

### 3 讨论

#### 3.1 缓冲溶液浓度对分离的影响

磷酸盐缓冲体系是毛细管电泳分析中最常用的缓冲体系之一,它的紫外吸收低,因而本实验也选用磷酸盐缓冲体系。缓冲溶液的浓度不仅影响毛细管内表面的 Zeta 电势,还影响溶液的黏度系数及分析物的扩散系数,最终影响分析物的分辨率和迁移时间<sup>[5]</sup>。改变磷酸盐缓冲液 (pH 3.0) 的浓度使其依次为 10, 20, 30, 40 mmol · L<sup>-1</sup>, 结果发现当浓度大于 30 mmol · L<sup>-1</sup> 时,由于较大电流产生大量焦耳热和严重的噪声信号不利于检测限的提高,同时也明显的引起区带展宽;当浓度小于 20 mmol · L<sup>-1</sup> 时,迁移时间相对延长,综合考虑,选择 20 mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸钠溶液为缓冲溶液。

#### 3.2 缓冲液 PH 的选择

本实验测定的是一种生物碱,故选择了区带电泳,缓冲体系由缓冲试剂和 pH 值调节剂两部分组成,其中缓冲试剂的选择主要由所需的 pH 值决定,而 pH 值则依样品的性质和分离效率而定,pH 的选择是决定分离成败的一大关键。在分别考察 pH 为 2.5, 2.8, 3.0, 3.2, 3.5, 4.0 时,发现 pH 3.0 的理论塔板数高,分离时间短。

#### 3.3 运行电压的选择

本实验考察了 3 种分离电压 15, 17.5, 20 kV, 随着电压的加大,育亨宾的迁移时间均呈现缩短趋势,峰宽均减小。但是随着电压的增加,其产生的焦耳热也明显增大,当电压等于 20 kV 时,电流已经达到 200 mA 左右,这就必然使得分离的重复性大大降低,所以最后确定应用电压值为 15 kV。

#### 3.4 毛细管清洗条件的选择

临用前采用合适的预清洗好的毛细管是保证结果重复的一个必要条件。有关研究表明:为了减少预清洗时间,预清洗液的 pH 值与缓冲溶液的 pH 值间不应有较大的差异。

从节省预清洗时间方面考虑,只在每天开机后依次用 1 mol · L<sup>-1</sup> 和 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 的 NaOH 分别清洗 4 min, 纯水冲洗 5 min, 背景缓冲液冲洗 5 min, 每次测定间省去 0.1 mol · L<sup>-1</sup> NaOH 清洗之步骤,而仅用缓冲溶液清洗 5 min, 结果大大提高了迁移时间的精密度,峰面积的精密度也相应增加。运行 6 次样品后跟换缓冲液。

本实验利用 HPCE 分离效率高、分析速度快等特点对育亨宾树皮中育亨宾碱进行探讨,相比较 UV 和荧光更快,更方便,通过对其线性、精密度、重复性以及回收率的考察,为控制育亨宾树皮中育亨宾提供一种新的快速、简便方法。

### REFERENCES

- [1] ANNE J, FRANCK A D, TOMOMORI K, *et al*, The indole alkaloids brucine, yohimbine, and hypaphorine are indole-3-acetic acid-specific competitors which do not alter auxin transport[J]. *Physiol Plant*, 2004, 120, 503-508.
- [2] WANG Y, WANG Y F, REN G F. In Situ Identification of Thin-layer Chromatography- Fourier Raman Spectroscopy of Yohimbine in *Rauwolfia Verticillata* Bail[J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2004, 4 (1), 31-34.
- [3] BRIGITTE S K, MARKUS F, HANS U S. Temporary inactivation of the rostral perirhinal cortex induces an anxiolytic-like effect on the elevated plus maze and on the yohimbine-enhanced startle response[J]. *Behav Brain Res*, 2005, 163, 168 - 173.
- [4] ZHAO Y, YANG X B, LI X H, *et al*. Monosaccharide composition analysis of pumpkin polysaccharides by capillary zone electrophoresis[J]. *Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学杂志)*, 2006, 23 (4), 323-326.

