

HPLC 法测定人血浆中头孢吡肟的浓度[△]

段 威^{1,2}, 夏东亚², 郭 涛^{2#} (1. 沈阳药科大学, 沈阳市 110016; 2. 沈阳军区总医院药剂科, 沈阳市 110016)

中图分类号 R969.1; R978.1+1 文献标识码 A 文章编号 1001-0408(2008)29-2262-03

摘 要 目的: 建立以高效液相色谱法测定人血浆中头孢吡肟浓度的方法。方法: 色谱柱为 Diamonsil C₁₈, 流动相为 20 mmol·L⁻¹ 醋酸铵溶液(冰醋酸调节 pH 值至 5.00)–乙腈(90:10), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 254 nm, 进样量为 20 μL, 柱温为室温。结果: 头孢吡肟血药浓度在 0.2~50.0 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好($r = 0.999\ 6$), 定量下限为 0.2 μg·mL⁻¹; 平均方法回收率为 99.16% ($RSD = 1.29\%$), 平均提取回收率为 85.43% ($RSD = 2.37\%$), 日内、日间 RSD 均 < 10%。结论: 本方法简便、灵敏、快速、准确, 可用于人血浆中头孢吡肟的药动学和生物利用度研究。

关键词 头孢吡肟; 高效液相色谱法; 血药浓度

Determination of Cefepime in Human Plasma by HPLC

DU AN Wei (Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

DU AN Wei, XIA Dong-ya, GUO Tao (Dept. of Pharmacy, The General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish an HPLC method for the determination of cefepime in human plasma. METHODS: The separation of sample was carried on a Diamonsil C₁₈ column with the mobile phase consisted of 20 mmol·L⁻¹ ammonium acetate (which was adjusted to pH = 5.00 by acetic acid) – acetonitrile (90:10) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 254 nm; the sample size was 20 μL, and the column temperature was set at room temperature. RESULTS: The linear range of cefepime was 0.2~50.0 μg·mL⁻¹ ($r = 0.999\ 6$), with the lower limit of quantitation at 0.2 μg·mL⁻¹. The average methodological recovery was 99.16% ($RSD = 1.29\%$) and the average extraction recovery was 85.43% ($RSD = 2.37\%$). The inter-day RSD and intra-day RSD were all less than 10%. CONCLUSION: The method was simple, sensitive, rapid and accurate and can be used for the pharmacokinetic and bioavailability study of Cefepime.

KEY WORDS Cefepime; HPLC; Plasma drug concentration

头孢吡肟 (cefepime) 是对革兰阴性和阳性菌均有抗菌活性的第 4 代头孢菌素类药物, 临床上用于治疗敏感菌所致的下呼吸道、皮肤和骨组织、泌尿系统、妇科和腹腔感染以及菌血症等^[1,2]。国外文献中有采用液–液萃取^[3]的方法处理样品, 操作繁琐。国内文献采用沉淀蛋白^[4,5]的方法, 但是保留时间长。本试验综合相关文献报道, 建立了简便、快捷的方法测定头孢吡肟的血药浓度, 可为开展头孢吡肟的药动学、生物利用度研究提供可靠的依据。

1 材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪, 包括 600 型四元泵、2487 型可见–紫外检测器 (美国 Waters 公司); N-2000 色谱工作站 (浙江大学智能信息工程研究所); AEL-160 电子分析天平 (日本岛津公司); YKH-2 型液体快速混合器 (江西医疗器械厂); TGL-16B 高速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试剂

头孢吡肟对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 130524-200502, 含量: 83%); 盐酸头孢吡肟 (北京悦康药业集

团有限公司, 规格 0.5 g:1 g); 内标: 阿司匹林对照品 (沈阳万隆制药厂, 批号: 20070815, 含量: 99%); 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。空白血浆由沈阳军区总医院输血科提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 20 mmol·L⁻¹ 醋酸铵溶液 (冰醋酸调节 pH 值至 5.00) – 乙腈 (90:10); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 254 nm; 进样量: 20 μL; 柱温: 室温。色谱见图 1。

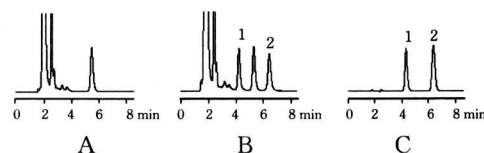


图 1 高效液相色谱

A. 空白血浆; B. 血浆样品 + 内标; C. 头孢吡肟对照品 + 内标; 1. 头孢吡肟; 2. 阿司匹林

Fig 1 HPLC

A. blank plasma; B. plasma sample + internal standard; C. cefepime standard + internal standard;

1. cefepime; 2. aspirin

由图 1 可知, 头孢吡肟色谱峰不受血浆中内源性杂质的干扰, 且与内标完全分离, 保留时间分别为 4.3、6.3 min。

2.2 溶液的配制

△ 全军医学科学技术研究“十一五”计划科技攻关课题基金资助项目 (06G023)

