

液相色谱 – 串联质谱 (LC- MS/MS)法 测定他克莫司胶囊的含量

王荣, 贾正平*, 王浩亮, 谢华, 马骏, 张强, 王娟

(兰州军区兰州总医院临床药理基地, 兰州 730050)

摘要 目的: 建立液相色谱 – 串联质谱 (LC- MS/MS)法测定他克莫司胶囊中他克莫司的含量。方法: 他克莫司胶囊内容物经乙腈超声提取, 氮气吹干流动相复溶进样, 色谱柱: Zorbax Extend- C₁₈柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 – 乙腈 – 20 mmol L⁻¹ 醋酸铵溶液 (80: 15: 5 v/v/v); 流速: 0.4 mL · min⁻¹。采用电喷雾离子化四极杆串联质谱, 多反应检测方式测定样品的浓度。检测离子对分别为 m/z 821. 7⁺ 768. 4和 m/z 821. 7⁺ 786. 5。结果: 他克莫司浓度在 0.437 ~ 280 ng · mL⁻¹范围内, 与峰面积线性关系良好 ($r = 0.9999$, $n = 5$), 平均回收率 ($n = 15$)为 99.4%, 日内精密度、日间精密度的 RSD 分别为 4.0% 和 1.8%; 3批样品中他克莫司的含量分别为 95.6%, 98.9%, 97.4%。结论: 本方法具有良好的灵敏度、准确度、精确度及专属性, 结果准确, 重现性好, 易于操作, 可用于制剂中他克莫司含量的测定。

关键词: 他克莫司; 液相色谱 – 串联质谱; 胶囊

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254- 1793(2009)06- 0941- 03

LC- MS/MS determination of tacrolimus capsules

WANG Rong JIA Zheng- ping*, WANG Hao- liang

XIE Hua MA Jun, ZHANG Qiang WANG Juan

(Base of Clinic Pharmacology, Lanzhou General Hospital Lanzhou Command, Lanzhou 730050, China)

Abstract Objective To develop an LC- MS/MS method for the content determination of tacrolimus capsules. **Methods** The analysis was isolated from tacrolimus capsules by acetonitrile with ultrasound extraction. The supernatant was evaporated to dryness and reconstituted with the mobile phase, then 10 μL was injected for analysis. A Zorbax Extend- C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted with mobile phase of methanol- acetonitrile- 20 mmol · L⁻¹ ammonium acetate (80: 15: 5 v/v/v) at a flow rate of 0.4 mL · min⁻¹. Electrospray ionization (ESI) sources was applied and operated in the position ion mode. Multiple reaction monitoring (MRM) mode with the transition of m/z 821. 7⁺ 768. 4 and m/z 821. 7⁺ 786. 5 were used to quantify tacrolimus. **Results** The method was proved to be linear in the range of 0.437- 280 ng · mL⁻¹ with a regression coefficient of 0.9999 ($n = 5$). The lower quantitative limit was 0.437 ng · mL⁻¹. The average recovery rate was 99.4% ($n = 15$). The RSDs of average contents of intra- day and inter- day were 4.0% and 1.8% respectively. **Conclusion** This method is accurate, precise, sensitive and specific to be used in the content determination of tacrolimus capsules.

Key words tacrolimus; LC- MS/MS; capsules

他克莫司 (tacrolimus), 是由日本藤泽制药公司于 1982 年从链霉菌的代谢产物中分离出的一种大环内酯类化合物, 是一种强效免疫抑制剂, 药效强度是环孢素 A (CsA) 的 100 倍^[1]。本品对 T 细胞具有选择性的抑制作用, 主要是通过抑制 TH 细胞释放 IL- 2, IL- 3, IFN- γ 及抑制 IL- 2R 的表达而发挥

