

应用 3 μm 填料色谱柱快速分析血清样品和尿样中头孢他啶的浓度及健康人体药动力学研究

魏敏吉¹, 孙路路², 方利明³

(1. 北京大学第一医院临床药理研究所, 北京 100191; 2 北京大学第九临床医学院, 北京 100038

3 杭州国光药业有限公司, 杭州 310018)

摘要 目的: 建立快速测定血清和尿样中头孢他啶含量的 HPLC 法, 进行药代动力学研究。方法: 采用 Alltima C₁₈ (53 mm × 7 mm, 3 μm) 色谱柱, 流动相为 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾 - 甲醇 (85:15, v/v), 流速为 2 mL·min⁻¹, 检测波长为 254 nm。结果: 血清样品在 0.25~50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内, 尿样在 1.25~250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内呈现良好的线性关系。对血清样品和尿样, 平均回收率分别为 95%~115% 和 102%~105%, 日内和日间 RSD 均小于 6.0%。整个分析时间约 3 min。12 名受试者静脉给予 1000 mg 头孢他啶后, 获得的主要药代动力学参数为 C_{max} (70.58 ± 8.23) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $t_{1/2}$ (1.89 ± 0.57) h, AUC_{0-24} (139.0 ± 19.5) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0~24 h 尿累计排泄率为 (78.9 ± 17.2)%。结论: 与 5 μm 填料色谱柱常规分析所需相比, 3 μm 填料的色谱柱可以显著提高测试速度。本方法简便、快速和准确, 可用于头孢他啶的药代动力学研究。

关键词: 头孢他啶; 快速分离色谱; 药代动力学

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)05-0773-05

Pharmacokinetic study and rapid determination of ceftazidime in serum and urine with column packed by 3 μm particle

WEI Min-ji¹, SUN Lu-lu², FANG Li-ming³

(1. Institute of Clinical Pharmacology First Hospital, Peking University, Beijing 100191, China; 2. Ninth Hospital, Peking University, Beijing 100038, China;

3. Hangzhou Guoguang Pharmaceutical Corp. Ltd., Hangzhou 310018, China)

Abstract Objective To establish a rapid HPLC method for the determination of ceftazidime in serum and urine and to study the pharmacokinetics of ceftazidime. **Method** Alltima C₁₈ (53 mm × 7 mm, 3 μm) was used as analysis column, mobile phase was 0.02 mol·L⁻¹ KH₂PO₄ - methanol (85:15, v/v), flow rate was 2.0 mL·min⁻¹, ultraviolet detector was used with wavelength set at 254 nm. **Results** The calibration curves were linear over the range of 0.25–50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for serum and 1.25–250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for urine. Average recovery rates were 96%–115% for serum and 102%–105% for urine samples. The intra-day and inter-day relative standard deviations were less than 6.0%. The whole run time was around 3 min. After 12 subjects were intravenously given 1000 mg of ceftazidime, the main pharmacokinetic parameters were as follows: C_{max} (70.58 ± 8.23) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $t_{1/2}$ (1.89 ± 0.57) h, AUC_{0-24} (139.0 ± 19.5) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$, accumulative excretion rate of ceftazidime in urine from 0 to 24 h was (78.9 ± 17.2)%. **Conclusion** Compared with that of 5 μm particle size, the column packed with 3 μm particle size can significantly reduce the run time. The established method is simple, rapid and accurate for the pharmacokinetic study of ceftazidime.

Key words ceftazidime; rapid resolution liquid chromatography; pharmacokinetics

头孢他啶 (ceftazidime, CAZ) 是在临床上使用的第 3 代头孢菌素类抗生素, 对许多革兰阴性杆菌特别是对绿脓杆菌有很强的抗菌作用, 且组织渗透性好,

不常见于氨基糖苷类抗生素的耳毒和肾毒等特点, 是临床危重感染病人的首选抗生素。

生物样品中头孢他啶的测定主要为 HPLC 方

法,由于静脉给药的剂量较高,使用 UV 检测其灵敏度就可以满足要求^[1,2]。

HPLC 常规分析方法一般采用粒径 5 μm 填料,长度为 15 cm 的色谱柱,每根色谱柱的理论板数在 8000 左右,1 次样品的分析时间常常为 10 min 左右,24 h 的通量为 144 个样品。在进行药代动力学研究时,有上千个样品需要在短时间内进行测定,这要求所建立的分析方法具有更高的通量。近年来,粒径小于 5 μm 的填料被广泛使用,如 3.5, 3.0, 2.8, 1.8 μm 甚至更细的填料已经被商品化。为与这些填料的色谱柱匹配,新的耐高压、低脉冲的 HPLC 系统已经被开发出来。与普通 HPLC 方法相比,使用更细填料的色谱分析具有更高的灵敏度、更快的分析速度、更强的分辨率^[3]。本文使用 3 μm 填料的色谱柱在普通 HPLC 上对血清和尿样中的头孢他啶浓度进行了快速测定,并用于药代动力学研究。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司生产,包括: G1310A HPLC 泵, G1313A 自动进样器, G1314A 紫外可调波长检测器, G1310A 色谱工作站。