收稿日期: 2006-04-14

## HPLC 测定人血浆中帕珠沙星浓度

邓鸣<sup>1</sup>, 张运好<sup>2</sup>, 侯艳宁<sup>2</sup> (1. 解放军第 261 医院药剂科, 北京 100094; 2. 白求恩国际和平医院临床药理室, 石家庄 050082)

**摘要:**目的 建立测定人血浆中帕珠沙星浓度的高效液相色谱法。方法 血浆样品用 10% 高氯酸沉淀蛋白。色谱柱为 Diamonsil C<sub>18</sub> 柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.02 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钠溶液 (含三乙胺 0.5%, 用磷酸调至 pH 3.0) 乙腈 (82:18), 流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 紫外检测波长 245 nm。结果 血浆中内源性物质对样品测定无干扰。本方法线性范围为 0.05 ~ 50 μg · mL<sup>-1</sup> (r=0.9999), 最低定量浓度为 0.05 μg · mL<sup>-1</sup>, 提取回收率大于 80%, 方法回收率为 100.6% ~ 101.4%, 日内、日间 RSD 均小于 6%。结论 本法简便、灵敏、准确, 适用于帕珠沙星药动学的研究。

**关键词:**帕珠沙星; 高效液相色谱; 血药浓度

**中图分类号:** R917.794; R969.11; R917.101

**文献标识码:** B

**文章编号:** 1007-7693 (2008) 05-0428-04

作者简介: 邓鸣, 女, 硕士, 副主任药师

TEL: (010) 66346279

E-mail: dm322@sina.com

# Determination of Pazufloxacin in Human Plasma by HPLC

DENG Ming<sup>1</sup>, ZHANG Yun-hao<sup>2</sup>, HOU Yan-ning<sup>2</sup> (1. Department of Pharmacy, the 261th Hospital of PLA, Beijing 100094, China; 2. Department of Clinical Pharmacology, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, China)

**ABSTRACT:OBJECTIVE** To establish an HPLC method for the determination of pazufloxacin in human plasma **METHODS** Proteins in plasma samples were precipitated by 10% perchloric acid. Pazufloxacin was separated on a Diamonsil C<sub>18</sub> column (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase consisted of 0.02 mol · L<sup>-1</sup> sodium dihydrogen phosphate solution (contained 0.5% triethylamine, pH was adjusted to 3.0 with phosphoric acid) - acetonitrile (82:18) at a flow rate of 1.0 mL · min<sup>-1</sup>. The UV detection wavelength was set at 245 nm. **RESULTS** The blank plasma did not interfere with the determination of the analytes. The linear range was of 0.05 ~ 50 μg · mL<sup>-1</sup> (r = 0.9999). The limit of quantitation was 0.05 μg · mL<sup>-1</sup>. The method recovery was 100.6% ~ 101.4%. Within-day and between-day RSD were less than 6%. **CONCLUSION** The method was simple, sensitive and accurate, which was suitable for the pharmacokinetic study of pazufloxacin.

