

克拉霉素干混悬剂药物动力学及生物等效性研究

李 兵¹, 邹建军^{2*}, 彭向东¹, 杨 劲², 丁 黎², 张胜强², 肖大伟²

(¹中南大学湘雅附属第三医院, 长沙 410006; ²中国药科大学药物分析学教研室, 南京 210009)

【摘 要】 目的: 建立人血浆中克拉霉素的 HPLC/MS 方法, 测定其干混悬剂的药物动力学参数及相对生物利用度。方法: 血样用乙腈沉淀、离心后进入 LC-MS 分析系统, 色谱柱: Lichrospher C₁₈ 5 μ m, 25 cm \times 4.6 mm id, 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)。结果: 在 0.003~5.0 μ g/ml 范围内峰比值 (克拉霉素峰面积 A_s 和内标罗红霉素峰面积 A_i 的比值) 与浓度线性关系良好 ($r=0.99978$), 最低定量限为 3 ng/ml。绝对回收率为 85.28%~89.07%。克拉霉素干混悬剂的相对生物利用度为 (92.5 \pm 14.2)%。结论: 建立的分析方法灵敏、准确、简便。20 名健康受试者随机交叉口服克拉霉素干混悬剂和片剂后, 其体内过程符合一室模型, 统计学结果表明两种制剂生物等效。

【关键词】 克拉霉素; HPLC/MS; 药物动力学; 相对生物利用度

【中图分类号】 R969 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2003)04-0313-04

克拉霉素 (clarithromycin, Clm) 是一种大环内酯类抗生素, 抗菌谱广, 治疗临床感染疗效较好。其血药浓度主要采用微生物法^[1-6], 用 HPLC 法测定的文献也有^[7-10], 但微生物法测定结果不够精确, HPLC/UV 法难以避免血浆内源性杂质的干扰。我们建立了一种专属、灵敏、准确的 HPLC/MS 法, 估算受试制剂的药物动力学及相对生物利用度, 同时为临床用药提供参考。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 液相色谱-质谱联用仪, 含电喷雾离子化接口, 四极质谱检测器。供试制剂 A: 克拉霉素干混悬剂 (杭州中美华东制药公司, 批号: 020901, 规格: 0.125 g/袋)。参比制剂 B: 克拉霉素片剂 (上海雅培制药有限公司, 批号 021015, 规格 0.125 g/片), 试验用水为去离子水, 甲醇为色谱纯 (德国 Merck 公司), 其它试剂为 AR 试剂。克拉霉素对照品溶液: 用甲醇配制 1 mg/ml 克拉霉素的储备液, 并用甲醇依次稀释成 100, 10, 1, 0.1 μ g/ml 的标准溶液。内标溶液: 用甲醇配制成 2.5 μ g/ml 的罗红霉素溶液 (Rm)。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

Lichrospher C₁₈ 色谱柱 (5 μ m, 25 cm \times 4.6 mm id, 淮阴汉邦科技有限公司), 柱温 25 $^{\circ}$ C; 流动相: 10 mmol/L 醋酸铵缓冲液 (pH 3.5)-甲醇 (15:85); 流速: 1.0 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 V, 干燥气流速: 10 L/min; 雾化室压力: 40 psi, 干燥气温度: 350 $^{\circ}$ C。Clm: [M+H]⁺ 离子, m/z 748.5; 内标: Rm, M+H 离子, m/z 837.5。

2.2 血样预处理

精密吸取血浆样品 0.2 ml, 置 1 ml 离心管中, 加入 2.5 μ g/ml 内标溶液 50 μ l, 涡旋 10 s, 再加入乙腈 0.8 ml, 涡旋 3 min, 于 16 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液转移至自动进样器样品管中, 进行 LC-MS 分析, 进样量 30 μ l。

2.3 受试者选择

20 名健康男性受试者, 体重 62.8 \pm 6.7 kg, 年龄 20~23 岁, 经生化检验证实肝、肾功能正常, 心电图检查正常, 精神状态良好。实验前一周及实验期间未用其它任何药物, 禁烟酒, 实验期间统一饮食。

