

LC-MS/MS 法同时检测人血浆及尿液中 头孢哌酮和他唑巴坦含量

郭蓓宁, 武晓捷, 张 菁

(复旦大学华山医院抗生素研究所, 上海 200040)

Simultaneous Determination of Cefoperazone and Tazobactam in Human Plasma and Urine Using Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

GUO Bei-ning, WU Xiao-jie, ZHANG Jing

(Institute of Antibiotics, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

Abstract: A rapid and selective LC-MS/MS method was developed for the simultaneous determination of cefoperazone and lactamase inhibitor tazobactam in human plasma and urine. Plasma samples were pretreated with acetonitrile, dried with N₂ and reconstructed with mobile phase. Urinary samples were diluted with buffer and analyzed directly following centrifugation. The post-treatment samples were applied to a prepacked Waters Atlantis C₁₈ column interfaced with a triple quadrupole tandem mass spectrometer. Negative electrospray ionization was employed as the ionization source. The mobile phase consisted of ammonium formate-methonal (60:40, V/V). The analytes and I.S. cefuroxime were detected by the use of selected reaction monitoring mode. The method was linear in the concentration range of 20-20 000 µg·L⁻¹ for cefoperazone both in plasma and urinary samples, 10-10 000 µg·L⁻¹ for tazobactam. The lower limit of quantification (LLOQ) for cefoperazone and tazobactam were 20 and 10 µg·L⁻¹, respectively. The intra-day and inter-day relative standard deviation for cefoperazone plasma samples across three validation runs over the entire concentration range was less than 2.98%. The accuracy determined at three concentrations (300, 6 000 and 18 000 µg·L⁻¹ for cefoperazone) ranged from 95.69% to 101.93% in terms of recovery. The chromatographic run time for each plasma sample was less than 5 min. The method herein described was successfully applied for the evaluation of single and multiple doses pharmacokinetic profiles of cefoperazone/tazobactam compound preparation in healthy volunteers.

Keywords: LC-MS/MS; cefoperazone; tazobactam

中图分类号: O657.63

文献标识码: A

文章编号: 1004-2997 (2007) 增刊-79-02

头孢哌酮(Cefoperazone)为第三代半合成头孢菌素,对绿脓杆菌、肠杆菌科等革兰阴性菌、革兰阳性菌和厌氧菌有广谱抗菌作用。他唑巴坦(Tazobactam)为β内酰胺酶抑制剂,可不同程度地保护头孢哌酮不被β内酰胺酶灭活,提高头孢哌酮对产酶菌的抗菌作用。受上海医药科技发展有限公司委托,复旦大学附属华山医院抗生素研究所对注射用头孢哌酮钠—他唑巴坦钠(8:1)复方制剂 1.125 g (含头孢哌酮 1 g 和他唑巴坦 0.125 g)进行了I期临床试验研究。I期临床试验内容包括两部分:①注射用头孢哌酮钠—他唑巴坦钠(8:1) 复方制剂人体单剂剂量递增耐受性试验;②注射用头孢哌酮钠—他唑巴坦钠(8:1) 复方制剂人体药物代谢动力学。本试验特建立同时测定人体血浆和尿液中头孢哌酮和他唑巴坦浓度的高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)测定法,用于人体药动学研究。

1 试验部分

1.1 主要仪器、材料与试剂

Waters Alliance 2690 高效液相色谱仪; Finnigan TSQ Quantum 台式质谱仪; Finnigan Xcalibur 数据处理系统以及 DELL 微机; Millipore 纯水系统; METTLER AE240 分析天平; N-EVAPTM112 氮吹仪; ABBOTT 离心机, $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 美国雅培制药有限公司产品。

甲醇和乙腈: 高效液相色谱纯, Sigma 公司产品; 甲酸铵: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司产品; 甲酸: 分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司产品。

1.2 实验条件

流动相: $V(2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 甲酸铵 pH 4.5}): V(\text{甲醇})=60: 40$; 固定相 Waters Atlantis dC₁₈ 柱 ($150\times 2.1\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$); 流速: $0.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样体积 $5\text{ }\mu\text{L}$; 电离源及检测模式: ESI 源负离子模式 SRM 扫描; 检测通道: 头孢哌酮 $m/z\ 644.1\rightarrow m/z\ 528.0$, 他唑巴坦 $m/z\ 299.1\rightarrow m/z\ 138.0$, 内标(头孢呋新) $m/z\ 423.0\rightarrow m/z\ 362.0$; 样品为室温条件下分离。在该色谱条件下, 头孢哌酮、他唑巴坦和内标的保留时间分别为 4.2、2.5 和 3.6 min。

1.3 血浆及尿液样品前处理方法

血浆样品前处理为采用 3 倍体积乙腈沉淀蛋白, 上清液 N_2 吹干, 流动相重建后进样分析, 尿液样品采用甲酸铵缓冲液稀释并离心后直接进样。

2 结果和讨论

血浆和尿液中头孢哌酮在 $20\sim 20\,000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内线性关系均良好($r^2>0.999$), 血浆和尿液样品中头孢哌酮提取回收率分别为 $(96.41\pm 4.02)\%$ 和 $(102.30\pm 8.10)\%$; 他唑巴坦在 $10\sim 10\,000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内线性关系均良好($r^2>0.999$), 样品提取回收率分别为 $(91.55\pm 4.02)\%$ 和 $(99.60\pm 3.31)\%$ 。头孢哌酮高、中、低浓度质控($18\,000$ 、 $6\,000$ 和 $300\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)血浆样品测定结果日内、日间及周间相对标准偏差分别为 $\leq 2.98\%$ 、 $\leq 3.29\%$ 和 $\leq 2.48\%$, 尿液样品的日内、日间及周间相对标准偏差分别为 $\leq 10.22\%$ 、 $\leq 5.46\%$ 和 $\leq 5.30\%$, 他唑巴坦高、中、低浓度质控($9\,000$ 、 $3\,000$ 和 $150\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)血浆样品测定结果的日内、日间及周间相对标准偏差分别为 $\leq 8.08\%$ 、 $\leq 4.94\%$ 和 $\leq 5.13\%$, 尿液样品测定结果的日内、日间及周间相对标准偏差分别为 $\leq 2.16\%$ 、 $\leq 3.41\%$ 和 $\leq 2.66\%$ 。稳定性试验表明样品室温下放置或处理后放置 12 h 及 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冻融 3 次对测定结果无影响, $1.25\text{ }\mu\text{mL}^{-1}$ 肝素对测定结果无影响。6 份来自于不同受试者的血浆基质效应研究证实, 该样品预处理方法对血浆中头孢哌、他唑巴坦和头孢呋新浓度的测定无影响。信噪比为 10:1 时, 头孢哌酮和他唑巴坦的检测灵敏度分别可达 2.5 和 $0.2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右。

建立的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)测定法可同时检测血浆或尿液中的头孢哌酮和他唑巴坦浓度, 为头孢哌酮、他唑巴坦复方制剂临床研究药代动力学研究提供了操作简单、快速、灵敏度高、特异性好、精确和准确的分析测定方法。

参考文献:

- [1] DOKLADALOVA J, QUERCIA G T, STANKEWICH J P. High-performance liquid chromatographic determination of cefoperazone in human serum and urine[J]. J Chromatogr, 1983, 276(1):129-37.
- [2] AUGHEY V, GROSSE P Y, ALBERT G, et al. High-performance liquid chromatographic determination of tazobactam and piperacillin in human plasma and urine[J]. J Chromatogr B Biomed Appl, 1996, 682(1):125-36.