

液相色谱-串联质谱法测定人血浆中克林霉素

张 丹, 韩 静, 王 涛, 王振龙, 郭 丽, 刘会臣

(北京大学航天临床医学院临床药理室, 北京 100049)

摘要:建立了测定人血浆中克林霉素的 LC-MS/MS 法。血浆样本用乙腈沉淀蛋白后, 选用 Shim-pack VP-ODS 色谱柱(150 mm × 2.0 mm × 5 μm), 以 V(甲醇) : V(10 mmol · L⁻¹ 乙酸铵(含 0.25% 甲酸)) = 55 : 45 为流动相, 流速为 0.4 mL · min⁻¹。选用 API3200 型三重四极杆串联质谱仪的多重反应监测(MRM)扫描方式进行监测, 电喷雾离子化源, 正离子方式, 选择监测离子反应分别为 m/z 425.2 → 126.3(克林霉素)和 m/z 256.2 → 167.3(内标苯海拉明)。克林霉素和苯海拉明的保留时间分别为 1.77 min 和 1.79 min; 血浆中克林霉素的线性范围为 0.030 0 ~ 10.0 mg · L⁻¹ ($r > 0.99$), 定量下限为 0.030 0 mg · L⁻¹; 日内、日间相对标准差(RSD)均小于 6%; 相对偏差(RE)均在 ±6% 的范围以内; 平均提取回收率为 (101.1 ± 2.6)%; 稳定性试验中, 血浆中克林霉素在各种贮存条件下均较稳定。该方法快速、灵敏、专属性强、重现性好, 适用于人体内克林霉素的药代动力学研究。

关键词:克林霉素; 人血浆; 液相色谱-串联质谱联用法; 药代动力学

中图分类号: O 657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2009)06-0346-06

Determination of Clindamycin in Human Plasma by LC-MS/MS

ZHANG Dan, HAN Jing, WANG Tao, WANG Zhen-long, GUO Li, LIU Hui-chen

(Clinical Pharmacology Department, Aerospace Clinical Medical College of

Peking University, Beijing 100049, China)

Abstract: A LC-MS/MS method for determination of clindamycin in human plasma was developed. After protein precipitation with acetonitrile, the analyte and internal standard (I. S.), diphenhydramine, were separated on a Shim-pack VP-ODS analytical column using the mobile phase of V(methanol) : V(10 mmol · L⁻¹ ammonium acetate (containing 0.25% formic acid)) = 55 : 45 at a flow rate of 0.4 mL · min⁻¹. Detection was carried out by electrospray positive ionization mass spectrometry in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. The MRM transitions of m/z 425.2 → 126.3 and m/z 256.2 → 167.3 were used to quantify clindamycin and I. S., respectively. Clindamycin and I. S. are eluted at 1.77 min and 1.79 min, respectively. The calibration curve is linear over the concentration range of 0.030 0-10.0 mg · L⁻¹ with the lower limit of quantitation (LLOQ) 0.030 0 mg · L⁻¹. Inter- and intra-day relative standard deviations are both less than 6%, and the relative errors

are within $\pm 6\%$. The mean extract recoveries are $(101.1 \pm 2.6)\%$. In the stability studies, clindamycin in plasma is found to be stable under various storage conditions. It is a rapid, sensitive, selective and reliable method for the determination of clindamycin in human plasma. The method is successfully applied to a pharmacokinetic study in healthy volunteers after oral administration of 300 mg clindamycin.

Key words: clindamycin; human plasma; LC-MS/MS; pharmacokinetics

克林霉素(clindamycin)化学名称为 6-(1-甲基-反-4-丙基-L-2-吡咯烷甲酰氨基)-1-硫代-7-(S)-氯-6,7,8-三脱氧-L-苏式- α -D-半乳辛吡喃糖苷,其化学结构示于图 1a,临床上常用其盐酸盐、磷酸酯等。克林霉素通过抑制细菌蛋白质的合成而发挥抗菌作用,其抗菌谱与林可霉素相同,但抗菌活性较强,对革兰氏阳性、阴性厌氧菌及革兰氏阳性需氧菌均具有明显的抗菌活性,目前被广泛应用于临床治疗^[1]。