硕士研究生。研究方向: 临床药学。电话: 024-23051435; E-mail: duanwei1226@163.com

通讯作者: 主任药师, 博士研究生导师。研究方向: 临床药学。电话: 024-23994860; E-mail: sy-guotao@263.net

2.2.1 对照品溶液的配制: 准确称取头孢吡肟对照品 12.0 mg 至 10 mL 容量瓶中, 用蒸馏水溶解并定容, 配制成 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的头孢吡肟对照品贮备液, 置于 4°C 冰箱中保存, 临用前用蒸馏水稀释至相应的浓度。

2.2.2 内标溶液的配制: 准确称取阿司匹林对照品 50.0 mg 至 50 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 配制成 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的阿司匹林内标贮备液, 置于 4°C 冰箱中保存, 临用前精密量取 2.0 mL 至 10 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释成 $200 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标溶液。

2.3 血浆样品的处理

取血浆 0.2 mL, 加 $200 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标溶液 50 μL , 10% 高氯酸 150 μL , 涡旋混合 1 min, $15\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 20 μL 进样。

2.4 标准曲线的绘制及定量下限考察

配制头孢吡肟浓度为 0.2、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的血浆样品, 按“2.3”项下方法操作, 以头孢吡肟与内标峰面积比 (Y) 对头孢吡肟血药浓度 (X) 进行线性回归, 得回归方程为 $Y = 0.012 + 0.170X$ ($r = 0.9996$)。结果表

表 1 精密度及回收率试验结果

Tab 1 Results of precision and recovery test

加入量 $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	日内 RSD ($n=5$)		日间 RSD ($n=15$)		方法回收率/%			提取回收率/%		
	测得量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%	测得量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%	回收率	$\bar{x}$	RSD	回收率	$\bar{x}$	RSD
0.5	0.49 ± 0.03	6.31	0.50 ± 0.05	9.14	97.79			87.75		
5.0	4.97 ± 0.11	2.20	4.89 ± 0.13	2.64	99.35	99.16	1.29	84.48	85.43	2.37
40.0	40.13 ± 0.62	1.54	39.92 ± 1.32	3.31	100.33			84.06		

2.7 稳定性试验

配制头孢吡肟浓度为 0.5、5.0、40.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的血浆样品, -20°C 条件下冷冻 24 h, 室温下解冻, 反复冻融 3 次, 分别取样, 按“2.3”项方法操作, 每个样品重复测定 3 次, 以 0 次测得值为 100%, 计算结果依次为 $(98.70 \pm 1.18)\%$ 、 $(103.36 \pm 4.28)\%$ 、 $(98.76 \pm 1.78)\%$; 另配制头孢吡肟浓度为 0.5、5.0、40.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的血浆样品, 在室温条件下放置, 分别于 0、1、2、3 h 时取样, 按“2.3”项方法操作, 每个样品重复测定 3 次, 以 0 h 测得值为 100%, 计算结果依次为 $(90.78 \pm 4.07)\%$ 、 $(83.94 \pm 6.33)\%$ 、 $(72.76 \pm 6.08)\%$ 。结果表明, 头孢吡肟的血浆样品在反复冻融 3 次、室温放置 1 h 的条件下是稳定的。

2.8 临床应用

3 名健康男性受试者, 年龄 $(22.7 \pm 1.2) \text{ a}$, 体重 $(61.0 \pm 3.6) \text{ kg}$ 。于试验前 1 天晚 7:00 开始禁食, 次日清晨 7:00 接受试验。将 0.5 g 盐酸头孢吡肟溶解于 0.9% 氯化钠注射液 100 mL 内, 30 min 内恒速滴注完毕。血样采集分别于滴注前, 滴注开始 10、20 和 30 min, 停止滴注后 5、15、30 min 及 1、1.5、2、4、6、8、10 h 共 14 个采血点, 由前臂静脉取血 4 mL, 置于涂肝素的离心管中, 取静置离心后的血浆样品, -20°C 冷冻保藏, 备用。按“2.3”项下方法操作, 测定头孢吡肟的血药浓度。3 名健康受试者静脉滴注 0.5 g 盐酸头孢吡肟后的平均药-时曲线见图 2。

3 讨论

本试验参考国内、外文献, 建立了色谱条件。在选择流动相时, 分别考察了乙腈、20 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵的比例及流动相的 pH 值对分离的影响, 最终确定 20 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵溶液(冰醋酸调节 pH 值至 5.00) - 乙腈 (90:10) 为流动相, 避免了文献中使用较高浓度磷酸盐^[6]对色谱柱的损害。