其强大的免疫抑制作用^[2], 适用于防治器官移植后的排斥反应。上市剂型有胶囊剂、注射液等, 现已作为预防、治疗排斥反应以及自身免疫性肝炎的一线药物。日本藤泽制药公司生产的他克莫司胶囊及注射液分别于 2001 年和 2002 年进入我国, Akashi 等^[3]报道运用反相液相色谱法定量研究他克莫司,

* 通讯作者 Tel: (0931)8994652 E- mail: Jiazp16@ sina. com

但目前未见文献报道用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)测定他克莫司制剂的方法,本文建立了测定他克莫司胶囊中他克莫司含量的LC-MS/MS分析方法,为药品检验和质量控制提供依据。

1 仪器与药品

API 3200型四极杆串联质谱仪(美国 Applied Biosystem公司),配有离子喷雾离子化源以及 Analyst 1.4.2 数据处理软件;岛津超高速液相(UFLC)色谱系统(日本岛津),包括 LC-20AD 二元输液泵, DGU-20A3 混合器, SL-20A 自动进样器, CBM-20A 控制器。

他克莫司胶囊($1\text{ mg}\cdot\text{粒}^{-1}$, $50\text{ 粒}\cdot\text{盒}^{-1}$, 批号 1D5004A), 藤泽药品(中国)有限公司, 他克莫司对照品(纯度 98.0%), 美国雅培公司。甲醇、乙腈为默克公司色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

精密称取他克莫司对照品 1 mg 用乙腈定容于 100 mL 量瓶中, 得浓度为 $0.01\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液作为对照品储备液。

原处方中除去他克莫司, 同法制备阴性对照品溶液。

2 样品的分析方法

2.1 样品的处理

取他克莫司胶囊 5 粒, 取出内容

物置 20 mL 锥形瓶中, 加 10 mL 乙腈超声(频率 50 Hz 功率 150 W)提取 30 min , 再转移至 5 mL 离心管中, $10000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min 取全部上清在氮气吹干仪下吹干, 用 1 mL 流动相稀释作为供试品溶液进行 LC-MS/MS 分析。

2.2 色谱条件 色谱柱: Zorbax Extend- C_{18} 柱($150\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$, 美国 Agilent 公司); 流动相: 甲醇-乙腈- $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵溶液($80:15:5\text{ v/v/v}$); 流速: $0.4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温: 室温; 进样量: $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

2.3 质谱条件 离子源: 电喷雾离子化源(ESI); 离子喷射电压: 5500 V ; 温度: $700\text{ }^{\circ}\text{C}$; 源内气体 1(GS_1, N_2)压力: 0.5 MPa 气体 2(GS_2, N_2)压力: 0.4 MPa 空气压缩机压力: 0.4 MPa 正离子方式检测; 扫描方式为多重反应监测(MRM); DP 电压: 40 V ; 碰撞气(N_2)压力: 20.68 kPa 他克莫司的碰撞诱导解离(CID)电压为 33 V ; 用于定量分析的离子反应分别为 $m/z\ 821.7\rightarrow 768.4$ 和 $m/z\ 821.7\rightarrow 786.5$ 。

