

HPLC – MS/MS 法测定琥乙红霉素颗粒体内活性代谢物

王爱华, 刘天扬, 杨杨, 多凯

(黑龙江省食品药品检验检测所 哈尔滨 150001)

摘要 目的: 建立琥乙红霉素人体内活性代谢物红霉素的 HPLC – MS/MS 分析方法。**方法:** 选用克拉霉素为内标, 血浆样品经正己烷 – 二氯甲烷 – 异丙醇 (300:150:15) 提取处理, 通过检测活性代谢物红霉素的浓度来监测琥乙红霉素体内行为。色谱条件 Waters C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 甲醇 – 水 (80:20, 含 0.5% 甲酸) 为流动相, 流速 0.6 mL · min⁻¹, 采用 HPLC – MS/MS 检测系统 (SRM 模式), 质谱采用电喷雾电离源 (ESI), 红霉素选择检测离子对为 m/z 734 → m/z 158, 内标克拉霉素选择检测离子对为 m/z 748 → m/z 158。结果: 血浆中红霉素检测方法的线性范围为 9.724 ~ 2431.0 ng · mL⁻¹, 最低检测限可达 9.724 ng · mL⁻¹。血浆中红霉素的平均回收率为 77.6% ~ 80.0%; 日内、日间 RSD 均小于 11%。结论: 本法灵敏、准确、选择性高, 可用于监测琥乙红霉素的体内行为。

关键词: 琥乙红霉素; 红霉素; 高效液相色谱 – 质谱法; 药代动力学

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254 – 1793(2011)03 – 0448 – 04

HPLC – MS/MS determination active metabolite *in vivo* of erythromycin ethylsuccinate granules

WANG Ai – hua, LIU Tian – yang, YANG Yang, DUO Kai

(Heilongjiang Institute for Food and Drug Control, Harbin 150001, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC – MS – MS method for the determination of erythromycin as an active metabolite of erythromycin ethylsuccinate in human plasma. **Methods:** The plasma was extracted by *n* – hexane – dichloromethane – isopropyl alcohol (300:150:15) and the internal standard was clarithromycin. Erythromycin was detected to monitor the erythromycin ethylsuccinate in plasma. The Waters C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used, the mobile phase was a mixture of methanol – waters (80:20, containing 0.5% formic acid), the flow rate was 0.6 mL · min⁻¹. HPLC – MS/MS system (SRM mode) and ESI was used. The ion of monitor: m/z 734 → m/z 158 (erythromycin), m/z 748 → m/z 158 (clarithromycin). **Results:** The linear range of the standard curve of erythromycin was 9.724 – 2431.0 ng · mL⁻¹ and the limit of detection was 9.724 ng · mL⁻¹. The recovery of erythromycin was 77.6% – 80.0%; intra – day and inter – day RSDs were less than 11%. **Conclusion:** The method had high sensitivity, good selectivity and precision. It is suitable for pharmacokinetic studies of erythromycin ethylsuccinate.

Key words: erythromycin ethylsuccinate; erythromycin; HPLC – MS/MS; pharmacokinetics

琥乙红霉素 (erythromycin ethylsuccinate), 国产制剂商品名为利君沙, 属大环内酯类抗生素, 为红霉素的乙酰琥珀酸酯, 是红霉素的衍生物, 因而增强了在胃酸的稳定性, 它在肠中以酯化的方式吸收, 既改善了口感, 又减少了胃肠道反应, 故在临床上较受欢迎^[1]。由于琥乙红霉素体内的活性代谢物为红霉素, 本研究采用 HPLC – MS/MS 法测定人血浆中红

霉素浓度, 用来间接监测琥乙红霉素的体内行为。本方法灵敏度高、专属性强, 为该药物及制剂的动物体内药动学研究及临床药动学和生物等效性研究打下良好的基础。

1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱系统 (安捷伦科技公司); Thermo Finnigan TSQ Discovery MAX 液质联用

第一作者 Tel: (0451) 53638792 – 8029; E – mail: wangaihua63@163.com

系统(美国赛默菲世尔公司);H-101型液体快速混合器(上海康禾光电仪器有限公司);TDL-5000-CR离心机(上海安亭科学仪器厂);HY-2型调速多用振荡器(国华电器有限公司);TurboVap蒸发仪(Zymark公司,美国);分析天平(BP211D型电子天平,北京赛多利斯天平有限公司)。

