

高效液相色谱法测定人血浆中头孢吡肟浓度及其药动学

胡婕慧¹, 谢林¹, 肖大为², 樊宏伟², 汪瑞芳², 钱薇², 刘晓东^{1*} (1. 中国药科大学药代研究中心, 南京 210009; 2. 南京市第一医院 1期临床病房, 南京 210006)

摘要:目的 建立人血浆中头盐酸孢吡肟浓度的 HPLC-UV测定方法, 研究静脉注射盐酸头孢吡肟在健康人体中药动学行为。方法 血浆经高氯酸沉淀蛋白后进行 HPLC-UV分析, 色谱柱为岛津 Shim-pack ODS, 5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm I. D., 流动相为 0.025 mol/L的 NaH₂PO₄:乙腈 (89:11), 磷酸调 pH = 3.0, 流速 1.0 mL/min, 紫外检测波长 270 nm. 测定健康志愿者 30 min内静滴盐酸头孢吡肟 500 mg及停药后 12 h的血药浓度-时间过程。结果 头孢吡肟在血浆中的线性范围为 0.2 ~ 50.0 μ g/mL, LLOQ为 0.2 μ g/mL, 批内和批间的精密性 (RSD)均小于 10%, 准确度 (Relative error, R. E)为 -3.48% ~ 0.06%。血浆中回收率大于 85%。健康志愿者单次静滴 500mg盐酸头孢吡肟 30 min后, 实测得 t_{max} 和 C_{max} 分别为 (0.51 \pm 0.02) h和 (24.96 \pm 3.50) μ g/mL, 估算的 $t_{1/2\beta}$ 和 MRT分别为 (2.03 \pm 0.18) h和 (2.65 \pm 0.29) h, V_1 和 CL分别为 (0.168 \pm 0.068) L/kg和 (0.207 \pm 0.026) L/(kg \cdot h), $AUC_{0-\infty}$ 为 (50.88 \pm 6.10) μ g \cdot h/mL。结论 该方法经考察符合生物样品的测定要求, 可应用于人血浆中头孢吡肟血药浓度的测定和药代动力学研究, 盐酸头孢吡肟在中国人和美国人中的药动学行为相近。

关键词: 头孢吡肟; 高效液相色谱; 药动学

中图分类号: R969.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2007)01-0053-04

HPLC Method for the Determination of Cefepime in Human Plasma and its Pharmacokinetics

HU Jie-hui¹, XIE Lin¹, XIAO Da-wei², FAN Hong-wei², WANG Rui-fang², QIAN Wei², LIU Xiao-dong^{1*} (1. Center of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. The Nanjing Municipal Hospital, Nanjing 210006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC method with ultraviolet detection for determining cefepime in human plasma and study pharmacokinetic behavior of cefepime following intravenous administration. **METHODS** 12 healthy subjects received 500 mg of cefepime hydrochloride via a 30min intravenous infusion, blood samples were collected at designed times, following protein precipitation with HClO₄, the analytes were separated on a Shim-pack ODS C₁₈, 5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm I. D. column with the mobile phase consisting of 0.025 mol/L phosphate buffer (pH = 3.0)-acetonitrile (89:11) at a flow rate of 1.0 mL/min and the eluent was detected at 270 nm. Concentrations of cefepime in plasma were determined and pharmacokinetic parameters were estimated. **RESULTS** Linear quantitative response curve was generated over a concentration range of 0.2 ~ 50.0 μ g/mL for plasma. Intra- and inter-batch precision and accuracy were acceptable for all quality control samples with relative error ranging from -3.48% to 0.06%, including lowest limit of quantification of 0.2 μ g/mL. The mean recovery of cefepime from plasma was >85%. Pharmacokinetic parameters after iv infusion dose were evaluated as follows: C_{max} and t_{max} were (24.96 \pm 3.50) μ g/mL and (0.51 \pm 0.02) h, respectively; $AUC_{0-\infty}$ (50.88 \pm 6.10) μ g \cdot h/mL, MRT (2.65 \pm 0.29) h and V_1 (0.168 \pm 0.068) L/kg, $t_{1/2\beta}$ (2.03 \pm 0.18) h and CL (0.207 \pm 0.026) L/(h \cdot kg). **CONCLUSION** This specific, sensitive and precise method is suitable for monitoring of cefepime in human and its pharmacokinetic investigation. The pharmacokinetic behavior of cefepime in Chinese is similar to that of in American.

