

反相高效液相色谱法测定人血浆及尿液中甲磺酸帕珠沙星浓度

陈勇川*, 石英, 何菊英, 唐敏, 代青, 刘松青 (第三军医大学西南医院药学部、国家药品临床研究基地, 重庆市 400038)

中图分类号 R969.1 文献标识码 A 文章编号 1001-0408(2006)09-0677-03

摘要 目的: 建立血浆及尿液中甲磺酸帕珠沙星浓度的反相高效液相色谱分析方法。方法: 用甲醇沉淀血浆蛋白, 离心后取上清液进行色谱分析; 尿样稀释后离心取上清液进样。分析柱为 Diamonsil C₁₈, 流动相为乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾(含 1% 四甲基溴化铵)(8:92, V/V), 流速为 1.4 ml/min, 激发波长 320 nm, 发射波长 400 nm。结果: 甲磺酸帕珠沙星在血浆和尿液中的检测浓度线性范围均为 31.25 ~ 10 000 ng/ml ($r = 0.9999$); 在血浆、尿液中的相对回收率分别为 97.77% ~ 99.87%、98.31% ~ 100.82%, RSD < 1.0% ~ 3.0%。结论: 本方法准确可靠、操作简便, 适用于甲磺酸帕珠沙星的临床药动学及常规血药浓度监测。
关键词 甲磺酸帕珠沙星; 反相高效液相色谱法; 血药浓度; 尿药浓度

Determination of Pazufloxacin Mesilate Concentration in Human Plasma and Urine by RP-HPLC

CHEN Yongchuan, SHI Ying, HE Juying, TANG Min, DAI Qing, LIU Songqing (Dept. of Pharmacy, Southwest Hospital of the Third Military Medical University, State Pharmaceutical Clinical Research Base, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a RP-HPLC analytical method for the determination of pazufloxacin mesilate in human plasma and urine. METHODS: The plasma proteins were precipitated with methanol and the supernatant liquid obtained from the serum centrifugate was subjected to chromatographic analysis. The supernatant liquid obtained from the diluted urine centrifugate was subjected to sample introduction. The analytical column was Diamonsil C₁₈, the mobile phase consisted of acetonitrile - 0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate (containing 1% tetrabutylammonium bromide)(8:92, V/V) with a flow rate at 1.4 ml/min, excitation wavelength at 320nm and emission wavelength at 400 nm. RESULTS: The linear range of pazufloxacin mesilate in both plasma and urine was 31.25 ~ 10 000 ng/ml ($r = 0.9999$). The relative recoveries of pazufloxacin mesilate in human plasma and urine were 97.77% ~ 99.87% and 98.31% ~ 100.82%, respectively with RSD less than 1.0% ~ 3.0%. CONCLUSION: This method is accurate, reliable and simple and it is suitable for the pharmacokinetic study and routine monitoring of blood concentration of pazufloxacin mesilate.

KEY WORDS Pazufloxacin mesilate; RP-HPLC; Blood concentration; Urine drug concentration

济负担的最有效途径。

与 2000 年相似, 2004 年 MP、CsA、Pred 仍为使用频度最高的抗排斥用药。但与以往相比, 免疫抑制剂的种类有所增加, 各种免疫抑制剂的使用频率都有所下降, 其中 CsA 作为抗免疫排斥的首选药物的使用频率也有所下降。临床应用 CsA, 多使用 CsA+MMF+Pred 三联疗法, 此方案可有效防止急性排斥反应的出现, 而且副作用较传统的 CsA+AZP+Pred 小。CsA+西罗莫司+Pred 等新方案也有尝试性应用。

2000 年的调查中发现仅有 3.6% 的患者使用了 FK506,

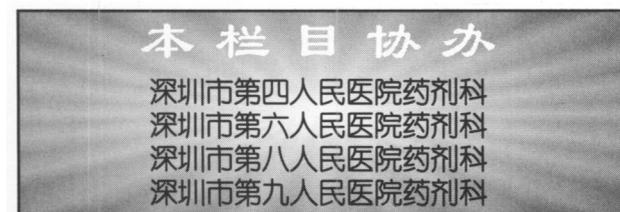
而本次调查中有 19.35% 的患者使用了 FK506。在大规模临床试验中发现, FK506 的不良反应较 CsA 小, 防止急性和慢性排斥反应疗效好。因此, 目前越来越多的患者开始使用。