3 分析方法确证

3.1 质谱分析 将他克莫司溶于流动相中, 按“质谱条件”项操作, 相应的二级全扫描质谱图见图 1。

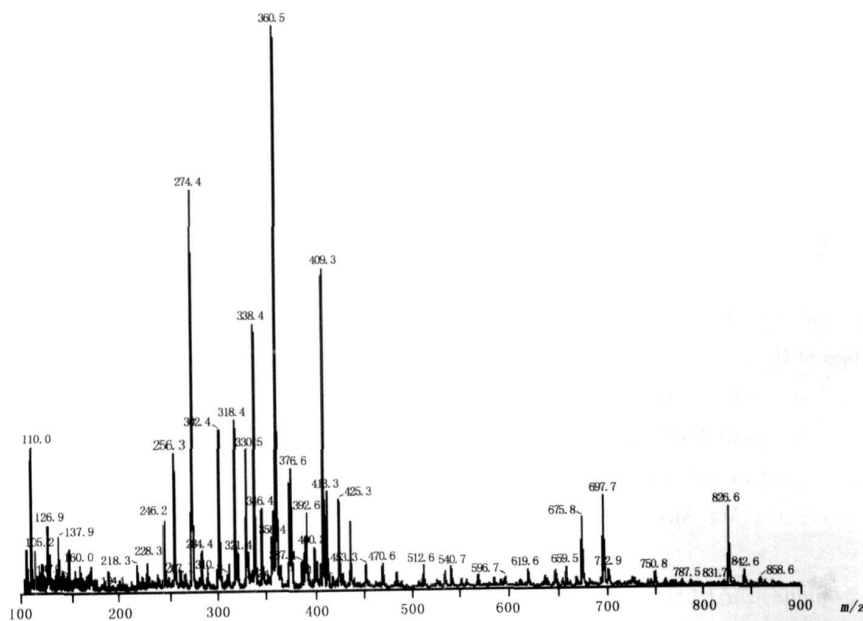


图 1 他克莫司 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 的二级全扫描质谱图

Fig 1 MS^2 full scan spectrograms of tacrolimus

3.2 方法的专属性 取流动相 1.0 mL , 进样 $10\text{ }\mu\text{L}$ 作空白图谱, 得色谱图 2-A; 取一定浓度的他克莫司对照品溶液 1.0 mL , 进样 $10\text{ }\mu\text{L}$ 作对照图谱, 得色谱图 2-B 他克莫司的保留时间为 5.1 min 取他

克莫司胶囊提取物供试品溶液, 进样 $10\text{ }\mu\text{L}$ 作样品图谱, 得色谱图 2-C。结果表明, 空白中的内源性物质不干扰他克莫司的测定。

3.3 标准曲线的制备 取对照品储备液, 用流动相

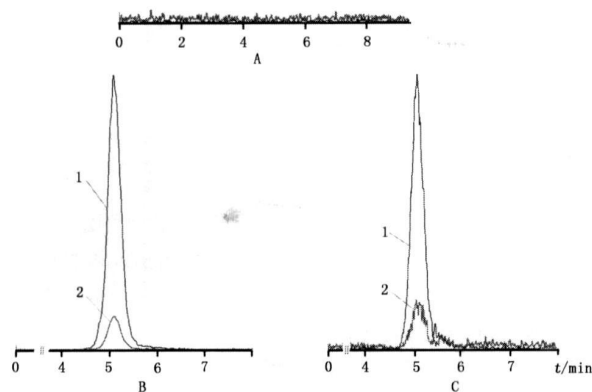


图 2 LC-MS/MS 测定他克莫司胶囊含量的典型色谱图

Fig 2 Typical chromatograms of tacrolimus capsules

A 空白样品 (blank sample) B $35.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 他克莫司对照品 (control) C 他克莫司胶囊样品 (tacrolimus capsules)

1. m/z 821.7/786.4 2. m/z 821.7/768.4

依次稀释使之浓度为 $0.437, 0.875, 1.75, 3.50, 7.00, 17.5, 35.0, 70.0, 140, 280 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 制备标准曲线。以待测物浓度为横坐标, 待测物的峰面积比值为纵坐标, 进行回归运算, 求得的直线回归方程为:

$$Y = 378X + 456 \quad r = 0.9999$$

线性范围为 $0.437 \sim 280 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 定量下限为 $0.437 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.4 精密度 按“标准曲线的制备”项下操作, 制备他克莫司低、中、高 3 个浓度 (分别为 $7.00, 70.0, 280 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的质量控制 (QC) 样品, 每一浓度进行 7 样本分析, 连续测定 3 d 根据当日的标准曲线, 计算 QC 样品的测得浓度, 根据 QC 样品结果计算本法的准确度与精密度, 结果见表 1。

表 1 LC-MS/MS 测定他克莫司胶囊含量的
的日间精密度与日内精密度 ($n = 5$)