**KEY WORDS:** pazufloxacin; HPLC; blood drug concentration

帕珠沙星 (pazufloxacin) 为新一代喹诺酮类广谱抗菌药物, 于 2002 年首次在日本上市, 通过抑制细菌 DNA 拓扑异构酶和的活性抑制细菌 DNA 的合成, 由于其分子结构中 7 位引入了氨基环丙基, 不良反应比同类品种明显降低。临床用于治疗革兰阳性菌及阴性菌引起的呼吸道、泌尿生殖系统、皮肤软组织及外科感染。文献报道测定血浆中帕珠沙星浓度的方法有 HPLC 荧光法<sup>[1-2]</sup>和 HPLC 紫外法<sup>[3-6]</sup>, 但都不同程度地存在着样品处理过程复杂、沉淀剂酸度偏高对仪器有损害、分析时间长等。笔者建立了一种简便、灵敏、快速的 HPLC 紫外法, 并将此法应用于健康志愿者静脉滴注帕珠沙星氯化钠注射液的药动学研究。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (包括四元泵、自动进样器、柱温箱、紫外检测器、A.08.03 化学工作站, 美国安捷伦公司); PHS-3C 型精密 pH 计 (上海精密科学仪器有限公司); BP211D 型十万分之一天平 (德国 Sartorius 公司); XW-80A 旋涡混合器 (上海精科实业有限公司); TGL-16B 型离心机 (上海安亭科学仪器厂); LDZ5-2 型离心机 (北京医用离心机厂)。

### 1.2 试剂

甲磺酸帕珠沙星对照品 (天津华津制药厂, 含量 100.1%, 批号 20050601); 甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液 (天津华津制药厂, 规格 300 mg · 100 mL<sup>-1</sup>, 批号 041025)。乙腈为色谱纯; 磷酸二氢钠、高氯酸为分析纯; 水为乐百氏纯净水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

分析柱: Diamonsil C<sub>18</sub> (200 mm × 4.6 mm, 5 μm, 迪马公司); 保护柱: XDB-C<sub>18</sub> (12.5 mm × 4.6 mm, 5 μm, 安捷伦公司); 流动相: 0.02 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钠溶液 (含三乙胺 0.5%, 用磷酸调至 pH 3.0) - 乙腈 (82:18), 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温: 30 °C; 紫外检测波长: 245 nm。

中国现代应用药学杂志 2008 年 10 月第 25 卷第 5 期

### 2.2 对照品溶液制备

精密称取甲磺酸帕珠沙星对照品 40.64 mg, 置 25 mL 量瓶中, 用水溶解并稀释至刻度, 配制成帕珠沙星浓度为 1.250 μg · mL<sup>-1</sup> 的储备液。将该储备液用水稀释成 1.25, 2.5, 5, 12.5, 50, 125, 500, 1000 μg · mL<sup>-1</sup> 的系列溶液, 备用。

### 2.3 血浆样品处理

取血浆样品 0.5 mL, 加入 10% 高氯酸 150 μL, 涡旋混合 1 min, 16 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液 20 μL 进样分析。

### 2.4 方法专属性

取空白血浆 0.5 mL, 按“2.3 项下操作, 得色谱图 1-A; 取空白血浆 0.5 mL, 加入 50 μg · mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液 20 μL, 按“2.3 项下操作, 得色谱图 1-B; 取健康受试者用药后的血浆样品 0.5 mL, 按“2.3 项下操作, 得色谱图 1-C。结果表明, 空白血浆中内源性物质不干扰帕珠沙星的测定, 帕珠沙星的保留时间约为 5.7 min。

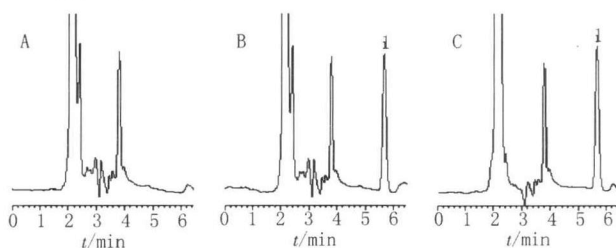


图 1 帕珠沙星 HPLC 色谱图

A - 空白血浆; B - 空白血浆加入帕珠沙星; C - 血浆样品; 1 - 帕珠沙星

Fig 1 HPLC chromatograms of pazufloxacin

A - blank plasma; B - blank plasma with pazufloxacin; C - a plasma sample; 1 - pazufloxacin

### 2.5 标准曲线

取空白血浆 0.5 mL, 加入帕珠沙星对照品系列溶液 20 μL, 配制成帕珠沙星浓度为 0.05, 0.2, 0.5, 2, 5, 20, 50 μg · mL<sup>-1</sup> 的含药血浆样品, 按“2.3 项下操作后进样分析,