头孢他啶对照品(批号: 0484-9901, 含量 84.9%) 购自中国药品生物制品检定所。头孢他啶(规格: 1000 $\text{mg} \cdot \text{支}^{-1}$; 批号: 021226, 生产单位: 深圳九新药业有限公司)。试验中所用的乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯,试验用水为双蒸水。空白血清为北京红十字会血站提供的健康人血清。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: A llima C₁₈ (53 mm \times 7 mm, 3 μm , 美国 Alltech 公司); 色谱预柱: A lichem-Bond AQ C₁₈ (2.1 mm \times 10 mm, 5 μm , 美国 Abel Industries 公司); 流动相: 0.02 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾-甲醇 (85: 15 v/v); 流速: 2 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长: 254 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20 μL 。

2.2 溶液配制 精密称取头孢他啶对照品适量,置 50 mL 量瓶中,用水溶解并稀释至刻度,配制成 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,作为储备液备用,冰箱 -4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 7 d。

2.3 样品预处理

血清样本处理方法: 精密吸取血清样品 500 μL , 置 5 mL 离心管中,加入高氯酸 (0.5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 500 μL , 涡旋振荡 1 min 于 10000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 吸取上清液进样测定。

尿液样本处理方法: 取尿液样本, 3000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$

离心分离 10 min, 取上清液依浓度高低分别稀释 5 ~ 50 倍, 取稀释尿液样本进样, 进行分析。

2.4 专属性 在本实验条件下的色谱图见图 1。头孢他啶的保留时间为 1.9 min, 空白尿样和空白血清中的杂质峰不干扰测定, 整个分析时间约 3 min。

2.5 标准曲线

用空白血清和头孢他啶储备液制备成 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的已知浓度对照品血清, 按照“2.3”项血样的处理方法进行处理, 以待测物浓度为横坐标 X ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 待测物的峰面积 Y 为纵坐标, 用 $1/Y^2$ 为权重进行加权回归, 求得直线回归方程为:

$$Y = 7.009X + 1.112 \quad r = 0.9997$$

最低检测浓度 (LOD, $SN = 3$) 为 0.05 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

用离心后 5 倍稀释的人空白尿样, 加入头孢他啶的储备液制成浓度为 1.25, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的液体, 按照“2.3”项尿样的处理方法进行处理, 以待测物浓度为横坐标 X ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 待测物的峰面积 Y 为纵坐标, 用 $1/Y^2$ 为权重进行加权回归, 求得直线回归方程为:

$$Y = 15.306X - 0.882 \quad r = 0.9994$$

最低检测浓度 (LOD, $SN = 3$) 为 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.6 准确度和精密度 取高、中、低浓度的质控样品各 5 份, 每日测定 5 次, 连续测定 5 d 以日内测定的各物质的浓度计算日内 RSD, 不同日测得的各物质浓度计算日间 RSD, 结果见表 1。以同浓度下的血清和尿样与其对照品水溶液的峰面积比, 求得绝对回收率, 见表 2。

2.7 稳定性 分别取高、中、低 3 个浓度的质控样品 (每个浓度 3 样本分析), 考察药物稳定性。血清样品在预处理后室温 6 h 稳定, 经过 2 个冷冻-解冻循环保持稳定; 样品在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存 15 d 稳定。以上试验结果的差异均在 5.0% 以内。

2.8 药动学研究

入选的 12 名健康男性志愿者均为大学在校学生, 受试者的平均年龄为 (21.8 \pm 1.6) 岁, 身高为 (173.8 \pm 2.9) cm, 体重为 (65.9 \pm 4.4) kg, 体重指数 BMI 为 21.8 \pm 1.5。体检、心电图、血生化、血常规和尿常规试验前均为正常。受试者试验前 1 周末服用过任何药物, 无药物过敏史及烟酒嗜好。本试验经过院伦理委员会批准, 参加试验的受试者均签署书面知情同意书。

