骨科学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000771

HPLC法检测兔胫骨及骨髓中的左氧氟沙星

王 琦[1],黄 伟[1],梁 熙[1],胡 宁[1],周 年[1],赵 辰[1],孙泽绪[1],于 超[2],张 晶[2],夏春勇[2]
(1. 重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016;2. 重庆医科大学生命科学研究院,重庆 400016)

【摘 要】**目的**:建立反相高效液相色谱仪(high performance liquid chromatography,HPLC)检测兔胫骨及骨髓中左氧氟沙星的方法,用于评价纳米微球载左氧氟沙星可控降解骨修复材料中的左氧氟沙星在兔局部骨组织及骨髓中的缓释特点。**方法**:分别将不同浓度左氧氟沙星加入空白胫骨、骨髓,以环丙沙星作为内标,采用 Sepax BR-C18(250 mm×4.6 mm 5 μm)色谱柱,流动相为:0.01 mol/L 磷酸二氢钾—甲醇—0.5 mol/L 四丁基溴化铵(75:25:4),流速:1.0 ml/min,柱温:40 ℃,紫外检测波长 290 nm。评价指标为:专属性、检测线、定量线、回收率、稳定性、精密度。**结果**:当胫骨中的左氧氟沙星浓度在 0.05 μg/ml~300 μg/ml 范围内线性关系良好(r=0.999);低、中、高 3 个浓度的方法回收率分别为(108.81±1.14)%、(96.85±3.64)%、(114.38±0.27)%;提取回收率分别为(110.92±0.42)%、(110.48±0.97)%、(80.39±0.08)%;日内精密度的 RSD 分别为 1.30%、0.23%、5.51%;日间精密度的 RSD 分别为:7.09%、3.71%、2.55%,样品稳定性良好。骨髓中的左氧氟沙星浓度在 0.01 μg/ml~300 μg/ml 范围内线性关系良好(r=0.999);低、中、高 3 个浓度的方法回收率分别为(91.67±3.73)%、(101.77±0.26)%、(87.72±0.72)%;提取回收率分别为(102.97±0.81)%、(87.00±0.62)%、(99.97±1.15)%;日内精密度的 RSD 分别为 1.49%、1.06%、0.11%;日间精密度的 RSD 分别为:5.61%、2.56%、2.37%,样品稳定性良好。**结论**:本方法操作简便、灵敏、稳定、回收率高,适用于检测新型载药骨修复材料中的左氧氟沙星在兔局部骨组织中的分布。

【关键词】高效液相色谱法;左氧氟沙星;胫骨;骨髓;兔
【中图分类号】R681.21;R917.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-04-19

作者介绍:王 琦,Email:wangqichongyi@163.com,
研究方向:骨关节外科。
通信作者:黄 伟,Email:huangwei68@263.net。
基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(编号:2013AA032203);重庆市研究生科研创新基金资助项目(编号:CYS14121)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150910.1839.028.html (2015-09-10)

[7] Hiippala ST,Strid LJ,Wennerstrand MI,et al.Tranexamic acid radically decreases blood loss and transfusions associated with total knee arthroplasty[J].Anesth Analg,1997,84(4):839-844.
[8] Kalairajah Y,Simpson D,Cossey AJ,et al.Spriggins AJ Blood loss after total knee replacement:effects of computer-assisted surgery[J].J Bone Joint Surg Br,2005,87(11):1480-1482.
[9] Krohn CD,Sorensen R,Lange JE,et al.Tranexamic acid given into the wound reduces postoperative blood loss by half in major orthopaedic surgery[J].Eur J Surg,2003(588):57-61.
[10] Jansen AJ,Andreica S,Claeys M,et al.Use of tranexamic acid for an effective blood conservation strategy after total knee arthroplasty[J].Br J Anaesth,1999,83(4):596-601.
[11] Tanaka N,Sakahashi H,Sato E,et al.Timing of the administration of tranexamic acid for maximum reduction in blood loss in arthroplasty of the knee[J].J Bone Joint Surg Br,2001,83(5):702-705.
[12] Irisson E,Hémon Y,Pauly V,et al.Tranexamic acid reduces blood loss and financial cost in primary total hip and knee replacement surgery[J].Orthop Traumatol Surg Res,2012,98(5):477-483.
[13] Abrishami A,Chung F,Wong J.Topical application of antifibrinolytic drugs for on-pump,surgery:a systematic review and meta-analysis[J].Can J Anaesth,2009,56(3):202-212.
[14] Ishida K,Matsumoto T,Tsumura N,et al.Mid-term outcomes of computer-assisted total knee arthroplasty[J].Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc,2011,19(7):1107-1112.
[15] Zufferey P,Merquiol F,Laporte S,et al.Do antifibrinolytics reduce allogeneic blood transfusion in orthopedic surgery?[J].Anesthesiology,2006,105(5):1034-1046.
[16] Onodera T,Majima T,Sawaquchi N,et al.Risk of deep venous thrombosis in drain clamping with tranexamic acid and carbazochrome sodium sulfonate hydrate in total knee arthroplasty[J].J Arthroplasty,2012,27(1):105-108.
[17] Reikvam H,Steien E,Hauge B,et al.Thrombelastography[J].Transfus Apher Sci,2009,40(2):119-123.

