

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01096

## 克拉霉素血药浓度 HPLC-MS 测定方法的改进及药代动力学研究

Modified HPLC-MS method in determination of plasma concentration of clarithromycin and its pharmacokinetic study

李新华<sup>1</sup>,程晓华<sup>2</sup>,刘建明<sup>3</sup>,熊玉卿<sup>3</sup>

1. 南昌大学医学院卫生科,南昌 330006

2. 南昌大学第一附属医院、国家药物临床试验机构,南昌 330006

3. 南昌大学医学院临床药理学研究所,南昌 330006

[关键词] 克拉霉素;血药浓度;HPLC-MS;药代动力学

[中图分类号] R 978.15 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2009)09-1096-03

克拉霉素(clarithromycin)又名甲氧基红霉素,为新一代对酸稳定的口服大环内酯类抗生素,其作用机制是通过阻碍细胞核蛋白50S亚基的联结,抑制蛋白合成而产生抑菌作用。临床上常用于咽炎和扁桃体炎、急慢性支气管炎、肺炎、皮肤软组织感染、沙眼衣原体引起的尿道炎及宫颈炎等<sup>[1]</sup>。以往有关克拉霉素血药浓度的检测方法大多为HPLC紫外分光光度法<sup>[2-3]</sup>,但由于紫外光检测波长较短为210 nm,除对试剂及样品处理等要求较高外,血浆中内源性杂质干扰也较严重,使测定结果不够精确。近年来,HPLC-MS法用于低波长甚至无紫外吸收光团药物的含量测定被广泛采用,本实验在参考有关文献<sup>[4-5]</sup>的基础上对该方法进行改进,建立了一种快速、灵敏、专属性强的人血浆中克拉霉素HPLC-MS测定法,并成功应用于药代动力学及两种克拉霉素片相对生物利用度的研究。

## 1 仪器和试剂

1.1 仪器 岛津LCMS2010EV高效液相色谱-质谱联用仪,包括CBM-20A系统控制器、LC-20AB双泵,SIL-20A自动进样器、CTO-20A柱温箱、LCMSsolution色谱工作站;XW-80A旋涡混匀器;N-EVAP 112干浴氮吹仪;Anke LXJ-II大容量多管离心机;Sigma 3K30台式超高速冷冻离心机。

1.2 试剂 克拉霉素片,江西国药有限责任公司研制,批号:20060402;对照药物:克拉霉素片(使力安),广州白云山制药股份有限公司生产,批号:1070003;克拉霉素对照品,纯度大于99.7%,江西国药有限责任公司提供;内标:罗红霉素对照品,含量大于99.8%,购自中国药品生物制品检定所。乙腈(色谱纯),Merck公司生产;其余试剂均为市售分析纯。

## 2 方法和结果

2.1 检测条件 色谱条件:流动相:乙腈-水溶液(含0.1%

甲酸,58:42 V/V),流速0.2 ml/min,分析柱 Shim-Pack VP-ODS C<sub>18</sub>(250 mm×2.0 mm,5 μm);柱温:35℃。质谱条件:选择性离子检测(SIM);电喷雾离子化(ESI);离子极性:正离子(positive);检测离子选择:克拉霉素,[M+H]<sup>+</sup> m/z:748.5;罗红霉素,[M+H]<sup>+</sup> m/z:837.5;雾化气流速1.5 L/min;干燥气流量:8.0 L/min,检测电压1.70 kV;曲形脱溶剂装置温度:250℃;加热块温度:200℃。

2.2 血浆样品的处理 取0.2 ml血浆,精密加入20 μl内标(罗红霉素,8.0 μg/ml),并加入40 μl 0.1 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液以碱化样品,混匀后加3.0 ml乙酸乙酯,振荡4 min,2 300×g离心5 min,取上清液2.0 ml,置50℃干浴锅中氮气挥干,以0.3 ml乙腈溶解残渣,再经36 000×g离心6 min后,取5 μl进样,用峰面积进行定量分析。

2.3 方法专属性 在本实验条件下,克拉霉素及内标有较大的质谱响应,并与血浆中内源性杂峰有良好的分离度,不干扰样品峰的测定,基线噪音小,克拉霉素、内标的保留时间分别为1.92、1.91 min(图1),本方法具有较高的专属性。

2.4 线性范围和定量限 取空白血浆0.2 ml,加克拉霉素对照品贮备液,使其浓度分别为0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2和6.4 μg/ml,按“2.2”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 $R = 2.317C + 0.037$ , $r = 0.9998$ ( $P < 0.01, n = 5$ ),线性范围0.025~6.4 μg/ml,定量下限为0.025 μg/ml。

2.5 精密度与方法回收率 取空白血浆0.2 ml,配制含克拉霉素浓度分别为0.1、0.4、3.2 μg/ml的血浆样品各5份,按“2.2”项下处理后进样分析,每日测定5份,连续测定3 d,以每天内测得的各浓度计算日内RSD,不同日内测定的各浓度计算日间RSD,结果表明日内、日间RSD均<10%,符合测定要求。