肾移植患者在使用免疫抑制剂的同时, 应密切注意药物的相互作用, 已知的 CsA 与其它药物相互作用较多, 但由于大部分相互作用都是影响 CsA 的血药浓度, 故在临床使用过程中进行血药浓度监测可有效避免相互作用的发生。而新型免疫抑制剂的应用, 可能存在一些尚未发现的药物相互作用, 如 FK506、MMF 等均存在潜在的相互作用问题, 临床应用过程中应予密切注意。

参考文献

- [1] 田建国, 李芸. 我国器官移植事业成绩斐然[J]. 首都医药, 2000, 8(9): 23.
- [2] 史丽敏, 徐香韵. 住院期间肾移植患者免疫抑制剂应用情况调查[J]. 中国临床药学杂志, 2003, 12(2): 84.
- [3] 万江华, 勒风炼, 李黔生, 等. 肾移植受者环孢素 A 治疗窗浓度研究[J]. 中国药房, 2002, 13(4): 224.

(收稿日期: 2005-11-17 修回日期: 2006-02-28)



* 硕士, 副主任药师。研究方向: 临床药理。电话: 023-68765495

甲磺酸帕珠沙星 (Pazufloxacin mesylate)^[1]是由日本研发的新型喹诺酮类广谱抗菌药物,为帕珠沙星的甲磺酸盐,于2002年在日本首次上市。帕珠沙星的作用靶位为细菌DNA促旋酶和拓扑异构酶VI,该药不仅保留了抗G⁻菌的高活性,且明显增强了抗G⁺菌活性,对厌氧菌也有较强的抗菌活性^[2-7]。笔者用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定甲磺酸帕珠沙星在人体血浆和尿液中的药物浓度,为研究其在健康人体内的药动学试验提供测定方法。

1 试药与仪器

甲磺酸帕珠沙星对照品(纯度:99.6%,批号:030701,临用前以纯水为溶剂配制浓度为1.0 mg/ml的甲磺酸帕珠沙星储备液,4℃冷藏,用时稀释至适宜浓度)、甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液(规格:300mg/100ml,批号:030512),均由重庆莱美药物研究所提供;乙腈、甲醇为色谱纯,磷酸、四丁基溴化铵为分析纯。

2690 Alliance液相色谱仪,包括474荧光检测器、Millennium 32数据采集处理系统(美国Waters公司);高速离心机(美国Abbott公司);超纯水器、微孔滤膜及过滤装置(美国Millipore公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Diamonsil C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钾(含1%四丁基溴化铵)(8:92, V/V);流速:1.4 ml/min;激发波长:320 nm,发射波长:400 nm;柱温:30℃;进样量:20 μl。

2.2 血浆样本预处理

取待测血浆0.3 ml,加入甲醇0.9 ml,振荡15 s沉淀蛋白,高速离心(13 000 r/min) 5 min,取上清液20 μl进样测定。

2.3 尿液样本预处理

取待测尿样品适量,用蒸馏水稀释至适当浓度,高速离心(13 000 r/min) 5 min,取上清液20 μl进样测定。

2.4 方法专一性

在上述色谱条件下,样品按上述方法操作,比较空白血浆(尿液)、空白血浆(尿液)+帕珠沙星对照品的色谱,考察方法的专一性。结果详见图1。

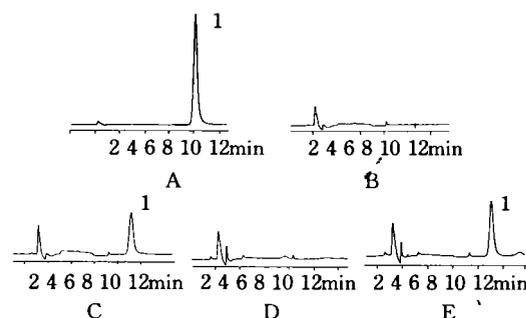


图1 HPLC

A. 帕珠沙星对照品; B. 空白血浆; C. 空白血浆+帕珠沙星对照品; D. 空白尿样; E. 空白尿样+帕珠沙星对照品; 1. 帕珠沙星

Fig 1 HPLC

A. standard pazufloxacin; B. blank plasma; C. blank plasma + standard pazufloxacin; D. blank urine sample; E. blank urine sample + standard pazufloxacin; 1. pazufloxacin