红霉素对照品(含量93.5%,批号200716,中国药品生物制品检定所);克拉霉素对照品(含量97.5%,批号200501,中国药品生物制品检定所);琥乙红霉素颗粒(规格0.1g·袋⁻¹,西安利君制药有限责任公司,批号0810043-14);甲醇(色谱纯,Burdick & Jackson);甲酸、异丙醇、正己烷、二氯甲烷均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 质谱条件及色谱条件

2.1.1 质谱条件 离子源为电喷雾离子源(ESI源);源喷雾电压4kV;加热毛细管温度为300℃;鞘气(N₂)流量3L·min⁻¹;辅助气(N₂)流速0.5L·min⁻¹;碰撞气(Ar);压力1.5mTorr。碰撞诱导解离(CID)电压为30V;正离子方式检测;扫描方式为选择反应监测(SRM),用于定量分析的离子反应分别为 m/z 734.4→ m/z 158.0(红霉素)和 m/z 748.3→ m/z 158.0(克拉霉素);扫描时间为0.5s。

2.1.2 色谱条件 色谱柱:Waters XTerra C₁₈柱(250mm×4.6mm,5μm);预柱:Phenomenex C₁₈保护柱(4mm×3.0mm);流动相:甲醇-水-甲酸(80:20:0.1*v/v*);流速0.6mL·min⁻¹;柱温30℃。

2.2 对照品及内标溶液的配制

对照品溶液:精密称红霉素10.40mg,置100mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,作为储备液。取上述储备液用甲醇稀释成38.896,194.48,972.4,1944.8,3889.6,7779.2,9724ng·mL⁻¹的系列溶液备用。

内标溶液:精密称取克拉霉素11.70mg,置100mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,作为储备液。取储备液2.0mL,置100mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度。

以上储备液及标准系列溶液在4℃冰箱内保存备用。

2.3 血浆样品的处理与测定 根据相关文献^[2],确定血浆样品处理如下:取血浆200μL,加入甲醇-水(50:50*v/v*)50μL,加入内标(2.34μg·mL⁻¹克

拉霉素)50μL,混匀,加入0.5mol·L⁻¹Na₂CO₃溶液200μL;加入提取溶剂正己烷-二氯甲烷-异丙醇(300:150:15*v/v*)3mL,涡流1min,振荡15min(240time·min⁻¹),离心5min(3500r·min⁻¹);分取上层有机相于另一试管中,于40℃空气流下吹干,残留物加入200μL流动相溶解,涡流混合,取5μL进行LC-MS/MS分析。

2.4 方法专属性考察

红霉素和内标克拉霉素在ESI离子化方式下,主要生成[M+H]⁺准分子离子峰,分别为 m/z 734和 m/z 748。选择性对准分子离子峰[M+H]⁺进行产物离子扫描(见图1),生成的主要碎片离子均为 m/z 158,将主要碎片离子作为定量分析时监测的产物离子。

取空白血浆0.2mL,置带塞试管中,除不加内标溶液外,其余按“2.3”项下方法操作,进行LC-MS/MS分析,获得空白血浆样品的色谱(图1-A);取3889.6ng·mL⁻¹红霉素对照品溶液50μL和内标溶液(2.34μg·mL⁻¹克拉霉素)50μL,加入空白血浆中,依同法操作,获得相应的色谱(图1-B);依同法获得受试者服药1h后血浆样品的色谱(图1-C)。与空白血浆样品的色谱图比较,证明血浆样品中内源性物质不干扰待测物及内标的测定。