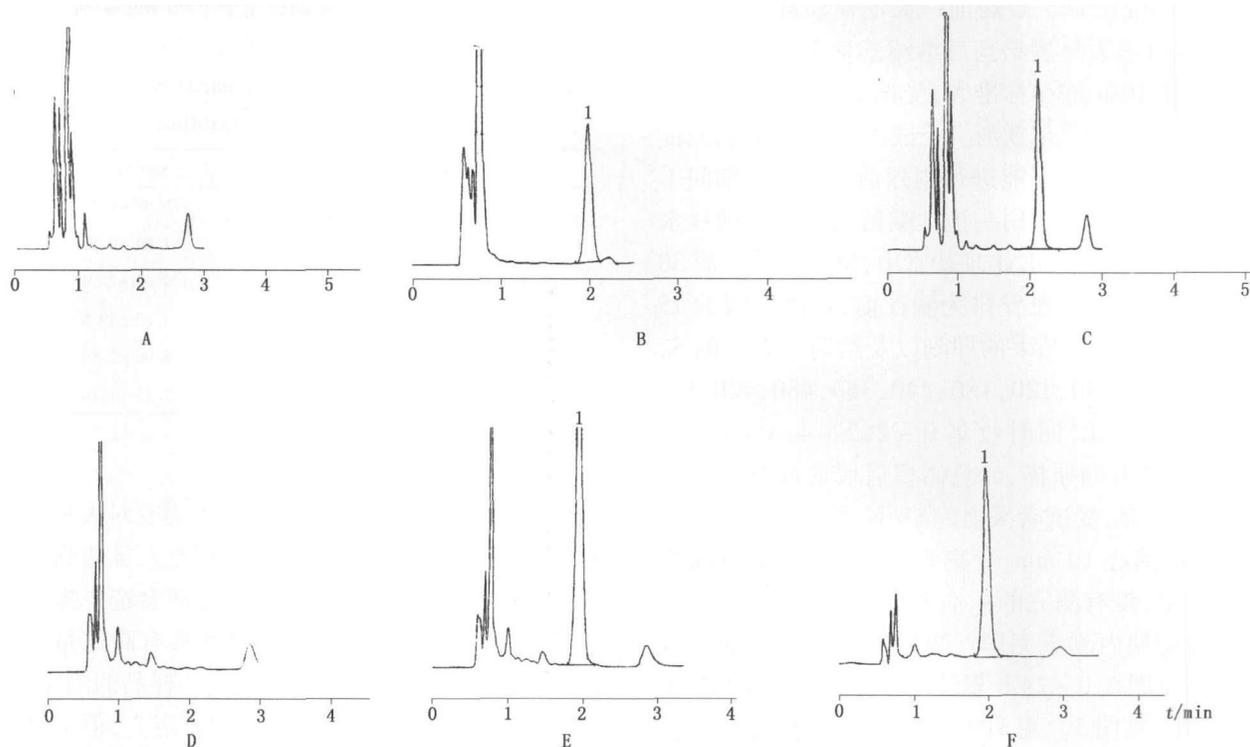


图 1 色谱图

Fig 1 Chromatograms

A. 空白血清 (blank serum) B. 空白血清 + 头孢他啶 (终浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (blank serum spiked with ceftazidime $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) C. 给药后 1 h 的血清样品 (serum sample 1 h after intravenous administration of ceftazidime) D. 空白尿样 (blank urine) E. 空白尿样 + 头孢他啶 (终浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (blank urine spiked with ceftazidime $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) F. 给药后 0~2 h 的尿样 (urine sample 0~2 h after intravenous administration of ceftazidime) 1 头孢他啶 (ceftazidime)

表 1 日内和日间变异 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $n = 5$)

Tab 1 Intra-day and inter-day precision

样品 (sample)	C/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	日间 (intra-day)		日内 (inter-day)	
		mean \pm SD/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD %	mean \pm SD/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD %
血清 (serum)	1.38	1.39 \pm 0.10	6.9	1.58 \pm 0.09	5.4
	12.4	12.00 \pm 0.24	2.0	12.76 \pm 0.11	0.86
	111.7	113.99 \pm 1.61	1.4	115.31 \pm 0.44	0.38
尿样 (urine)	1.38	1.49 \pm 0.12	7.8	1.44 \pm 0.09	6.0
	12.4	13.07 \pm 0.14	1.0	12.67 \pm 0.17	1.4
	111.7	114.00 \pm 0.58	0.51	113.80 \pm 0.34	0.30

表 2 绝对回收率 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $n = 5$)

