

西替伪麻缓释片中盐酸伪麻黄碱的人体药动学研究

金晓玲, 高守红, 邬蓉(第二军医大学长征医院药学部, 上海 200003)

[摘要] 目的 建立人血浆中伪麻黄碱浓度的 LC-MS/MS 测定方法,并用该法研究西替伪麻缓释片在健康人体内的药动学。方法 采用 LC-MS/MS 测定人血浆中不同时间点伪麻黄碱的浓度,以盐酸金刚烷胺为内标,血浆样品用乙腈沉淀蛋白,色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 3.5 μm),流动相为甲醇-0.1% 甲酸水溶液(40: 60),流速 0.3 ml/min,柱温 30 ℃。结果 伪麻黄碱的线性范围为 2.5 ~ 1 000.0 ng/ml ($r=0.9952$),最低定量检测浓度达 2.5 ng/ml ($S/N > 10$),提取回收率 > 78%,日内和日间 RSD < 15%。结论 本法操作简单,选择性好,灵敏度高,适用于伪麻黄碱的药动学研究。

[关键词] 伪麻黄碱;高效液相串联质谱;药代动力学

[中图分类号] R945 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2011)05-0350-04

Pharmacokinetics of pseudoephedrine in cetirizine sustained release tablets in human plasma

JIN Xiao-ling, GAO Shou-hong, WU Rong (Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[Abstract] **Objective** To establish a LC-MS/MS method for the determination of pseudoephedrine concentration in plasma, and to investigate the pharmacokinetics of sustained release tablets of cetirizine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride in Chinese healthy volunteers. **Methods** The plasma concentrations of pseudoephedrine were determined by LC-MS/MS method in the volunteers at different time points. Amantadine hydrochloride was used as internal standard. After precipitation of the plasma proteins with acetonitrile, the analytes were separated on an agilent zorbax SB-C₁₈ reversed-phase column with methanol -0.1% formic acid (40: 60, v/v) and detected by electrospray ionization (ESI) mass spectrometry in positive multiple reaction monitoring (MRM) mode. The flow rate was 0.3 ml/min. Column temperature was maintained at 30 ℃. **Results** The calibration curves with good linearities ($r=0.9952$ for plasma sample) were obtained in the range of 2.5 ~ 1 000.0 ng/ml for pseudoephedrine. The lower limit of quantification (LLOQ) was 2.5 ng/ml. Recoveries were around 78% for the extraction from human plasma, and good precision and accuracy were achieved. The intra-day and inter-day RSD were less than 15.0%. **Conclusion** This method was simple, selective and sensitive. It's suitable for the pharmacokinetic research of pseudoephedrine in human plasma.

[Key words] pseudoephedrine; LC-MS/MS; pharmacokinetics

西替伪麻缓释片为盐酸西替利嗪和盐酸伪麻黄碱组成的复方制剂。盐酸伪麻黄碱是麻黄碱的差向异构体,临床所用的为右旋伪麻黄碱(PSE),可选择性收缩呼吸道血管,消除鼻黏膜水肿,在许多抗感冒药中常常含有该成分^[1,2]。本研究是以缓释成分盐酸伪麻黄碱为指标观察人单剂量口服西替伪麻缓释片后血药浓度经时过程,估算相应的药代动力学参数。由于伪麻黄碱血药浓度低,需要高灵敏方法进行测定,而 HPLC 法^[3-5]检测灵敏度低,采用 GC-MS 法^[6]测定时需要将样品进行衍生化处理,操作烦琐。采用 LC-MS 法^[7,8]测定血浆中伪麻黄碱的浓

度,虽然方法灵敏度有所提高,但重现性不好,测定时间较长。考虑到临床生物样本量大、稳定性差、浓度低、专属性要求高等特点,笔者建立了快速测定人血浆中伪麻黄碱的 LC-MS/MS 方法,1 个样品的测定时间仅需 2.5 min,1 d 能测定 500 多个样品,快速而简便地分析大量的血浆样品,为临床试验提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 仪器和药品 Agilent 1200 液相色谱-Agilent 6410 型三重四极杆串联质谱仪(美国 Agilent 公司);Agilent 6410 B.01.03 定量处理软件;飞鸽牌 TGL-16G 高速离心机(上海安亭科学仪器厂);漩涡振荡混和器 WL-901 Vortex(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。伪麻黄碱对照品(含量

[作者简介] 金晓玲(1974-),女,药师。

[通讯作者] 邬蓉. Tel: (021) 81886187, E-mail: 13816686113@126.com.