[收稿日期] 2009-06-16 [接受日期] 2009-07-21

[作者简介] 李新华,教授. E-mail:xyq1126@163.com

2.6 介质效应 分别取克拉霉素对照品贮备液适量于离心管中,用乙腈配成浓度为 0.1、0.4、3.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的溶液各 10 份,每份 0.5 ml,置 50 $^{\circ}\text{C}$  干浴锅中氮气挥干,其中 5 份以乙腈 300  $\mu\text{l}$  溶解残渣,吸取 5  $\mu\text{l}$  进行分析,记录样品及内标峰面积  $A_s$ 。另外 5 份以 200  $\mu\text{l}$  空白血浆提取后的 300  $\mu\text{l}$  乙腈复溶液溶解残渣,吸取 5  $\mu\text{l}$  进行分析,记录克拉霉素的峰面积  $A_x$ 。介质效应  $\text{ME}(\%) = A_x/A_s \times 100\%$ ,若 ME 值为 85%~115%,则表明无介质效应,否则即表明有介质效应干扰测定。实验结果显示克拉霉素在 0.1、0.4、3.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  浓度水平的 ME 平均值分别为 (107.8 $\pm$ 3.2)%、(101.7 $\pm$ 4.2)%、(99.8 $\pm$ 2.5)%,内标 ME 平均值 (106.3 $\pm$ 2.7)%,表明采用本实验建立的血样测定方法,克拉霉素及内标的测定不受介质效应干扰。

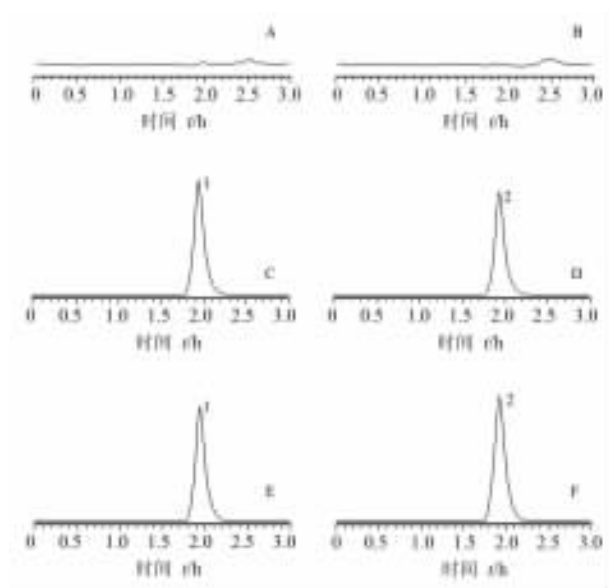


图 1 人血浆中克拉霉素典型色谱图

A,B:空白血浆;C,D:空白血浆加入克拉霉素及内标;E,F:健康受试者口服 500 mg 克拉霉素 2 h 后血浆样品。1:克拉霉素;2:罗红霉素

2.7 稳定性考察 精密配制 0.1、0.4、3.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  3 种浓度的对照品血样,分别进行血浆室温放置 4 h、反复冻融 3 次、血浆样品处理后自动进样器内放置 12 h 以及 -20 $^{\circ}\text{C}$  冷冻保存 20 d 的稳定性考察,在上述处理储存条件下所测得各浓度水平 RSD 均 <15%,RE 在  $\pm 15\%$  范围内,表明样品稳定性良好。

## 2.8 药动学研究

2.8.1 受试者选择与试验设计 18 名健康男性志愿者,年龄 (23 $\pm$ 3.50) 岁,体质量 (61.20 $\pm$ 6.38) kg。受试前经体格检查及心电图、肝肾功能检查正常,精神正常,无药物过敏史。试验前全部自愿签署知情同意书,受试者随机分为两组,一组先服用受试制剂,后服用参比制剂;另一组先服用参比制剂,后服用受试制剂,2 次服药间隔 1 周作为洗脱期。受试者于给药前 1 d 晚上进入临床试验病房,禁食 12 h 后分别空腹口服 500 mg 克拉霉素受试制剂或参比制剂,用约 200 ml

温开水送服,给药 2 h 后方可饮水,受试者给药 4 h 后统一进标准饮食。并分别于服药前 (0 h) 和服药后 0.33、0.67 和 1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、12.0、24.0 h 各抽取上肢静脉血 3.0 ml 置于含有肝素的离心管中,立即以 2 000 $\times g$  离心 10 min,分离出血浆,置 -20 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存待测。

2.8.2 数据处理 数据处理采用皖南医学院孙瑞元教授编写的 DAS2.0 软件,AUC 按梯形法计算, $C_{\text{max}}$ 、 $t_{\text{max}}$  均为实测值。所得参数  $\text{AUC}_{0-t_n}$ 、 $C_{\text{max}}$  经自然对数转换后先用双交叉试验设计的方差分析,再用双单侧  $t$  检验进行生物等效性评价。 $t_{\text{max}}$  经非参数检验 (Wilcoxon 秩和检验) 进行生物等效性评价,并求得克拉霉素在人体内的主要药代动力学参数。

