

# 罗红霉素胶囊人体药物动力学及生物等效性研究

严方<sup>1</sup>, 杨劲<sup>2</sup>, 赵陆华<sup>1\*</sup>, 吴孟华<sup>1</sup>, 谭喜莹<sup>1</sup>, 潘娟<sup>1</sup> (1. 中国药科大学分析中心, 南京 210009; 2. 中国药科大学药物代谢动力学研究中心, 南京 210009)

**摘要:**目的 建立人血浆中罗红霉素的 HPLC-MS 方法, 测定其片剂的药物动力学参数及相对生物利用度。方法 20 名健康受试者随机交叉口服罗红霉素胶囊。血样用乙腈沉淀, 离心后进入 LC-MS 分析系统, 色谱柱: Hypersil C<sub>18</sub> ODS (5 μm, 25 cm × 4.6 mm); 流动相: 10 mmol/L 醋酸铵缓冲液 (pH 3.5) - 甲醇 (15:85); 质谱条件: 气动辅助电喷雾离子化, 正离子检测, 选择性离子检测 (SIM), 检测离子: 罗红霉素  $m/z$  837.5 [M+H]<sup>+</sup>, 克拉霉素  $m/z$  748.3 [M+H]<sup>+</sup>。结果 在 0.025 ~ 50 μg/mL 范围内峰比值 (罗红霉素峰面积 A<sub>S</sub> 和内标克拉霉素面积 A<sub>I</sub> 的比值) 与浓度线性关系良好 ( $r=0.9999$ ), 最低定量限为 3 ng/mL。绝对回收率为 85.87% ~ 95.03%。罗红霉素片剂的相对生物利用度为 (102.2 ± 26.0)%。结论 建立的分析方法灵敏、准确、简便, 符合血浆样品的测定要求。受试制剂和参比制剂后, 统计学结果表明: 两种制剂生物等效。

**关键词:** 罗红霉素; HPLC/MS; 药物动力学; 相对生物利用度

中图分类号: R961.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2006)05-0374-04

## Study of pharmacokinetics and relative bioavailability of roxithromycin

YAN Fang<sup>1</sup>, YANG Jin<sup>2</sup>, ZHAO Lu-hua<sup>1\*</sup>, WU Meng-hua<sup>1</sup>, TAN Xi-ying<sup>1</sup>, PAN Juan<sup>1</sup> (1. Analysis Center, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** An HPLC-MS method was developed for determination of roxithromycin in human plasma to study the pharmacokinetic parameters in capsule and relative bioavailability. **METHODS** The plasma was added acetonitrile, vortexed and centrifuged. And the supernate was analyzed by LC-MS. A RP-column (Hypersil ODS, 5 μm, 25 cm × 4.6 mm) was used with a mobile

\* 通讯作者: Tel: 025-83271560 E-mail: zhaoluhua@hotmail.com

phase of methanol-acetate buffer solution (pH 3.5) (85:15). LC-ESI MS was used in the selected ion monitoring (SIM) mode with target ions at  $m/z$  837.5 for roxithromycin and  $m/z$  748.3 for clarithromycin. **RESULTS** The standard curve was linear in the range of 0.025 ~ 50  $\mu\text{g/mL}$ . The limited concentration was 3  $\text{ng/mL}$  and the recovery was 85.87% ~ 95.03%. The relative bioavailability of roxithromycin capsule was (102.2  $\pm$  26.0)%. **CONCLUSION** The assay was proved to be sensitive, accurate and suitable for pharmacokinetic study of roxithromycin. The results of pharmacokinetics study after oral administration roxithromycin capsules showed that the two formulations were bio-equivalent.