99.3%, 中国药品生物制品检定所)。西替伪麻缓释片(上海信谊药业有限公司, 批号 090320); 盐酸金刚烷胺(内标, 中国药品生物制品检定所); 甲醇、乙腈和甲酸为色谱纯试剂(德国 Merck 公司); 水为纯净水。

1.2 色谱分离条件 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈(150 mm × 2.1 mm, 3.5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 甲酸水溶液(40: 60), 流速为 0.3 ml/min, 柱温为 30 °C。

1.3 质谱分离条件 采用 ESI 离子源, 正离子检测, 选择 MRM 工作方式进行一/二级质谱分析。用于定量分析的检测离子为: 伪麻黄碱 [M + H]⁺ m/z 148.1 → m/z 132.1, 内标盐酸金刚烷胺 [M + H]⁺ m/z 152.0 → m/z 135.1, 见图 1。干燥气流速为 10 L/min, 干燥气温度为 350 °C, 雾化气压力为 40 psi, 毛细管电压为 4 000 V。

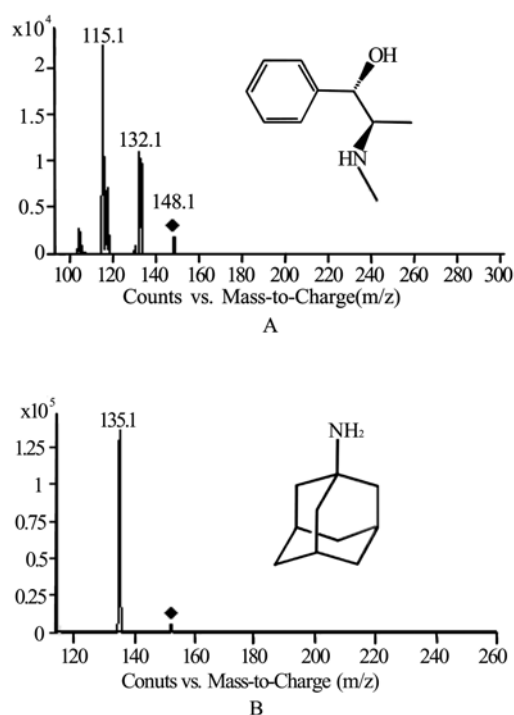


图 1 伪麻黄碱和内标的 ESI-MS 质谱图

A-伪麻黄碱产物离子质谱图; B-内标产物离子质谱图

1.4 受试者与试验设计 本临床试验方案经长征医院伦理委员会审核批准, 在试验过程中受伦理委员会指导, 试验过程中无不良反应发生。10 名男性健康志愿者, 年龄(21.8 ± 1.22) 岁, 体重(66.8 ± 3.9) kg, 肝肾功能及心电图正常, 试验前 1 周及试验期间禁用其他药物, 试验期间禁烟、酒、茶并签署知情同意书。在禁食 12 h 后, 于次日晨空腹口服西替伪麻缓释片 2 片(含盐酸西替利嗪

10 mg, 盐酸伪麻黄碱 240 mg), 用 200 ml 温开水送服。服药后 4 h 方可统一进食标准餐。于给药前及给药后 0.25、0.5、0.75、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、24.0 和 36.0 h 于静脉取血 3 ml, 3 500 r/min 离心 10 min, 分离血浆后置 -20 °C 冰箱保存。

1.5 血浆样品预处理 取血浆 200 μl 置于 -1.5 ml 塑料离心管中, 加入 400 μl 乙腈(含内标盐酸金刚烷胺 5 ng/ml), 涡旋振荡 1 min, 于 12 000 r/min 高速离心 10 min, 取上清液 200 μl 加入 200 μl 0.1% 甲酸溶液, 涡旋混匀后取 10 μl 进样, 峰面积内标法定量分析。

