

LC-MS/MS法测定犬血浆中阿莫西林的浓度及其药动学研究^Δ

张元元^{1*},王晨²,张斗胜²,周从亚¹,杨丽¹,赵荣生¹,翟所迪¹,张现化^{1#}(1.北京大学第三医院药剂科,北京100191;2.中国食品药品检定研究院,北京102629)

中图分类号 R969.1;R978.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)23-3193-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.23.06

摘要 目的:建立测定犬血浆中阿莫西林浓度的方法,研究其药动学特征。方法:取12只比格犬,灌胃阿莫西林胶囊250 mg,分别于给药前和给药后0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、8、10 h取血1.0~1.5 mL,以阿莫西林-d₁为内标,血浆样品经酸性乙腈沉淀后,采用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)测定其中阿莫西林的浓度。色谱条件为色谱柱 Waters Atlantis dC₁₈,流动相乙腈(含0.1%甲酸)-10 mmol/L 甲酸铵水溶液(pH 4.5),采用梯度洗脱的方式,流速0.3 mL/min,柱温30 ℃,进样量1 μL;质谱条件为电喷雾离子源,正离子模式,扫描方式为多反应监测,离子源喷雾电压5.5 kV,离子源温度450 ℃,雾化气压力30 psi,加热气压力40 psi,阿莫西林离子对 m/z 366.2→113.9,内标离子对 m/z 370.2→353.0,二者碎裂电压分别为26、16 V,驻留时间均为200 ms。结果:阿莫西林检测质量浓度在0.1~16 μg/mL范围内线性关系良好($r=0.998 2$),日内、日间精密度的RSD分别小于14.3%、11.8% ($n=5$),准确度为93.0%~112.0% ($n=3$);提取回收率为58.9%~63.3% (RSD=3.3%, $n=3$),基质效应为2.8% ($n=6$),稳定性试验的RSD均小于15% ($n=3$)。阿莫西林在犬体内的药动学符合一室模型, $t_{1/2}$ 为1.56 h,10 h内的药-时曲线下面积(AUC_{0-10 h})为24 300 ng·h/mL, c_{max} 为7 523 ng/mL。结论:该方法灵敏、准确、简便、快速,可用于犬血浆中阿莫西林的浓度测定及药动学的研究。
关键词 阿莫西林;液相色谱-串联质谱法;比格犬;血药浓度

Determination of Amoxicillin Concentration in Dog Plasma by LC-MS/MS and Its Pharmacokinetic Study
ZHANG Yuanyuan¹, WANG Chen², ZHANG Dousheng², ZHOU Congya¹, YANG Li¹, ZHAO Rongsheng¹, ZHAI Suodi¹, ZHANG Xianhua¹ (1. Dept. of Pharmacy, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China; 2. National Institute for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

围,还可作为盐酸西替利嗪、盐酸异丙嗪、特非那定和马来酸非尼拉敏对映体分离的新方法,并在立体选择性代谢研究、手性药物质量控制等方面具有一定的参考价值。

参考文献

- [1] 冯小倩,武霞,谭颖徽.组胺及组胺受体的研究进展[J].中华肺部疾病杂志,2015,8(2):234-236.
- [2] COREY EJ, HELAL CJ. Catalytic enantioselective synthesis of the second generation histamine antagonist cetirizine hydrochloride[J]. *Tetrahedron Lett*, 1996, 37 (28): 4837-4840.
- [3] RUSTICHEL C, GAMBERINI MC, FERUILI, et al. Enantioselective analyses of antihistaminic drugs by high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr*, 2004, 60(1/2):99-103.
- [4] 刘桂兰.毛细管电泳法对几种手性抗组胺药物的分析应用[D]. 郑州:郑州大学,2009.