2.8.3 血药浓度-时间曲线 18 名健康受试者单次口服克拉霉素片受试与参比制剂 500 mg 后,其平均血药浓度-时间曲线见图 2。

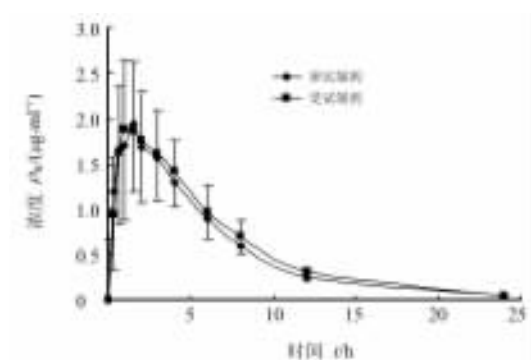


图 2 口服克拉霉素后平均血药浓度-时间曲线

$n=18, \bar{x} \pm s$

2.8.4 药代动力学参数 由 DAS 2.0 软件计算 18 名健康受试者口服克拉霉素片受试和参比制剂后的主要药代动力学参数,结果见表 1。

表 1 口服克拉霉素后的主要药代动力学参数

( $n=18, \bar{x} \pm s$ )

参数	受试制剂	参比制剂
$C_{\text{max}} \rho_B / (\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1})$	2.21 $\pm$ 0.75	2.15 $\pm$ 0.68
$t_{\text{max}} t/\text{h}$	1.55 $\pm$ 0.94	1.72 $\pm$ 1.33
$\text{AUC}_{0-24} (\text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1})$	13.30 $\pm$ 3.88	14.48 $\pm$ 5.21
$\text{AUC}_{0-\infty} (\text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1})$	13.84 $\pm$ 3.69	14.70 $\pm$ 5.28
$t_{1/2} t/\text{h}$	4.31 $\pm$ 3.76	3.75 $\pm$ 0.76

2.8.5 生物等效性评价 受试者口服受试制剂或参比制剂克拉霉素片 500 mg 后,克拉霉素血浆浓度经时变化过程及 2 种制剂的药代动力学参数相近。主要药代动力学参数经方差分析显示,2 种制剂间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),受试制剂的相对生物利用度  $F = (103.6 \pm 45.3)\%$ ,  $t_{\text{max}}$  经非

参数检验(Wilcoxon 秩和检验)差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。 $AUC_{0-24}$ 的90%置信区间为80.7%~114.1%, $AUC_{0-\infty}$ 的90%置信区间为82.0%~116.5%,均在等效标准的80%~125%内; $C_{max}$ 的90%置信区间为82.9%~128.2%,在等效标准的70%~143%内,以上结果说明2种制剂生物等效。

### 3 讨论

LC-MS/LC-MS-MS法用于克拉霉素血浆样品中的测定已多有报道<sup>[4-6]</sup>。本实验主要对血样处理方法进行改进,我们曾用乙腈沉淀蛋白的方法处理血浆样品,但由于血浆样本中蛋白不能完全被沉淀,沉淀后的样品黏稠度较高,容易堵塞流路及喷雾离子源中的毛细管,并且影响其电离雾化效果,从而降低检测的灵敏度,因而沉淀蛋白法对LC-MS检测影响较大,不宜采用。后试用有机溶剂乙醚液萃取,发现在萃取振荡混涡过程中乙醚挥发严重,离心后取上层有机相的量很难达到实验所需的统一标准,萃取后样品和内标在稳定性和精密度方面很难达到要求。最后采用乙酸乙酯提取经预碱化后的样品,操作过程标准统一,提取后的样品纯净,较文献<sup>[4]</sup>报道方法操作的稳定性及精密度均较高,流动相构成简单,方法测定快速,分析时间短,成本降低。因此,本实验

所建立的血浆中克拉霉素测定方法步骤简单,灵敏度高,专属性强,能较好地应用于大批量的生物样品分析处理及其药代动力学研究。

### [参考文献]

- [1] 诸骏仁. 临床用药须知[M]. 二部. 北京: 化学工业出版社, 2000:680.
- [2] 乔海宁,张莉蓉,张启堂,贾琳静,刘凤芝,马统勋. 克拉霉素分散片在健康人体内的相对生物利用度[J]. 河南医科大学学报,2000,35:326-328.
- [3] 张红,李华,李艳艳,熊玉卿. 克拉霉素血药浓度 HPLC 测定方法和生物等效性研究[J]. 中国临床药理学与治疗学杂志,2004,9:792-794.
- [4] 田开珍,王峰,李焕德. HPLC-MS 法测定人血浆中克拉霉素[J]. 中南药学,2007,5:111-113.
- [5] 梁艳,谢林,刘晓东,王广基. LC-MS 法测定人血浆中克拉霉素的浓度[J]. 中国药科大学学报,2004,35:50-53.
- [6] 柳茜,冯芳,李金恒,马明,崔双进,王凌,等. 克拉霉素胶囊的人体药物动力学及生物等效性研究[J]. 药学与临床研究,2007,15:191-194.

[本文编辑] 尹茶