1.6 含量测定的方法学考察 用健康空白血浆精密配制成 2.5、5.0、25.0、50.0、100.0、250.0、500.0 和 1 000.0 ng/ml 浓度的伪麻黄碱标准血浆样品, 按 1.5 项下方法操作, 制备血浆标准曲线。配制 5.0、50.0 和 500.0 ng/ml 3 种不同浓度的伪麻黄碱血浆质控样品, 按 1.5 项下方法操作, 进行回收率、基质效应及日内、日间精密度考察。还考察了伪麻黄碱血浆样品经历 3 次冷冻-解冻循环的稳定性、血浆样品经样品处理后室温放置 24 h 的稳定性以及血浆样品在 -20 °C 保存 60 d 的稳定性。

1.7 药动力学参数计算 采用统计矩法计算药代动力学参数, C_{max}、t_{max} 采用实测值, AUC 采用梯形面积法计算, λ_z 为末端相消除速率常数, 用末端相浓度对数与时间回归直线求得: t_{1/2} = 0.693/λ_z。

2 结果

2.1 方法专属性 在上述色谱条件下, 伪麻黄碱和内标峰形良好, 伪麻黄碱和内标的保留时间分别为 1.59 min 和 1.82 min(图 2)。血浆中内源性杂质均不干扰药物的测定。

2.2 方法学考察 结果表明伪麻黄碱在 2.5 ~ 1 000.0 ng/ml 浓度范围内线性关系良好, 回归方程为 A = 0.002 3C + 0.003 4(r = 0.995 2)。伪麻黄碱在血浆中最低定量检测限为 2.5 ng/ml, RSD 为 8.46%。低、中、高 3 种浓度的日内及日间精密度分别 < 5.7% 和 < 11.6%, 萃取回收率 > 78%, 基质效应在 103.0% ~ 107.7% 之间。伪麻黄碱血浆样品经历 3 次冷冻-解冻循环后稳定, RSD 为 9.54%; 血浆样品经样品处理后室温放置 24 h 稳定, RSD 为 8.91%。血浆样品在 -20 °C 保存 60 d 其浓度无明显变化, 说明其在 -20 °C 条件下, 药物在血浆中可稳定存在。

2.3 药动力学结果 10 名健康志愿者单剂量口服西替伪麻缓释片二片(含盐酸西替利嗪 10 mg, 盐酸伪麻黄碱 240 mg), 用 LC-MS/MS 测定其血药浓度, 按

“1.7”项方法计算,体内盐酸伪麻黄碱药时曲线的末端相消除半衰期($t_{1/2}$)、平均滞留时间(MRT)、峰浓度(C_{max})、峰时间(t_{max})、 AUC_{0-36} 、 $AUC_{0-\infty}$ 分别为:(7.32 ± 0.97)h, (12.41 ± 1.46)h, (706.64 ± 113.72)ng/ml, (6.8 ± 1.0)h, (9269.72 ± 1598.13)ng·h/ml 和(9638.65 ± 1793.59)ng·h/ml。西替伪麻缓释片中盐酸伪麻黄碱的体内主要药代动力学参数与文献报道基本一致。