- [5] 朱丹,刘健艺,左丽华,等.高效毛细管电泳法分离4种碱性药物对映体[J].西北药学杂志,2011,26(5):340-342.
- [6] 程燕,贾欣欣,刘健艺,等.以CM-β-CD为HPLC手性流动相添加剂分离扑尔敏等6种手性药物对映体[J].沈阳药科大学学报,2012,29(2):121-125.
- [7] VAN EA, DETAEVERNIER MR, CROMMEN J, et al. Influence of methanol on the enantiore solution of antihistamines with carboxymethyl-beta-cyclodextrin in capillary electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2004, 25 (16): 2838-2847.
- [8] 沈静茹,韦慧慰,余学红,等.β-环糊精硝基衍生物HPLC柱分离手性药物扑尔敏[J].中南民族大学学报(自然科学版),2011,30(4):32-35.
- [9] 赵允凤,宋佳新,孙嘉仪,等.纤维素键合手性固定相拆分6种萘满酮衍生物对映体[J].色谱,2014,32(8):832-836.
- [10] 王琰,陈文静,周颖,等.纤维素衍生物手性固定相拆分肾上腺素、盐酸去氧肾上腺素[J].药物分析杂志,2012,32(11):1985-1990.
- [11] 罗英豪.超临界流体色谱法拆分萘普生对映体[J].中国药房,2015,26(34):4789-4791.

Δ 基金项目:国家科技重大专项课题(No.2017ZX09101001-007-001,2017ZX09304012008)

* 药师。研究方向:体内药物分析。电话:010-82266701。E-mail:13641129615@163.com

通信作者:副主任技师,硕士。研究方向:体内药物分析。电话:010-82266673。E-mail:zhangxianhua432@163.com

(收稿日期:2018-08-14 修回日期:2018-10-10)
(编辑:唐晓莲)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop the method for the determination of amoxicillin concentration in dog plasma, and to study its pharmacokinetic characteristics. METHODS: Totally 12 Beagle dogs were collected and given Amoxicillin capsules 250 mg intragastrically. The 1.0-1.5 mL plasma samples were collected before medication, and 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 8, 10 h after medication. Using amoxicillin-d₄ as internal standard (IS), after precipitated with acidic acetonitrile, the plasma concentration of amoxicillin was determined by LC-MS/MS. The separation was performed on an Atlantis dC₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile (containing 0.1% formic acid)-10 mmol/L ammonium formate water solution (pH 4.5, gradient elution) at the flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was 30 °C, and sample size was 1 μL. Mass spectrum condition included ESI, positive ion mode, multiple reaction monitoring, ion source spray voltage 5.5 kV, ion source temperature 450 °C, atomizing gas pressure 30 psi, heater pressure 40 psi, ion pair *m/z* 366.2→113.9 and *m/z* 370.2→353.0 for amoxicillin and IS, fragmentation voltage 26 and 16 V, residence time 200 ms. RESULTS: The linear range of amoxicillin was 0.1-16 μg/mL (*r*=0.998 2). RSDs of intra-day and inter-day were lower than 14.3% and 11.8% (*n*=5). The accuracy was 93.0%-112.0% (*n*=3). The extraction recoveries were 58.9%-63.3% (RSD=3.3%, *n*=3), and matrix effect was 2.8% (*n*=6). RSDs of stability test was lower than 15% (*n*=3). By single compartment model, the pharmacokinetic parameters of amoxicillin included that *t*_{1/2} was 1.56 h, AUC_{1-10 h} was 24 300 ng·h/mL and *c*_{max} was 7 523 ng/mL. CONCLUSIONS: The method is sensitive, accurate, simple and rapid. It is applied for the determination of amoxicillin concentration in the plasma of dog and the pharmacokinetic study of amoxicillin.

KEYWORDS Amoxicillin; LC-MS/MS; Beagle dog; Plasma concentration

阿莫西林(Amoxicillin)是一种半合成广谱β-内酰胺类抗菌药物。在化学结构上,由于羟基和氨基的引入,阿莫西林具有很好的耐酸性,比一般青霉素更适合口服且抗菌谱更广,应用广泛,但在临床上可引起有多种不良反应^[1-4]。青霉素类制剂普遍存在副反应,其中以阿莫西林的报道最多,因此必须严格控制其用量。由于阿莫西林分子中含有的β-内酰胺结构,在水、强酸、强碱及青霉素酶等的作用下容易水解破裂,进而失去活性,甚至聚合产生致敏性杂质,导致人体产生严重的过敏反应。因此,在开展仿制药一致性评价之前,需对仿制药的药动学、药效学及毒理学性质进行全面的评估。本研究参考已报道的阿莫西林血药浓度的液质联用检测方法^[5-10],并加以改进,建立了一种更加稳定、样本需要量更少的液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS),并考察将其用以研究阿莫西林在比格犬体内的药动学特征,以期为阿莫西林的质量监控提供一种新的检测方法。

