

# 高效毛细管电泳法测定大鼠血浆中头孢地尼浓度及其药动学研究

刘晓凤<sup>1\*</sup>, 谭梅英<sup>2</sup>, 詹利之<sup>3</sup>(1.广州医科大学附属肿瘤医院药学部, 广州 510095; 2.广东省第二中医院/广东省中医药工程技术研究院药学部, 广州 510095; 3.广州中医药大学热带医学研究所, 广州 510405)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)19-2658-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.19.19

**摘要** 目的:测定大鼠血浆中头孢地尼浓度,并进行药动学考察。方法:采用高效毛细管电泳法(HPCE)。使用熔融硅胶毛细管柱(75  $\mu\text{m}$ ,总长为30 cm,有效长度为21.5 cm),缓冲液为20 mmol/L柠檬酸,进样电压为10 kV持续10 s,分离电压为-20 kV,检测波长为214 nm。取6只大鼠ig头孢地尼溶液(20 mg/kg),分别于给药前及给药后0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、12、24 h经尾缘静脉取血0.2 mL进行测定。采用BAPP 2.0软件计算药动学参数。结果:头孢地尼质量浓度在0.2~50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好( $r=0.9997$ ),定量下限为0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;日内( $n=6$ )、日间( $n=3$ )精密度的RSD均不大于12.2%;稳定性试验的RSD $\leq 9.10\%$ ( $n=6$ );方法回收率为95.4%~114.3%(RSD=9.0%, $n=6$ );基质效应为63.5%~70.2%(RSD=10.39%, $n=6$ )。头孢地尼在大鼠体内的 $t_{1/2}$ 为(0.54 $\pm$ 0.01) h, MRT为(1.90 $\pm$ 0.14) h,  $c_{\text{max}}$ 为(32.92 $\pm$ 0.81)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $t_{\text{max}}$ 为(1.50 $\pm$ 0.02) h,  $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ 为(46.65 $\pm$ 0.44)  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ,  $\text{AUC}_{0-\infty}$ 为(46.83 $\pm$ 0.44)  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 。结论:该方法快速、准确、简便,可用于大鼠血浆中头孢地尼浓度的测定及其药动学考察。

**关键词** 头孢地尼;高效毛细管电泳法;大鼠;药动学

## Determination of Cefdinir Concentration in Rat Plasma by High Performance Capillary Electrophoresis and Its Pharmacokinetics Research

LIU Xiaofeng<sup>1</sup>, TAN Meiyong<sup>2</sup>, ZHAN Lizhi<sup>3</sup>(1.Dept. of Pharmacy, Cancer Hospital Affiliated to Guangzhou Medical University, Guangzhou 510095, China; 2.Dept. of Pharmacy, Guangdong Second TCM Hospital/Guangdong Province Engineering Technology Research Institute of TCM, Guangzhou 510095, China; 3.Institute of Tropical Medicine, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To determine the concentration of cefdinir in rat plasma, and investigate its pharmacokinetics. METHODS: High performance capillary electrophoresis (HPCE) was adopted by using fused-silica capillary (75  $\mu\text{m}$ , total length of 30 cm, effective length of 21.5 cm), buffer solution of 20 mmol/L citric acid, injection voltage of 10 kV for 10 s, separation voltage of -20 kV, and detection wavelength of 214 nm. 6 rats were intragastrically received cefdinir solution (20 mg/kg). 0.2 mL blood sample was taken from the tail vein before and 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 12, 24 h after administration. BAPP 2.0 software was used to calculate the pharmacokinetics parameters. RESULTS: The linear range of cefdinir ranged 0.2-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $r=0.9997$ ), lower limit of quantification was 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The intra-day ( $n=6$ ) and inter-day RSDs of ( $n=3$ ) precision test were no more than 12.2%; RSD of stability test was no more than 9.10% ( $n=6$ ); method recovery rate was 95.4%-114.3% (RSD=9.0%,  $n=6$ ); matrix effect was 63.5%-70.2% (RSD=10.39%,  $n=6$ ). The  $t_{1/2}$  of cefdinir in rats *in vivo* was (0.54 $\pm$ 0.01) h, MRT was (1.90 $\pm$ 0.14) h,  $c_{\text{max}}$  was (32.92 $\pm$ 0.81)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $t_{\text{max}}$  was (1.50 $\pm$ 0.02) h,  $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$  was (46.65 $\pm$ 0.44)  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$  and  $\text{AUC}_{0-\infty}$  was (46.83 $\pm$ 0.44)  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ . CONCLUSIONS: The method is rapid, accurate and simple, and can be used for the determination of cefdinir concentration in rat plasma and its pharmacokinetics research.

