

LC - MS/MS测定人血浆中的头孢克洛

赵 曦¹, 杨汉煜¹, 张彦玲¹, 李俊德²

(1. 石药集团药物研究院药理中心, 河北 石家庄 050051; 2 石家庄四药有限公司, 河北 石家庄 050051)

摘要: 目的 采用 LC - MS/MS测定人血浆中的头孢克洛。方法 血浆样品经沉淀蛋白处理后, 用 Allure C₁₈柱 (50 mm × 4.6 mm, 5 μm) 分离, 乙腈 - 1% 甲酸 (20: 80) 为流动相; 采用三重四级杆串联质谱, 电喷雾离子源, 以正离子多反应监测方式进行定量分析。结果 血浆中头孢克洛的线性范围为 0.01 ~ 10.00 μg · mL⁻¹, 定量下限为 0.01 μg · mL⁻¹。回收率为 79.6% ~ 83.2%, 日内、日间 RSD 均小于 3.5%。结论 所建方法专属、灵敏、准确, 适用于头孢克洛药物动力学的研究。

关键词: 头孢克洛; 液相色谱 - 串联质谱法; 血药浓度; 血浆样品

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1006 - 0103(2008)02 - 0207 - 03

Determination of Cefaclor in human plasma by LC - MS/MS

ZHAO Xi¹, YANG Han - yu¹, ZHANG Yan - ling¹, LI Jun - de²

(1. Pharmacology center of Pharmaceutical Research Institute, Shijiazhuang 050051, China; 2. Shijiazhuang No. 4 Pharmaceutical Ltd., Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To establish an LC/MS/MS method to determine Cefaclor in human plasma. **METHODS** Plasma samples were precipitated with methanol initially, then the separation was performed on a Allure C₁₈ analytical column using acetonitrile - 1% formic acid (20: 80) as the flow rate at 0.5 mL · min⁻¹. Electrospray ionization source (ESI) was applied and operated in positive ion mode for the quantitative analysis by MRM. **RESULTS** LOQ of Cefaclor was 0.01 μg · mL⁻¹. The linear range of Cefaclor was 0.01 - 10.0 μg · mL⁻¹. The mean recovery was 79.6% - 83.2% with intra - day and inter - day RSD less than 3.5%. **CONCLUSION** The method is proved to be specific, sensitive and accurate, and suitable for clinical pharmacokinetics study of Cefaclor.

Key words: Cefaclor; LC - MS/MS; Plasma concentration; Plasma sample

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006 - 0103(2008)02 - 0207 - 03

头孢克洛为第二代头孢菌素, 因抑制细菌细胞壁的合成导致细胞溶解而发挥杀菌作用^[1,2]。目前, 多采用 HPLC 法检测其人体内的血药浓度, 但灵敏度较低, 很难检测到 3.5 h 后的血药浓度^[3]。而采用 LC - MS/MS 法测定时, 样品的前处理方法烦琐^[1,2]。为此, 特建立了简便的头孢克洛血浆样品前处理过程和专属、灵敏、快速的 LC - MS/MS 测定方法, 并用于分析临床药物动力学样品。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

API4000 型液相色谱 - 三重四级杆质谱联用仪包括 Analyst 1.4 软件 (美国 ABI 公司); 1100 色谱系统 (美国安捷伦公司)。希刻劳干混悬剂 (礼来苏州制药有限公司); 头孢克洛对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 130481 - 200503, 93.7%); 匹多莫德内标 (河北省药品检验所, 批号: 010626, 含量 99.1%); 乙腈、甲酸为色谱纯; 空白人血浆 (河北省中心血站); 受试血浆样品 (中国人民解放军白求