KEY WORDS: Cefepime; HPLC; Pharmacokinetics

盐酸头孢吡肟为第四代头孢菌素, 抗菌谱比第三代头孢菌素广, 对大多数革兰阳性和阴性菌, 包括多数耐氨基糖苷类或耐第三代头孢菌素 (如头孢他定) 的菌株均有效, 适用于治疗中度感染, 包括呼吸系感染、尿路感染、皮肤和软组织感

染等。目前已有国外文献报道头孢吡肟在健康受试者 (青年、老年)、呼吸道感染患者及肾衰患者体内的药代动力学行为^[1-5], 而笔者未见国内此方面的资料。笔者旨在建立一种 HPLC-UV法测定健康志愿者血浆中头孢吡肟浓度, 并对其

作者简介: 胡婕慧, 女, 1979, 中国药科大学药代研究中心硕士研究生, Tel: 013813986845

* 通讯作者: 刘晓东, Tel: 025 - 83271006 E-mail: xdliu@cpu.edu.cn

进行药代动力学行为的研究。

1 实验仪器与材料

1.1 仪器

岛津 LC-2010C_{HT} 高效液相色谱仪, Shimadzu CLASS-VP 6.12 SP4 色谱工作站; Milli-Q Gradient A10 超纯水器 (Millipore Inc. USA); Biofuge Stratos 台式高速冷冻离心机 (SORVALL)。

1.2 药品与试剂

盐酸头孢吡肟 (珠海联邦制药股份有限公司中山分公司) 纯度 83.6%, 茶碱 (中国药品生物制品检定所); 乙腈为色谱纯 (Merck Company, Inc. USA); 其余试剂为市售分析纯, 水为超纯水。

1.3 标准溶液的配制

盐酸头孢吡肟标准品: 精密称取相当于头孢吡肟标准品 10.0 mg, 超纯水溶解定容, 配制成 1.0 mg/mL 贮备液, 临用时用超纯水稀释到相应的浓度。

茶碱内标液: 精密称取茶碱标准品, 用甲醇溶解后, 稀释至 0.1 mg/mL 备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Shim-pack ODS, 5 μ m, 柱长 250 mm \times 4.6 mm I.D. (岛津公司), 柱温 35 $^{\circ}$ C。流动相由 0.025 mol/L 磷酸二氢钠: 乙腈 (89:11) 组成, 磷酸调 pH 至 3.0, 流速为 1.0 mL/min。紫外检测波长为 270 nm。

2.2 血浆样品的处理

取 0.2 mL 血浆, 加内标 20 μ L 混均后, 加 100 μ L 10% 高氯酸, 振荡 10 min, 20 000 r/min 离心 10 min, 二次离心后取上清液 20 μ L 进样。

2.3 分析方法确证

2.3.1 方法专属性 在本试验条件下, 头孢吡肟有较大的色谱峰和较好的分离度, 血浆中杂质不干扰样品峰, 基线噪声小, 盐酸头孢吡肟和内标的保留时间分别约为 4.0 和 6.1 min, 见图 1, 说明该方法专属性较高。在此条件下所测得的结果能代表头孢吡肟浓度。

2.3.2 标准曲线及线性范围 取空白血浆 0.2 mL, 加不同量的标准品, 使其浓度分别为 0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 25.0 和 50.0 μ g/mL, 按“血浆样品的处理”项下操作, 记录样品和内标峰面积, 利用样品浓度 C 对样品与内标峰面积比 R 作直线回归, 得回归方程 $R = 0.0597C + 0.0001$, $r = 0.9999$ ($n = 5$, $P < 0.01$)。结果表明头孢吡肟在血浆中 0.2 ~ 50.0 μ g/mL 范围内线性良好, 最低可定量浓度为 0.2 μ g/mL。

2.3.3 准确度和精密度 按“标准曲线的制备”项下操作, 制备头孢吡肟血浆低中高三个浓度 (0.5, 2.5, 25.0 μ g/mL) 的质控样品 (QC), 用当日的随行标曲测定 QC 样品的浓度, 每个浓度 5 个样本, 连续进行 3d, 计算批内和批间的精密度 (RSD%) 和准确度 (RE%)。结果见表 1。

