

高效液相色谱法测定氟氧头孢的血药浓度

李珍 范国荣 金桂兰 胡晋红

(第二军医大学长海医院临床药理研究室, 上海 200433)

摘要 建立了测定氟氧头孢血药浓度的 HPLC 法。采用 Hypersil C₁₈ 色谱柱, 以甲醇-乙腈-水-磷酸-三乙胺 (16: 6: 78: 0.28: 0.4) 为流动相, 流速为 1.0 ml/min, 检测波长 270 nm, 灵敏度 0.05 AUFS 该法线性范围为 0.25~100 μg/ml ($r=0.9998$), 回收率大于 93%, 日内、日间 RSD 小于 8.0%。

关键词 氟氧头孢; 高效液相色谱法; 血药浓度; 药代动力学

氟氧头孢 (flofoxef, Fmox) 是由日本盐野义制药株式会社研制成功的新型广谱氧头孢烯类抗生素, 其 7β 位侧链具有双氟甲基硫甲基结构, 增强了对 \mathcal{G}^+ 菌特别是金葡菌的作用。^[1] Fmox 抗菌谱广, 对 \mathcal{G}^+ 球菌、 \mathcal{G}^- 杆菌和厌氧菌具有强大的抗菌活性, 而且对 β 内酰胺酶稳定, 对 PBP-2⁺ 诱导能力低, 可用于临床各系统感染, 尤其是耐甲氧西林金葡菌 (MRSA) 引起的各种感染。^[2,3] 国外该药血药浓度测定多采用微生物法, 国内未见文献报道。本文根据 Fmox 的结构特点, 建立了 HPLC 法测定血浆中 Fmox 的浓度, 并应用于健康人体药代动力学研究。

1 实验部分

1.1 仪器

日立 655 系列 HPLC 仪, 包括 655A-1 型恒流泵, 655A-22 型可变波长紫外检测器和 655B-7 型微处理机; Rheodyne 7125 进样阀, 配以 20 μl 定量管。

1.2 药品及试剂

氟氧头孢标准品 (Shionogi & Co., Ltd., Osaka, Japan, 含量 940.9 μg/mg); 内标物为香草醛 (中国药品生物制品检定所); 氟氧头孢注射剂 (日本盐野义制药株式会社, 1g 瓶, 批号 7054); 甲醇、乙腈为色谱纯; 其它试剂均为分析纯。

1.3 方法和结果

1.3.1 色谱条件 分析柱为 Hypersil C₁₈ (中科院

大连化学物理研究所, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-乙腈-水-磷酸-三乙胺 (16: 6: 78: 0.28: 0.4, pH=3), 检测波长为 270 nm; 流速为 1.0 ml/min, 灵敏度为 0.05 AUFS, 室温 20°C 下操作, 内标法峰面积定量。

1.3.2 样品预处理 取血浆 250 μl, 精密加入浓度为 80 μg/ml 的香草醛 20 μl, 混合均匀后, 再加 10% 三氯醋酸 100 μl 沉淀蛋白, 涡旋混合 10s 后于 10000r/min 离心 5min, 取上清液进样。在上述色谱条件下, 无血浆内源性杂质干扰, Fmox 与内标物的保留时间分别为 9.52 min 和 11.71 min (图 1)。

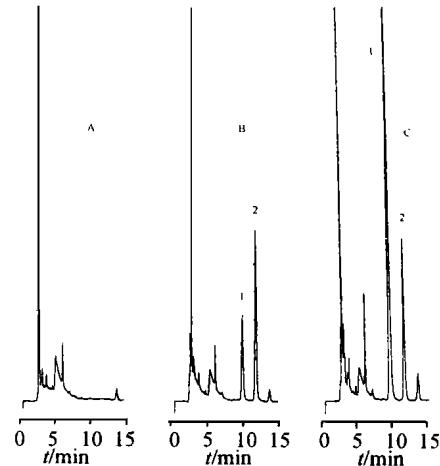


Fig. 1. Chromatograms of flofoxef in human plasma
A. blank plasma; B. blank plasma with Fmox and internal standard; C. plasma of 1h after administration (1 Fmox; 2 internal

standard)

1.3.3 标准曲线 精密称取氟氧头孢标准品 50 mg, 用蒸馏水定容于 10 ml 量瓶中, 得到 5 mg/ml 的标准贮备液。以健康人空白混合血浆配制成 0.25, 1.0, 5, 10, 25, 100 μg/ml 的血浆标准溶液, 按上述方法进行测定, 以 Fmox 与内标峰面积之比 A_s/A_i 与血药浓度 (C) 进行线性回归, 结果显示 Fmox 在 0.25~100 μg/ml 范围内线性良好, 其回归方程为 $C(\mu\text{g}/\text{ml}) = 0.0474 + 18.4168 A_s/A_i (r=0.9998)$, 血浆中最低检测浓度为 0.125 μg/ml ($S/N=3$)。

