

LC/MS/MS法测定人血浆中罗红霉素的血药浓度

何夕典¹,袁波²,徐海燕² (1.中国医科大学附属第一医院药剂科,沈阳 110001;2.沈阳药科大学,沈阳 110016)

摘要:目的 建立 LC/MS/MS法测定人血浆中罗红霉素的浓度。方法 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱,流动相甲醇-水-甲酸(75:25:0.5),流速为 0.5 mL·min⁻¹。质谱检测方式:SIM。克拉霉素为内标,血浆样品用乙醚提取浓集,进行 LC/MS/MS分析。结果 本方法在 0.1 ~ 40.0 μg·mL⁻¹内线性关系良好($r=0.9997$),平均回收率 87.6%,日内和日间 RSD <10%。结论 本方法快速、准确,适用于罗红霉素的临床药动学研究和血药浓度检测。

关键词:液质联用;罗红霉素;血药浓度

中图分类号:R969.11 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2008)05-0424-03

Determination of the Concentration of Roxithromycin in the Human Plasma by LC/MS/MS

HE Xi-dian¹, YUAN Bo², XU Hai-yan² (1. The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a LC/MS/MS method to determine the concentration of roxithromycin in the human plasma.

METHODS The assay was conducted on the Diamonsil C₁₈ column with methanol-water-methane acid(75:25:0.5) as the mobile phase, running at a flow rate of 0.5 mL·min⁻¹. LC/MS/MS was performed in the selected ion monitoring (SIM) mode. The clarithromycin was used as the internal standard. The plasma samples were extracted with diethyl ether and determined by LC/MS/MS.

RESULTS The linear calibration curve was obtained in the concentration range of 0.1 ~ 40.0 μg·mL⁻¹ ($r=0.9997$), the recovery of within-day RSD and between-day RSD were <10%. **CONCLUSION** The method is shown to be convenient, accurate, rapid, and suitable for the determination of roxithromycin in the human plasma and pharmacokinetic studies of roxithromycin.

KEY WORDS: LC/MS/MS; roxithromycin; plasma drug concentration

罗红霉素(Roxithromycin)是一种半合成大环内酯类抗生素,对革兰阳性菌、部分革兰阴性菌、厌氧菌、支原体、衣原体、军团菌等均有较强的抗菌作用。临床证明,罗红霉素对治疗呼吸道感染、泌尿生殖道感染、皮肤和软组织感染方面效果显著。罗红霉素具有口服吸收好、对胃酸稳定、生物利用度好、血和组织中含量高、不良反应小、半衰期长等优点。有关罗红霉素的血药浓度分析,多采用微生物法^[1]和高效液相色谱-电化学检测器^[2],而微生物法操作繁琐、周期长,电化学检测器一般实验室难以具备。由于罗红霉素结构中无共轭基团,只在紫外末端吸收,用紫外检测器检测灵敏度低,需预先对血样进行提取浓集,文献报道^[3-5]的提取方法回收率低,操作繁琐。本实验建立了 LC/MS/MS法来测定人血浆

中罗红霉素的血药浓度。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

TSQ Quantum Ultra液相色谱-三重四极杆串联质谱仪,电喷雾离子源(ESI源),Surveyor LC泵,Surveyor型自动进样器以及 Xcalibur 1.3 数据采集软件(美国 Finnigan 公司);Microsoft Excel 2000 数据处理软件(美国微软公司);TGL-16C型离心机(上海手术器械厂);XW-80A旋涡混合器(上海精科实业有限公司)。

1.2 药品及试剂

罗红霉素对照品(纯度 99.6%),内标克拉霉素(纯度 99.8%)均购于中国生物制品检定所;甲醇为色谱纯(山东禹

作者简介:何夕典,男,主管药师

Tel: (024) 23256666-6158

E-mail: GAO_Ming9778@yahoo.com.cn

王试剂厂); 甲酸、乙醚和碳酸钠为分析纯(沈阳化学试剂厂); 空白血浆由沈阳中心血站提供。

2 方法

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水-甲酸(75:25:0.5), 流速为 0.5 mL·min⁻¹, 柱温: 室温。

2.1.2 质谱条件 ESI离子源; 源喷雾电压为 4.0 kV; 加热毛细管温度为 300 °C; 鞘气(N₂)压力 25 A, 辅助气(N₂)压力 5 A, 碰撞气(Ar)压力 1.2 mTorr。罗红霉素和克拉霉素的碰撞诱导解离(CID)电压都为 25 eV; 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 837.5(m/z 679.3 罗红霉素)和 m/z 748.5(m/z 158.1 克拉霉素); 扫描时间为 0.3 s。