2.5 线性关系考察 取空白血浆200μL,加红霉素系列对照品溶液50μL,配制的红霉素血浆浓度为9.724,48.62,243.0,486.2,972.4,1944.8,2431.0ng·mL⁻¹血浆,每一浓度进行双样本分析,按“2.3”项下依法操作,进样5μL,记录色谱图;以待测物浓度 C (ng·mL⁻¹)为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值(A)为纵坐标,用加权($W=1/x^2$)最小二乘法进行回归运算^[3],结果证明血浆中红霉素浓度在9.724~2431.0ng·mL⁻¹范围内 A 与 C 呈良好的线性关系,回归方程为:

$$A = 2.916 \times 10^{-3} + 1.313 \times 10^{-3} C \quad r = 0.9976$$

按色谱峰信噪比(S/N)>3计,本方法的定量下限为9.724ng·mL⁻¹。

2.6 提取回收率 取空白血浆200μL,加入红霉素系列对照品溶液,使对应的血浆中红霉素浓度分别为9.724,486.2,1944.8ng·mL⁻¹,每一浓度进行6样本分析。按“2.3”项下操作,计算回收率;结果平均提取回收率($n=6$)别为80%,77.6%,78.2%;日内RSD分别为6.7%,4.2%,5.9%;日间RSD分别为9.6%,11.0%,3.7%。

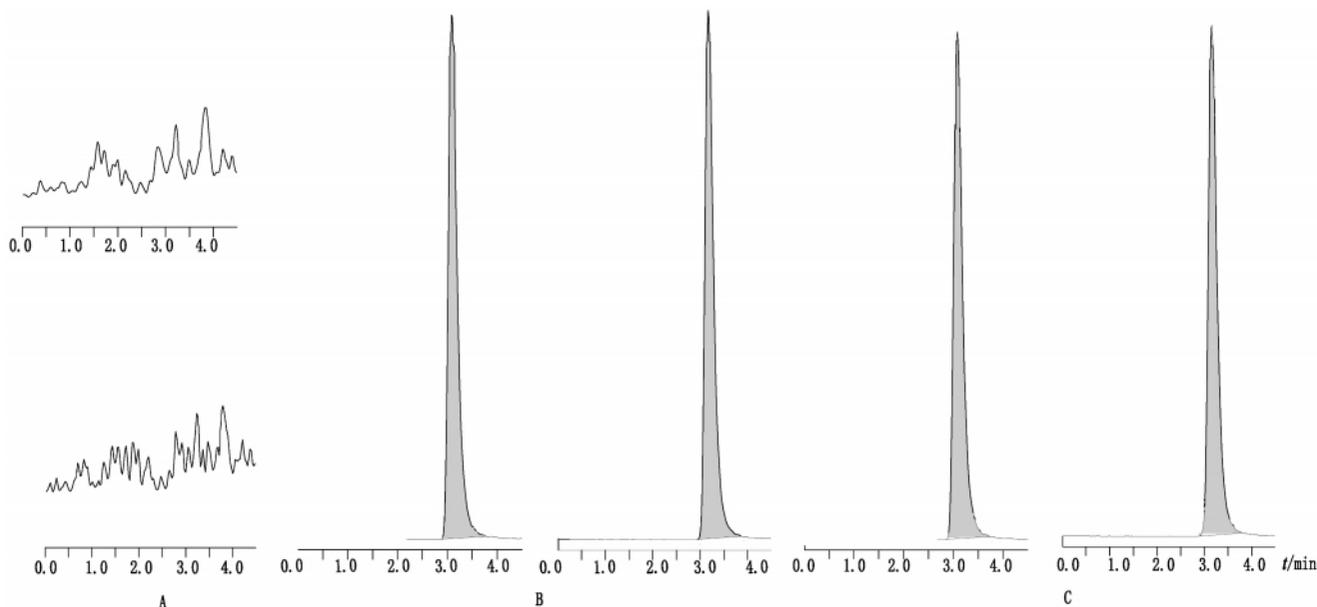


图1 红霉素及内标提取离子图

Fig 1 Extraction ion figure of erythromycin and internal standard

A. 空白血浆 (blank plasma) B. 空白血浆 + 红霉素 + 内标 (blank plasma spiked with erythromycin and internal standard) C. 受试者血浆样品 (drug plasma sample)

2.7 精密度与准确度 取空白血浆 200 μL , 加入红霉素系列对照品溶液, 使对应的血浆中红霉素浓度分别为 9.724, 486.2, 1944.8 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的质量控制 (QC) 样品, 每一浓度进行 6 样本分析。按“2.3”项下操作, 连续测定 3 d, 根据当日的标准曲线, 计算 QC 样品的测定浓度, 根据 QC 样品结果计算本法的准确度与精密度, 日内 RSD 分别为 6.7%, 4.2%, 5.9%; 日间 RSD 分别为 9.6%, 11.0%, 3.7%。