国内外对生物样本中克林霉素的测定方法有气相色谱法(GC)^[2]、液相色谱法(HPLC-UV)^[3-4]、液相色谱-串联质谱联用法(LC-MS/MS)^[5-8]等,但这些方法都存在一定的局限性,如样本处理过程复杂(液-液萃取、固相萃取)^[2-4,7-8]、成本较高(固相萃取)^[3-4]、血浆用量较大(500 μ L)^[3-4]、色谱条件复杂(梯度洗脱)^[5]、检测时间较长^[3-5]、未对基质效应进行研究^[6-8]等。为了研究克林霉素磷酸酯片的人体药代动力学,本实验拟建立高效、灵敏、准确、专属性强的 LC-MS/MS 方法以测定人血浆中克林霉素浓度。

1 仪器与试剂

API3200 型三重四极杆串联质谱仪:美国 Applied Biosystems 公司产品,配有电喷雾离子化源(ESI)以及 Analyst 1.4.2 数据处理软件;Prominence 20A 液相色谱仪:日本 Shimadzu 公司产品,包括 LC-20AD 型二元泵,DGU-20A3 型脱气机,SIL-20A 型自动进样器,CTO-20A 型柱温箱,CBM-20A 系统控制器。

克林霉素对照品(批号:130422-200705,纯度以克林霉素计为 86.0%):购自中国药品生物制品检定所;盐酸苯海拉明对照品(批号:0066-9705,纯度 $>98\%$):购自中国药品生物制品检定所;甲醇(批号:083433,色谱纯):美国 Fisher 公司产品;乙腈(批号:083904,色谱纯):美国 Fisher 公司产品;甲酸(批号:14111,色谱纯):美国

Dikma 公司产品;其他试剂均为分析纯;空白人血浆:由北京大学航天临床医学院提供。

2 溶液的配制

对照品储备液的配制:精密称取 5.81 mg 克林霉素对照品(相当于 5.00 mg 克林霉素),置于 5 mL 容量瓶中,加入 $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=3:2$ 的溶液溶解,并稀释至刻度,配制浓度为 $1.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的克林霉素储备液。

标准曲线样本的配制:分别取适量克林霉素储备液,用空白血浆稀释成浓度分别为 0.030 0、0.100、0.300、1.00、3.00、10.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准曲线样本。

质控样本的配制:分别取适量克林霉素储备液,用空白血浆稀释成浓度分别为 0.080 0、0.800、8.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的质控样本。

质控溶液的配制:分别取适量克林霉素储备液,用乙腈稀释成浓度分别为 0.080 0、0.800、8.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的质控溶液。

内标溶液的配制:精确称取 5.83 mg 盐酸苯海拉明,置于 50 mL 容量瓶中,加乙腈溶解,并稀释至刻度,配制浓度为 $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯海拉明储备液,取适量苯海拉明储备液,用乙腈稀释成浓度为 $0.400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。

3 血浆样本处理

精密取 50 μ L 血浆样本置于 1.5 mL EP 管中,加入 50 μ L 内标溶液、550 μ L 乙腈沉淀剂、250 μ L 去离子水,涡流 1 min,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取 1 μ L 上清液,进行 LC-MS/MS 分析。

4 色谱条件及质谱条件

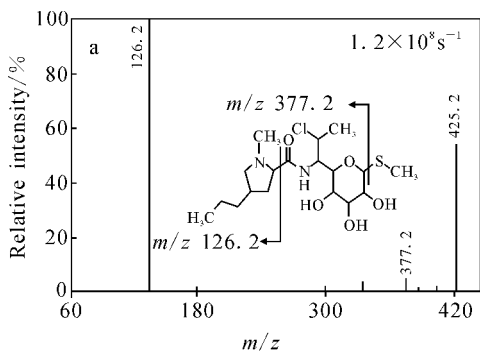
4.1 色谱条件

预柱:Phenomenex C_{18} 保护柱(4 mm $\times$ 3.0 mm $\times$ 5 μ m,美国菲罗门公司产品);分析柱:Shim-pack VP-ODS 柱(150 mm $\times$ 2.0 mm $\times$

5 μm , 日本岛津公司产品); 流动相: V (甲醇): V (10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵(含 0.25% 甲酸)) = 55 : 45; 洗脱方式为等度洗脱; 流速 0.40 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 1 μL 。