**KEY WORDS:** roxithromycin; HPLC/MS; pharmacokinetics; relative bioavailability

罗红霉素 (roxithromycin) 由法国 Roussel UCLAF 公司开发的一种新的大环内酯类抗生素, 于 1987 年上市。该药抗菌谱广, 抗菌作用强, 作用时间长, 临床上主要用于呼吸道感染。其血药浓度的测定, 目前国内主要采用微生物法<sup>[1-2]</sup> 和 HPLC-UV<sup>[3]</sup>, 国外有文献采用 HPLC-UV, HPLC-ECD 和 HPLC-AD<sup>[4-6]</sup>, LC-MS 法测定血药浓度未见报道, 但微生物法测定结果不够精确, HPLC 法提取过程繁琐, 且难以避免血浆内源性杂质的干扰。我们采用 HPLC-MS 法对血浆中罗红霉素的浓度进行测定, 估算受试制剂的药物动力学及相对生物利用度, 方法专属、简便、灵敏、准确, 为临床用药提供了参考。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1100 液相色谱-质谱联用仪, 含双高压泵, 自动进样器, 柱温箱, 电喷雾离子化接口, 四极质谱检测器及 Agilent ChemStation 色谱工作站。受试制剂 (T): 罗红霉素胶囊 (苏州二叶制药有限公司, 批号: 030601, 规格: 75  $\text{mg}$ /粒); 参比制剂 (R): 罗红霉素胶囊 (苏州中化药品工业有限公司, 批号: 50103012, 规格: 150  $\text{mg}$ /粒)。试验用水为去离子, 甲醇为色谱纯 (江苏汉邦科技有限公司), 其他试剂为 AR 级。罗红霉素标准品溶液: 用甲醇配制 150  $\mu\text{g/mL}$  罗红霉素的储备液, 并用甲醇依次稀释为 100, 50, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.25  $\mu\text{g/mL}$  标准溶液。内标溶液: 用甲醇配制成 5  $\mu\text{g/mL}$  的克拉霉素溶液。

### 2 方法和结果

#### 2.1 色谱条件

图 1 Hypersil ODS 色谱柱 (5  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4.6  $\text{mm}$ , 大连依利特分

析仪器有限公司), 柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 流动相: 10  $\text{mmol/L}$  醋酸铵缓冲液 (pH 3.5) 甲醇 (15:85); 流速: 1.0  $\text{mL/min}$ ; 质谱条件: 气动辅助电喷雾离子化, 正离子检测, 选择性离子检测 (SIM), 传输区电压: 120  $\text{V}$ , 干燥气流速: 9  $\text{L/min}$ ; 雾化室压力: 35  $\text{psi}$ , 干燥气温度: 350  $^{\circ}\text{C}$ 。罗红霉素 (Rm): [M+H]<sup>+</sup> 离子,  $m/z$  837.5, 内标: 克拉霉素 (Clm), [M+H]<sup>+</sup> 离子,  $m/z$  748.3。

#### 2.2 血浆预处理

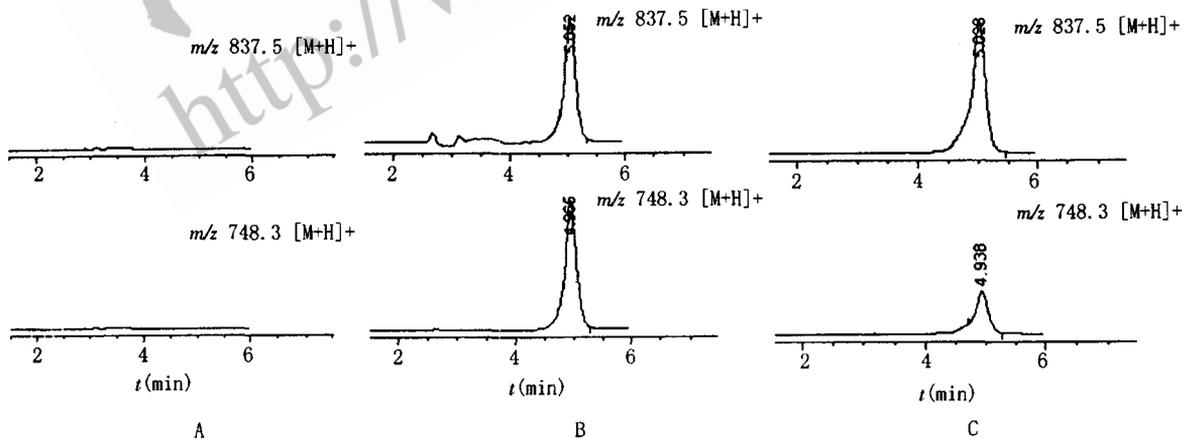
于 1  $\text{mL}$  离心管中精密加入血浆样品 200  $\mu\text{L}$ , 内标溶液 (5  $\mu\text{g/mL}$ ) 50  $\mu\text{L}$ , 涡旋混匀, 加入乙腈 800  $\mu\text{L}$ , 涡旋 3  $\text{min}$ , 于 16000  $\text{r/min}$  离心 10  $\text{min}$ 。吸取上清液转移至自动进样器样品管中, 进样分析, 进样量 40  $\mu\text{L}$ 。