Tab 2 Absolute recoveries

样品 (sample)	浓度 (concentration) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	实测值 (found) \pm SD/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	回收率 (recoveries) %	RSD %
血清 (serum)	1.38	1.58 \pm 0.08	115.0	5.0
	12.4	12.38 \pm 0.10	100.0	0.84
	111.7	107.90 \pm 0.61	96.1	0.57
尿样 (urine)	1.38	1.44 \pm 0.09	105.2	5.9
	12.4	12.70 \pm 0.17	102.2	1.3
	111.7	113.71 \pm 0.50	102.1	0.44

12名受试者于服药前一天吃清淡晚餐后禁食12 h, 受试当天早晨给药后继续禁食至4 h, 分别在给药后4, 10 h进食标准餐, 受试期间可以饮水, 不能饮茶、咖啡及其他饮料。受试者在试验期间, 只能在专门病房活动, 不能进行剧烈活动。试验期间不能饮酒、吸烟。注射用头孢他啶钠用少量生理盐水溶解后, 加入250 mL生理盐水中, 恒速静脉点滴30 min。试验期间采血安排为点滴前、点滴期间的15 min, 点滴30 min结束的即刻以及给药结束后的5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480, 720 min取静脉血5 mL, 同时收集0~2, 2~4, 4~8, 8~12, 12~24 h的尿样, 计总体积后留取部分尿样于-20℃保存, 受试者采血完毕后, 可以离去。4000 r·min⁻¹离心10 min, 分离血清, 给药后的血标本立即测定, 没有测完的标本于-20℃保存, 并在样品的稳定期内测定完毕。测得的平均血药浓度时间曲线见图2, 0~24 h累计尿排泄率为(78.9%±17.2)%, 见图3。用3P97药代动力学计算软件求得主要药代动力学参数, 见表3。

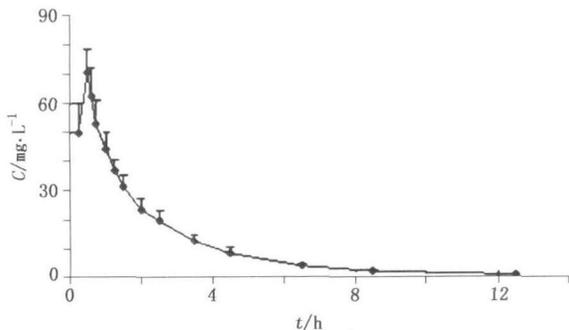


图2 12名受试者静脉给予1000 mg 头孢他啶后的平均血药浓度-时间图(n=12)

Fig 2 The mean serum concentration versus time profile after iv administration of 1000 mg ceftazidime

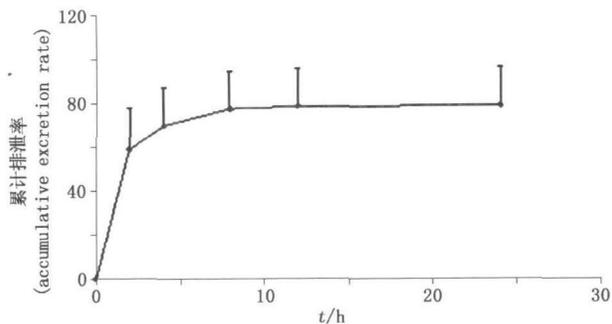


图3 12名受试者静脉给予1000 mg 头孢他啶后的平均尿药累计排泄图(n=12)

Fig 3 Average accumulative excretion rate of ceftazidime in urine after iv administration of 1000 mg to 12 subjects

表3 健康受试者单剂量给予1000 mg 头孢他啶后的主要药代动力学参数

Tab 3 Main pharmacokinetic parameters after iv dose of 1000 mg ceftazidime

参数 (parameters)	mean ± SD
$C_{max} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	70.58 ± 8.230
$t_{1/2} / \text{h}$	1.89 ± 0.570
$AUC_{0-24} / \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	139.02 ± 19.49
$AUC_{0-\infty} / \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	143.65 ± 19.57
V_d / L	8.96 ± 2.590
$Cl / \text{L} \cdot \text{h}^{-1}$	7.34 ± 1.180

3 讨论

3.1 分析通量 在新药研发阶段, 需要对大量化合物进行药代动力学研究, 这使得研究人员遇到越来越多的样品测试压力, 研究人员通常会选择提高分析通量的分析方法。LC-MS/MS具有高通量分析的优点, 一般可以用3 min完成1个样品的测定, 最快可以在15 s内完成1个样本的测定^[4], 但该种仪器价值昂贵、使用成本高。目前, HPLC在国内实验室内普及度远远高于LC-MS/MS, 因此, 提高HPLC的使用效率将加快新药研发的步伐。本试验采用3 μm 填料进行血清和尿样中头孢他啶的分析, 在不改变现有设备的情况下, 实现快速测定, 分析通量由常规色谱柱的144个/24 h可以达到480个/24 h(不考虑进样时间)。