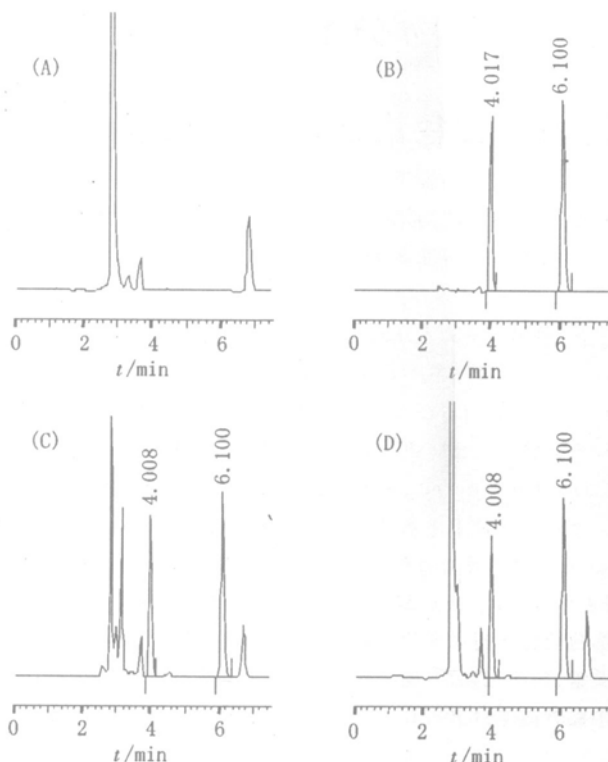


图 1 色谱图: (A) 空白血浆; (B) 头孢吡肟标准品 (10 μ g/mL) + 内标茶碱 (10 μ g/mL); (C) 空白血浆加入头孢吡肟标准品 (10 μ g/mL) + 内标茶碱 (10 μ g/mL); (D) 静滴 500 mg 盐酸头孢吡肟 1 h 后的血样 + 内标茶碱 (10 μ g/mL)

Fig 1 Chromatograms of (A) blank plasma; (B) cefepime standard (10 μ g/mL) + IS Theophylline (10 μ g/mL); (C) blank plasma spiked with cefepime (10 μ g/mL) and IS (10 μ g/mL); (D) plasma sample of 1 h after intravenous infusion of 500 mg cefepime hydrochloride and IS (10 μ g/mL)

$t_R = 4.0$ min in cefepime; $t_R = 6.1$ min in Theophylline

表 1 人血浆中头孢吡肟的精密度和准确度 (批内 $n = 5$; 批间 $n = 5 \times 3$)

Tab 1 Precision and accuracy for cefepime in human plasma (Inter-assay $n = 5$; Intra-assay $n = 5 \times 3$)

	Added /(μ g/mL)	Founded /(μ g/mL)	RSD /%	RE /%
intra-assay	0.5	0.48 \pm 0.01	1.61	-3.48
	2.5	2.50 \pm 0.02	0.74	-0.02
	25.0	25.02 \pm 0.19	0.77	0.06
inter-assay	0.5	0.49 \pm 0.01	1.61	-1.51
	2.5	2.47 \pm 0.01	0.25	-1.07
	25.0	24.76 \pm 0.04	0.17	-0.97

Note: R. E% = (mean founded-added) / added * 100

2.3.4 提取回收率 取 6 支洁净玻璃试管, 加入 20 μ L 不同浓度的标准品工作液和内标, 用氮气吹干, 然后加 200 μ L 超纯水和 100 μ L 10% 高氯酸溶解, 取 20 μ L 进样, 记录样品峰面积, 用样品峰面积与样品加入量作直线回归, 得到标准品的回归方程。另取试管加空白血浆 0.2 mL, 加入不同浓

度的标准品,使其浓度分别为 0.5, 5.0 和 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,按“血浆样品的处理”项下操作,记录样品峰面积,将样品峰面积代入到标准品的回归方程,得到相应的浓度,从而求得血浆中盐酸头孢吡肟回收率,结果见表 2。

表 2 人血浆中头孢吡肟的提取回收率 ($n=5$)

Table 2 Extraction recovery of cefepime in human plasma ($n=5$)

Added / $(\mu\text{g}/\text{mL})$	Recoveries/%						$\bar{x} \pm s$
0.5	85.10	88.35	86.59	88.04	88.53	87.32	± 1.46
5.0	94.20	95.71	92.34	93.56	94.98	94.16	± 1.30
25.0	94.64	94.03	92.93	93.92	93.04	93.71	± 0.72

2.3.5 稳定性考察 质控样品 (QC),每个浓度 5 个样本,放置 -20C 冰箱冷藏一周,用 37C 恒温水浴解冻后测定,血浆中三个 QC 浓度 (0.5, 5.0, 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 头孢吡肟解冻后测定结果分别为 (0.47 ± 0.01), (4.98 ± 0.06) 和 (24.66 ± 0.22) $\mu\text{g}/\text{mL}$;结果表明头孢吡肟冻融稳定。