(责任编辑:关蕴良)

Determination of levofloxacin concentration in rabbit tibia and bone marrow by HPLC

Wang Qi[1], *Huang Wei*[1], *Liang Xi*[1], *Hu Ning*[1], *Zhou Nian*[1], *Zhao Chen*[1], *Sun Zexu*[1], *Yu Chao*[2], *Zhang Jing*[2], *Xia Chunyong*[2]

(*1. Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*; *2. Institute of Life Science, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of levofloxacin in the rabbit tibia and bone morrow; to evaluate the release characteristics of levofloxacin in nanoparticles contained levofloxacin degradation-controllable bone repair materials in rabbit local bone tissue and bone marrow. ***Methods***: Different concentrations of levofloxacin were added in blank tibia and bone marrow respectively. Ciprofloxacin was used as an internal standard. Sepax BR-C18 (250 mm × 4.6 mm 5 μm) column was employed; the mobile phase was: 0.01 mol/L potassium dihydrogen phosphate-methanol-0.5 mol/L tetrabutylammonium bromide (75:25:4); flow rate was 1.0 ml/min; column temperature was 40 ℃; detection wavelength was 290 nm. Evaluation indexes were linear range, recoveries, extraction recoveries, intra-day precision, inter-day precision, sample stability and accuracy. ***Results***: When the tibia of levofloxacin concentrations in 0.05-300 μg/ml, good linear relationship was achieved (r=0.999); low, medium and high concentrations of three recoveries were (108.81 ± 1.14)%, (96.85 ± 3.64)%, (114.38 ± 0.27)%; the extraction re coveries were (110.92 ± 0.42)%, (110.48 ± 0.97)%, (80.39 ± 0.08)%; intra-day precision RSD were 1.30%, 0.23%, 5.51%; inter-day precision RSD were as follows: 7.09%, 3.71%, 2.55%, a good sample stability. When the bone marrow levofloxacin concentrations in 0.05-300 μg/ml, a good linear relationship was achieved (r=0.999); low, medium and high concentrations of three recoveries were (91.67 ± 3.73)%, (101.77 ± 0.26)%, (87.72 ± 0.72)%; the extraction recoveries were (102.97 ± 0.81)%, (87.00 ± 0.62)%, (99.97 ± 1.15)%; intra-day precision RSD were 1.49%, 1.06%, 0.11%; inter-day recision RSD were as follows: 5.61%, 2.56%, 2.37%, a good sample stability. ***Conclusion***: With the advantages of simple, sensitive, stable, high recovery rate, this method is applicable to the detection of distribution of levofloxacin in rabbit local bone tissue in a new bone repair materials.