明, 头孢吡肟血药浓度在 0.2~50.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。另平行配制 6 份 0.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的血浆样品, 按“2.3”项下方法操作。结果显示, 6 份样品的实测浓度为 $(0.20 \pm 0.02) \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $RSD = 10.39\%$, 由此确定本方法的定量下限为 0.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.5 精密度试验

配制头孢吡肟浓度为 0.5、5.0、40.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的血浆样品各 5 份, 按“2.3”项方法操作, 连续测定 3 d, 计算日内和日间精密度, 结果见表 1。

2.6 回收率试验

2.6.1 方法回收率: 配制头孢吡肟浓度为 0.5、5.0、40.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的血浆样品各 5 份, 按“2.3”项方法操作, 以头孢吡肟测得量与加入量的比值计算方法回收率, 结果见表 1。

2.6.2 提取回收率: 配制头孢吡肟浓度为 0.5、5.0、40.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的血浆样品各 5 份, 按“2.3”项下方法操作, 记录头孢吡肟的峰面积 (A_1), 与相同浓度未经提取样品所得的头孢吡肟峰面积 (A_2) 相比, 计算提取回收率 (提取回收率 = $A_1/A_2 \times 100\%$), 结果见表 1。

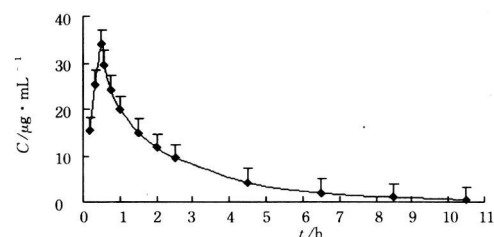


图 2 3 名受试者静脉滴注 0.5 g 盐酸头孢吡肟后的平均药-时曲线

Fig 2 Mean concentration - time curve of cefepime in 3 healthy male volunteers after drip infusion of 0.5 g cefepime

在选择内标时, 笔者曾采用紫外吸收在 254 nm 的对乙酰氨基酚^[5]作为内标, 但是在 10 min 内, 其与内源性杂质分离不好, 尝试换用与其结构相近的阿司匹林, 结果表明, 在该色谱条件下, 头孢吡肟可与内源性杂质峰和内标峰分离良好, 且保留时间短, 可将分析周期控制在 8 min 以内, 提高了样品的测定效率。

在选择血浆样品处理方法时, 分别试用 10% 高氯酸和 20% 三氯乙酸为蛋白沉淀剂, 试验结果表明, 用 10% 高氯酸沉淀蛋白的效果明显好于 20% 三氯乙酸, 沉淀完全且杂质较少。

本文所建立的方法灵敏度高^[4,5], 精密度好, 操作便捷, 方法学验证指标可满足临床药动力学研究的需要, 为开展头孢吡肟的药动力学、生物利用度研究提供了方法学依据。

参考文献

- [1] 陈新谦, 金有豫, 汤光主编. 新编药理学[M]. 第 16 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 64.

氨酚曲马多片人体药动学研究

何海霞¹, 司法启², 周远大^{1#} (1. 重庆医科大学附属第一医院临床药理研究室, 重庆市 400016; 2. 青海大学附属医院药剂科, 西宁市 810001)

中图分类号 R971^{+.1}; R969.1 文献标识码 A 文章编号 1001-0408(2008)29-2264-04

摘要 目的: 研究氨酚曲马多片在人体内的药动学过程。方法: 10名志愿者单剂量口服氨酚曲马多片后, 采用高效液相色谱法测定血药浓度, 用 3p97 软件计算药动学参数。结果: 氨酚曲马多片中对乙酰氨基酚和曲马多的药-时曲线均符合口服吸收一室模型; $t_{1/2\alpha}$ 分别为 (0.23 ± 0.16) h、 (0.64 ± 0.60) h, $t_{1/2\beta}$ 分别为 (2.12 ± 0.78) h、 (5.48 ± 2.90) h, t_{max} 分别为 (0.90 ± 0.43) h、 (1.88 ± 1.12) h, C_{max} 分别为 (9.37 ± 2.56) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 (115.27 ± 98.88) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{CL}/F(\text{s})$ 分别为 (24.52 ± 7.12) $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ 、 (0.15 ± 0.08) $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$, AUC_{0-1} 分别为 (30.38 ± 7.47) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 (598.36 ± 232.14) $\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ 分别为 (33.02 ± 9.15) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 (800.12 ± 420.92) $\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, MRT_{0-1} 分别为 (3.75 ± 1.41) h、 (5.46 ± 1.64) h, $\text{MRT}_{0-\infty}$ 分别为 (5.24 ± 2.92) h、 (9.86 ± 6.00) h。结论: 本研究可为新剂型氨酚曲马多片的临床应用提供依据。