2.5 标准曲线绘制

取空白血浆(尿液)加入帕珠沙星对照品甲醇液(100 μg/ml)适量,使其浓度为20 000 ng/ml,再依次用空白血浆(尿液)稀释成10 000、5 000、2 000、1 000、500、250、125、62.5、31.25 ng/ml系列浓度溶液,按样品处理方法处理后进样测定。将帕珠沙星峰面积(A)对浓度(C)进行回归,得回归方程:(1)血样 $A = 17 895.91 + 1 061.261C$ ($r = 0.9999$, $n = 9$)、(2)尿样 $A = -8 384.096 + 1 036.104C$ ($r = 0.9999$, $n = 9$)。结果表明,检测浓度线性范围均为31.25~10 000 ng/ml,最低检测浓度均为15.625 ng/ml(以S/N ≥ 3计)。

2.6 回收率及精密度试验

取空白血浆(尿液)加入帕珠沙星对照品甲醇液(浓度为100 μg/ml)适量,分别稀释为高、中、低3种不同浓度(5 000、500、62.5 ng/ml),按样品处理方法处理后进样测定,将测得的高、中、低浓度样品的峰面积代入标准曲线方程,计算药物浓度,以测得量与加入量之比计算相对回收率,再分别于同日内测定及连续5 d内测定5次,计算日内及日间精密度,结果详见表1。

表1 方法回收率及精密度试验结果

Tab 1 Results of recovery rates and precision tests

加入浓度 (ng/ml)	血样					尿样				
	测定浓度 (ng/ml)	回收率 (%)	平均回收率 ($\bar{x} \pm s$)	日内RSD (%)	日间RSD (%)	测定浓度 (ng/ml)	回收率 (%)	平均回收率 ($\bar{x} \pm s$)	日内RSD (%)	日间RSD (%)
5 000	4 948.169	98.96	98.14 ± 0.70	0.7	1.0	5 044.633	100.89	100.82 ± 0.10	0.1	0.2
	4 858.32	97.17				5 032.317	100.65			
	4 885.29	97.71				5 043.293	100.87			
	4 918.866	98.38				5 040.806	100.82			
	4 924.924	98.50				5 043.933	100.88			
500	503.608	100.72	99.87 ± 1.06	1.1	1.8	490.132	98.03	98.31 ± 0.4	0.4	2.7
	498.788	99.76				492.475	98.50			
	490.453	98.09				491.78	98.36			
	502.786	100.56				489.561	97.91			
	500.991	100.20				493.897	98.78			
62.5	61.631	98.61	97.77 ± 2.95	3.0	1.7	62.774	100.44	100.56 ± 1.0	1.0	1.9
	62.372	99.80				62.764	100.42			
	58.081	92.93				62.039	99.26			
	62.663	100.26				63.771	102.03			
	60.778	97.24				62.888	100.62			

由表 1 可见, 血浆中甲磺酸帕珠沙星低、中、高 3 种浓度的相对回收率为 97.77%~99.87%, 日内、日间精密度分别小于 3.0%、1.8%; 尿液相对回收率为 98.31%~100.82%, 日内、日间精密度分别小于 1.0%、2.7%。

2.7 稳定性试验

将含药血浆(尿液)样品置于-40℃低温冰箱冷冻保存, 30d 后测定含量, 高、中、低 3 种浓度的样品含量下降变化均在 3% 以内(97.68%、99.39%、98.65%), 说明帕珠沙星血浆样品在-40℃低温保存条件下至少 30d 内含量保持稳定。

2.8 方法应用

10 名男性健康自愿者, 年龄 18a~23a, 体重(57.2±4.8) kg, 身高(168.3±4.7) cm, 体检示血压、心率、心电图、呼吸状况、肝、肾功能和血象无异常; 试验前 4wk 内未用过任何药物; 经院伦理委员会批准并自愿签署知情同意书。每位受试者于清晨单次静脉滴注试验药物, 剂量为 300mg/100ml, 滴注时间严格控制在 45min。给药后 2 h 方可再饮水, 4 h 后进统一标准餐。给药前禁食 12 h, 受试者于试验前 1d 和试验期间禁止饮用酒类和咖啡类饮料并避免剧烈运动, 亦不得长时间卧床。分别于给药前与给药后 0.25、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0、10.0 h 取静脉血 3.0 ml, 肝素抗凝, 分离血浆, -40℃冷冻保存, 2wk 内测定完毕。尿样: 分别于给药前和给药后 0h~2h、2h~4h、4h~6h、6h~8h、8h~10h、10h~12h、12~24h 时间段收集尿液标本, 记录体积, 留取 1ml, 置于-70℃冷冻保存至测定。10 名健康受试者的药-时曲线见图 2。