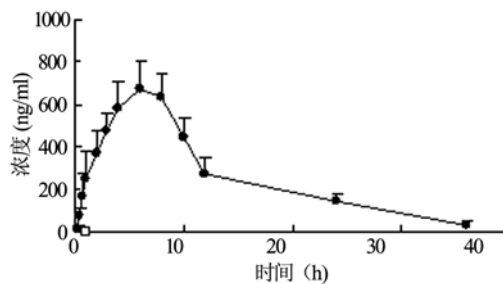


图3 健康志愿者单剂量口服西替伪麻缓释片盐酸伪麻黄碱的平均药-时曲线

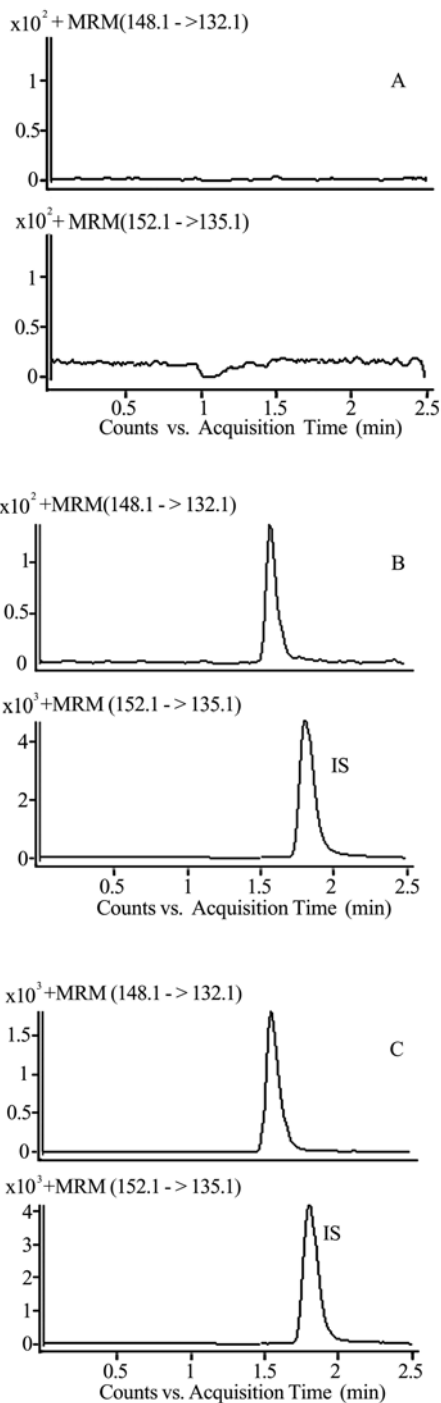


图2 伪麻黄碱血浆样品 MRM 色谱图

A-空白人血浆样品;B-空白血浆样品添加伪麻黄碱;
C-实测血浆样品

3 讨论

本文采用 ESI 正离子模式,对所测定的伪麻黄碱及其内标盐酸金刚烷胺的电离条件进行优化, $[M + H]^+$ 峰容易生成有规律的碎片,便于 MS/MS 测定,经过优化质谱和色谱条件,最终可以满足伪麻黄碱及其内标盐酸金刚烷胺血药浓度的测定。

由于伪麻黄碱分子结构中含有碱性氮原子,所以流动相的 pH 值对其保留时间有一定影响。用甲醇-0.1% 甲酸水溶液(40: 60)作为流动相时分离效果最好。因伪麻黄碱为弱碱性药物,通常合成盐酸盐可增加溶解度,其血样的提取一般采用乙醚、乙醚-正乙烷、甲基叔丁基醚等有机溶剂提取,但常有乳化现象产生,操作过程烦琐,耗时长,成本较高。而采用蛋白沉淀法进行血样处理,操作简单,选择沉淀剂时,曾探讨使用甲醇、乙腈等蛋白沉淀剂处理生物样品,结果使用乙腈提取回收率较高,但若用上清液直接进液质,峰形不佳且响应较低,将上清液用水、流动相、0.1% 甲酸、0.3% 甲酸、0.5% 甲酸分别 1: 1 和 1: 2 稀释,结果发现用 0.1% 甲酸 1: 1 稀释,提取回收率最高,达 78% 左右。本实验所需血浆样品量少,前处理采用蛋白沉淀,操作简便,分析测定时间短,在处理大批量血浆样品时可大大减少工作量和节省时间。

伪麻黄碱在人体血浆中的浓度较低,采用 HPLC-UV 法测定时,有时可观察到少量杂质干扰其低浓度测定。为保证临床大量且复杂生物样本分析的专属性和准确性,本实验建立了伪麻黄碱人血浆样本 LC-MS/MS 分析方法,可以选择性的检测选定的离子以及该离子所产生的子离子,因而选择性很高,而对 LC 的分离要求不高,甚至可以不通过 LC 分离而直接将混合样品进入 MS 进行测定,故可以实现快速分离。空白血浆无杂质干扰,最低定量检测浓度可达 2.5 ng/ml,完全满足临床血药浓度监测的要求。
(下转第 371 页)