以帕珠沙星浓度 ( $C$ ) 为横坐标, 帕珠沙星的峰面积 ( $Y$ ) 为纵坐标, 采用加权 ( $1/C^2$ ) 最小二乘法进行回归, 回归方程为:  $Y = 69.2527C + 0.02879$ ,  $r = 0.9999$ 。结果表明, 血浆中帕珠沙星浓度在  $0.05 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  内线性良好。血浆中帕珠沙星的最低定量浓度为  $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

## 2.6 提取回收率

配制低、中、高 3 个浓度 (分别为  $0.1, 2, 40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的血浆样品各 6 份, 按“2.3 项下操作记录帕珠沙星的峰面积  $A$ ; 另以水代替空白血浆, 余同上操作, 记录帕珠沙星的峰面积  $A_s$ 。用峰面积比值求算血浆中帕珠沙星的提取回收率 ( $r = A_s/A_{\text{std}} \times 100\%$ )。结果见表 1。3 个浓度血浆样品中帕珠沙星的平均提取回收率为 85.8%。

表 1 血浆样品中帕珠沙星的提取回收率 ( $n=6$ )

Tab 1 Extraction recovery of pazufloxacin in human plasma ( $n=6$ )

加入量 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	提取回收率 / %	RSD / %
0.1	90.4 $\pm$ 3.7	4.0
2	83.9 $\pm$ 1.4	1.7
40	83.1 $\pm$ 0.9	1.0

## 2.7 精密度与方法回收率

配制低、中、高 3 个浓度 (分别为  $0.1, 2, 40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的血浆样品, 按“2.3 项处理后进样, 每个浓度 6 份, 重复 4 d

表 3 血浆中帕珠沙星的稳定性 ( $n=2$ )

Tab 3 Stability of pazufloxacin in human plasma ( $n=2$ )

加入量 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	室温放置 24 h		冻融 3 次		-20 保存 10 d	
	测得量 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RE / %	测得量 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RE / %	测得量 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RE / %
0.10	0.098	-2.0	0.097	-2.7	0.103	2.8
2.00	2.00	0.0	2.01	0.3	2.02	0.8
40.00	39.48	-1.3	40.48	1.2	40.82	2.1

表 4 处理后血浆中帕珠沙星的稳定性 ( $n=2$ )

Tab 4 Stability of the processed samples of pazufloxacin in human plasma ( $n=2$ )

加入量 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	处理后室温放置 24 h	
	测得量 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RE / %
0.10	0.107	7.2
2.00	2.07	3.4
40.00	41.88	4.7

## 2.9 方法应用

10 名健康志愿者, 男、女各半, 年龄 ( $22.1 \pm 1.1$ ) 岁, 体重 ( $59.2 \pm 6.9$ ) kg, 身高 ( $1.67 \pm 0.08$ ) m; 试验前进行病史询问和体格检查, 心电图、胸透、肝功、肾功、血常规、尿常规检查等均正常。受试者试验前两周及试验期间未服用任何其他药物, 试验期间禁烟酒及含咖啡因的饮料。受试者了解试验目的、方法、意义以及可能发生的不良反应后, 签署知情同意书。试验方案经白求恩国际和平医院伦理委员会批准。受试者于试验前 12 h 吃清淡晚餐后禁食, 试验当日清晨 8 时

测定, 并与标准曲线同时进行, 计算测得浓度, 与理论浓度对照, 采用单因素方差分析法求得本法的精密度, 用 RSD 表示。方法回收率用测定浓度的平均值与理论浓度比值的百分数表示, 结果见表 2, 日内 RSD  $< 5.2\%$ , 日间 RSD  $< 5.6\%$ , 方法回收率为  $100.6\% \sim 101.4\%$ , 满足生物样品分析方法的要求。