#### 2.3 标准曲线制备及最低定量限测定

取 1  $\text{mL}$  离心管数支, 分别精密加入不同量的罗红霉素标准液及空白血浆 200  $\mu\text{L}$ , 涡旋混匀, 配成 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5, 10, 15  $\mu\text{g/mL}$  的标准含药血浆, 平行制备 5 份, 按“血浆样品的处理”项下操作, 记录色谱图, 计算罗红霉素面积  $A_s$  和内标峰面积  $A_i$  的比值  $f$ 。以平均比值  $f$  ( $f = A_s / A_i$ ) 对血药浓度 ( $c$ ) 作回归计算, 得回归方程  $f = 0.0006 \times c - 0.0194$  (权重系数  $w = 1/C^2$ )  $r = 0.9999$ , 最低定量限  $\text{LOQ} = 3 \text{ ng/mL}$  ( $S/N = 10$ )。

#### 2.4 方法的专属性

按“2.1”项下操作, 罗红霉素和克拉霉素峰形良好, 血浆中杂质峰不干扰样品的测定。罗红霉素和克拉霉素的保留时间均在 4.9 ~ 5.1  $\text{min}$  范围内 (图 1)。



人血浆中罗红霉素的典型色谱图

**Fig 1** Typical chromatogram of roxithromycin in human plasma

A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 罗红霉素对照剂 + 克拉霉素内标; C. 血浆样品 + 克拉霉素内标

A. blank plasma; B. blank plasma + Rm + Clm; C. plasma + Clm

## 2.5 精密度试验

取 1 mL 离心管数支,精密加入不同量的罗红霉素及 200  $\mu$ L 空白血浆,涡旋混匀,配成 0.05, 1, 10  $\mu$ g/mL 的标准含药血浆,按“2.2”项下操作,在日内和日间(5d)对每种浓度各做 5 份样品,记录色谱图,计算罗红霉素面积  $A_s$  和内标峰面积  $A_i$  的比值  $f$ ,求得日内和日间相对标准差,结果表明 0.05, 1, 10  $\mu$ g/mL 3 种浓度标准血浆的日内 RSD 分别为 2.03%, 1.91%, 2.30%, 日间 RSD 分别为 1.54%, 2.53%, 1.48%。