1 材料

1.1 仪器

液质联用仪,包括 Shimadzu 20AD 液相色谱仪(日本岛津公司);Sciex 5500 QTrap 质谱仪(美国 Sciex 公司);MS3 digital 涡旋混合器(德国 IKA 公司);BT25S 电子天平(德国 Sartorius 公司);3-18K 离心机(美国 Sigma 公司);Cascada-I 纯水机(美国 Pall 公司)。

1.2 药品与试剂

阿莫西林对照品(中国食品药品检定研究院,批号:30409-201011,纯度:85.8%);阿莫西林-d₄标准品(内标,美国 TRC 公司,批号:7-YHH-23-1,纯度:96.0%);阿莫西林胶囊(中国某药企提供,批号:01,规格:每粒 250 mg);乙腈、甲酸、醋酸铵以及甲酸铵均为色谱纯。

1.3 动物

比格犬,普通级,♀♂各6只,8~12月龄,体质量为

7.78~9.48 kg,来源于北京日新科技有限公司,实验动物生产许可证号为 SCXK(京)2016-0004。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 溶剂 0.01 mol/L 醋酸铵缓冲液(pH 4.5)-甲醇(1:1, V/V)溶液。

2.1.2 对照品溶液 精密称取阿莫西林对照品适量,用溶剂配制成质量浓度为 1.0 mg/mL 的对照品贮备液,再用溶剂稀释制成所需质量浓度的对照品溶液,-20 °C 下保存备用。

2.1.3 内标溶液 取阿莫西林-d₄标准品,直接用溶剂溶解配制成质量浓度为 526.6 μg/mL 的内标贮备液,再用溶剂稀释成质量浓度为 52.66 μg/mL 的内标溶液,-20 °C 下保存备用。

2.2 样品前处理

精密吸取 100 μL 血浆,置于 1.5 mL 离心管中,加入内标溶液 5 μL,涡旋混合后加入 400 μL 乙腈(含 0.3% 甲酸),涡旋 1 min,4 °C 条件下 15 000 r/min 离心 5 min,取上清液进样。

2.3 色谱条件与质谱条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Atlantis dC₁₈(150 mm×2.1 mm, 5.0 μm);流动相 A 为乙腈溶液(含 0.1% 甲酸),流动相 B 为 10 mmol/L 甲酸铵水溶液(pH 4.5),梯度洗脱(0~1.3 min, 99% B; 1.3~3 min, 99% B→8% B; 3~4 min, 8% B; 4~4.1 min, 8% B→99% B; 4.1~7 min, 99% B);流速为 0.3 mL/min;柱温为 30 °C;进样量为 1 μL。

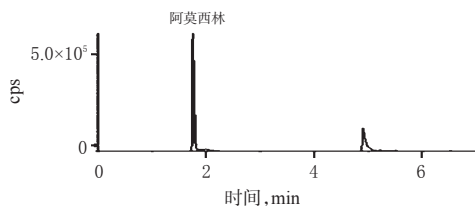
2.3.2 质谱条件 离子源:电喷雾离子源(ESI),以正离子模式、多反应监测(MRM)扫描方式进行定量。离子源电压为 5.5 kV,离子源温度为 450 °C,雾化气压力为 30 psi,加热气压力为 40 psi。阿莫西林离子对为 *m/z* 366.2→113.9,碎裂电压为 26 V;内标离子对为 *m/z*

370.2→353.0, 碎裂电压为 16 V, 驻留时间均为 200 ms。

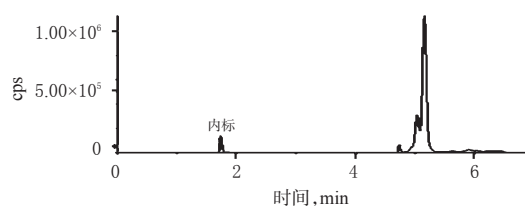
2.4 专属性

取 6 只比格犬, 分别取空白血浆各 100 μL 作为双空白血浆样品; 另取空白血浆 95 μL , 分别加入溶剂 5 μL 作为单空白血浆样品; 再取空白血浆 95 μL , 加入阿莫西林对照品, 制成 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的含药血浆样品; 以给药后 1 h 的血浆样品作为待测样品, 除双空白血浆样品不加入内