4.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(ESI), 正离子方式监测; 离子喷射电压: 1 900 V; 温度: 450 $^{\circ}\text{C}$; 源内气体 1(GS1, N_2) 压力: 276 kPa; 气体 2(GS2, N_2) 压力: 276 kPa; 气帘气体(N_2) 压力: 138 kPa; 碰撞气(CAD, N_2) 压力: 21 kPa; 扫描方式为多重反应监测(MRM); 用于定量分析的离子反应分别为 m/z 425. 2 $\rightarrow$ 126. 3(克林霉素)和 m/z 256. 2 $\rightarrow$ 167. 3(苯海拉明); 解簇电压(DP) 分别为 60 V 和 15 V; 碰撞能量(CE) 分别为 38 eV 和 20 eV; Q1 和 Q3 分辨率均为 UNIT。



5 分析方法确证

5.1 质谱分析

将克林霉素、苯海拉明储备液用乙腈稀释成浓度均为 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, 采用蠕动泵以 10 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的恒定速度泵入 MS/MS 系统, 进行碎片离子分析, 相应的二级全扫描质谱图示于图 1。

5.2 特异性

分别取 6 名健康志愿者的空白血浆(加入乙腈代替内标溶液)、标准曲线样本(加入内标溶液)和 1 名健康志愿者口服 300 mg 克林霉素 2 h 后的血浆样本(加入内标溶液), 按 3、4 项进行操作, 其色谱图示于图 2。克林霉素和苯海拉明的保留时间分别为 1.77 min 和 1.79 min, 血浆中内源性物质在克林霉素和内标出峰处均无杂峰。

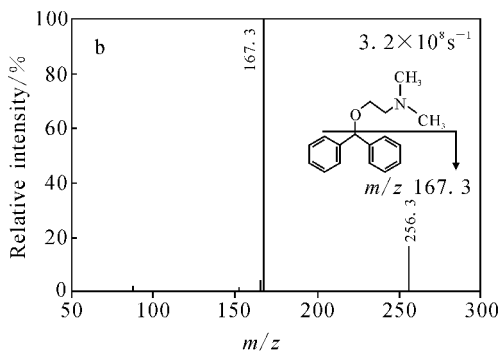


图 1 克林霉素(a)和苯海拉明(b) $[M+H]^+$ 的二级全扫描质谱图

Fig. 1 Full-scan product ion spectra of $[M+H]^+$ for clindamycin(a) and diphenhydramine(b)

5.3 基质效应

分别取适量克林霉素储备液, 用 6 名健康志愿者的空白血浆稀释成质控样本(每一浓度均有 6 个不同来源空白血浆的质控样本各 1 份)。取上述 50 μL 质控样本, 按 3、4 项进行操作。另分别取 50 μL 质控溶液, 按 3、4 项进行操作, 每一浓度进行 6 样本分析。以每一浓度 2 种处理方法的峰面积比值, 计算血浆中内源性物质对克林霉素和苯海拉明的基质效应^[9]。测定血浆中低、中、高 3 个浓度的克林霉素时, 基质效应分别为 (112.2 $\pm$ 3.8) %、(115.5 $\pm$ 0.9) %、(114.0 $\pm$ 1.0) %, 平均基质效应为 (114.0 $\pm$ 2.6) %; 测定血浆中内标苯海拉明时, 基质效应为 (101.9 $\pm$ 1.1) %。

5.4 标准曲线和定量下限

分别取 50 μL 标准曲线样本, 按 3、4 项进行操作。以血浆中待测物浓度为横坐标 x ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标 y , 用加权 ($W=1/x^2$) 最小二乘法进行回归运算, 求得直线回归方程为 $y=0.706\ 3x-0.001\ 4$, $r=0.999\ 8$, 示于图 3。本方法测定人血浆中克林霉素的线性范围为 0.030 0~10.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

取 50 μL 浓度为 0.030 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准曲线样本, 按 3、4 项进行操作, 取 6 样本分析, 连续测定 3 天。根据当日的标准曲线, 计算每一样本的浓度。准确度与精密度结果列于表 1, 本方法测定人血浆中克林霉素的定量下限为 0.030 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