**KEYWORDS** Cefdinir; High performance capillary electrophoresis; Rats; Pharmacokinetics

- acute lung injury[J]. *Mol Med*, 2011, 17(3/4):293-307.
- [8] Bruns B, Hönle T, Kellermann P, *et al.* Divergent effects of neutrophils on fas-induced pulmonary inflammation, apoptosis, and lung damage[J]. *Shock*, 2017, 47(2):225-235.
- [9] Tunceroglu H, Shah A, Porhomayon J, *et al.* Biomarkers of lung injury in critical care medicine: past, present, and future[J]. *Immunol Invest*, 2013, 42(3):247-261.
- [10] Sharp C, Millar AB, Medford AR. Advances in understanding of the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome[J]. *Respiration*, 2015, 89(5):420-434.
- [11] 朱贲贲, 马晓鹏, 吴科锋, 等. 3-甲基嘌呤对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的保护作用及其机制研究[J]. *中国药房*, 2016, 27(4):464-468.

\*副主任药师。研究方向:药物分析。电话:020-66673666-2001。  
E-mail: liuxiaofengzlyy@126.com

(收稿日期:2016-11-15 修回日期:2017-04-27)  
(编辑:林静)

作为第三代口服头孢菌素类抗菌药物,头孢地尼主要用于治疗对其敏感的葡萄球菌属、链球菌属、肺炎球菌、消化链球菌、丙酸杆菌、淋病奈瑟氏菌、卡他莫拉菌、大肠埃希菌、克雷伯菌属、奇异变形杆菌、普鲁威登斯菌属、流感嗜血杆菌等菌株所引起的感染<sup>[1-3]</sup>。其具有抗菌谱广、抗菌作用强、临床疗效高、毒性低、过敏反应少、方便使用等特点<sup>[4]</sup>。

目前,通常采用高效液相色谱(HPLC)法进行头孢地尼的质量控制和药动学研究。但这些方法普遍存在样品和溶剂消耗大、分析时间长、色谱柱相对昂贵且易被蛋白和干扰物质堵塞的更换成本高等缺陷<sup>[5-7]</sup>。Li J等<sup>[7]</sup>采用柱切换HPLC法测定比格犬体内头孢地尼的血药浓度,其中大部分杂质被排除,且整体分析时间较短,但该方法使用的仪器设备需进行改装,存在仪器设备较为昂贵、稳定性较差等缺点。

高效毛细管电泳技术(HPCE)是在高压电场作用下,带电组分随电场方向迁移的一种分离分析方法<sup>[8-10]</sup>。由于这种分离在狭小空间内进行(内径为25~200  $\mu\text{m}$ 、长度为30~70 cm的毛细管),加之缓冲液的液流受电场推动而呈平面形,故具有较高的柱效。此外,待测物在该模式下,由于带电量的不同可导致迁移速率的差异,进而实现分离,且受分子量与极性影响相对较小。因此,在本研究中,笔者采用HPCE法,测定大鼠血浆中头孢地尼的浓度,并测定其药动学参数,以期为其进一步应用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Beckman P/ACE MDQ 毛细管电泳仪,包括光电二极管阵列检测器(190~600 nm)、P/ACE系统和MDQ工作站软件(美国Beckman Coulter公司);YN-075365熔融硅胶毛细管(中国河北瑞泽色谱器件有限公司,375 mm $\times$ 100 mm,75  $\mu\text{m}$ )。