表 2 精密度和方法回收率

Tab 2 Method recovery and precision of pazufloxacin in human plasma

加入量 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	测得量 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	日内 RSD / %	日间 RSD / %	方法回收率 / %
0.1	0.101 $\pm$ 0.005	5.1	3.3	101.1 $\pm$ 5.0
2	2.030 $\pm$ 0.05	2.2	2.3	101.4 $\pm$ 2.3
40	40.240 $\pm$ 1.13	2.1	5.5	100.6 $\pm$ 2.8

## 2.8 稳定性试验

配制低、中、高 3 个浓度 (分别为  $0.1, 2, 40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的血浆样品, 每个浓度 2 份, 分别考察其在室温、冻融循环、-20

保存以及处理后在室温条件下的稳定性, 以当日随行标准曲线计算血浆样品中帕珠沙星的浓度, 将测定浓度的平均值与理论浓度对照, 结果见表 3, 表 4, 相对偏差  $RE < \pm 7.3\%$ , 表明血浆样品在室温放置 24 h, 冻融 3 次、-20 保存 10 d 以及处理后在室温放置 24 h 的条件下都是稳定的。

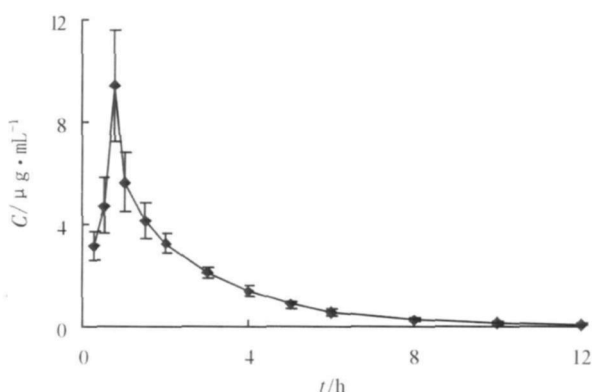


图 2 10 名健康受试者静脉滴注甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液 300 mg 后的平均血药浓度-时间曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of pazufloxacin after single intravenous infusion of 300 mg in 10 healthy volunteers

静脉滴注甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液 300 mg, 静脉滴注时间 0.75 h, 给药 2 h 后统一饮水, 4, 10 h 后统一进餐。于给

药前及给药开始后 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 h 分别从肘静脉取血 3 mL 置肝素管中, 3 000 r · min<sup>-1</sup>离心 10 min, 分离血浆, 置 -20 °C 下冻存备用。用本法测定受试者给药后血浆中帕珠沙星的浓度, 10 名健康受试者单剂量静脉滴注甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液 300 mg 后的平均血药浓度-时间曲线见图 2。将受试者给药后的血药浓度值录入 DAS 2.0 统计软件, 计算各药动学参数 (统计矩参数)。10 名健康受试者的主要药动学参数 (统计矩参数) 计算结果见表 5。

表 5 10 名健康受试者静脉滴注甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液 300 mg 后的主要药动学参数

Tab 5 Pharmacokinetic parameters of pazufloxacin after single intravenous infusion of 300 mg in 10 healthy volunteers

统计矩参数	$\bar{x} \pm s$
$C_{max} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	9.43 ± 2.15
$T_{max} / \text{h}$	0.75 ± 0.00
$t_{1/2z} / \text{h}$	1.75 ± 0.18
$AUC_{0-12\text{h}} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$	16.93 ± 1.73
$AUC_{0-} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$	17.10 ± 1.74
$MRT_{0-12\text{h}} / \text{h}$	2.43 ± 0.27
$MRT_{0-} / \text{h}$	2.55 ± 0.31
$V_z / \text{L}$	44.93 ± 7.08
$Cl_r / \text{L} \cdot \text{h}^{-1}$	17.72 ± 1.94