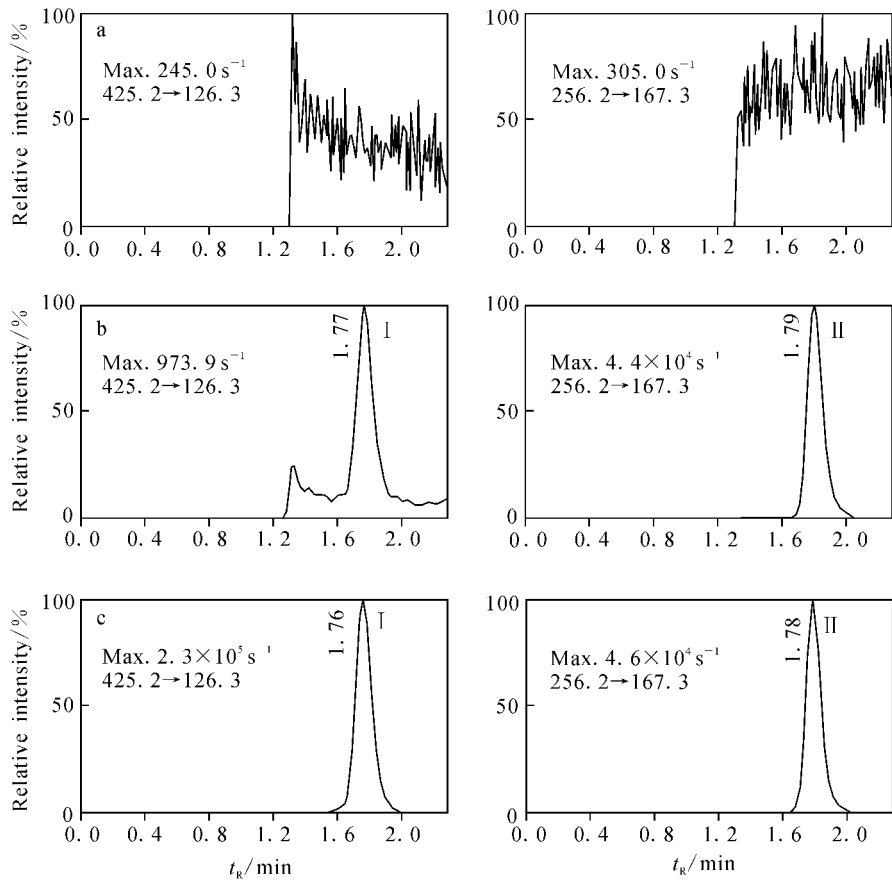


图 2 克林霉素(Ⅰ)和苯海拉明(Ⅱ)的典型色谱图

a. 空白血浆;b. 0.030 0 mg · L⁻¹克林霉素标准曲线样本;c. 志愿者口服 300 mg 克林霉素 2 h 后的血浆样本

Fig. 2 Chromatograms of clindamycin (Ⅰ) and diphenhydramine (I. S.) (Ⅱ)

a. blank plasma; b. standard curve sample (0.030 0 mg · L⁻¹) added I. S. ;
c. plasma sample from a healthy volunteer 2 h after oral administration of 300 mg clindamycin

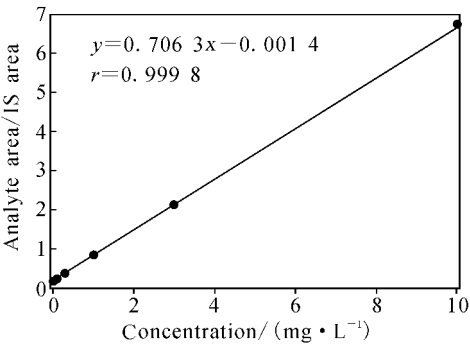


图 3 LC-MS/MS 法测定人血浆中克林霉素的典型工作曲线

Fig. 3 A typical calibration curve for determination of clindamycin in human plasma

5.5 准确度与精密度

分别取 50 μL 质控样本,按 3、4 项进行操

作,每一浓度进行 6 样本分析,连续测定 3 天。根据当日的标准曲线,计算质控样本的测定浓度。准确度与精密度结果列于表 1,相对偏差(RE)均在±6%的范围以内,日内、日间相对标准差(RSD)均小于 6%。

5.6 提取回收率

分别取 50 μL 质控样本,按 3、4 项进行操作,每一浓度进行 6 样本分析。另取 50 μL 空白血浆,除不加内标溶液,且加入的乙腈沉淀剂体积改为 500 μL 外,按 3 项进行操作,离心后上清全部转移至另一 1.5 mL 干净的 EP 管中,分别加入 50 μL 相应浓度的质控溶液(0.080 0、0.800、8.00 mg · L⁻¹克林霉素的乙腈溶液)和 50 μL 内标溶液,每一浓度进行 6 样本分析,按 4 项进行操作。以每一浓度 2 种处理方法的峰面积比值,计算血浆中克林霉素和苯海拉明的提取