2.4 给药方案及血样采集

采用双交叉试验设计方案, 剂量均为 125 mg \times 2。服药方式: 于早 7 时空腹服药, 用 200 ml 温开水送服, 服药 4 h 后统一进食。于服药后 0, 0.5, 1.0,

1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 11.0, 15.0, 24.0 h 采血 3 ml 于肝素试管中, 分离出血浆, -4°C 保存待测。2 周后进行交叉试验。

2.5 数据分析

将所得血药浓度-时间数据经自然对数转换后, 用最小二乘法对尾段相回归计算消除速率常数 k ; c_{\max} 及 t_{\max} 均为实测值; 消除半衰期 ($t_{1/2}$)、曲线下面积 (AUC) 分别按下列各式估算: $t_{1/2} = 0.693/k$, $AUC_{0-24} = \sum (c_i + c_{i+1}) \times (t_i - t_{i-1})/2$, $AUC_{0-\infty} = \sum (c_i + c_{i+1}) \times (t_i - t_{i-1})/2 + c_n/k$, 所得参数 c_{\max} 、 AUC_{0-24} 、 $AUC_{0-\infty}$ 先进行自然对数转换, 再进行分析, 并进行双单侧检验 ($\alpha = 0.05$), t_{\max} 用 Wilcoxon 符号秩检验。

2.6 方法的专属性

按“2.1”项下操作, Clm 与 Rm 峰形良好, 血浆中杂质峰不干扰样品的测定。Clm 和 Rm 的保留时间均在 3.3~3.4 min 范围内 (图 1)。

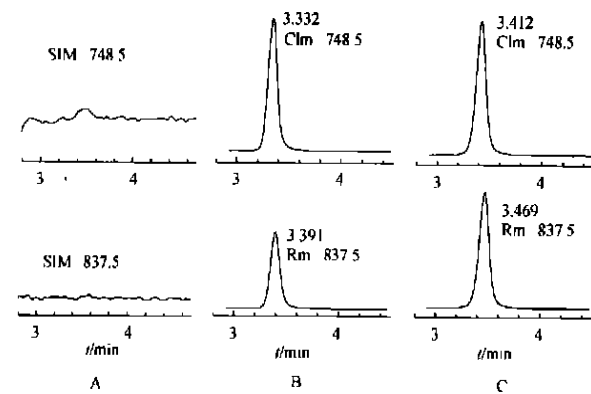


Fig 1. Typical chromatogram

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

2.7 标准曲线制备及最低定量限测定

取 1 ml 离心管数支, 分别精密加入不同量的 Clm 标准液后用氮气流吹干, 加入空白血浆 0.2 ml, 涡旋 1 min, 配成含克拉霉素分别为 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 2.5, 5 $\mu\text{g/ml}$ 的标准血浆, 按“血浆样品的处理”项下操作, 每种浓度做 5 份样品, 记录色谱图, 计算克拉霉素峰面积 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 $f = 2.4035c + 0.002294$ (权重系数 $w = 1/c^2$), $r = 0.9998$, 最低定量限 $LOQ = 3 \text{ ng/ml}$ ($S/N = 10$)。

2.8 精密度试验

取 1 ml 离心管数支, 精密加入不同量的 Clm

溶液适量, 以氮气流吹干, 精密加入 0.2 ml 空白血浆, 涡旋 1 min, 配成含 Clm 0.003, 0.03, 0.3, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 的血浆, 按“血样处理”项下操作, 在日内和日间 (5 d) 对每种浓度各做 5 份样品, 记录色谱图, 计算克拉霉素峰面积 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 0.003, 0.03, 0.3, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 4 种浓度标准血浆的日内 RSD 分别为 6.11%, 5.66%, 2.81%, 1.27%, 日间 RSD 分别为 8.11%, 6.11%, 2.91%, 1.30%。