3.2 色谱柱压 按照理论公式^[3], 在保持色谱柱长度, 流动相粘度、流速、内径不变的情况下, 色谱柱压的大小与填料粒度直径的平方呈反比。因此, 使用细粒度的填料会显著增加色谱柱的柱压。为了减少柱压, 采取的措施是缩短细粒度填料的色谱柱长度, 增加色谱柱内径, 也可以采取流动相加温降低粘度的方式。目前的快速分离色谱系统, 流动性的温度可以达到100℃。在本试验中, 采用了7 mm 内径、53 mm 长的色谱柱, 即使在流速达到2 mL·min⁻¹时, 柱压也维持在150 kg·cm⁻²左右。加入保护预柱可以减少样品中细微颗粒对色谱柱的污染。

3.3 采样频率 当分析时间缩短时, 如要保持对色谱峰的准确记录, 可以采取提高采样频率的办法。本试验没有调整采样的频率, 主要考虑所获得的色谱图中, 其流出峰的峰宽在正常的记录峰宽范围内。

3.4 流动相流速 填料粒度越小的色谱柱, 其最小理论板高受流速变化的影响越小, 通常5 μm 填

料最小理论板高时的流速在 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 左右, 而 $3 \mu\text{m}$ 填料的最小理论板高的流速在 $2 \sim 3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。本试验的流速设定在 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 可以兼顾到柱压和分析速度。

3.5 分析测试 据文献资料介绍^[5], 静脉 30 mL 滴注 1 g 头孢他啶后, 血峰浓度可以达到 $69 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 消除半衰期约为 1.9 h 大于 80% 的给药剂量在 24 h 内经尿排泄。本试验采用 $3 \mu\text{m}$ 填料的色谱柱所建立的测定方法对血清和尿中头孢他啶的浓度进行了准确和快速的测试, 所得到的药代动力学参数与文献报告结果基本一致。

4 结论

与使用 $5 \mu\text{m}$ 填料的常规 HPLC 方法比较, 在不增加仪器投资的情况下, 使用 $3 \mu\text{m}$ 填料的色谱柱可以显著缩短分析时间, 提高了分析通量。

参考文献

- 1 YUE Bing-yan(岳炳岩), PENG Jun(彭军). High performance liquid chromatographic analysis of the concentration of cefazidime in earlobe serum(高效液相色谱法测定微量耳血中头孢他啶的浓度). *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 1995, 15(10): 435
- 2 ZHU Zhu(朱珠), WANG Hong-na(王宏钠), XU Xiao-wei(徐小微). The determination of ceftazidime in human serum by means of high performance liquid chromatography(HPLC测定人血清中头孢他啶浓度). *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1995, 30(6): 351
- 3 AI Hua(艾华), WANG Guang-ji(王广基), GU Yi(顾轶), *et al* Application of ultra performance liquid chromatography in contemporary pharmacokinetics(超高效液相色谱在现代药代动力学中的应用). *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2007, 38(4): 294
- 4 WEI Min-ji(魏敏吉), ZHANG Pu(张朴). Progress in the high-throughput pharmacokinetic studies(高通量药代动力学研究进展). *Chin J Med Guide* (中国医药导刊), 2007, 9(2): 136
- 5 Paul Walsh Physicians' Desk Reference(PDR). 56th Ed Montvale New Jersey, USA: Medical Economics company Inc., 2002. 1541

(本文于 2008 年 2 月 27 日收到)

全国药品快检技术教员暨湖北省快检技术学员培训班在武汉召开

2009 年 4 月 8 日至 13 日, 全国药品快检技术教员暨湖北省快检技术学员培训班在湖北省武汉市召开。中检所的专家、教员, 全国药品快检技术教员以及湖北省各市、州、直管市、林区的 70 多名专业技术人员参加了培训班。本次培训班是我国药品快检技术领域的高层次培训班, 集中了全国高水平的快检专家和全国各地高水平的教员。培训的内容既涉及到快检领域最前沿、最尖端的创新成果, 又结合实践体现出很强的实用性。

本次培训班包括药品快检技术信息管理平台和近红外快速鉴别系统培训班, 对各药品快检信息软件更新升级后的变化和使用方法以及近红外快速鉴别系统进行了全面的培训。

培训期间, 中检所及相关公司技术人员对湖北省的 18 台药品检测车车载系统和近红外快检软件进行全面的升级和更新, 并对 18 台车载近红外光谱仪进行检查和维护。

详见 <http://www.nicpbp.org.cn>