2.2 样品的处理方法

2.2.1 样品的预处理 用肝素抗凝的负压真空离心管取全血 2 mL, 上下震荡 3 次, 以 5 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 分离上层血浆, 立即置于冰箱, -20 °C 贮存。

2.2.2 血浆样品的处理 向 50 μL 血浆中分别加入 50 μL 内标溶液(克拉霉素 10 μg·mL⁻¹)和 0.05 mol·L⁻¹ Na₂CO₃ 30 μL 混匀; 加 1 mL 提取溶剂乙醚, 涡流混合 1 min, 往复振荡 10 min(180 次·min⁻¹), 离心 5 min(4 000 r·min⁻¹), 分取上层有机相于另一试管中, 于 40 °C 空气流下吹干, 残留物加入 1 mL 流动相溶解, 涡流混合, 取 20 μL 进行 LC/MS/MS 分析。

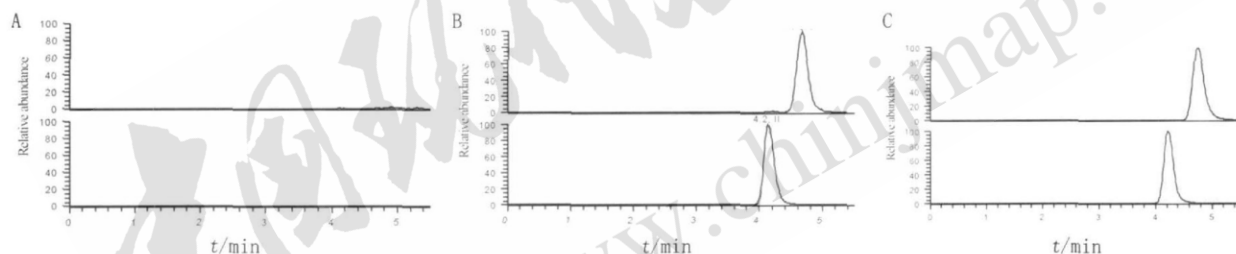


图 1 测定血浆中罗红霉素和内标克拉霉素的质谱图

A-空白血浆; B-空白血浆加入罗红霉素至 0.400 0 μg·mL⁻¹ 和内标克拉霉素至 80.00 μg·mL⁻¹; C-受试者口服含 200 mg 罗红霉素参比制剂后 2.5 h 血浆样品(峰 I 为罗红霉素, 峰 II 为克拉霉素)

Fig 1 Chromatograms of roxithromycin and internal standard clarithromycin

A-blank plasma; B-blank plasma with roxithromycin 0.400 0 μg·mL⁻¹ and internal standard clarithromycin 80.00 μg·mL⁻¹; C-healthy volunteer plasma sample 2.5 h after a oral dose of 200 mg roxithromycin(I- roxithromycin; II- clarithromycin)

2.5 血浆样品提取回收率

取空白血浆 50 μL, 按“血浆标准曲线的制备”项下的方法制备罗红霉素低、中、高三个浓度点(0.1, 4.0, 32.0 μg·mL⁻¹)的样品, 每一浓度进行 6 样本分析。同时另取空白血浆 50 μL, 除不加标准系列溶液和内标外, 按“血浆样品的处理”项下操作, 向提取的上清液中加入相应浓度的标准溶液和内标各 50 μL, 涡流混合, 40 °C 空气流下吹干。残留物以 1 mL 流动相溶解, 进样分析, 获得相应峰面积(3 次测定的平均值)。以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算提取回收率。罗红霉素在 0.1, 4.0, 32.0 μg·mL⁻¹ 三个浓度的血浆样品提取回收率分别为 85.1%、87.3% 和 90.5%。

2.6 精密度试验

2.3 血浆标准曲线的制备 取空白血浆 50 μL, 加罗红霉素标准系列溶液 50 μL, 配制成相当于罗红霉素血浆浓度为 0.1, 0.4, 1.0, 4.0, 10.0, 40.0 μg·mL⁻¹ 的样品, 按“血浆样品处理”依法操作, 每一浓度进行双样本分析, 进样 20 μL, 记录色谱图; 以待测物浓度为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标, 用加权最小二乘法^[6]进行回归运算, 求得的直线回归方程即为标准曲线 $y = 2.748 \times 10^{-2}x - 4.666 \times 10^{-3}$, $r = 0.9997$, 根据标准曲线, 罗红霉素血浆浓度测定方法的线性范围为 0.1~40.0 μg·mL⁻¹。

2.4 方法专属性与检测限

罗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 837.5 和 m/z 748.5。选择性对准分子离子峰 $[M+H]^+$ 进行产物离子扫描, 生成的主要碎片离子分别为 m/z 679.3 和 m/z 158.1, 将主要碎片离子作为定量分析时监测的产物离子。