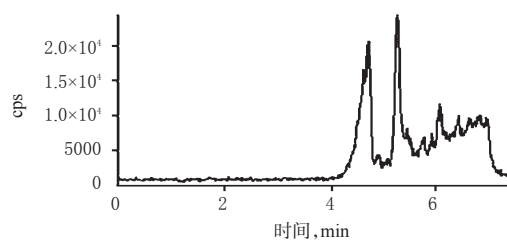
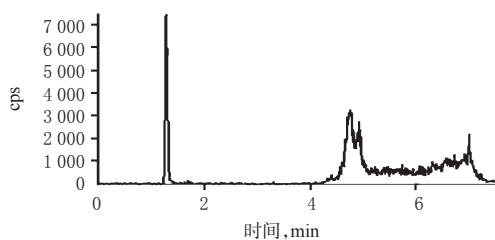
阿莫西林:



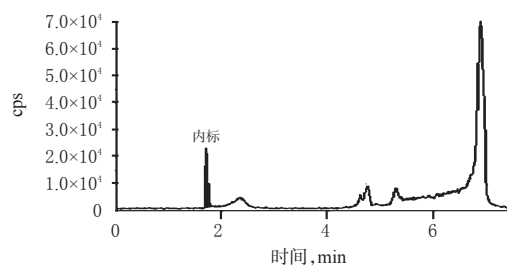
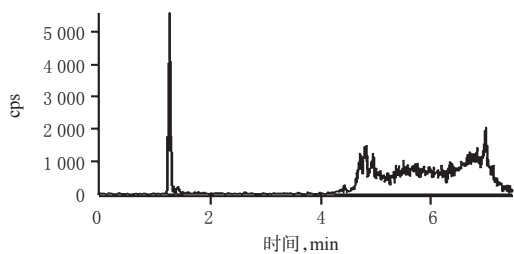
内标:



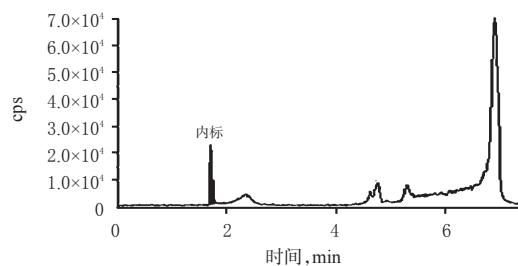
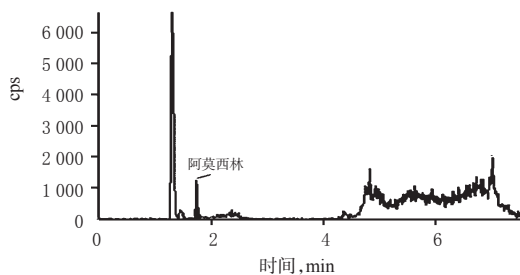
A. 阿莫西林+内标溶液



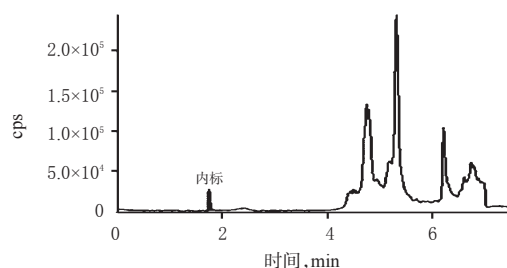
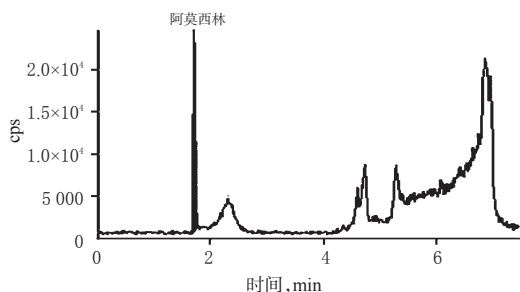
B. 双空白血浆样品