限度检查方法进行判定,结果见表3。

表3 控制菌检查法验证结果

组别	结果			
	增菌培养	MUG 5 h	MUG 24 h	靛基质反应
试验组	+	+	+	+
阳性对照组	+	+	+	+
阴性对照组	-	-	-	-
本底对照	-	-	-	-

注: + 阳性反应; - 阴性反应

结果显示,控制菌检查阳性菌生长良好,阴性对照无菌生长。

2.5.4 样品控制菌检查 取3批样品1:10的供试液各10 ml,分别接种至胆盐乳糖培养基100 ml中;另取大肠埃希菌的10~100 cfu/ml菌悬液1 ml、pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液10 ml分别接种至同样培养基中作为阳性对照和阴性对照。按“2.5.3”项下方法操作,结果见表4。

表4 样品控制菌检查结果

批号	组别	结果		
		MUG 5 h	MUG 24 h	靛基质反应
090925	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	+	+	+
	D	-	-	-
091029	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	+	+	+
	D	-	-	-
091030	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	+	+	+
	D	-	-	-

注:A-实验组; B-阴性对照组; C-阳性对照组; D-本底对照组

结果表明,3批样品按验证方法检查,阳性对照检出大肠埃希菌,样品均未检出大肠埃希菌,阴性对照未见菌生长,结果符合规定。

3 讨论

3.1 方法验证 复方参芪五味咀嚼片采用常规法进行细菌、霉菌和酵母菌计数方法验证时,5种试验菌回收率均大于70%,表明本品对细菌、霉菌和酵母菌无抑制作用,可用常规法进行细菌、霉菌和酵母菌计数检查。

3.2 菌液制备 细菌、霉菌和酵母菌计数中菌液的制备尤为重要。菌液含菌数过多或过少,在回收率测定时误差都会增大。因此需要通过反复多次试验,摸索出接种环刮取菌苔的量及稀释菌液的经验方法,在菌液制备好时,同时进行活菌计数和供试品的方法验证,才能将菌数控制在50~100 cfu/ml之间,而且在进行3次独立平行试验时,3次试验的菌原液浓度应尽量一致,除黑曲霉孢子悬液外其他试验菌菌悬液最好现用现配,这样才能保证验证结果准确可靠。

【参考文献】

- [1] 中国药典. 2010年版. 一部[S]. 2010;附录 XIII C:79~88.
- [2] 中国药品生物制品检定所. 中国药品检验标准操作规范[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010;351~368.

[收稿日期]2011-03-22

[修回日期]2011-04-08

(上接第352页)

【参考文献】

- [1] 谢林,梁艳,刘晓东,等. 西嗉伪麻缓释胶囊中盐酸伪麻黄碱在犬血浆中LC-MS法测定及其药代动力学[J]. 中国药科大学学报,2004,35(6):528.
- [2] 张鹏,张逸凡,陈笑艳,等. 三种伪麻黄碱制剂在中国健康人体的药动学及生物等效性[J]. 中国新药杂志,2006,15(17):1491.
- [3] Macek J, Ptacek P, Klima J. Rapid determination of pseudoephedrine in human plasma by HPLC[J]. J Chromatogr B, 2002, 766(2): 289.
- [4] 张善堂,舒冰,史天陆,等. 高效液相色谱法测定人血浆中

盐酸伪麻黄碱浓度[J]. 安徽医药,2006,10(2):110.

- [5] 张建军,欧丽娜,李伟,等. 小青龙颗粒中麻黄碱及伪麻黄碱在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中华中医药杂志,2010,25(12):1991.
- [6] 贺丰,罗佳波,陈飞龙,等. GC-MS法研究麻黄汤中麻黄碱、伪麻黄碱的人体内过程[J]. 中药新药与临床药理,2004,15(5):336.
- [7] 樊志君. HPLC-MS测定人血浆中伪麻黄碱[J]. 中医药导报,2007,13(6):108.
- [8] 史天陆,陈礼明,孙言才,等. 健康人血浆中伪麻黄碱浓度的LC-MS法测定[J]. 安徽医药,2008,12(11):1045.

[收稿日期]2011-08-17

[修回日期]2011-09-08