2.3.6 方法学质控 在生物样本分析方法确证完成以后开始测定未知样品,同时进行质量控制。每个分析批生物样品测定时建立新的标准曲线,并进行三浓度双样本质控样品分析,质控样品数大于未知样品总数的 5%,并将质控样品 RE $<15\%$ 作为当日数据是否接受的标准。

2.4 健康受试者静滴盐酸头孢吡肟后的药理学

12 名健康受试者,男女各半,年龄 (22.8 ± 1.4) 岁,体重 (60.3 ± 6.2) kg,在接受健康检查和签约知情同意后,前 1 d 晚上入住 I 期临床病房,并于晚上 10 点开始禁止食用食物,但可自由饮水,次日早晨 7:00 接受试验。用生理盐水将给药剂量 500 mg 的盐酸头孢吡肟调整至 10 mg/mL 的浓度于 30 min 内滴注完毕。给药后 2 h 内禁止饮水,3 h 后方可进食,统一食物。血样采集分别于给药前、滴注开始 5, 10, 15 和 30 min,停药后 5, 10, 15, 30, 60 min, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8 和 12 h,用一次性注射器或埋针由肘静脉取血 2 mL 置肝素化试管中,离心后取血浆于 -20C 贮存至血药浓度测定。以上实验方案通过南京市第一医院临床研究机构医学伦理委员会批准。

12 名健康志愿受试者静滴 500 mg 盐酸头孢吡肟 30 min 及其停药后 12 h,由 I 期临床病房临床医生监护并观察其耐受性及一般情况,未见相关不良反应发生,血浆中头孢吡肟浓度-时间曲线见图 2。用安徽省药物临床评价中心孙瑞元等编制的 DAS ver1.0 (Drug And Statistics for Windows) 软件按 AIC 值最小选择最佳房室模型权重拟合表明:选择权重系数为 $1/C^2$ 的二房室模型时获得较好的拟合。求得的模型参数和用矩量法估算的受试者静滴 500 mg 盐酸头孢吡肟后的药代动力学参数列于表 3。

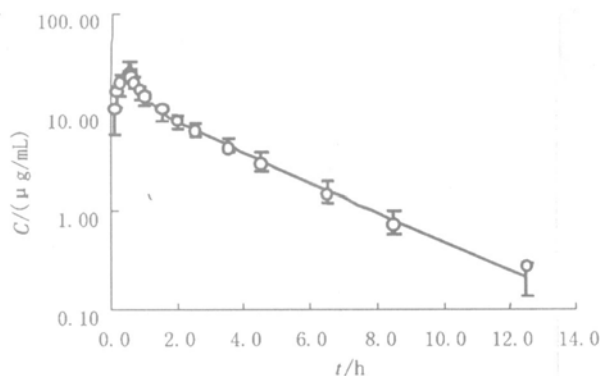


图 2 受试者静滴盐酸头孢吡肟后平均药-时曲线 ($n=12$)

Fig 2 Mean concentration-time curves of cefepime in human plasma after iv infusion administration ($n=12$)

表 3 受试者静滴盐酸头孢吡肟后用二房室模型拟合 (权重系数: $1/C^2$) 及用 DAS ver1.0 统计矩法估算的药代动力学参数 ($n=12$)

Table 3 Pharmacokinetic parameters of cefepime evaluated by a two-compartment modeling (weight coefficient $1/C^2$) and non-compartmental methods using DAS ver1.0 after iv infusion administration ($n=12$)

Parameters	$\bar{x} \pm s$
A/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	19.69 ± 5.45
B/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	79.73 ± 14.83
$t_{1/2\alpha}$ /h	0.16 ± 0.08
$t_{1/2\beta}$ /h	2.03 ± 0.18
k_{10} / $(1/h)$	0.525 ± 0.334
k_{12} / $(1/h)$	1.326 ± 1.689
k_{21} / $(1/h)$	4.505 ± 3.783
V_1 / (L/kg)	0.168 ± 0.068
CL / $[L/(h \cdot \text{kg})]$	0.207 ± 0.026
t_{max} /h	0.51 ± 0.02
C_{max} / $(\mu\text{g}/\text{mL})$	24.96 ± 3.50
$\text{AUC}_{0-12.5h}$ / $(\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL})$	49.96 ± 6.21
$\text{AUC}_{0-\infty}$ / $(\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL})$	50.88 ± 6.10
MRT/h	2.65 ± 0.29

据文献^[2]报道:美国人 30 min 单剂量静脉滴注 500 mg 头孢吡肟后的峰浓度、半衰期和 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 分别为 (31.9 ± 6.00) $\mu\text{g}/\text{mL}$, (2.00 ± 0.64) h 和 (56.6 ± 11.4) $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$,表 3 中 12 名健康志愿受试者静脉滴注 500 mg 盐酸头孢吡肟后估算的药代动力学参数与之相近,提示盐酸头孢吡肟在中国人和美国人中的动力学行为相近。