分别取 6 名受试者的空白血浆 50 μL, 除不加内标外, 按“血浆样品的处理”依法操作, 进行 LC/MS/MS 分析, 获得空白血浆样品的色谱图, 如图 1A; 将一定浓度的标准溶液和内标溶液加入空白血浆中, 依同法操作, 得色谱图, 如图 1B。其中罗红霉素的保留时间约为 4.7 min, 内标克拉霉素的保留时间约为 4.2 min。取健康受试者给药后收集的血浆样品, 依同法操作, 得色谱图, 如图 1C。结果表明, 空白血浆中内源性物质不干扰待测物及内标物的测定。最低检测限为 0.06 μg·mL⁻¹。

取空白血浆 50 μL, 按“血浆标准曲线的制备”项下的方法配制罗红霉素低、中、高三个浓度(分别为 0.1, 4.0, 32.0 μg·mL⁻¹)的质量控制(QC)样品, 6 样本, 连续测定 3 d 并与标准曲线同时进行, 计算 QC 样品的测得浓度, 与配制浓度对照, 求得本法的准确度与精密度, 数据见表 1。日内精密标准曲线 $y = 3.694 \times 10^{-2}x - 7.682 \times 10^{-3}$, $r = 0.9995$; 日间精密标准曲线 $y = 5.129 \times 10^{-2}x - 3.782 \times 10^{-3}$, $r = 0.9996$ 。

2.7 稳定性的考察

本实验考察了罗红霉素血浆样品经液-液萃取处理后室温放置 24 h 的稳定性, 血浆样品室温放置 2 h 的稳定性, 血浆样品 -20 °C 放置 30 d 及血浆样品经历 3 次冷冻(解冻循

表 1 人血浆中罗红霉素的准确度与精密度

Tab 1 Accuracy and precision of Roxithromycin in human plasma

加入量	测得值	日内精密度	测得值	日间精密度
$/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	/%	$/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	/%
0.10	0.10 ± 0.01	6.7	0.10 ± 0.006	6.4
4.00	3.88 ± 0.13	3.4	3.98 ± 0.09	2.2
32.0	31.20 ± 1.8	5.7	31.40 ± 2.1	6.7

环的稳定性。稳定性考察时,取空白血浆 50 μL ,按“标准曲线的制备”项下的方法配制罗红霉素低、高两个浓度的血浆样品(罗红霉素浓度分别为 0.1 和 32.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),每一种浓度水平进行 3 样本分析,采用 LC/MS/MS 法测定。数据表明:处理后的血浆样品室温放置 24 h 内稳定 (RE 在 $\pm 7.9\%$ 之内),血浆样品室温放置 2 h 内稳定 (RE 在 $\pm 5.2\%$ 之内),血浆样品 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 30 d 内稳定 (RE 在 $\pm 6.9\%$ 之内),罗红霉素血浆样品经过 3 次冷冻(解冻循环后)稳定 (RE 在 $\pm 3.7\%$ 之内)。

3 讨论

本实验采用有机溶剂乙醚提取后用氮气吹干浓缩血浆的预处理方法,简单易操作,使用样品量少。选用克拉霉素作为内标,其中罗红霉素的保留时间约为 4.7 min,内标克拉霉素的保留时间约为 4.2 min;结果表明,空白血浆中内源性物质不干扰待测物及内标物的测定。本方法提取回收率均大于 85%,日内及日间精密度 (RSD) 均小于 10%,最低检测

限为 0.06 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。标准曲线在 0.1 ~ 40.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好 ($r=0.9997$)。故此法有较高的灵敏度和专属性,能够满足生物样品测定的要求。采用 LC/MS/MS 法测定罗红霉素的含量,有检测时间短、灵敏度高、重复性好及血浆预处理方法简单、易操作的优点,在实际的临床药动力学研究和血药浓度检测工作中有广泛的应用前景。

REFERENCES

- [1] WANG H, ZHANG Q Y, SHI A M. Detection of Roxithromycin content in human blood plasma by HPLC [J]. Anti-infection Pharmacy, 2005, 2 (1): 25-26.
- [2] DAI H, HU C Q. HPLC Analysis of Roxithromycin and Its Related Substances [J]. Journal of drug analysis, 2002, 22 (3): 185-188.
- [3] LIU H J, WANG C L, REN J M. Detection of Roxithromycin content in human blood plasma by RE-HPLC [J]. Journal of He Bei medical University, 2005, 26 (5): 353-354.
- [4] TIAN L, ZHONG D F. Detection of Roxithromycin in human blood plasma by HPLC-EC [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 1999, 34 (7): 480-483.
- [5] TIAN J, HU C Q. Discussion of Roxithromycin and its related substances by high-speed column HPLC [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2003, 23 (6): 434-438.

收稿日期: 2007-07-12