C. 单空白血浆样品



D. 含药血浆样品



E. 给药 1 h 后血浆样品

图 1 阿莫西林与内标的 MRM 色谱图

Fig 1 MRM chromatograms of amoxicillin and internal standard

2.5 线性关系与定量下限

取空白血浆 95 μL , 加入相应浓度的对照品溶液, 制备成质量浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准曲线样品溶液, 按“2.2”项下方法处理后, 进样测定, 记录峰面积。以阿莫西林与内标峰面积之比为纵坐标(y)、阿莫西林的质量浓度为横坐标(x)进行回归分析, 权重为 $1/x^2$ 。得回归方程为 $y=0.00035x-0.000375$ ($r=0.9982$), 阿莫西林的检测质量浓度线性范围为 0.1~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 定量下限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.6 精密度与准确度

取空白血浆 95 μL , 加入相应质量浓度的对照品溶液, 制成质量浓度分别为 0.1、0.3、2.5、8.0、12.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的质控样品, 每个浓度平行配制 5 份, 按“2.2”项下方法处理后, 进样测定, 记录峰面积, 考察批内精密度, 并以测得值/真实值 $\times 100\%$ 计算批内准确度。同法在 3 d 内配制并测定 3 批次样品, 考察批间精密度和批间准确度。精密度与准确度结果见表 1。

表 1 精密度与准确度结果 ($n=5$)

Tab 1 Results of precision and accuracy ($n=5$)

质量浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$	批内		批间	
	RSD, %	准确度, %	RSD, %	准确度, %
0.1	14.3	112.0	1.8	110.0
0.3	4.6	93.7	5.2	95.3
2.5	5.7	105.3	5.8	104.4
8.0	4.5	104.5	4.2	99.6
12.0	1.9	93.0	3.8	94.4

2.7 提取回收率

取空白血浆 95 μL , 加入阿莫西林对照品溶液制成质量浓度分别为 0.3、2.5、8.0、12.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的质控样品, 加入 400 μL 乙腈 (含 0.3% 甲酸) 后, 涡旋 1 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 15 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 加入溶剂 5 μL 和内标溶液 5 μL , 涡旋混匀后吸取上清液进样测定, 计算阿莫西林与内标峰面积的比值 $A_{\text{QC}}/A_{\text{IS}}$; 另取空白血浆 95 μL , 加入溶剂 5 μL , 涡旋混匀后加入 400 μL 乙腈 (含 0.3% 甲酸), 涡旋 1 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 15 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 加入相应质量浓度的阿莫西林对照品溶液和内标溶液制成同上浓度的样品, 涡旋混匀后吸取上清液进样分析, 计算阿莫西林与内标峰面积的比值 $A'_{\text{QC}}/A'_{\text{IS}}$ 。以 $(A_{\text{QC}}/A_{\text{IS}})/(A'_{\text{QC}}/A'_{\text{IS}})\times 100\%$ 计算提取回收率, 每个浓度平行做 3 份。结果显示, 0.3、2.5、8.0、12.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的质控样品的提取回收率分别为 63.3%、60.8%、59.3%、58.9%, 平均提取回收率为 60.6%, RSD 为 3.3% ($n=4$)。说明不同质控水平提取回收率变异均较小。

2.8 基质效应

分别取 6 只比格犬的空白血浆, 各 95 μL , 加入溶剂 5 μL , 按“2.7”项下方法提取后, 再加入 0.3、12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度的对照品溶液 5 μL 和内标溶液 5 μL , 涡旋混匀后进样测定, 计算阿莫西林与内标峰面积的比值 $A_{\text{QC}}/A_{\text{IS}}$; 以

纯化水取代血浆, 制备同上浓度的含阿莫西林和内标的纯溶液, 进样测定, 计算阿莫西林与内标峰面积的比值 $A'_{\text{QC}}/A'_{\text{IS}}$, 计算内标归一化基质效应因子 (ISMF) = $(A_{\text{QC}}/A_{\text{IS}})/(A'_{\text{QC}}/A'_{\text{IS}})$, 并计算其 RSD。结果显示, 在低、高浓度下, 不同来源血浆中阿莫西林 ISMF 的 RSD 均为 2.8% ($n=6$), 符合 2015 年版《中国药典》的要求。