### 1.2 药品与试剂

头孢地尼胶囊(广州白云山爱华制药股份有限公司,批号:204350,规格:每粒0.1 g);头孢地尼(批号:1097614,纯度:98%)、头孢哌酮(内标,批号:C0684800,纯度:98%)对照品均购自德国Sigma公司;甲醇、柠檬酸、氢氧化钠等均为色谱纯。

### 1.3 动物

SPF级SD大鼠6只,♀,体质量220~240 g,购自广东省实验动物中心[许可证号:SYXK(粤)2015-0059]。

## 2 方法与结果

### 2.1 头孢地尼和内标对照品贮备液的制备

精密称取头孢地尼和头孢哌酮(内标)对照品各10 mg,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解、定容,即得头孢地尼和头孢哌酮质量浓度均为1 mg/mL的贮备液。

### 2.2 血浆样品处理

精密吸取给药后大鼠血浆100  $\mu\text{L}$ ,置1.5 mL离心管中,加入1 mg/mL头孢哌酮贮备液10  $\mu\text{L}$ ,静置5 min后加300  $\mu\text{L}$ 乙腈,离心(离心半径为12.15 cm,13 000 r/min,下同)10 min。吸取上清液300  $\mu\text{L}$ ,氮气吹干,加甲醇100  $\mu\text{L}$ 复溶,即得。

### 2.3 HPCE 条件

分析柱:熔融硅胶毛细管(375 mm $\times$ 100 mm);缓冲液:20 mmol/L柠檬酸(含50 mmol/L十二烷基硫酸钠,pH为2.8);检测波长:214 nm;分离电压:-20 kV,进样电压:10 kV,持续10 s。分析前,用打火机烧去毛细管柱有效长度处的聚亚酰胺涂层以制备检测窗。毛细管装入仪器前,先连接蠕动泵,以0.1 mmol/L的盐酸溶液冲洗30 min以去除管壁内的杂质;冲水至pH为7.0后,以0.1 mmol/L氢氧化钠溶液冲洗1 h进行活化;再用水冲至流出液体显中性(pH=7.0),最后以缓冲液冲洗5 min。之后在仪器上使用缓冲液冲洗30 min进行平衡,使用-20 kV电压平衡直到电流稳定。在此条件下,取空白血浆、给药1.5 h后血浆+内标、空白血浆+内标依法处理,进样测定。结果,理论板数以头孢地尼计不低于3 000,分离度>1.5,色谱图见图1。

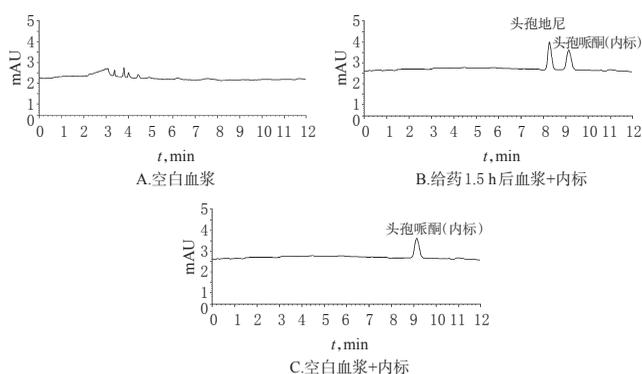


图1 高效毛细管电泳图

Fig 1 HPCE chromatograms

### 2.4 方法学考察

根据2015年版《中国药典》(四部)通则9012“生物样品定量分析方法验证指导原则”相关规定进行方法学考察。结果,头孢替尼质量浓度在0.2~50  $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好( $r=0.9997$ );日内( $n=6$ )、日间( $n=3$ )精密度试验的RSD均不大于12.2%;方法回收率为95.4%~114.3%(RSD $\leq$ 13%, $n=6$ );稳定性试验(血浆于-20  $^{\circ}\text{C}$ 下冷冻8 h取出解冻,循环3次;25  $^{\circ}\text{C}$ 放置8 h;处理后置于自动进样器中8 h)的RSD分别为5.36%、9.10%、8.82%( $n=6$ );基质效应为63.5%~70.2%(RSD=10.39%, $n=6$ )。此外,采用HPCE法时,还需考察pH、缓冲液浓度和电压等影响分离分析的参数发生轻微变化时对结果的影响(耐用性试验)。本研究分别考察pH为4.1、4.5、4.9,缓冲液浓度为18、20、22 mmol/L,分离电