2.8 基质效应 取空白血浆 200 μL , 加入红霉素系列对照品溶液, 使对应的血浆中红霉素浓度分别为 9.724, 486.2, 1944.8 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每浓度 6 样本分析。同时另取水 200 μL , 加入红霉素系列对照品溶液, 使对应的浓度分别为 9.724, 486.2, 1944.8 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每浓度 6 样本分析, 按“2.3”项下操作, 以每一浓度 2 种处理方法的峰面积比值计算基质效应。结果平均基质效应 ($n=6$) 分别为 98.8%, 99.6%, 99.4%。结果显示: 基质不影响红霉素的测定。

2.9 稳定性考察 取空白血浆 200 μL , 加入红霉素系列对照品溶液, 使对应的血浆 3 样本分析, 按“2.3”项下操作。本试验考察了处理后 QC 样品室温放置 10 h 的稳定性、空气流 40 $^{\circ}\text{C}$ 吹干处理后 QC 样品室温放置 24 h 稳定性、QC 样品经历 3 次冷冻-解冻循环的稳定性以及 QC 样品 -40 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻放置 15 d 的稳定性。结果表明: 处理后的 QC 样品室温

放置 10 h 后, 室温放置试验测定值与添加值的相对偏差均小于 4.1%, 空气流处理后 QC 样品室温放置 24 h, 室温放置试验测定值与添加值的相对偏差均小于 5.4%, 结果表明分析测试过程中的样品较为稳定; QC 样品经历 3 次冷冻-解冻循环试验, 所有冻融试验测定值与添加值的相对偏差均小于 4.8%, 结果表明血浆样品可以进行反复冻融; QC 血浆样品 -40 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻放置 15 d, 试验测定值与添加值的相对偏差均小于 6.8%, 结果表明长期冰冻放置血浆样品不影响本方法对样品浓度的准确测定。

2.10 未知样品的测定 按“2.3”项下操作, 每个分析批制备 1 条工作曲线, 同时制备低、中、高 (双样本) 3 个浓度的 QC 样品 (9.724, 486.2, 1944.8 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的红霉素), 根据当日标准曲线计算未知样品浓度和质控样品浓度, 质控样品中最多允许 2 个不同浓度样品的浓度超出理论值的 15% (低浓度点为 20%), 否则此批数据不被接受。试验最后对血浆浓度异常数据点进行复检。

3 药动力学研究

24 名健康男性志愿者单剂量口服琥乙红霉素颗粒 0.5 g, 分别于服药前 (0 h) 及服药后 10, 20, 30, 45 min 及 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 5.0, 8.0, 12.0 h, 从志愿者肘静脉取血 2 mL, 置已肝素化的试管中, 4 $^{\circ}\text{C}$, 3500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取血浆, 在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。24 名健康受试者平均血药浓度-时间曲

线见图 2 ,主要动力学参数见表 1。

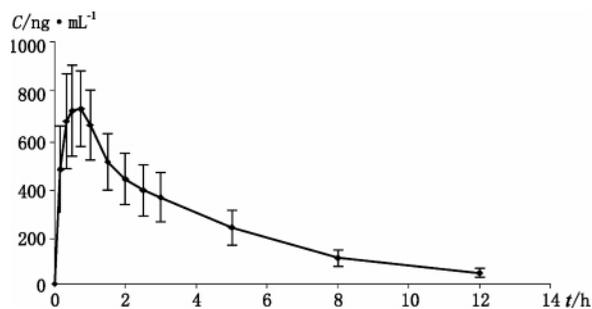


图 2 口服琥乙红霉素颗粒后红霉素平均血药浓度 - 时间曲线图
Fig 2 Mean erythromycin concentration - time curve after administration of single 500 mg dose

表 1 口服琥乙红霉素颗粒后红霉素的主要药动学参数

Tab 1 The erythromycin pharmacokinetic parameters of human plasma after administration of single 100mg dose