关键词 氨酚曲马多片; 高效液相色谱法; 药动学

Pharmacokinetics of Tramadol Hydrochloride Paracetamol Tablets in Healthy Volunteers

HE Hai-xia, ZHOU Yuan-da (Clinical Pharmacology Laboratory, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

SI Fa-qi (Dept. of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the pharmacokinetics of tramadol hydrochloride paracetamol tablets in healthy volunteers. METHODS: 10 healthy volunteers were assigned to receive oral single dose of tramadol hydrochloride paracetamol tablets. Plasma concentrations of tramadol hydrochloride and paracetamol were measured by HPLC and the pharmacokinetic parameters were computed by 3p97 software. RESULTS: The concentration-time curves of tramadol hydrochloride and paracetamol all fitted one compartment open model. The pharmacokinetic parameters of tramadol hydrochloride and paracetamol were as follows: $t_{1/2\alpha}$ were (0.23 ± 0.16) h and (0.64 ± 0.60) h, $t_{1/2\beta}$ were (2.12 ± 0.78) h and (5.48 ± 2.90) h, t_{max} were (0.90 ± 0.43) h and (1.88 ± 1.12) h, C_{max} were (9.37 ± 2.56) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and (115.27 ± 98.88) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{CL}/F(\text{s})$ were (24.52 ± 7.12) $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ and (0.15 ± 0.08) $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$, AUC_{0-1} were (30.38 ± 7.47) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ and (598.36 ± 232.14) $\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ were (33.02 ± 9.15) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ and (800.12 ± 420.92) $\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, MRT_{0-1} were (3.75 ± 1.41) h and (5.46 ± 1.64) h, $\text{MRT}_{0-\infty}$ were (5.24 ± 2.92) h and (9.86 ± 6.00) h, respectively. CONCLUSION: This study provided a basis for clinical application of tramadol hydrochloride paracetamol tablets.

KEY WORDS Tramadol hydrochloride paracetamol tablet; HPLC; Pharmacokinetics

氨酚曲马多为盐酸曲马多 (Tramadol hydrochloride, TMD) 与对乙酰氨基酚 (Paracetamol, Par) 的复方制剂。TMD 是 4- 苯基哌啶类镇痛药, 为人工合成的非吗啡类新型安全强效镇痛药, 具有镇痛作用强, 成瘾性、耐受性和依赖性低等优点。临床用于缓解各种急、慢性疼痛。Par 可防止炎症时前列腺素的生物合成而产生镇痛作用, 是外周性镇痛药, 临床上常用于关节痛。TMD 与 Par 二者合用, 达到起效快, 镇痛作用持久,

并在不同部位产生镇痛作用, 起到协同作用。为考察河南南克药业有限公司研制的氨酚曲马多片在健康男性志愿者体内的药动学特征, 笔者参考有关文献^[1-3], 建立了准确、可靠的高效液相色谱 (HPLC) 法, 进行了氨酚曲马多片单剂量给药后的 TMD 与 Par 血药浓度测定及其药动学研究, 旨在为评价新药质量, 指导临床合理用药提供参考。

1 材料

- [2] 莫非, 张正, 陆春雨. 头孢吡肟对 576 株临床常见病原菌的抗菌活性分析[J]. 中国药房, 2006, 17(15): 1160.
- [3] Breilh D, Lavallec C, Fratfa A, et al. Determination of cefepime and cefpirome in human serum by high performance liquid chromatography using an ultrafiltration for antibiotics serum extraction[J]. J Chromatogr B

副教授。研究方向: 临床药学。电话: 023- 68898185, E-mail: cqhaixia@163.net

通讯作者: 教授, 博士研究生导师。研究方向: 新血管药理与新药开发。电话: 023- 68898185

Biomed Sci Appl, 1999, 734(1): 121.

- [4] 沈凯, 鲁亚苏, 于作华, 等. 人体血液及脑脊液中头孢吡肟浓度的 HPLC 测定方法研究[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(3): 263.
- [5] 夏东亚, 郭涛, 陈岩, 等. 用 HPLC 法测定人血浆中头孢吡肟的浓度[J]. 药学服务与研究, 2007, 7(2): 117.
- [6] 胡婕慧, 谢林, 肖大为, 等. 高效液相色谱法测定人血浆中头孢吡肟浓度及其药动学[J]. 中国现代应用药学杂志, 2007, 24(1): 54.

(收稿日期: 2007-12-05 修回日期: 2008-05-07)