2.9 稀释效应

配制 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的血浆样本, 用空白血浆稀释 10 倍后, 按“2.2”项下方法处理后, 进样测定, 平行测定 5 份, 考察精密度和准确度。结果显示, 峰面积的 RSD 为 2.8% ($n=5$), 准确度为 107.4%, 表明血浆样品经 10 倍稀释后, 不影响其测定结果的准确性。

2.10 稳定性

2.10.1 标准溶液的稳定性 分别将阿莫西林贮备液 (2 mg/mL) 储存于玻璃容器和塑料容器中, 依次在室温、4 $^{\circ}\text{C}$ 、-20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存 48 h、7 d、10 d、14 d, 与新鲜配制的贮备液同时进样分析, 平行测定 3 次, 考察标准溶液的稳定性。结果表明, 阿莫西林室温下稳定性最差, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存稳定性最好; 用塑料容器储存降解速度低于玻璃容器。因此, 本研究中标准溶液用塑料容器保存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下。样品置于不同容器中的稳定性试验结果见图 2。

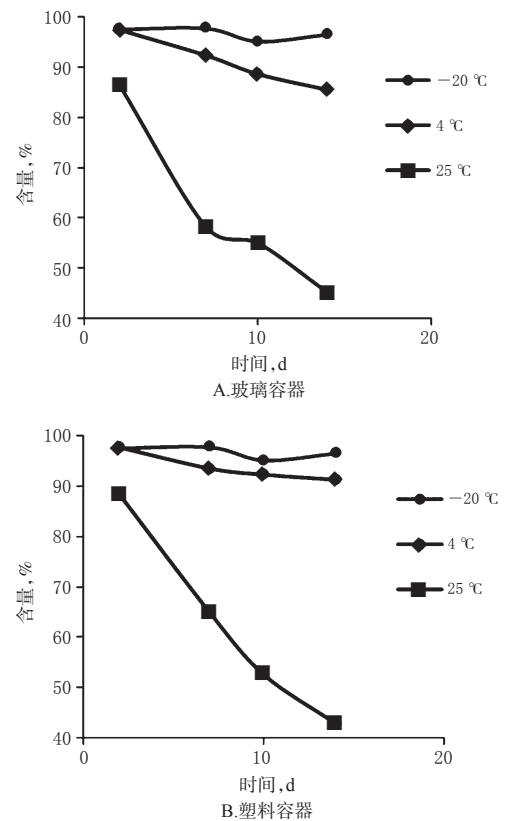


图 2 样品置于不同容器中的稳定性试验结果

Fig 2 Results of stability tests of samples in different containers

2.10.2 含药血浆稳定性 分别考察质量浓度分别为

0.3、12.0 $\mu\text{g/mL}$ 的含药血浆在室温下放置 25 h、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 3 次、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下放置 58 d 以及处理后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下放置 120 h 的稳定性, 平行测定 3 次, 考察准确度和 RSD, 结果见表 2。

表 2 血浆样品的稳定性试验结果 ($n=3$)

Tab 2 Results of stability tests of plasma sample ($n=3$)

存放条件	质量浓度, $\mu\text{g/mL}$	准确度, %	RSD, %
室温 25 h	0.3	92.7	7.2
	12.0	85.3	3.0
$-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 3 次	0.3	98.7	1.0
	12.0	95.3	7.0
$-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 58 d	0.3	87.3	4.2
	12.0	86.9	3.9
$4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 120 h	0.3	101.0	2.3
	12.0	96.9	4.2

2.11 药动学实验

取 12 只比格犬, ♀ ♂ 各半, 单剂量灌胃阿莫西林胶囊 250 mg, 分别于给药前 (0 h) 和给药后 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、8、10 h 取前肢静脉血 1.0~1.5 mL, 分别置于有抗凝剂的离心管中, 混匀后 3 500 r/min 离心 10 min, 取上层血浆, 加入到 1.5 mL 塑料离心管中, 保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下待测。按本文建立的方法测定血浆样品中阿莫西林的浓度, 根据其变化发现阿莫西林在比格犬体内的转运和清除符合一室模型。计算阿莫西林在比格犬体内的药动学参数 $t_{1/2}$ 为 1.56 h, 药-时曲线下面积 ($\text{AUC}_{0-10\text{ h}}$) 为 24 300 $\text{ng}\cdot\text{h/mL}$, c_{max} 为 7 523 ng/mL , 表观分布容积为 0.023 L, 清除率为 0.010 L/h, t_{max} 为 1.5 h。犬体内阿莫西林的药-时曲线见图 3。