Tab 1 Intra- day and inter- day precision
of tacrolimus capsules by LC- MS/MS

加入量 (added) $/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	日内 (intra- day)		日间 (inter- day)	
	测得量 (found) $/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD /%	测得量 (found) $/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD /%
7.0	6.44 ± 0.40	6.2	6.32 ± 0.18	2.8
70.0	73.3 ± 2.12	3.0	72.51 ± 1.34	1.8
280.0	289 ± 8.38	2.9	287 ± 2.49	0.9

3.5 回收率 取乙腈 1.0 mL , 加入对照品储备液, 按“2”项下方法操作, 制备低、中、高 3 个浓度 (他克莫司含量分别为 $0.875, 7.00, 70.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的溶液, 每一浓度进行 5 样本分析。同时另取阴性对照品溶液 1.0 mL , 按“2”项下方法操作, 向获得的上清液中等体积加入一定浓度的对照品溶液, 涡流混合, 进样分析, 获得相应峰面积。计算得高、中、低 3 个

浓度的回收率 ($n = 5$) 分别为 $99.8\%, 100.2\%, 98.3\%$, RSD 分别为 $2.3\%, 2.1\%, 1.9\%$ 。平均回收率 ($n = 15$) 为 99.4% 。

3.6 稳定性考察 样品经按“2.1 样品的处理”方法处理后, 室温下放置 12 h 24 h 内测得峰面积不变 ($\text{RSD} < 0.5\%$), 说明他克莫司在该方法处理下室温稳定。

3.7 未知样品的测定 按“2.1 样品的处理”项下操作, 每个分析批 (1 d 内测试的同种样品) 制备一条工作曲线, 同时制备低、中、高 ($0.20, 2.00, 32.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3 个浓度的质量控制样品, 每个浓度的质量控制样品进行双样本分析。根据每一分析批的工作曲线计算质控样品和未知样品的浓度。3 批样品中他克莫司的含量分别为 $95.6\%, 98.9\%, 97.4\%$; RSD 分别为 $1.9\%, 2.3\%, 1.8\%$ 。

4 讨论

4.1 本文利用 HPLC-MS/MS 具有很高的专属性、灵敏性、准确性等优点, 将传统上测定药物制剂含量区限于大剂量、高浓度的视野转移至小剂量、低浓度、高精度的检测方向上来, 用一种更为精确的质量分析方法服务于药物制剂含量的测定。由于该方法的检测限已达到 $0.437 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 因此该方法不仅可用于他克莫司的制剂含量测定, 还可用于血药浓度的分析及药物代谢动力学研究, 也可作为他克莫司其他测定方法的参考标准。

4.2 据文献报道, 他克莫司在水溶剂中易发生互变异构, 而在非极性的有机溶剂中, 能以他克莫司的化学类型保持稳定, 在含水的乙腈、乙醇等溶剂中都存在此问题, 直接导致定量峰面积和峰高的差异而影响定量测定; 而在不含水的有机溶剂中未见互变异构体形成。文献报道采用乙醇溶解后再以水稀释, 经放置 6 h 后测定, 以达到异构平衡^[1], 而本实验中以乙腈为溶剂, 结果峰面积可持续稳定。结果表明, 在无水的乙腈溶剂中, 他克莫司未发生互变异构。故选择乙腈作为本品的含量测定的溶剂。

参考文献

- XU Q in- ming (徐亲明). Study on the industrialization of tautomeric (他克莫司的工业化研究). *World Notes Antibiot* (国外医药抗生素分册), 2000, 21(4): 151
- WANG Yi- ru (王意如). Recent advances in immunosuppressive drugs (免疫抑制剂研究新进展). *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2002, 11(7): 512
- Akashi T, Nefuji T, Yoshida M, et al Quantitative determination of tautomeric FK506 by reversed - phase liquid chromatography *J Pharm Biomed Anal*, 1996, 14: 339

(本文于 2008 年 4 月 17 日收到)