恩和平医院国家药品临床研究基地) 在采血后迅速分离提取血浆样品, 并立即在受试血浆中加入 5% 冰醋酸, 使血浆样品 pH < 4.5。

1.2 方法与结果

1.2.1 LC - MS/MS 的条件 色谱柱采用 Allure C₁₈ 柱 (50 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 - 1% 甲酸水溶液 (20: 80); 流速 0.5 mL · min⁻¹; 进样量 10 μL; 柱温 20。质谱条件采用电喷雾离子化源 (ESI); 电离电压为 5.5 kV; 卷帘气、雾化气、辅助气和碰撞气均为 N₂, 流量分别为 25、60、40、8 L · min⁻¹; 毛细管雾化温度为 500; 正离子方式检测; 扫描方式为多离子反应监测 (MRM)。用于定量分析的离子反应分别为 m/z 368.0、174.1 (头孢克洛), m/z 245.2、134.0 (内标, 匹多莫德), 驻留时间均为 200 ms。

1.2.2 溶液的制备 精密称取 26.68 mg 头孢克洛对照品, 置 25 mL 量瓶中, 用 5% 冰醋酸液配成 1.0 mg · mL⁻¹ 的对照品贮备液; 用含 5% 冰醋酸的空白血浆稀释该贮备液为 0.01、0.02、0.05、0.20、0.75、

作者简介: 赵曦 (1979 -), 男, 云南宜良, 硕士, 工程师, 从事药物动力学研究工作。

* 通讯作者 (Correspondent author), E - mail: zxyy 678@tom.com

2.50、10.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液。精密称取 25 mg 匹多莫德, 置 25 mL 量瓶中, 用甲醇配制成 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的贮备液, 用含 1% 甲酸的甲醇液稀释成 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标液。

1.2.3 血浆样品的处理 精密吸取 0.1 mL 血浆样品, 置 2 mL 离心管中, 加入 0.1 mL 内标溶液, 精密加入 0.2 mL 含 1% 甲酸的甲醇溶液, 漩涡混合 0.5 min, $1 \times 10^4 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min; 取 0.1 mL 上清液, 置 2 mL 离心管中, 加入 0.4 mL 1% 甲酸的水溶液, 漩涡混合 0.5 min, 取 10 μL 进行分析。

1.2.4 质谱分析 采用正离子方式检测, 在一级全扫描质谱中, 基峰均为质子化的准分子离子峰 $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z 为 368、245, 选择性对 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 峰进行二级质谱分析 (图 1), 选择主要的碎片离子 (m/z 为 174、134) 作为 MRM 定量分析的产物离子。

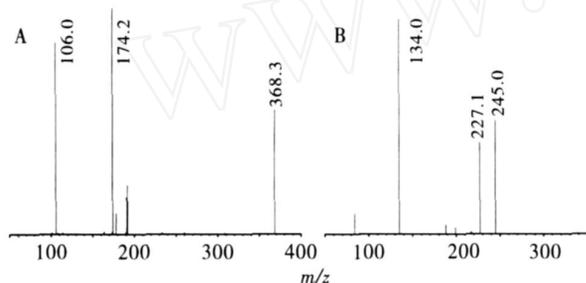


图 1 头孢克洛 (A) 和匹多莫德 (B) 的产物离子全扫描质谱图

Fig 1 Production mass spectra of Cefaclor (A) and Pidotimod (B)

1.2.5 方法的专属性 分别取 6 名受试者的空白血浆 0.1 mL, 其中不加入内标液 (用 1% 甲酸的甲醇液 0.1 mL 补齐), 其余按 “1.2.3 项下方法操作, 进样 10 μL , 取对照品溶液 0.1 mL, 按 “1.2.3 项下方法操作, 头孢克洛和内标的保留时间约为 1.5、1.4 min; 取健康受试者给药后收集的血浆样品, 同法操作。结果表明, 样品中内源性物质不干扰头孢克洛和内标的测定。

1.2.6 标准曲线和定量下限 分别取头孢克洛系列对照品血浆溶液各 0.1 mL, 按 “1.2.3 项下方法操作, 进样 10 μL , 记录色谱图; 以浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 头孢克洛与内标峰面积比为纵坐标, 采用加权 ($1/C^2$) 最小二乘法进行回归, 回归方程为: $A = 0.764C + 0.001$ ($r = 0.9995$)。血浆中头孢克洛 0.01 ~ 10.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与峰面积比呈良好的线性关系, 定量下限为 0.01 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.2.7 精密度和准确度试验 按 “1.2.6 项下方法配制头孢克洛低、中、高浓度 (0.02、0.75、8.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的血浆样品溶液, 分别取上述血浆溶液 0.1 mL, 每个浓度 6 份, 连续测定 4 批, 并与标准曲线同时进行。采用单因素方差分析法求得本法的精