【Key words】high performance liquid chromatography (HPLC); levofloxacin; tibia; bone marrow; rabbit

左氧氟沙星(Levofloxacin)是第 3 代喹诺酮类药物，为氧氟沙星的光学活性 S(-)异构体，其作用机制为抑制细菌的Ⅱ型拓扑异构酶，干扰 DNA 复制、转录过程[1]，其体外抗菌活性约为氧氟沙星的 2 倍[2]。左氧氟沙星对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌具有广谱抗菌作用[3]，且不良反应小，因而广泛应用于敏感菌引起的皮肤软组织、呼吸系统、泌尿系统和消化系统等重度感染[4-5]。慢性骨髓炎是骨与骨髓的慢性感染[6]，是临床上的常见病，其致病菌主要为金黄色葡萄球菌以及革兰氏阴性杆菌[7]。随着交通事故的增加，创伤后骨髓炎患者在增加，另外糖尿病、免疫缺陷患者的增多，耐药菌的产生、多种病原体混合感染亦使慢性骨髓炎的发病率上升[8-9]，临床上治疗十分棘手。由于左氧氟沙星具有良好的药效和药代动力学性质，选择左氧氟沙星治疗慢性骨髓炎是一种很好的选择。

由国家高技术研究发展计划(863 计划)项目资助，课题组将纳米微球吸附左氧氟沙星与壳聚糖等多种材料复合，得到一种具有药物缓释、材料可控降解的新型骨修复材料，用于治疗慢性骨髓炎。为了客观评价新型骨修复材料纳米微球中的左氧氟沙星在动物体内局部骨组织的时间、空间分布，选用合适的方法对骨组织中的左氧氟沙星精确定量，显得尤为重要。目前，左氧氟沙星的常用检测方法有高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)[10]、紫外分光光度法[11]、微生物法[12]，许多研究者检测了血清或血浆中的左氧氟沙星，而骨及骨髓中的药物检测方法鲜有报道，本文的目的是建立 HPLC 法检测动物骨及骨髓中的左氧氟沙星，以评价新型骨修复材料中的左氧氟沙星在局部组织中的代谢特点。

1 实验材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪(LC-2010AHT，日本岛津公司，包括CBM-20A 系统控制器，Shimadzu CLASS-VP 色谱工作站)；超声波清洗器(KQ2200B 昆山市超声仪器有限公司)；高速离心机(sigma D-37520 美国)；循环恒温水浴锅(岛津公司 TB-85 日本)；组织匀浆机(IKA，T10 basic S25 德国)；氮气干燥仪(River Road west Berlin MA 01301 美国)；Elix10 超纯水净化系统

(Milli-QGradientA10 美国)。XS-105 十万分之一电子天平(METTLER TOLEDO 瑞士)。

1.2 试剂

左氧氟沙星标准品(含量:≥98 %,中国食品药品检定研究院,批号:130455-201106);环丙沙星对照品(含量:≥98%,批号:17850-5G-F,sigma-Aldrich 美国);四丁基溴化铵(分析纯,批号:20141103;国药集团生产);空白兔胫骨、骨髓(重庆医科大学动物实验中心提供);水为双蒸水;甲醇为色谱纯;其余试剂均为分析纯。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为:Sepax BR-C18(250 mm×4.6 mm 5 μm),流动相为:0.01 mol/L 磷酸二氢钾—甲醇—0.5 mol/L 四丁基溴化铵(75:25:4),流速:1.0 ml/min,柱温:40 ℃,紫外检测波长 290 nm。进样量:10 μl。

2.2 溶液配制

2.2.1 左氧氟沙星标准品配制 精密称取 15.00 mg 左氧氟沙星的标准品,于甲醇中溶解,转移至 5 ml 容量瓶中定量即可得到标准溶液(3 mg/ml),再进行倍比稀释,将标准品分 14 个浓度梯度:300、200、100、50、25、10、5、2.5、1、0.5、0.25、0.1、0.05、0.01 μg/ml。

2.2.2 环丙沙星溶液的配制 取环丙沙星 25.04 mg 精确称定,置于 25 ml 的容量瓶中,用甲醇溶液定容至刻度,再稀释成浓度为 500.8 μg/ml 的内标工作液。置冰箱 4 ℃冷藏保存,备用。