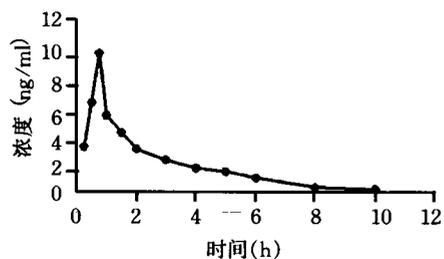


图 2 10 名健康受试者单次静脉滴注 300mg 甲磺酸帕珠沙星后血药浓度-时间曲线

Fig 2 Serum concentration-time curves in 10 healthy volunteers after single intravenous drip infusion of 300mg pazufloxacin mesylate

3 讨论

笔者建立的反相高效液相色谱-荧光检测法测定甲磺酸帕珠沙星在人体血浆和尿液中的药物浓度, 为研究其在中国健

康人体内药理学试验和生物等效性试验提供了灵敏、精确、可靠的测定方法。因甲磺酸帕珠沙星在血浆中的浓度较低, 采用常规紫外检测方法不能完全满足低浓度样品的测定要求, 经在试验中对甲磺酸帕珠沙星进行荧光全波长扫描发现, 其最大激发波长在 320nm 左右, 最大发射波长在 400nm 左右, 故选择以上荧光检测波长, 极大提高了方法检测的灵敏度和准确度。

根据甲磺酸帕珠沙星两性化合物的性质, 选择含有四丁基溴化铵作为离子对试剂的流动相, 改善了目标物的分离。用甲醇沉淀法处理血样, 其提取效率高, 杂质干扰少, 简化了试验步骤, 减少操作误差, 达到了生物样品分析的要求。试验过程中, 甲磺酸帕珠沙星在试验溶液、血浆及尿液样品中都保持了良好的稳定性。

参考文献

- [1] Mitsuyama J, Miyazaki S, Ishii Y, et al. Antibacterial activity of a new injectable quinolone pazufloxacin mesylate in vitro and in vivo [J]. *Jpn J Chemother*, 1999, 47(Suppl 1): S1.
- [2] Nishino T, Ikeda Y, Otsuki M, et al. In vitro and in vivo antibacterial activity of pazufloxacin mesylate, a new parenteral fluoroquinolone [J]. *Jpn J Chemother*, 1999, 47(Suppl 1): S25.
- [3] Mikamo H, Sato Y, Hayasaki Y, et al. In vitro activities of pazufloxacin, an injectable new quinolone, against bacteria causing infections in obstetric and gynecological patients [J]. *Jpn J Chemother*, 1999, 47(Suppl 1): S16.
- [4] 刘昌孝, 孙瑞元. 药物评价实验设计与统计学基础[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1999: 164~232.
- [5] Mitsuyama J, Takahata M, Yamashiro Y, et al. Antibacterial activity of a new injectable quinolone, pazufloxacin mesylate, in vitro and in vivo [J]. *Jpn J Chemother*, 1999, 47(Suppl 1): S37.
- [6] Shimada K, Oka S, Sano Y, et al. Phase II study of intravenously infused pazufloxacin mesylate [J]. *Jpn J Chemother*, 1999, 47(Suppl 1): S176.
- [7] Matsumoto T, Kumazawa J, Kumamoto Y, et al. Phase II clinical study of pazufloxacin mesylate in complicated urinary tract infection [J]. *Jpn J Chemother*, 1999, 47(Suppl 1): S209.

(收稿日期: 2006-01-06 修回日期: 2006-02-15)

卫生部将举办中国卫生发展与改革国际高级研修班

本刊讯 为提高我国卫生领域的高级行政管理干部的管理水平, 促进卫生事业的发展, 卫生部与清华大学、美国哈佛大学共同开展高级卫生行政人员培训项目。2006年7月, 该项目将举办第1期“中国卫生发展与改革国际高级研修班”, 研修班为期4周, 第1周国内培训, 第2周~4周国外培训。国内培训的主要内容包括公共卫生管理基础、公共卫生政策分析、公共

卫生部门管理能力建设、医院内部管理、医院改制、医患关系、领导力与医院公益性等课程。国外培训的主要内容包括健康政策分析工具、健康系统改革(概念和国际经验)、公共健康实践(主要事务和领导技能)以及社会实践等课程。将有来自全国的20余名学员参加第1期培训班, 学员条件为45岁以下的正处级以上干部, 具备一定的英语能力。