压分别为18、20、22 kV 情况下头孢替尼的质量浓度,结果,耐用性试验的RSD≤4.60% (n=3),待测物色谱峰与周围干扰分离度符合要求(≥1.5)。

## 2.5 分组、造模与给药

取6只SD大鼠,禁食12 h后ig头孢地尼溶液(将头孢地尼胶囊内容物溶于生理盐水中),20 mg/kg,给药剂量根据预实验确定,按人体的等效剂量换算。分别于给药前及给药后0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、12、24 h经尾缘静脉取血0.2 mL,加肝素后离心10 min,取上清液,-20 °C保存。

## 2.6 药动学测定

采用BAPP 2.0软件对大鼠体内药-时曲线进行非房室模型拟合,并根据所得数据自动计算出相关药动学参数,结果见图2、表1。

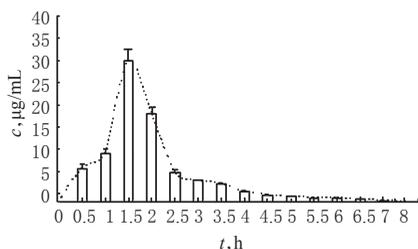


图2 头孢地尼在大鼠体内的药-时曲线

Fig 2 Concentration-time curve of cefdinir in rats *in vivo*

表1 头孢地尼在大鼠体内的药动学参数( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 1 Pharmacokinetics parameters of cefdinir in rats *in vivo* ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

参数	头孢地尼
$t_{1/2}$ , h	0.54 ± 0.01
MRT, h	1.99 ± 0.14
$c_{max}$ , μg/mL	32.92 ± 0.81
$t_{max}$ , h	1.50 ± 0.02
AUC <sub>0-24h</sub> , μg·h/mL	46.65 ± 0.44
AUC <sub>0-∞</sub> , μg·h/mL	46.83 ± 0.44

## 3 讨论

### 3.1 HPCE 条件优化

综合文献报道和头孢地尼的理化性质及化学结构<sup>[10-13]</sup>,笔者选取了分离电压、pH和缓冲盐浓度为指标对头孢地尼和内标与血浆蛋白等干扰性成分电色谱峰的分度进行了考察。结果显示,pH对分离度的影响最大,当pH为2.6时,待测组分与干扰性成分的分度最佳。其原因可能与头孢地尼的化学结构有关:头孢地尼的解离常数 $pK_{a1}=1.9$ (羧基), $pK_{a2}=3.3$ (2-氨基噻唑环上的氨基), $pK_{a3}=9.9$ (脞基)。由于熔融硅胶毛细管柱的酸碱承受范围在pH 2.0~8.0之间,当缓冲液pH低于3.3时,头孢地尼分子可以得到充分解离,同时毛细管内壁仍可保持稳定。经反复试验,最终确定缓冲液最佳pH为2.6。分离电压对HPCE分析也有较为显著的影响,当电压较大时,各组分迁移速率较高,但所产生的焦耳热也较大。综合考虑柱效、稳定性和整体分离效率,

最后选取-20 kV为最优分离电压。缓冲盐浓度的影响则主要体现在改变缓冲液pH和离子强度方面,除前述的pH影响外,该参数的变化也可以通过改变电渗流的方向对分离产生影响。经反复试验,最终确定最优缓冲盐浓度为20 mmol/L。