## 2.6 回收率试验

取 1 mL 离心管数支,精密加入不同量的罗红霉素标准液,氮气流吹干,加入水 200  $\mu$ L,配成浓度为 0.05, 1, 10  $\mu$ g/mL 罗红霉素溶液,加入乙腈 800  $\mu$ L,涡旋混匀,分取有机相 500  $\mu$ L 于另一离心管中,加入 50  $\mu$ L 内标溶液(5  $\mu$ g/mL),涡旋 10s,进样分析,记录色谱图,计算样品和内标的峰面积比值  $f_s$ ( $f_s = A_s/A_i$ )。另取 1 mL 离心管数支,分别精密加入不同量的罗红霉素溶液,氮气流吹干,加入 200  $\mu$ L 空白血浆,涡旋混匀,配成浓度为 0.05, 1, 10  $\mu$ g/mL 罗红霉素溶液,平行制备 5 份。加入乙腈 800  $\mu$ L,涡旋 3 min,于 16 000 r/min 离心 10 min。分取有机相 500  $\mu$ L 于另一离心管中,加入 50  $\mu$ L 内标溶液(5  $\mu$ g/mL),混匀,涡旋 10s,进样分析。记录色谱图,计算样品和内标的峰面积  $f_x$ ( $f_x = A_s/A_i$ ),将上述  $f_s$  和  $f_x$  的比值代入下式即可求得罗红霉素的绝对回收率( $R\%$ ),  $R\% = f_x/f_s \times 100\%$ ,结果表明:0.05, 1, 10  $\mu$ g/mL 3 种浓度的平均回收率( $n=5$ )分别为 85.87%, 89.36%, 95.03%; RSD 分别为 2.66%, 9.47%, 3.47%。

## 2.7 方法学应用

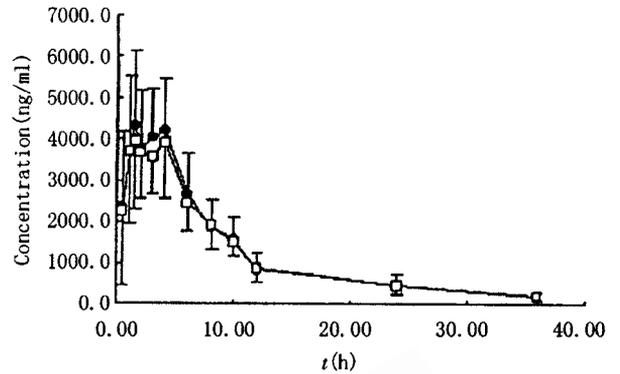
**2.7.1 受试者选择** 受试者入选条件:年龄:18~30岁;性别:男性;体重:标准体重的  $\pm 10\%$ ;体检与实验室检查:包括血、尿常规,肝、肾功能,心电图检查等均无异常,乙肝表面抗原检查为阴性;精神状态:良好;其他:受试者不嗜烟酒,无药物过敏史。试验的两周前及试验期间不得服用任何其他药物。

**2.7.2 给药方案及血样采集** 采用双交叉实验设计,给药剂量均为 150 mg。受试者于次日早晨 7:00 空腹服用受试制剂或参比制剂,用 200 mL 温开水送服;服药 2 h 后方可再饮水,4 h 后进统一餐。两次服药间隔 7 d 清洗期。于服药后 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 h 抽静脉血约 3 mL,置肝素抗凝试管中。分离出血浆,取出血浆于  $-30^\circ\text{C}$  冷冻保存至分析。

### 2.7.3 药动学研究

20 名健康受试者随机交叉制剂 T 及制剂 R 后,测定血浆中罗红霉素浓度,其血药浓度-时间曲线见图 2。根据血药浓度-时间曲线比较及 AUC 值显示,以制剂 R 为标准对照,算得制剂 T 的相对生物利用度为  $(102.2 \pm 26.0)\%$ ,结果见表 1。对两制剂的罗红霉素的参数  $C_{\max}$ ,  $AUC_{0-t}$  先进行方差分析,再进行双单侧  $t$  检验。双单侧  $t$  检验结果表明,上

述两个参数生物等效,  $T_{\max}$  经非参数法检验差异没有显著性意义( $P > 0.05$ )。



20 名受试者单剂量口服罗红霉素试验或参比制剂 250 mg 后平均药-时曲线

Fig 2 Mean plasma concentration time curves following a single dose of roxithromycin (250 mg) tested and reference preparations orally

□ 试验制剂; ● 参比制剂

□ tested preparation; ● reference preparation

表 1 20 名健康受试者单剂量口服罗红霉素试验或参比制剂 250 mg 后的药动学参数 ( $n=20, \bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of the two preparation of roxithromycin in 20 healthy subjects after a single 250 mg oral dose ( $n=20, \bar{x} \pm s$ )