回收率。血浆中低、中、高 3 个浓度克林霉素的提取回收率分别为 $(100.6 \pm 3.6)\%$ 、 $(100.7 \pm 1.2)\%$ 、 $(102.0 \pm 2.8)\%$ ，平均提取回收率为 $(101.1 \pm 2.6)\%$ ，血浆中苯海拉明的提取回收率为 $(103.9 \pm 0.9)\%$ 。

5.7 稳定性

分别取 50 μL 质控样本，按 3、4 项进行操作，每一浓度进行 3 样本分析，考察血浆样本在

−80 $^{\circ}\text{C}$ 冰冻放置 28 d、室温放置 6 h、经 3 次冻融、以及血浆样本经处理后于自动进样器中室温放置 8 h 后克林霉素的稳定性，结果列于表 2。测定浓度与理论浓度的 RE 均在 $\pm 8\%$ 以内，表明在血浆样本长期冰冻放置、室温放置、反复冻融过程中，以及处理后分析测定过程中，克林霉素均较为稳定，各种贮存条件不影响对样本浓度进行准确测定。

表 1 人血浆中克林霉素 LC-MS/MS 测定方法的准确度与精密度 ($n=18$)

Table 1 Results of precision and accuracy for the determination of clindamycin in human plasma ($n=18$)

理论浓度/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	测定浓度/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	RE/%	日内 RSD/%	日间 RSD/%
0.030 0	$0.030\ 1 \pm 0.000\ 5$	0.24	1.65	0.55
0.080 0	$0.076\ 0 \pm 0.002\ 5$	−5.00	2.91	5.66
0.800	0.792 ± 0.017	−1.00	1.10	5.36
8.00	7.55 ± 0.18	−5.61	1.50	5.44

表 2 各种贮存条件下血浆中克林霉素稳定性试验 ($n=3$)

Table 2 Results of stability studies of clindamycin in plasma under various storage conditions ($n=3$)

贮存条件	理论浓度/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	测定浓度/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	RE/%
血浆样本于−80 $^{\circ}\text{C}$ 冰冻放置 28 d	0.080 0	$0.073\ 9 \pm 0.003\ 7$	−7.63
	0.800	0.744 ± 0.027	−6.95
	8.00	7.48 ± 0.19	−6.45
血浆样本于室温放置 6 h	0.080 0	$0.081\ 6 \pm 0.001\ 5$	2.00
	0.800	0.827 ± 0.023	3.36
	8.00	7.83 ± 0.06	−2.13
血浆样本于−80 $^{\circ}\text{C}$ 冰冻、 室温熔融 3 次	0.080 0	$0.075\ 3 \pm 0.002\ 4$	−5.87
	0.800	0.815 ± 0.006	1.86
	8.00	7.58 ± 0.14	−5.19
血浆样本经处理后于自动 进样器中室温放置 8 h	0.080 0	$0.077\ 6 \pm 0.000\ 7$	−3.00
	0.800	0.800 ± 0.011	0.02
	8.00	7.49 ± 0.08	−6.31

6 方法应用

应用本方法测定 20 名中国成年健康志愿者单剂量口服 300 mg 克林霉素后不同时间血浆中克林霉素的浓度，并计算药代动力学参数。平均血药浓度-时间曲线示于图 4。药代动力学参数结果如下： C_{max} 为 $(3.01 \pm 0.76)\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ， t_{max} 为 $(1.89 \pm 0.92)\text{h}$ ， $t_{1/2}$ 为 $(1.86 \pm 0.30)\text{h}$ ， AUC_{0-7} 为 $(11.7 \pm 3.8)\text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ ， $\text{AUC}_{0-\infty}$ 为 $(11.9 \pm 4.1)\text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

7 结论与讨论

LC-MS/MS 法具有选择性好、灵敏度高、高

通量等优点，目前已被广泛应用于检测生物样本中的药物，以及药代动力学等研究^[10-11]，而基质效应则是 LC-MS/MS 法测定生物样本中药物浓度时十分重要的问题^[9,12]，因此 LC-MS/MS 法完整的方法确证应包括对于方法基质效应的研究，尤其在使用电喷雾离子化源 (ESI) 时更为必要^[9,13]。Cherlet 等^[5] 为减少血浆中内源性物质对克林霉素的基质效应而采用梯度洗脱的色谱分离方法，分析测定时间长达 12 min，影响了方法的测定效率。而其他报道^[6-8] 测定血浆中克林霉素的 LC-MS/MS 方法未对基质效应进行研究。Cherlet 等^[5] 还指出：文献^[6] 所报道的 LC-MS/MS 方法使用高比例有机相进行洗脱，