药动学参数 (pharmacokinetic parameters)	Mean ± SD
$T_{1/2}/h$	2.798 ± 0.587
K_e/h^{-1}	0.258 ± 0.051
T_{max}/h	0.756 ± 0.387
$C_{max}/ng \cdot mL^{-1}$	804.684 ± 363.377
$AUC_{(0-t)}/ng \cdot h^{-1} \cdot L^{-1}$	2916.625 ± 1525.551
$MRT_{(0-t)}/h$	3.148 ± 0.381

4 讨论

琥乙红霉素体内血药浓度的测定 ,国内主要采用微生物法^[3]和 HPLC 法^[4] ,由于大环内酯类药物在分析化学上无紫外吸收峰 ,因此采用 HPLC 分析方法测定一般要使用电化学检测器(Ag - AgCl) 检测 ,实验往往受到测定条件的限制。

微生物检测法以其低浓度检查的优点 ,仍然是目前常用的方法 ,但是由于微生物法试验结果体现了药物体内的综合情况 ,并不能完全精准地反映药物的吸收情况 ,即并非准确反映药代动力学(PK) ,而在一定程度上体现了药效动力学(PD) 。并且微生物法操作烦琐 检验周期长 影响生物检定法准确性的因素较多 ,专属性不强。与色谱法相比 ,微生物法的实验数据更难以保存和回溯 ,如果试验出现问题 ,也难以重新进行分析 ,查找试验的问题。这种情况 ,也不利于监管。

近年来 ,由于质谱技术的广泛应用 ,HPLC - MS/MS 具有专属性强、灵敏度高、重现性好等优点 ,应用 HPLC - MS/MS 用于血药浓度的测定越来越广泛 ,但是国内对于采用 HPLC - MS/MS 法研究琥乙红霉素体内行为的报道^[5] 很少。

由于琥乙红霉素是红霉素的衍生物 ,在体内可水解释放红霉素而起作用 ,并且在实验过程中发现琥乙红霉素在甲醇溶液中并不稳定 ,在配制对照溶液的过程中就已经有部分琥乙红霉素水解成红霉素 ,因此本文建立了 HPLC - MS 法测定血浆样品中红霉素浓度的方法 ,用来检测琥乙红霉素的体内行为 ,提高了检测的灵敏度 ,样品检测浓度可达 ng 级 ,血浆内源杂质无干扰。本法测定方法专属性强、灵敏度高、重现性好 ,不仅适用于琥乙红霉素体内分析 ,还可以用于红霉素的体内分析。

参考文献

- JIANG Min(姜敏) , CHEN Yan - bing(陈岩冰) , ZHANG Hong(张红) , *et al.* Study on the pharmacokinetics and bioequivalence of erythromycin ethylsuccinate in Chinese healthy volunteers(国产琥乙红霉素人体药代动力学及生物等效性研究) . *Acta Acad Med Jiangxi(江西医学院学报)* , 2004 , 44(1) : 19
- Zhang Xiang - rong , Chen Xiao - yan , Li Xiao - yan *et al.* Determination of clarithromycin in human plasma by liquid chromatography - tandem mass spectrometry: validation and application in clinical pharmacokinetic study. *J Chin Pharm Sci* , 2004 , 13(3) : 166
- ZENG Gui - xiong(曾桂雄) , ZHONG Guo - ping(钟国平) , WANG Xue - ding(王雪丁) , *et al.* Bioavailability and bioequivalence of erythromycin ethylsuccinate granules in healthy volunteers(琥乙红霉素颗粒的人体生物利用度和生物等效性研究) . *Chin J Infect Chemother(中国感染与化疗杂志)* , 2006 , 6(4) : 228
- WANG Jia - rui(王家蕊) , CHEN Li - qing(陈立清) , DONG Wei - lin(董伟林) *et al.* HPLC determination of erythromycin ethylsuccinate and pharmacokinetic studies in serum(兔血清中琥乙红霉素的 HPLC 测定及药代动力学研究) . *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)* , 2000 , 20(1) : 46
- ZHANG Xuan(张焯) , ZHANG Chun - ying(张春英) , DUAN Yu(段宇) *et al.* Bioequivalence of erythromycin ethylsuccinate granules evaluated by HPLC - MS - MS(LC - MS - MS 法研究琥乙红霉素颗粒的生物等效性) . *Chin J New Drugs(中国新药杂志)* , 2008 , 17(13) : 1164

(本文于 2010 年 5 月 11 日收到)