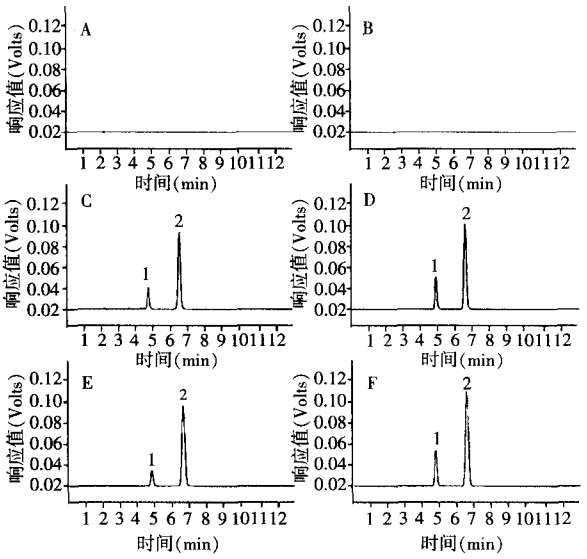
2.3 样品处理

2.3.1 胫骨处理 选新西兰健康成年大白兔,雌雄不限,体质量 2.2~2.4 kg 之间,将兔处死后,取出空白胫骨,清洗干净,剪切成 1 cm 柱状,冷冻、干燥 10 h,取出后研磨成粉末。称取粉末 200 mg,按 100 mg:1 ml 的比例加入 PBS 缓冲液中,摇匀,混均,置于 4 ℃冰箱浸泡 24 h。取 100 μl 空白上清液,加入 10 μl 不同浓度的左氧氟沙星和 10 μl 内标环丙沙星,涡旋混匀 5 min,加入 800 μl 二氯甲烷,涡旋 5 min,8 000 r/min 离心 5 min。取上清液 750 μl,50 ℃水浴下氮气吹干,加入 100 μl 流动相溶解,超声、涡旋、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 10 μl 进样分析。每个浓度分析 3 次。

2.3.2 骨髓处理 选新西兰健康成年大白兔,雌雄不限,体质量 2.2~2.4 kg 之间,将兔处死后,取兔的骨髓,置于 EP 管中,精确称取 200 mg,按 100 mg:1 ml 加入 PBS,匀浆机匀浆,漩涡震荡 5 min,待充分混匀后,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,置于-20 ℃备用。取 100 μl 空白上清液,加入 10 μl 不同浓度的左氧氟沙星和 10 μl 内标环丙沙星,涡旋混匀 5 min,加入 800 μl 二氯甲烷,涡旋 5 min,8 000 r/min 离心 5 min,取上清液 750 μl,50 ℃水浴下氮气吹干,加入 100 μl 流动相溶解,超声、涡旋、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 10 μl 进样分析。每个浓度分析 3 次。

2.4 方法的专属性

分别取空白胫骨及骨髓,对照品溶液及加样血浆,按“2.2”项下方法处理,按“2.1”项下色谱条件测定,结果左氧氟沙星和内标环丙沙星的保留时间分别为 4.84 min 和 6.74 min,胫骨及骨髓中内源性杂质对样品的测定无干扰,两者峰形良好,分离完全。各样品色谱图见图 1。



注:A. 胫骨空白;B. 骨髓空白;C. 胫骨 + 左氧氟沙星 + 环丙沙星;D. 骨髓 + 左氧氟沙星 + 环丙沙星;E. 胫骨中药物实测;F. 骨髓中药物实测;1. 左氧氟沙星;2. 内标环丙沙星

图 1 各组色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of each group

2.5 数据分析

使用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,线性系数进行 t 检验,动物实验组间比较采用两独立样本 t 检验,检验水准 α=0.05。相对标准偏差(RSD)=标准偏差(SD)/计算结果的算术平均值(X)×100%。

2.6 线性与定量下线

将上述 14 个不同浓度梯度的标准工作液按 2.3 项下方法处理,进样分析和处理数据,记录色谱峰面积,标准曲线以左氧氟沙星与内标环丙沙星峰面积的比值(Y)为纵坐标,左氧氟沙星的浓度(X)为横坐标,用加权最小二乘法($W=1/C^2$)进行回归计算,可得胫骨的直线回归方程:Y=0.033X+0.007,r=1(n=3,t=221.202,P=0.000),最低定量浓度 0.05 μg/ml;骨髓的直线回归方程为:Y=0.026+0.036X,r=0.999(n=3,t=66.594,P=0.000),最低定量浓度为 0.01 μg/ml。