密度与准确度^[4], 结果日内、日间 RSD 均小于 4.0% (表 1)。

表 1 血浆中头孢克洛测定方法的精密度与准确度

Table 1 Precision and accuracy of the determination of cefaclor in human plasma

| Added/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | Found/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | Intra-day RSD/% | Inter-day RSD/% | Relative error/% |
|--|--|--------------------|--------------------|---------------------|
| 0.02 | 0.02 | 3.71 | 3.46 | -1.0 |
| 0.75 | 0.74 | 1.76 | 2.06 | -1.2 |
| 8.0 | 8.21 | 3.46 | 1.62 | 2.6 |

1.2.8 回收率试验 分别取 “1.2.7 项下的血浆样品溶液 0.1 mL, 每个浓度 6 份, 按 “1.2.3 项下方法操作, 记录头孢克洛的峰面积 A_s 。另取上述 3 个浓度的 5% 冰醋酸水溶液 0.1 mL, 其余按 “1.2.3 项下方法操作, 记录头孢克洛的峰面积 A_{sd} 。按 “回收率 = $A_s/A_{sd} \times 100\%$ ” 计算, 低、中、高浓度血浆中, 头孢克洛提取回收率分别为 83.2%、79.6%、81.2%。内标溶液同法处理, 回收率为 77.3%。结果表明, 方法存在一定的基质效应, 但头孢克洛与内标的提取回收率均比较稳定, 不影响血浆中头孢克洛的测定。

1.2.9 稳定性考察 考察样品在血浆中室温放置 4 h 的稳定性; 处理后的样品在 1% 甲酸溶液中室温放置 24 h 内的稳定性; 血浆样品反复冻融 3 次及在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存 7 d 内的稳定性, 其 RSD 均 < 5.9%。

1.2.10 方法学应用 图 2 为 20 名受试者单剂量口服 250 mg 头孢克洛 (希刻劳) 后的药-时曲线。按文献^[1-3]报道的线性范围试验, 发现部分血浆样品的药物浓度超出其上限, 对超限的血浆样品进行复检。即将超限血浆样品用含 5% 冰醋酸的空白血浆稀释 1 倍后, 按 “1.2.3 项下方法操作; 复检结果与原测定结果比较偏差均小于 15%, 故超限样品的血药浓度均采用复检结果。

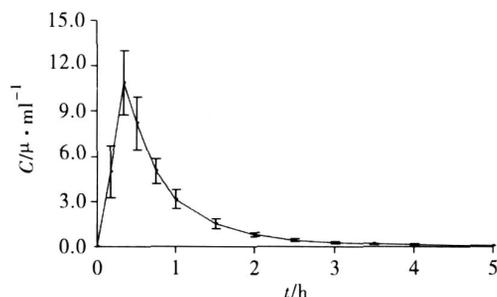


图 2 20 名受试者单剂量口服 250 mg 头孢克洛后的药-时曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of Cefaclor after a single administration of 250 mg Cefaclor to 20 volunteers

2 讨论

头孢克洛通常在血浆样品中易降解, 在 $\text{pH} < 4.5$ 的环境中较稳定。因此, 往血浆样品中加入 5%

冰醋酸、用 1%甲酸的甲醇溶液沉淀蛋白等操作来保持头孢克洛的稳定。文献^[4]报道的流动相为甲醇 - 1%甲酸 (80 : 20),操作时发现头孢克洛出现明显的溶剂效应(色谱峰为双峰)和极严重的质谱离子抑制现象。将流动相变为乙腈 - 1%甲酸 (20 : 80),通过降低有机相比例,增加了头孢克洛的色谱保留,使色谱峰形和基质效应明显改善。采用乙腈代替甲醇后,质谱响应提高近 3倍且响应较稳定。