2.9 方法回收率

精密称取 Clm 标准液适量于离心管中, 用甲醇配成 0.01, 0.1, 1, 5 $\mu\text{g/ml}$ 四个浓度的溶液, 每份 0.2 ml, 以氮气流吹干, 加水 0.2 ml, 乙腈 0.8 ml, 涡旋混匀, 吸取 0.5 ml 置 1 ml 离心管中, 加入 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 内标溶液 25 μl , 涡旋 10 s, 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 Clm 溶液适量, 以氮气流吹干, 精密加入 0.2 ml 空白血浆, 涡旋 1 min, 配成含克拉霉素 0.01, 0.1, 1, 5 $\mu\text{g/ml}$ 的血浆, 每种浓度各做 5 份样品。加入乙腈 0.8 ml, 涡旋 3 min, 于 16000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液 0.5 ml 置 1 ml 离心管中, 加入 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 内标溶液 25 μl , 涡旋 10 s, 进样分析。记录色谱图, 计算样品和内标的峰面积比值 f_x ($f_x = A_s/A_i$), 将上述 f_x 和 f_s 的比值代入下式即可求得克拉霉素的绝对回收率 ($R\%$), $R\% = f_x/f_s \times 100\%$, 结果表明: 0.01, 0.1, 1, 5 $\mu\text{g/ml}$ 4 种浓度的平均回收率 ($n = 5$) 分别为 85.28%, 86.55%, 87.53%, 89.07%; RSD 分别为 5.83%, 3.45%, 1.88%, 1.56%。

2.10 药动学研究

制剂 A 及制剂 B 给药后的血药浓度-时间曲线见图 2, 根据血药浓度-时间曲线比较及 AUC 值显示, 制剂 A 和制剂 B 在人体内的药动学过程用一房室模型拟合较好, 因此血药浓度数据采用 PKBP-N1 程序选择一房室模型进行拟合计算, 结果见表 1, 以制剂 B 为对照, 算得制剂 A 的相对生物利用度为 $(92.5 \pm 14.2)\%$ 。经双单侧检验分析两制剂的 AUC_{0-24} , $AUC_{0-\infty}$ 及 c_{\max} , 结果表明两制剂生物等效。 t_{\max} 用 Wilcoxon 符号秩检验, $S = 4.5 < S_{0.05}(20) = 52$, $P < 0.05$, 受试制剂与参比制剂有显著性差异。

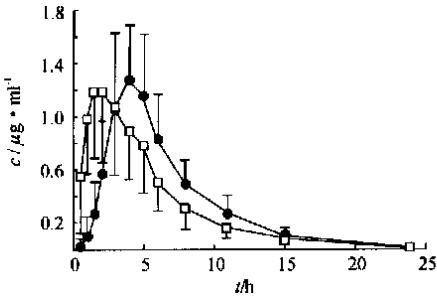


Fig 2. Mean plasma Conc. following a single dose of clarithromycin (250 mg)

—□—Test; —●—Reference

Tab 1. Pharmacokinetic parameters of the two preparations of clarithromycin following a single 250 mg oral dose ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

Preparations	c_{\max} ($\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$)	t_{\max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	AUC_{0-24} ($\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1}$)	$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1}$)
Reference	1.37 ± 0.43	3.9 ± 0.8	3.37 ± 0.33	8.26 ± 2.96	8.36 ± 3.01
Test	1.30 ± 0.49	2.0 ± 1.0	3.74 ± 0.74	7.64 ± 3.04	7.74 ± 3.06

3 讨 论

3.1 血药浓度测定方法的建立与选择

文献报道, 克拉霉素血药浓度的检测方法有 HPLC-UV 法^[7], 由于 HPLC-UV 法采用末端吸收检测, 紫外最大吸收波长约为 210 nm, 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克拉霉素浓度。故其药动力学研究多用微生物法^[1-6, 11, 12], 其测定的是克拉霉素及其代谢物所有具有抗菌活性多组分复合物。测定结果不够精确, 不太适合于药物动力学及生物等效性研究。以上两种方法均难将克拉霉素与其活性代谢物 14-羟基克拉霉素分离开。我们建立人血浆中克拉霉素的 HPLC/MS 测定方法, 因血药浓度较高, 样品不必提取、浓缩, 可直接用乙腈沉淀, 高速离心后注入 LC-MS 进行选择离子检测, 样品处理简单, 快速, 方法的专属性及选择性均较高。克拉霉素峰和内标峰形良好, 无杂峰干扰, 绝对回收率在 85% 以上, 灵敏度高, 最低定量限 (LOQ) 为 3 ng/ml (S/N=10), 最低检测限 (LOD) 为 1 ng/ml (S/N=3), 而其它方法的最低检测限 (LOD) 为 0.05~0.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^[1-7]。该法适合于克拉霉素临床药物动力学及生物等效性研究。