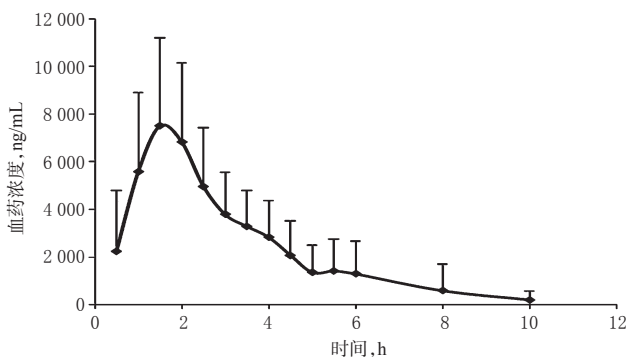


图 3 犬体内阿莫西林的药-时曲线 ($n=12$)

Fig 3 Plasma concentration-time curve of amoxicillin in dog ($n=12$)

3 讨论

由于阿莫西林本身化学极性较大且稳定性差, 采用液液萃取法进行前处理回收率非常低, 因此本研究采用酸性乙腈沉淀蛋白后直接进样, 操作简单、快速。由于蛋白沉淀后易存在基质效应影响^[6], 本研究采用同位素内标阿莫西林- d_4 , 其理化性质与阿莫西林高度相似, 可减小基质效应影响, 提高方法的耐用性和检测结果的准确性。此外, 由于阿莫西林结构中含有四元环, 稳定性较差, 因此, 本研究对阿莫西林的稳定性及保存条件进行了较为深入的考察, 最终选择塑料容器保存标准溶液 ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) 及血浆样本 ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)。在样本制备和测定过程中, 另还需要严格控制 pH, 以保证检测结果的准确性。

参考文献

- [1] 赵惠君. 阿莫西林不良反应分析[J]. 临床医学, 2016, 36(8): 114.
- [2] 高立军. 探讨阿莫西林所致不良反应及药学临床分析[J]. 中国保健营养, 2015, 25(8): 219.
- [3] 胡俊华, 孟秋媛, 胡艳秋. 阿莫西林与阿莫西林-克拉维酸钾不良反应的对比研究[J]. 中国初级卫生保健, 2018, 32(4): 74-75.
- [4] 李雪林, 胡欣, 徐巧玲. 基因多态性与药品不良反应的相关性[J]. 中国药房, 2016, 27(32): 4469-4472.
- [5] 张平. 阿莫西林分散片在健康人体内的药代动力学研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(6): 640-641.
- [6] 张海英, 赵立波, 蔡焕, 等. 2 种阿莫西林分散片人体药动学及生物等效性研究[J]. 中国药房, 2010, 21(26): 2441-2443.
- [7] 帅海涛, 帅放文, 王向峰, 等. 液相色谱-质谱联用法测定人血浆中的阿莫西林[J]. 化学分析计量, 2018, 27(1): 51-54.
- [8] 时文博, 李春青, 陈永平, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定淡水、沉积物中的阿莫西林[J]. 河北渔业, 2017. DOI: 10.3969/j.issn.1004-6755.2017.014.
- [9] 南峰, 徐楠, 陈积馥, 等. 快速灵敏的 LC-MS/MS 法测定人血浆中阿莫西林并应用于两种制剂的一致性评价[J]. 临床药理学, 2018, 23(1): 73-77.
- [10] ABDULLA A, BAHMANY S, WIJMA RA, et al. Simultaneous determination of nine β -lactam antibiotics in human plasma by an ultrafast hydrophilic-interaction chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatog B*, 2017. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.06.014.

(收稿日期: 2018-06-08 修回日期: 2018-10-18)

(编辑: 邹丽娟)

《中国药房》杂志——中文核心期刊, 欢迎投稿、订阅