### 3 讨论

本试验建立了 HPLC 紫外法测定人血浆中帕珠沙星, 与文献报道的 HPLC 荧光法<sup>[1-2]</sup>相比, 紫外检测器更具有适用性和普遍性, 且用于配制流动相的试剂价廉低毒, 简单易得; 文献<sup>[3]</sup>每一样品的测定时间较长, 在 10 min 以上, 且所用沉淀剂 (25% 高氯酸) 酸度较高; 文献<sup>[4]</sup>采用二氯甲烷为提取溶剂, 毒性较大, 操作烦琐。本试验血样仅经过 10% 高氯酸沉淀蛋白后即可进样分析, 操作简便、快速, 大大缩短了样品处理时间, 且每一样品的测定可在 6.5 min 内完成。结果表明, 此法快速、灵敏、准确、专属性强, 为帕珠沙星的药动学研究提供了可靠的方法。

生物样品的预处理方法主要有提取法和沉淀法。本试

验采用沉淀法对血样进行处理。比较了甲醇、高氯酸、三氯醋酸等不同沉淀剂对血样处理的效果, 结果表明, 用高氯酸沉淀时对样品稀释度较小、干扰较少。试验中分别试用了 6%、10% 及 15% 的高氯酸, 6% 的高氯酸浓度太低, 不能有效地沉淀蛋白; 15% 的高氯酸使样品 pH 过低, 对色谱柱有损害; 故选用了 10% 的高氯酸。

曾采用 0.02 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钠溶液-乙腈 (80:20), 帕珠沙星的色谱峰拖尾严重, 加入 0.5% 三乙胺, 可使峰形明显改善; 通过考察流动相组分及 pH 值对测定结果的影响, 确定流动相为 0.02 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钠溶液 (含三乙胺 0.5%, 用磷酸调至 pH 3.0) 乙腈 (82:18), 在此条件下帕珠沙星峰形对称、保留时间适中。

本试验所得的主要药动学参数与文献报道基本一致<sup>[2,6]</sup>。

### REFERENCES

- [1] YU Z C, CHEN B, ZHANG W X, *et al* Pharmacokinetics of pazufloxacin mesilate in Chinese healthy volunteers [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2006, 41(15): 1168-1171.
- [2] ZHOU L J, GU L H, WANG Y J, *et al* Pharmacokinetics of pazufloxacin injection in healthy volunteers [J]. *Fudan Univ J Med Sci* (复旦学报: 医学版), 2005, 32(6): 718-720.
- [3] REN Y, YUAN H J, YAN T, *et al* Determination of pazufloxacin mesilate in human plasma by HPLC [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2006, 26(4): 418-420.
- [4] YU Q, LIANG M Z, QIN Y P, *et al* Determination of pazufloxacin in human plasma by RP-HPLC [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2005, 14(9): 1180-1183.
- [5] LU L, LI K X, LI Y, *et al* HPLC studies on determination of pazufloxacin in human plasma [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2004, 24(5): 529-531.
- [6] WANG J, XIAO Y H, LV Y, *et al* Pharmacokinetics of pazufloxacin mesilate sodium chloride for injection [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2006, 15(10): 821-824.

收稿日期: 2007-04-27

## 胃痛舒片质量标准研究

赵艳普, 李冬梅, 袁浩, 冯丽 (河北省药品检验所, 石家庄 050011)

**摘要:**目的 建立胃痛舒片质量控制方法。方法 对甘草、厚朴进行了薄层色谱鉴别; 采用高效液相色谱法测定甘草酸的含量。色谱柱: SHMADZU VP-ODS (150 mm × 6.0 mm, 5 μm), 乙腈-0.017 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸溶液 (37:63) 为流动相; 检测波长为 250 nm。结果 测得线性范围 0.079 4 ~ 3.968 9 μg, ( $r=0.999 9$ ), 平均回收率 99.4%, RSD 为 1.5% ( $n=9$ )。结论 本法简便、准确、重复性好。

**关键词:**胃痛舒片; 甘草酸; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

作者简介: 赵艳普, 女, 副主任药师 Tel: (0311) 85212004-8042 E-mail: aayanpu@xina.com