2.7 回收率实验

分别制备左氧氟沙星浓度为 0.25、5、200 μg/ml 的胫骨、骨髓样品各 5 份,作为质控样品,按“2.3”项下方法处理,进样检测。样品实测浓度与理论浓度的比值为方法回收率,质控样品峰面积与水溶液峰面积比值为绝对回收率。胫骨的方

法回收率、提取回收率(表 1),骨髓的方法回收率、提取回收率(表 2)。

表 1 胫骨的方法回收率($\bar{x}\pm s$,n=5)、提取回收率($\bar{x}\pm s$,n=3)

Tab.1 Method recoveries of tibia($\bar{x}\pm s$,n=5), extraction recoveries of tibia($\bar{x}\pm s$,n=3)

浓度(μg/ml)	方法回收率(%)	*RSD*(%)	提取回收率(%)	*RSD*(%)
0.25	108.81 ± 1.14	1.30	110.92 ± 0.42	0.38
5	96.85 ± 3.64	3.76	110.48 ± 0.97	0.87
200	114.38 ± 0.27	0.23	80.39 ± 0.08	0.10

表 2 骨髓的方法回收率($\bar{x}\pm s$,n=5)、提取回收率($\bar{x}\pm s$,n=5)

Tab.2 Method recoveries of bone marrow($\bar{x}\pm s$,n=5), Extraction recoveries of bone marrow($\bar{x}\pm s$,n=5)

浓度(μg/ml)	方法回收率(%)	*RSD*(%)	提取回收率(%)	*RSD*(%)
0.25	91.67 ± 3.73	4.07	102.97 ± 0.81	0.78
5	101.77 ± 0.26	0.25	87.00 ± 0.62	0.72
200	87.72 ± 0.72	0.82	99.97 ± 1.15	1.15

2.8 精密度实验

用空白胫骨及骨髓分别制备左氧氟沙星浓度为 0.25、5、200 μg/ml 的对照品溶液各 5 份,按"2.3"项下方法处理,分别检测胫骨及骨髓样品,每次进样 10 μl,计算日内精密度。同样的方法每日测定 1 次,连续测定 5 d,计算日间精密度。胫骨的精密度结果(表 3),骨髓的结果(表 4)。

表 3 胫骨的日内日间精密度($\bar{x}\pm s$,n=5)

Tab.3 Inter-day precisions and intra-day precisions of tibia ($\bar{x}\pm s$,n=5)

浓度(μg/ml)	日内差异		日间差异	
	实测浓度(μg/ml)	*RSD*(%)	实测浓度(μg/ml)	*RSD*(%)
0.25	0.27 ± 0.01	1.30	0.25 ± 0.02	7.09
5	5.72 ± 0.01	0.23	5.48 ± 0.20	3.71
200	168.93 ± 9.30	5.51	181.53 ± 4.62	2.55

表 4 骨髓的日内日间精密度($\bar{x}\pm s$,n=5)

Tab.4 Inter-day precisions and intra-day precisions of bone marrow($\bar{x}\pm s$,n=5)

浓度(μg/ml)	日内差异		日间差异	
	实测浓度(μg/ml)	*RSD*(%)	实测浓度(μg/ml)	*RSD*(%)
0.25	0.201 ± 0.01	1.49	0.22 ± 0.01	5.61
5	5.71 ± 0.06	1.06	5.53 ± 0.14	2.56
200	203.67 ± 0.21	0.11	186.26 ± 4.41	2.37

2.9 稳定性实验

在室温和-20 ℃的条件下反复多次考察冻融稳定性。胫骨及骨髓的高、中、低 3 个浓度(0.25 μg/ml,5 μg/ml,200 μg/ml)的回收率(表 5 及表 6)。

表 5 胫骨样品的稳定性($\bar{x}\pm s$,n=3)

Tab.5 Stability of the tibia samples($\bar{x}\pm s$,n=3)

浓度(μg/ml)	回收率(%)	*RSD*(%)
0.25	102.63 ± 5.24	5.10
5	97.94 ± 5.78	5.90
200	87.31 ± 2.94	3.36

表 6 骨髓样品的稳定性($\bar{x}\pm s$,n=3)

Tab.6 Stability of the bone marrow samples($\bar{x}\pm s$,n=3)

浓度(μg/ml)	回收率(%)	*RSD*(%)
0.25	90.21 ± 3.60	4.00
5	110.76 ± 2.73	2.47
200	94.96 ± 1.40	1.48