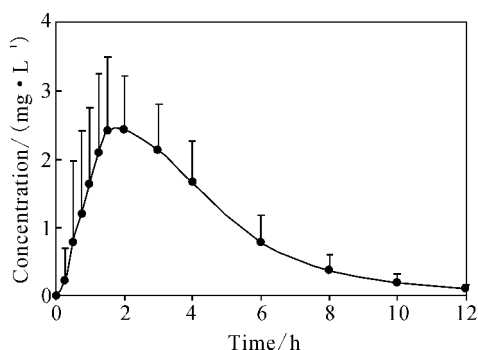


图 4 20 名健康志愿者口服 300 mg 克林霉素后的平均血药浓度-时间曲线

Fig. 4 Mean plasma concentration-time profile of amycin in 20 healthy volunteers after oral administration of 300 mg clindamycin

虽然克林霉素能较快洗脱出峰,但同时也受到快速洗脱出的基质对其离子化的影响。

本研究建立了测定人血浆中克林霉素的 LC-MS/MS 法,并进行了系统的方法确证。沉淀蛋白前处理方法简单快速,优化后的色谱条件极大缩短检测时间,同时也减少了沉淀蛋白后生物样本中基质对克林霉素的影响,每个样本分析仅需 2.3 min,每 8 h 可分析测定 150~200 个样本,实现了高通量测定。本方法灵敏度高,血浆用量仅为 50 μL ,定量下限为 0.030 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,能够满足克林霉素的人体药代动力学研究的需要。

参考文献:

[1] PHILLIPS I. Clinical uses and control of rifampicin and clindamycin[J]. J Clin Pathol, 1971, 24 (5): 410-418.

[2] GATTI G, FLAHERTY J, BUBP J, et al. Comparative study of bioavailabilities and pharmacokinetics of clindamycin in healthy volunteers and patients with AIDS[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1993, 37(5): 1 137-1 143.

[3] LIU C M, CHEN Y K, YANG T H, et al. High-performance liquid chromatographic determination of clindamycin in human plasma or serum; application to the bioequivalency study of clindamycin phosphate injections[J]. J Chromatogr B, 1997, 696(2): 298-302.

[4] FIEGER-BUSCHGES H, SCHUSSLER G, LAR-SIMONT V, et al. Determination of clindamycin

in human plasma by high-performance liquid chromatography using coupled columns[J]. J Chromatogr B, 1999, 724(2): 281-286.

[5] CHERLET M, CROUBELS S, DE BACKER P. Determination of clindamycin in animal plasma by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry [J]. J Mass Spectrom, 2002, 37(8): 848-853.

[6] YU L L, CHAO C K, LIAO W J, et al. Determination of clindamycin in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry: application to the bioequivalence study of clindamycin[J]. J Chromatogr B, 1999, 724 (2): 287-294.

[7] RECH BERGER G N, FAULER G, WINDISCH-HOFER W, et al. Quantitative analysis of clindamycin in human plasma by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry using d1-N-ethylclindamycin as internal standard [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003, 17 (2): 135-139.

[8] LI J, WANG N, ZHANG Z J, et al. Pharmacokinetics and bioequivalence study of clindamycin hydrochloride formulations after single-dose administration in healthy Chinese male volunteers [J]. Arzneimittelforschung, 2008, 58 (7): 358-362.

[9] MATUSZEWSKI B K, CONSTANZER M L, CHAVEZ-ENG C M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS[J]. Anal Chem, 2003, 75(13): 3 019-3 030.

[10] JEMAL M. High-throughput quantitative bioanalysis by LC/MS/MS[J]. Biomed Chromatogr, 2000, 14(6): 422-429.

[11] ACKERMANN B L, BERNA M J, MURPHY A T. Recent advances in use of LC/MS/MS for quantitative high-throughput bioanalytical support of drug discovery[J]. Curr Top Med Chem, 2002, 2(1): 53-66.

[12] TAYLOR P J. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry [J]. Clin Biochem, 2005, 38(4): 328-334.

[13] ANNESLEY T M. Ion suppression in mass spectrometry [J]. Clin Chem, 2003, 49 (7): 1 041-1 044.