中进一步代谢。本研究显示,肝切除患者在麻醉诱导期静脉应用异甘草酸镁1 h后,门静脉血药浓度明显高于外周静脉血药浓度(接近2倍),而且该浓度不受肝脏原发疾病和基础疾病(如肝硬化)的影

我院2011—2014年化脓性脑膜炎患者脑脊液病原菌分布及耐药性分析

拜 年^{1*},贾樱樱²,高玉娟^{1#}(1.新疆医科大学第一附属医院药学部,乌鲁木齐 830054;2.新疆医科大学第二附属医院药剂科,乌鲁木齐 830063)

中图分类号 R978.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)17-2345-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.17.14

摘要 目的:分析我院化脓性脑膜炎病原菌的分布及耐药特点,为抗菌药物的合理使用提供参考。方法:对我院2011年1月1日—2014年12月31日送检的4 255例化脓性脑膜炎住院患者脑脊液病原菌进行培养、鉴定和药敏试验。结果:共分离出834株病原菌,检出阳性率为19.6%,包括革兰氏阳性菌576株,占69.1%;革兰氏阴性菌255株,占30.6%;真菌3株,占0.4%。革兰氏阳性菌排前3位的是凝固酶阴性葡萄球菌(436株)、金黄色葡萄球菌(56株)和肠球菌属(29株);革兰氏阴性菌排前3位的是肺炎克雷伯菌(46株)、鲍曼不动杆菌(38株)和大肠埃希菌(31株)。病原菌分布科室前3位是神经外科(506株)、重症监护病房(169株)和呼吸重症科(64株)。药敏试验结果显示,葡萄球菌和肠球菌属对万古霉素、替考拉宁和米诺环素未发现耐药菌株;非发酵革兰氏阴性杆菌对米诺环素耐药率较低。结论:我院化脓性脑膜炎患者脑脊液细菌感染病原菌检出率以革兰氏阳性菌为主,各种致病菌耐药状况严重,临床应根据药敏情况合理选择抗菌药物。

关键词 化脓性脑膜炎;脑脊液;病原菌分布;耐药性

Analysis of Pathogen Distribution and Drug Resistance of Cerebrospinal Fluid in Pyogenic Encephalitis Patients in Our Hospital during 2011-2014

BAI Nian¹, JIA Yingying², GAO Yujuan¹(1.Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2.Dept. of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830063, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To analyze the distribution and drug resistance of pyogenic encephalitis in our hospital, and to provide reference for rational use of antibiotics. METHODS: The cerebrospinal fluid pathogen of 4 255 patients with pyogenic encephalitis in our hospital during Jan. 1st, 2011-Dec. 31st, 2014 were cultured and identified, and drug sensitivity test was conducted. RESULTS: A total of 834 pathogens were isolated with positive detection rate of 19.6%, including 576 strains of gram-positive bacteria, accounting for 69.1%; 255 strains of gram-negative bacteria, accounting for 30.6%; 3 strains of fungi, accounting for 0.4%. Top 3 gram-positive bacteria were *Coagulase-negative staphylococci* (436 strains), *Staphylococcus aureus* (56 strains) and *Enterococcus* (29 strains). Top 3 gram-negative bacteria were *Klebsiella pneumoniae* (46 strains), *Acinetobacter baumannii* (38 strains) and *Escherichia coli* (31 strains). Top 3 departments were neurosurgery department (506 strains), ICU (169 strains) and severe respiratory disease department (64 strains). Results of drug sensitivity test showed that no drug-resistant *Staphylococcus* and *Enterococcus* strains to vancomycin, teicoplanin and minocycline was found; nonfermenting Gram-negative bacilli showed low resistant to minocycline. CONCLUSIONS: Gram-positive bacteria dominates the detection rate of cerebrospinal fluid of pyogenic encephalitis patients; drug resistance of various pathogens is serious and clinicians should choose antibiotics based on drug sensitivity.

KEYWORDS Pyogenic encephalitis; Cerebrospinal fluid; Pathogen distribution; Drug resistance

响。结果提示,肝切除患者在术中静脉应用异甘草酸镁后,该药能够迅速地向肝脏积聚、分布,在门静脉血中保持较高的血药浓度,进一步间接地验证了该药的高度肝脏靶向性,从而有利于其发挥保护肝细胞及改善肝功能的作用,适于在肝脏围术期使用。

参考文献

- [1] 王丽丽,黄熙,张莉.甘草甜素药代动力学研究[J].世界华人消化杂志,2000,8(5):567.
- [2] 王佩,吴锡铭.异甘草酸镁对大鼠四氯化碳慢性肝损伤的治疗作用[J].中国新药与临床杂志,2004,23(12):833.
- [3] 欧明洪.异甘草酸镁药理与临床研究进展[J].中国药业,

* 主管药师,硕士。研究方向:临床药学。电话:0991-4362939。E-mail:357006530@qq.com

通信作者:主管药师。研究方向:临床药学。电话:0991-4362634。E-mail:83357446@qq.com

2010,19(15):83.

- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2000年版.北京:化学工业出版社,2000:附录XIX B193.
- [5] 马广慈.药物分析方法与应用[M].北京:科学出版社,2000:982.
- [6] 孙黎,李肖玲,沈金芳.高效液相色谱法测定异甘草酸镁血药浓度[J].中国医院药学杂志,2005,25(2):138.
- [7] 张喜全,夏春光,万顺之.天晴甘美[J].中国新药杂志,2006,15(16):1 409.
- [8] van Rossum TG, Vulto AG, de Man RA, et al. Review article: glycyrrhizin as a potential treatment for chronic hepatitis C[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 1998, 12(3): 199.

(收稿日期:2015-08-12 修回日期:2015-10-13)

(编辑:李 劲)