3.2 药代动力学参数比较

本文建立的 LC/MS 法可以用于克拉霉素及其内标罗红霉素的药代动力学研究。本文测定的克拉霉素干混悬剂药动学参数 $t_{1/2}$ 为 3.74 ± 0.74 h;

t_{\max} 为 2.0 ± 1.0 h; c_{\max} 为 1.30 ± 0.49 mg/ml; AUC 为 7.64 ± 3.04 。克拉霉素片剂药动学参数 $t_{1/2}$ 为 3.37 ± 0.33 h; t_{\max} 为 3.9 ± 0.8 h; c_{\max} 为 1.37 ± 0.43 mg/ml; AUC 为 8.26 ± 2.96 。其药代动力学参数与文献^[7-10] 报道基本一致。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; 受试制剂的达峰时间 t_{\max} 显著快于参比制剂; 这表明克拉霉素干混悬剂和片剂相比, 生物利用程度等效, 达峰提前。

参 考 文 献

[1] 宋洪杰(Song HJ), 沈意翔(Shen YX). 克拉霉素片剂的生物利用度研究[J]. 第二军医大学学报(*Acad J Second Mil Med Univ*), 1998, 19(1): 92-94

[2] 储小曼(Chu XM), 卓海通(Zhuo HT). 国产克拉霉素胶囊与颗粒剂人体药动学及生物利用度[J]. 中国临床药理学杂志(*Chin J Clin Pharmacol*), 1998, 14(2): 94-98

[3] 魏倩萍(Wei QP), 周兴华(Zhou XH), 等. 克拉霉素胶囊相对生物利用度实验研究[J]. 重庆医科大学学报(*Acta Univ Sci Med Chongqing*), 1999, 24(2): 161-163

[4] 孙忠民(Sun ZM), 孙培红(Sun PH), 等. 克拉霉素药代动力学研究[J]. 中国新药杂志(*J Chin New Drugs*), 1998, 7(3): 227-229

[5] 黄海华(Huang HH), 钟大放(Zhong DF). 克拉霉素两种制剂生物等效性研究[J]. 中国抗生素杂志(*J Chin Antibiotic*), 1998, 23(3): 209-211

[6] 程紫骅(Cheng ZH), 张 仓(Zhang C). 国产克拉霉素颗粒剂与胶囊相对生物利用度[J]. 中国药 学 杂 志(*Chin Pharm J*), 1998, 33(11): 672-674

[7] 李涣德(Li HD), 张毕奎(Zhang BK). 克拉霉素片药动学及相对生物利用度研究[J]. 中国药 学 杂 志(*Chin Pharm J*), 1998, 33(7): 418-421

[8] Periti P, Mazzei T, Mini E, et al. Clinical Pharmacokinetics properties of the macrolide antibiotics[J]. *Clin Pharmacokinet*, 1989, 16(5): 261-265

[9] Chu SY, Wilson DS, Guay DRP, et al. Clarithromycin Pharmacokinetics in the healthy young and elderly volunteers[J]. *J Clin Pharmacol*, 1992, 32(11): 1045-1049

[10] Gran VN, Chu SY, Kusmiesz HT, et al. Pharmacokinetics of Clarithromycin suspension in infants and children[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992, 36(11): 2478-2481

[11] 邓树海(Deng SH), 黄桂华(Huang GH), 张 娜(Zhang N). 克拉霉素颗粒剂和片剂的正常人体药动学和生物等效性[J]. 沈阳药科大学学报(*J Shenyang Pharm Univ*), 2000, 17(2): 93-97

[12] 乔海宁(Qiao HN), 张莉蓉(Zhang LR), 张启堂(Zhang QT). 克拉霉素分散片在健康人体内的相对生物利用度[J]. 河南医科大学学报(*J Henan Med Univ*), 2000, 35(4): 326-331

Study of Pharmacokinetics and Relative Bioavailability of Clarithromycin

LI Bing¹, ZOU Jian-Jun², PENG Xiang-Dong¹, YANG Jin², DING Li², ZHANG Sheng-Qiang²

¹3rd XiangYa Hospital of Middle-South University, Changsha 410013;

²Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

【ABSTRACT】 AIM: A HPLC-MS method was established for the determination of clarithromycin in human plasma to study the pharmacokinetic parameters in dry suspension and relative bioavailability. **METHOD:** The plasma and acetonitrile were vortexed and centrifuged, the supernate was analyzed by Lichrospher C₁₈ column with the mobile phase of methanol-acetate buffer solution (85:15). LC-ESI MS was used in the selected ion monitoring (SIM) mode with target ions at m/z 748.5 for clarithromycin and m/z 837.5 for roxithromycin. The fragmentor voltage was 120V. **RESULT:** Clarithromycin was linear in the range of 0.003~5.0 $\mu\text{g/ml}$. The limit detection concentration was 3 ng/ml and the recovery was 85.28%~89.07%. **CONCLUSION:** The assay was proved to be sensitive, accurate and convenient. The results of pharmacokinetics study after oral administration clarithromycin preparations showed that the two formulations conformed to one compartment model and they were bio-equivalent.

【KEY WORDS】 Clarithromycin; HPLC-MS; Pharmacokinetics; Relative bioavailability

新技术。

基因技术与中药现代化

人类基因组计划的实施,不仅为我们提供了数目可观的新药靶标,更重要的是催生了一批与新药研发相关的新技术,例如基因芯片技术、生物信息学技术,以及由此发展起来的药物基因组学等。基因技术以高通量、多因素、微型化、自动化和快速灵敏的特点而见长,正可以应对中药的多成分、多途径、多系统、多靶点的作用特点而进行系统深入的研究,有可能使我们从一个全新的视角阐明中医药的科学本质。基因技术在中药现代化研究中的作用:

1. 寻找药物作用的靶向基因——明确药物作用的靶点和作用机制,并为新基因的发现提供线索

有效药物作用靶点的筛选与鉴定是现代新药研发的中心内容之一,对药物靶点的研究可在基因和蛋白质两个层面进行。相对来说,目前对基因研究的平台技术远较蛋白质成熟、简便,对基因组学的研究也较蛋白质组学更深入、全面。

基因药物开发的前提是药靶的确定。人类基因组和一批重要模式生物体基因组的全序列测定,为医药工业提供了一个全新的突破方向。

借助于基因芯片技术,特别是表达谱基因芯片,可以对用药后的不同时间点采样,以用药前组织/细胞样品为对照,对用药前后相应组织/细胞中基因表达的动态变化进行比较分析,获得与药物作用相关的基因表达谱资料。因此,结合表达谱基因芯片技术,可以揭示药物作用的靶向基因,获得新的药靶。

2. 药用基因的获得——发现新的有效成分

中药有效成分的研究仍然是中药现代化领域一个前提

性的关键问题。经过长期的努力,我们已初步阐明了数百种常用中草药的主要成分和大量主药有效成分的基本药理作用。但是,整体来说,对中药有效成分的研究还很不全面。

中药是一个天然的巨型的化学分子库,它所作用的对象是具有不同结构层次的(如分子水平、细胞水平、组织/器官水平)高度复杂的有机体,其成分的多样化必然导致作用方式和途径的多样化。因此,利用基因技术筛选新的有效成分,不仅仅是为了弥补传统方法的缺陷,更重要的是在中药新药研究领域,建立全新的理念和先进的研究手段,使中药现代化真正进入一个宽广的良性发展的轨道。

3. 毒副反应基因的筛检——提示候选药物的毒副反应,在药物筛选中具有重要参考价值

4. 与药物代谢转化相关基因的研究——药物基因组学的核心内容之一

药物基因组学是研究药物对不同个体产生不同作用的遗传基础。根据个体的遗传差异对患者进行分型,进而指导治疗药物的选择/确定,是新药开发领域的重要方向。

5. 指纹图谱技术——中药

这是质量控制的首选方法,中药的质量标准还不够完备、不够先进是制约中药发展和进入国际市场的重要因素。目前,基因技术在中药分类、鉴别、资源利用等方面的应用进展最快。其中,基因指纹图谱已成为一种对中药进行分子遗传标记鉴定的首选方法,并将成为中药质量评估系统的核心内容。

(唐汉中医药网)