3 讨论

头孢吡肟由于其甲基头孢烯 3 位吡咯烷的引入,使其较第三代头孢菌素相比,具有更低的 β -内酰胺酶亲和力和更强的细菌外膜穿透力。停药 12 h 后,血浆中药物浓度仍然达到 (0.28 ± 0.08) $\mu\text{g}/\text{mL}$,超过肺炎链球菌、淋球菌、脑膜炎球菌和大部分肠杆菌体外抗菌活性的 MIC_{90} ^[3]。高效、广谱的抗菌作用等同甚至强于头孢他定或头孢噻肟,目前已被用于防治多种细菌感染性疾病,而国内对头孢吡肟的研究也多

集中在对其抗菌活性及治疗感染的临床疗效和安全性评价方面。本实验通过研究国人单剂量静滴头孢吡肟后的药代动力学特征,可为该药的进一步临床应用提供参考。

有关头孢吡肟的测定方法多采用反相高效液相色谱-紫外检测,本实验参考同类文献^[4]建立色谱条件,分别改变乙腈的比例、磷酸盐的浓度和流动相 pH 值,考察其对分离的影响,得出该色谱条件下,头孢吡肟与内标峰不受内源性杂质干扰,分离良好,并可以达到较低的检测限。国外文献^[5]中多采用乙腈先沉淀蛋白后二氯甲烷提取的方法处理样品,且通常保留时间较长。最近国内有人建立了三氯醋酸沉淀蛋白的 HPLC 测定方法^[6],虽然简化了样品处理过程,却依然存在分析周期长的特点,因此内标的选择很关键。作者也在该色谱条件下尝试了一系列头孢类抗生素以及紫外特征吸收接近 270 nm 的物质作为内标,发现头孢类物质在此条件下保留行为均较强,且紫外响应较弱,须采用较高浓度。而选择最大吸收波长为 275 nm 的茶碱在此色谱条件下保留时间适宜,经高氯酸沉淀蛋白的方法处理样品后还可达到 (94.9 ± 0.5)% 的回收率,因此是优于头孢他啶、头孢匹罗等头孢类抗生素的内标选用物。且本实验血样处理方法同样简洁,大大提高了样品测定的效率。

文献^[2]研究表明:在 62.5 ~ 2000 mg 剂量范围内,头孢吡肟在人体内的处置符合线性动力学的过程,每天三次给药也未见药物在体内的蓄积现象。血浆蛋白结合率低 (16% ~ 19%),能广泛分布到组织及体液中(成人 Vd 为 14 ~ 20 L),主要以原型从肾脏排泄,排泄率达 85%。因此在肾功能减退患者体内的处置过程则稍有改变:半衰期延长,药物清除率降低^[7]。本实验结果表明头孢吡肟在我国健康受试者体内具有良好的药代动力学特征,与美国人的体内处置过程相

似,提示国人的用药方案可以参照美国人的方案。

参考文献

- [1] TANG J G. Pharmacokinetics of cefepime [J]. World Notes Antibiot (国外医药·抗生素分册), 1996, 17(2): 96-100.
- [2] BARBHAIYA R H, FORGUE S T, GLEASON C R, *et al*. Pharmacokinetics of cefepime after single and multiple intravenous administrations in healthy subjects [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1992, 36(3): 552-557.
- [3] LANG Y, ZHANG H J. Cefepime, the fourth-generation cephalosporin [J]. Tianjin Pharm (天津药学), 1999, 11(2): 6-7.
- [4] VALASSIS I N, PARISSI-POULOU M, MACHERAS P. Quantitative determination of cefepime in plasma and vitreous fluid by high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1999, 721(2): 249-255.
- [5] BREILH D, LAVALLEE C, FRATTA A, *et al*. Determination of cefepime and ceftiofime in human serum by high-performance liquid chromatography using an ultrafiltration for antibiotics serum extraction [J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1999, 734(1): 121-127.
- [6] SHEN K, LU Y S, YU A H, *et al*. HPLC determination of cefepime in human plasma and cerebrospinal fluid [J]. Chin J Pharm Anal, 2005, 25(3): 263-266.
- [7] REBECCA S M, DOUGLAS N F, EDWARD A, *et al*. Pharmacokinetics of cefepime during continuous renal replacement therapy in critically ill Patients [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(11): 3148-3155.

收稿日期: 2006-04-10