1.3.4 回收率试验 取 Fmox 标准贮备液适量, 分别用蒸馏水稀释成浓度为 1.0, 10, 100 μg/ml 的 Fmox 标准溶液 250 μl, 精密加入浓度为 80 μg/ml 的香草醛溶液 20 μl 和蒸馏水 100 μl, 混合均匀后进样, 测得标准溶液 Fmox 峰面积与内标峰面积之比 (f_s)。再取 Fmox 标准贮备液适量, 用健康人空白血浆配制成浓度为 1.0, 10, 100 μg/ml 的 Fmox 血浆标准溶液各 5 份, 用上述样品预处理方法处理后, 取上清液进样, 测得相应浓度的血浆标准溶液 Fmox 峰面积与内标峰面积之比 (f_x), f_x 与 f_s 的比值即为血浆 Fmox 的回收率。三种浓度的回收率结果见表 1。

Tab 1. Recovery of Fmox in human plasma ($n=5$)

Added ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	$\bar{x} \pm s$	Recovery (%)	RSD (%)
1.0	0.97 ± 0.039	96.68	4.12
10	9.58 ± 0.254	95.85	2.65
100	93.63 ± 2.14	93.63	2.28

1.3.5 精密度试验 分别取 Fmox 标准贮备液适量, 用健康人空白血浆配制低、中、高三个浓度的血浆标准溶液, 分别在日内和日间按上述方法处理后测定, 每个浓度重复 5 次, 求得日内和日间精密度, 结果见表 2。

Tab 2 Within-day and between-day precision of the method ($n=5$)

Added ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Within-day		Between-day	
	$\bar{x} \pm s$ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	RSD (%)	$\bar{x} \pm s$ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	RSD (%)
1.0	0.97 ± 0.039	4.12	0.96 ± 0.076	7.92
10	9.58 ± 0.254	2.65	9.47 ± 0.43	4.45
100	93.63 ± 2.14	2.28	94.0 ± 2.67	2.84

1.3.6 药代动力学研究 用本法对 8 名健康志愿者静脉滴注 Fmox 1 g 后进行药代动力学研究。

Fmox 1 g 溶于 0.9% NaCl 100 ml 中, 在 0.5 h 内滴完, 分别于给药开始即刻及给药后的 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8 h 采样, 用上述方法测定血浆中 Fmox 浓度, 受试者平均血药浓度-时间曲线见图 2 所示。

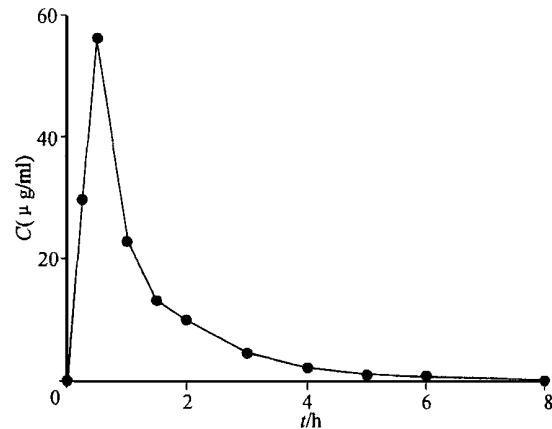


Fig 2. Mean plasma concentration-time profile after infusion of flomox ef in 8 healthy volunteers

2 讨 论

目前头孢类抗生素血药浓度测定, 通常采用反相高效液相色谱方法, 流动相组成为水和有机调节剂, 多元流动相体系能增强选择性, 有利于分离分析^[6]。本文根据 Fmox 的结构特点, 采用了甲醇-乙腈-水-磷酸-三乙胺为流动相体系, 采用正交实验设计方法考察各因素对色谱行为的影响。由于 Fmox 基本结构为有机酸, 流动相 pH 对色谱结果影响显著, 本法用 H_3PO_4 来抑制羧基解离, 提高容量因子, 在总体偏酸的条件下, 考察了不同 pH 对 Fmox 色谱行为的影响, pH 以 2.5~3.0 为宜。流动相中加入三乙胺, 能有效减少生物样品中内源性碱性杂质对样品测定的影响, 改善色谱峰形。