### 3.2 血浆样品前处理方法优化

根据文献<sup>[10-13]</sup>报道,本研究对不同提取方法、提取溶剂和溶剂-血浆体积比进行了优化。提取方法分别选取液-液萃取(LLE)和蛋白沉淀(PP)法,前者选用甲基叔丁基醚和乙酸乙酯为提取溶剂,溶剂-血浆比选择4:1和6:1;后者采用甲醇、乙腈和6%高氯酸溶液为蛋白沉淀剂,溶剂-血浆比则选用3:1和4:1。笔者在预试验中以提取回收率和最低定量限为指标,分别考察上述条件下各方法提取目标成分、排除基质干扰的能力。结果显示,采用蛋白沉淀法,以3:1比例乙腈为沉淀剂时,头孢地尼的提取回收率最高。在最低定量限方面,LLE法所制备样品均不符合规定(信噪比<10);PP法制备的样品除6%高氯酸为沉淀剂外,均符合规定。综上所述,最优血浆样品前处理方法最终确定为:采用溶剂-血浆比为3:1的乙腈沉淀蛋白。

### 3.3 药动学结果分析

头孢地尼在动物和人体内的药动学研究已有文献报道<sup>[5,14-16]</sup>。由于本研究采用大鼠作为实验动物,其药动学特征与文献报道中所用的比格犬和人类志愿者有较大差异。在进行换算后,结果显示 $t_{1/2}$ 、MRT、 $c_{max}$ 、 $t_{max}$ 和AUC<sub>0-24h</sub>等指标均与文献报道基本吻合,证明本研究可信度较高。

综上,本研究采用HPCE法对大鼠血样中的头孢地尼进行了测定,同时进行了药动学测定,所用方法快速、灵敏、高效,定量限较低,样品和溶剂消耗极小,符合体内药物分析高通量、高灵敏、干扰成分众多等特点,可作为HPLC法的有效补充。此外,由于HPCE采用电场为驱动力,待测物在微小空间内进行迁移、分离和测定,相较传统的液相色谱、质谱等方法,更为节约、经济和环保。

## 参考文献

- [1] 张明发,辛海涛.头孢地尼的临床应用评价[J].中国医院用药评价与分析,2004,4(5):269-273.
- [2] Fung-Tomc J, Huczko E, Stickle T, *et al.* Antibacterial activities of cefprozil compared with those of 13 oral cephalosporins and 3 macrolides[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(2):533-538.
- [3] 周永健,边颖,蔡毅.第三代口服头孢菌素:头孢地尼[J].天津药学,2003,15(2):66-69.
- [4] 王杏林. HPLC测定头孢地尼的含量及有关物质[J].中国新药杂志,2003,12(2):114-117.
- [5] 杨祥明,侯静,敖钢城.人血浆中头孢地尼浓度的HPLC测定法及药物动力学研究[J].临床和实验医学杂志,

# 醋龟甲不同剂型对血虚或骨质疏松小鼠的防治作用比较

王新雨<sup>1,2\*</sup>, 谭晓梅<sup>1#</sup>, 张文新<sup>1</sup>, 胡元立<sup>1</sup>(1.南方医科大学中医药学院, 广州 510515; 2.广东岭南职业技术学院医药健康学院, 广州 510663)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)19-2661-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.19.20