2.10 实际样品测定

选用新西兰兔 6 只,雌雄不限,体质量为 2.2~2.4 kg。实验组 3 只,于右侧胫骨平台下端 1 cm 处,钻直径 2 mm 的圆孔,立即用骨蜡封闭,将 0.1 ml 浓度为 500 mg/ml 的左氧氟沙星注入骨髓腔,注入总量为 50 mg,逐层缝合。对照组 3 只,注入生理盐水。注入药物后 2 h,将兔采用过量麻药法处死,取出右侧胫骨及骨髓,将胫骨及骨髓截取长度为 2 cm,按"2.3"样品处理方法,随后进样检测。实际测定:胫骨中左氧氟沙星的浓度为(2.63 ± 0.66) μg/ml。骨髓中左氧氟沙星的浓度为(10.54 ± 1.01) μg/ml,均检测到左氧氟沙星,且骨髓中的左氧氟沙星浓度高于胫骨中的左氧氟沙星(P=0.000)。

3 讨 论

3.1 流动相的选择

本研究在预实验阶段是用含 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液的水相与甲醇为流动相,缓冲液与有机溶剂的比例对保留时间和分离度有影响。本实验分别考察了水相-甲醇(75:25,65:35,60:40,V/V)3 个比例,在实际操作中发现有杂质峰未与药物峰完全分离,且峰形不佳,随后在流动相中加入四丁基溴化铵后峰形明显改善。结果 0.01 mol/L 磷酸二氢钾—甲醇—0.5 mol/L 四丁基溴化铵(75:25:4)符合要求,杂质峰也与其分离,效果较好。

3.2 样品处理方法

兔的胫骨坚硬,匀浆机无法匀浆,样品处理困难,崔颖[13]、Sroga 等[14]报道骨骼经冷冻干燥后易粉碎,因此本实验采用了此方法,先把胫骨冷冻干燥 10 h,取出后迅速研磨成粉。随后用 PBS 浸泡 24 h,再用二氯甲烷萃取,确保胫骨中的左氧氟沙星充分溶出。预实验中采用高氯酸对左氧氟沙星进行萃取,色谱图出现倒峰,且干扰较大,考虑是高氯酸致样品 pH 过低,影响测定。最终选用二氯甲烷进行萃

取，提取回收率达到要求。

3.3 实际样品测定

由于胫骨组织坚硬，药物不易渗入，将 50 mg左氧氟沙星注入局部骨髓腔后，药物通过局部扩散以及血液循环进入胫骨，会造成骨髓中药物浓度高，而胫骨中药物浓度低的情况。口服左氧氟沙星后可被快速吸收，通常在口服后 1~2 h 后血浆药物浓度达到峰值[15-16]。随着药物的代谢，药物浓度渐降低。本实验与其不同，是局部注射药物，综合考虑，选术后 2 h 进行样品检测。结果表明，此方法可以成功检测出胫骨及骨髓中的左氧氟沙星。

3.4 测定胫骨及骨髓中左氧氟沙星的临床意义

慢性骨髓炎是骨科最难处理的并发症之一，因感染部位有死骨形成、血供不足，在临床上处理非常棘手[17]。频发的交通事故导致的创伤性骨髓炎以及骨科植入假体感染等基础疾病继发感染增多使外源性骨髓炎有增多的趋势，其会导致感染性骨缺损，迁延不愈者会造成严重的功能障碍，甚至危及患者生命[9,18]。在抗感染的基础上彻底清创加上骨缺损修复是治疗感染性骨缺损的基本原则，长时间全身系统用药会对机体产生毒性，并且在局部很难达到有效杀菌浓度[6,17]，而局部用药可在局部获得持续的较高药物浓度，同时保持较低的血药浓度，避免了毒副作用及难以进入缺乏血供病灶区的弊端。纳米微球载左氧氟沙星可控降解骨修复材料是一种新型的具有药物控释、控制感染、修复骨缺损的复合材料。客观评价材料中药物在骨局部组织中的缓释持续时间及空间分布是必要的。

本实验建立了 HPLC 法检测兔胫骨及骨髓中的左氧氟沙星的方法学，本方法简便、灵敏、回收率高，为下一步评价材料的药物控释性能奠定了基础，适用于检测新型载药骨修复材料中的左氧氟沙星在兔局部骨组织中的分布。以期为治疗慢性骨髓炎提供解决方案。

参 考 文 献

[1] Torres A, Liapikou A. Levofloxacin for the treatment of respiratory tract infections[J]. Expert Opin Pharmacother, 2012, 13(8): 1203-1212.