参数	试验制剂	参比制剂
$C_{\max}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	$4.82 \pm 1.42$	$5.08 \pm 1.41$
$t_{\max}$ (h)	$2.10 \pm 1.3$	$2.80 \pm 1.3$
$t_{1/2}$ (h)	$9.15 \pm 2.02$	$9.06 \pm 2.16$
$AUC_{0-36}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	$42.09 \pm 12.01$	$43.22 \pm 14.74$
$AUC_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	$45.09 \pm 13.71$	$46.24 \pm 16.6$

## 3 讨论

### 3.1 血药浓度测定方法的建立与选择

文献报道,罗红霉素血药浓度的测定方法有 HPLC-UV<sup>[3]</sup>法和微生物法<sup>[1-2]</sup>。由于 HPLC-UV 法采用末端吸收检测,紫外最大吸收波长为 210 nm 左右,这种方法灵敏度较低且血浆中内源性杂质干扰比较严重,很难准确测定血浆中罗红霉素浓度;并且罗红霉素的代谢物在体外也具有抗菌活性<sup>[7]</sup>,故采用微生物法无法将罗红霉素和其代谢产物分开。我们选择 LC-MS 法测定血浆中罗红霉素的浓度,其专属性及选择性均较高,罗红霉素峰和内标峰形良好,无杂质干扰,绝对回收率在 85%,且灵敏度高,最低定量限(LOQ)为 3 ng/mL,而其他方法的最低定量限通常为 100~250 ng/mL<sup>[1-6]</sup>。该法适合于罗红霉素临床药动学及生物等效性研究。

### 3.2 药动学参数比较

本实验建立的 LC-MS 法可以用于罗红霉素及其内标克拉霉素的药动学研究。本实验测定制剂 T 的药动学参数  $t_{1/2}$

为  $9.15 \pm 2.02$ h;  $t_{\max}$  为  $2.1 \pm 1.3$ h;  $c_{\max}$  为  $4.83 \pm 1.42$  $\mu$ g/mL; AUC 为  $42.09 \pm 12.01$ 。制剂 R 的药动学参数  $t_{1/2}$  为  $9.15 \pm 2.02$ h;  $t_{\max}$  为  $2.8 \pm 1.3$ h;  $c_{\max}$  为  $4.82 \pm 1.42$  $\mu$ g/mL; AUC 为  $43.22 \pm 14.74$ 。两种制剂经三因素方差分析表明  $\ln c_{\max}$ 、 $\ln AUC_{0-24}$  和  $\ln AUC_{0-\infty}$  均无显著性差异;这表明罗红霉素胶囊受试制剂和参比制剂具有生物利用程度等效。

## 参考文献

- [1] 乔海灵,张莉蓉,张启堂,等.进口罗红霉素在健康人体内的药代动力学[J].河南医科大学学报,1998,3(33):107.
- [2] 来彩霞,陈炜,王爱民,等.罗红霉素分散片人体相对生物利用度研究[J].沈阳药科大学学报,1999,16(3):197.
- [3] 唐星,张倩,邵瑞莹.罗红霉素缓释胶囊在家犬体内的药动学及相对生物利用度[J].沈阳药科大学学报,2003,20(6):391.
- [4] J. Macek, P. Ptáček, J. Klíma. Determination of roxithromycin in

human plasma by high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1999, 723(1-2): 233.

- [5] N. Grgurinovich, A. Matthews. Analysis of erythromycin and roxithromycin in plasma or serum by high-performance liquid chromatography using electrochemical detection[J]. J Chromatogr, 1988, 433: 298.
- [6] Chieko Taninaka, Hisakazu Ohtani, Erika Hanada, et al. Determination of erythromycin, clarithromycin, roxithromycin, and azithromycin in plasma by high-performance liquid chromatography with amperometric detection[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2000, 738: 405.
- [7] 黄海华,于立华,孙铁民,等.罗红霉素主要代谢产物的体外抗菌活性研究[J].中国抗生素杂志,2000,25(6):344.

收稿日期:2005-04-14