**摘要** 目的:比较醋龟甲的水煎剂和散剂对血虚小鼠或骨质疏松小鼠的防治作用。方法:将小鼠随机分为正常组(1%羧甲基纤维素钠溶液)、模型组(1%羧甲基纤维素钠溶液)、阳性组(复方阿胶浆20 mL/kg或骨松宝胶囊1.98 g/kg)以及醋龟甲水煎剂和散剂的低、中、高剂量组(剂量均为1.95、3.90、7.80 g/kg),每组10只。在小鼠血虚模型实验中,除正常组外,其余各组小鼠ip环磷酰胺0.1 g/kg造模;并从实验第1天起ig给药(阳性药物为复方阿胶浆),每天1次,连续8 d;给药结束后,测定小鼠外周血中白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HG)、红细胞比容(HCT)、血小板(PLT)水平及股骨中骨髓有核细胞(BMNC)数。在小鼠骨质疏松模型实验中,除正常组外,其余各组小鼠ig维甲酸0.105 g/kg造模;并从实验第1天ig相应药物(阳性药物为骨松宝胶囊),每天1次,连续30 d;给药结束后,测定小鼠血清中碱性磷酸酶(ALP)水平、脏器(胸腺、肝、脾、卵巢)系数和股骨的干质量、去脂干质量、灰质量以及股骨中钙、磷含量。结果:在小鼠血虚模型实验中,与正常组比较,模型组小鼠外周血中WBC、RBC、HG、HCT、PLT水平及股骨中BMNC数均显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,醋龟甲水煎剂低剂量组小鼠外周血中HCT、PLT、BMNC水平和中剂量组中RBC、HG水平以及高剂量组中HCT水平均显著升高( $P<0.05$ ),醋龟甲散剂低、高剂量组小鼠外周血中WBC水平以及中剂量组HG水平显著升高( $P<0.05$ )。在小鼠骨质疏松模型实验中,与正常组比较,模型组小鼠血清中ALP水平和股骨的干质量、去脂干质量、灰质量、灰质量/去脂干质量以及股骨中钙、磷含量均显著降低( $P<0.01$ ),各脏器系数无统计学差异( $P>0.05$ );与模型组比较,醋龟甲水煎剂高剂量组小鼠血清中ALP水平和股骨的干质量、磷含量均显著升高( $P<0.05$ ),醋龟甲散剂中、高剂量组以及中剂量组小鼠股骨的灰质量、灰质量/去脂干质量和钙、磷含量均显著升高( $P<0.05$ )。结论:醋龟甲水煎剂对血虚小鼠的防治作用较好;醋龟甲散剂对骨质疏松小鼠的防治作用较好。

**关键词** 醋龟甲;水煎剂;散剂;骨质疏松;血虚;小鼠

2007,6(11):114-115.

[6] 沈时鹏,冯浩.头孢地尼的抗菌活性和药动学研究[J].中国实用医药,2009,4(15):30-31.

[7] Li J, Wang L, Chen Z, et al. Development and validation of a rapid HPLC method for the determination of cefdinir in beagle dog plasma integrated with an automatic on-line solid-phase extraction following protein precipitation in the 96-well plate format[J]. *J Chrom B*, 2012, 895/896: 83-88.

[8] Kapnissi-Christodoulou CP, Zhu X, Warner I. Analytical separations in open-tubular capillary electrochromatography[J]. *Electrophoresis*, 2003, 24(22/23):3917-3934.

[9] Eeltink S, Rozing GP, Kok WT. Recent applications in capillary electrochromatography[J]. *Electrophoresis*, 2003, 24(22/23):3935-3961.

[10] 汪难喜,翟学佳,朱超然,等.头孢地尼在健康人体中生理药动学模型的建立与应用[J].中国药房,2016,27(35):4920-4923.

[11] 钱妍,赵春景,喻娅婷. HPLC测定头孢地尼胶囊的含量[J]. 华西药理学杂志, 2005, 20(3):253-255.

[12] Sader H, Jones R. Cefdinir: an oral cephalosporin for the treatment of respiratory tract infections and skin and skin structure infections[J]. *Expert Rev Antiinfect Ther*, 2007, 5(1):29-43.

[13] 张伟,秦玉花,赵红卫,等.头孢地尼口腔崩解片生物等效性研究[J].实用诊断与治疗杂志,2008,22(6):404-406.

[14] 王锋,李相鸿,孙华.国产头孢地尼分散片生物等效性研究[J].今日药学,2010,20(5):22-24.

[15] Chen Z, Zhang J, Yu J, et al. Selective method for the determination of cefdinir in human plasma using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2006, 834(1/2):163-169.

[16] 林建阳,姜明燕,阚周密,等.头孢地尼分散片在健康人体内的药动学及生物等效性[J].中国抗生素杂志,2012,37(9):706-710.

\* 博士研究生。研究方向:中药制剂。电话:020-62789112。E-mail:379319742@qq.com

# 通信作者:研究员,博士生导师。研究方向:中药新制剂。电话:020-61648265。E-mail:txm@fimmu.com

(收稿日期:2017-01-03 修回日期:2017-05-03)  
(编辑:刘明伟)