[2] 陈新谦，金有豫，汤 光. 新编药物学[M]. 北京：人民卫生出版社，2011：97.

[3] Kuti JL, Nicolau DP. Presence of infection influences the epithelial lining fluid penetration of oral levofloxacin in adult patients[J]. Int J Antimicrob Agents, 2015, 45(5): 512-518.

[4] Absi M, Ghareeb H, Khalil A, et al. The effect of levofloxacin and moxifloxacin on cardiovascular functions of rats with streptozotocin-induced diabetes[J]. Diab Vasc Dis Res, 2013, 10(1): 65-71.

[5] Wagenlehner FM, Umeh O, Steenbergen J, et al. Ceftolozane-tazobactam compared with levofloxacin in the treatment of complicated urinary-tract infections, including pyelonephritis: a randomised, double-blind, phase 3 trial (ASPECT-cUTI)[J]. Lancet, 2015, 385(9981): 1949-1956.

[6] Sombié BC, Yameogo JG, Semdé R, et al. Ciprofloxacin monoolein water gels as implants for the treatment of chronic osteomyelitis: In vitro characterization[J]. J Adv Pharm Technol Res, 2014, 5(4): 158-163.

[7] Mohsien RA, Al-Mohammedawi MC, Yahya AGI. Virulance factors enhancing microbial infection in chronic osteomylitis and antibiotic susceptability pattern[J]. American Journal of Medical Case Reports, 2014, 2(6): 126-132.

[8] Jorge LS, Chueire AG, Rossit ARB. Osteomyelitis: a current challenge[J]. Braz J Infect Dis, 2010, 14(3): 310-315.

[9] Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis[J]. Lancet, 2004, 364(9431): 369-379.

[10] Aguilar-Carrasco JC, Hernández-Pineda J, Jiménez-Andrade JM, et al. Rapid and sensitive determination of levofloxacin in microsamples of human plasma by high-performance liquid chromatography and its application in a pharmacokinetic study[J]. Biomed Chromatogr, 2015, 29(3): 341-345.

[11] Mathew C, Suman B, Ajitha M, et al. A green analytical method for the simultaneous estimation of Levofloxacin hemihydrate and ambroxol hydrochloride using hydrotropy and first derivative UV spectroscopy[J]. Oriental Journal of Chemistry, 2014, 30(3): 1385-1389.

[12] Dafale NA, Semwal UP, Agarwal PK, et al. Development and validation of microbial bioassay for quantification of Levofloxacin in pharmaceutical preparations[J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2014, 5(1): 18-26.

[13] 崔 颖，李灵芝，朱 江. HPLC 法测定小鼠骨中大黄酸浓度[J]. 中国新药杂志，2008，17(13)：1154-1156.

[14] Sroga GE, Vashishth D. UPLC methodology for identification and quantitation of naturally fluorescent crosslinks in proteins: a study of bone collagen[J]. Journal of Chromatography B, 2011, 879(5): 379-385.

[15] 宋 青，张华峰，戴 博. HPLC 法测定人血浆中左氧氟沙星的浓度[J]. 解放军药学学报，2014，30(2)：159-161，164.

[16] Gao CH, Yu LS, Zeng S, et al. Personalized therapeutics for levofloxacin: a focus on pharmacokinetic concerns[J]. Ther Clin Risk Manag, 2014(10): 217-227.

[17] Mondal S, Roy R, Ghosh TK, et al. The study of outcome of chronic pyogenic long bone osteomyelitis treated by antibiotic impregnated bone cement beads and nails[J]. Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences, 2015, 4(10): 1622-1627.

[18] Mody RM, Zapor M, Hartzell JD, et al. Infectious complications of damage control orthopedics in war trauma[J]. J Trauma, 2009, 67(4): 758-761.

（责任编辑：关蕴良）