文中用 1%甲酸的甲醇溶液沉淀血浆蛋白,上清液再用 1%甲酸水溶液稀释后直接进样分析,采用 LC - MS/MS方法分析血浆样品,每个样品所需分析时间仅为 2 min。方法灵敏、快速、简便,适用于头孢克洛临床药物动力学的研究。

参考文献:

- [1] 张静,李健华,赵悦,等. HPLC法测定人血浆中头孢克洛浓度 [J]. 江苏药学与临床研究, 2002, 10(3): 11 - 13.
- [2] Chen XY, Zhong DF, Huang B, *et al* Determination of cefaclor in human plasma by a sensitive and specific liquid chromatographic - tandem mass spectrometric method [J]. J Chromatogr B, 2003, 784: 17 - 24.
- [3] 赵明,张逸凡,钟大放,等. 头孢克洛缓释片在健康人体的药代动力学和生物等效性 [J]. 中国临床药理学杂志, 2003, 19(6): 426 - 429.
- [4] Causon R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis—Viewpoint and discussion [J]. J Chroma B, 1997, 689: 175 - 178.

收稿日期: 2006 - 10

HPLC - ELSD测定芪红胶囊中的黄芪甲苷

宋晓东,刘哲,辛颖,张禅那,惠汝太

(中国协和医科大学阜外心血管病医院 教育部心血管病基因与临床研究重点实验室 中德实验室,北京 100037)

摘要:目的 采用 HPLC - ELSD法测定芪红胶囊中的黄芪甲苷。方法 采用 Capcell PAK C₁₈色谱柱 (250 mm ×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇 - 水 (75 : 25),检测温度 115 °C,载气流速 2.5 ml·min⁻¹,柱温 35 °C。结果 黄芪甲苷能与相邻峰完全分开,进样量 1.012 ~ 5.06 μg与峰面积积分值的线性关系良好 ($r=0.9998$)。结论 所建方法简便易行,准确可靠,可用于芪红胶囊中黄芪甲苷的质量控制。

关键词: 芪红胶囊;黄芪甲苷;高效液相色谱 - 蒸发光散射检测

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1006 - 0103(2008)02 - 0209 - 02

Determination of astragaloside in Qihong capsule by HPLC - ELSD

SONG Xiao - dong, LU Zhe, XN Ying, ZHANG Chan - na, HU IRu - tai

(Key Laboratory of Clinical Cardiovascular Genetics, Ministry of Education & Sino - German Laboratory for Molecular Medicine, Cardiovascular Institute & Fuwai Hospital, Peking Union Medical College, Beijing 100037, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To establish an HPLC - ELSD method for the determination of astragaloside in Qihong capsule. **METHODS** The HPLC system was consisted of Capcell PAK C₁₈ column (250 mm ×4.6 mm, 5 μm), a mixture of methanol and water (75 : 25) as the mobile phase. The detector temperature at 115 °C, the flow rate was 2.5 ml·min⁻¹ and the column temperature was set at 35 °C. **RESULTS** The peak of astragaloside could be separated from others completely, and the linear range of astragaloside was 1.012 - 5.06 μg ($r=0.9998$). **CONCLUSION** The established method is simple, accurate and suitable for the determination of astragaloside in Qihong capsule.

Key words: Qihong capsule; Astragaloside; HPLC - ELSD

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006 - 0103(2008)02 - 0209 - 02

芪红胶囊由黄芪、红景天、苦参三味中药组成,具有清热解毒、益气养阴、温阳散寒之功效。在组方中,黄芪为君药,具有补气固表、敛疮生肌之功效,其主要化学成分之一黄芪甲苷具有扩张血管及冠脉、

促进细胞及体液免疫、抗缺氧及抗疲劳等作用^[1~4]。现采用高效液相色谱 - 蒸发光散射检测 (HPLC - ELSD)法测定芪红胶囊中的黄芪甲苷,方法简便、灵敏、重复性好。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(批准号:30640080);芪红胶囊专利号:2004100063223

作者简介:宋晓东(1974 -),男,山西忻州,博士,助理研究员,从事心血管药理学和基因分子生物学的工作。