Fmox 体液浓度测定国外多采用微生物法, 该法灵敏度低, 特异性差, 线性范围窄, 高浓度样品需要稀释后点样, 而且影响测定结果的因素多, 在有活性代谢物存在或合并用其他抗生素时, 不能准确反映母体药物或单个药物的体内药物浓度。本文建立的测定 Fmox 血药浓度的 HPLC 方法, 血样经 10% 三氯醋酸沉淀蛋白后进样, 操作简便, 而且线性范围为 0.25~100 μg/ml, 能满足临床药代动力学研究的需要。

参考文献

- Teruji T, Hsao S, Masayuki N, et al. Synthesis and antibacterial activity of 6315-s, a new member of the oxacephem antibiotic. *J Antibiot*, 1985, **38**(4): 466
- Ito M, Ishigami T. The meaning of the development of flomoxef and clinical experience in Japan. *Infection*, 1991, **19** (Suppl 5): S253
- 李家泰,陈尔章,孙永华,等. 氧头孢烯类抗生素氟氧头孢(Flomoxef)随机对照治疗细菌性感染206例临床研究. 中国临床药理学杂志, 1995, **11**(2): 65
- Ito K, Hayasaki M, Tamaya T. Pharmacokinetics of cephem anti-biotics in exudate of pelvic retroperitoneal space after radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990, **34**(6): 1160
- Saito H, Kimura T, Takeda T, et al. Pharmacokinetics of flomoxef in mucosal tissue of the middle ear and mastoid following intravenous administration in humans. *Chemother*, 1990, **36**: 193
- 宋世谦. 头孢菌素类抗生素分析方法研究进展. 国外医药. 抗生素分册, 1998, **19**(6): 428

HPLC Determination of Flomoxef in Human Plasma

LI Zhen, FAN Guo-Rong, JIN G Gui-Lan, HU Jin-Hong

Department of Clinical Pharmacology, Shanghai Hospital, Shanghai 200433

Abstract A HPLC method was developed for the determination of flomoxef in human plasma. The method adopted a Hypersil C₁₈ column, CH₃OH-CH₃CN-H₃PO₄-Et₃N (16: 6: 78: 0.28: 0.4) as mobile phase with the flow rate of 1.0 ml/min. The detective wavelength and sensitivity were set at 270 nm and 0.05 AUFS respectively. The calibration curve was linear from 0.25 to 100 μg/ml (*r*= 0.9998). The recovery of flomoxef was over 93%. The variation within-day and between-day was all less than 8.0%.

Key words Flomoxef; HPLC; Plasma concentration; Pharmacokinetics

【文摘 032】 紫外光谱人工神经网络方法测定新洁尔灭中苯扎溴铵的含量 严拯宇, 姜新民, 王朝晖. 中国现代应用药学杂志, 2000, **17**(2): 132

目的: 对紫外吸收光谱重叠的新洁尔灭进行多组分不经分离的含量测定. 方法: 应用 BP方法即人工神经网络误差反向传播方法对其进行含量测定. 结果: 网络隐蔽层的节点数为 5 以 9个节点输入时, 苯扎溴铵和亚硝酸钠的平均回收率分别为 102% 和 101%, RSD 分别为 1.0% 和 2.9%. 结论: 该方法测定结果准确, 性能良好; 对于其它吸收光谱相互重叠的药物含量测定有一定的借鉴作用.

【文摘 033】 贝母的分子生物学鉴定方法的研究 蔡朝晖, 李萍, 董婷霞, 詹华强. 药学学报, 2000, **35**(4): 309

DN A的提取和 PCR扩增是分子生物学最基

本的操作步骤之一. 本文以贝母为研究对象, 探讨不同 DN A提取方法、不同扩增条件对 PCR产物的影响, 为生药的分子生物学鉴定提供参考

【文摘 034】 *O*对甲脒苯氧烷基-N取代酪氨酸甲酯的合成与抗血小板聚集活性 许天林, 蒋巡天, 倪沛洲, 华维一, 裴咏梅. 药学学报, 2000, **35**(3): 228

非肽类纤维蛋白原受体拮抗剂是一类有新作用机制的抗血栓剂. 本文在 *O*对甲脒苯胺基羧甲基及 *O*对甲脒苯氧乙基-N取代酪氨酸甲酯类化合物的合成及其抗血小板活性研究的基础上, 为了进一步考察空间臂的极性和长度对化合物活性的影响, 合成了一系列新的化合物IV a~i, 并测试了它们的活性, 为这类化合物的研究提供新的有意义的线索.