

LC-MS/MS 法测定人血浆中氯马斯汀浓度

赵恒利¹, 王海生¹, 常堃¹, 于金龙¹, 曹若明², 方增军^{1*}

(1. 山东大学第二医院临床药学部, 济南 250033; 2. 济南市疾病预防控制中心, 济南 250012)

摘要 目的: 建立 LC-MS/MS 法测定人血浆中氯马斯汀浓度, 并进行其药代动力学和生物等效性研究。方法: 血浆样品以苯海拉明为内标, 经提取溶剂 [正己烷-二氯甲烷-异丙醇 (30:20:1)] 萃取后进行 LC-MS/MS 分析。采用高效液相色谱分离系统, 色谱柱为 Inertsil Hilic C₁₈ 柱 (150 mm × 3.0 mm 5 μm), 流动相为乙腈 10 mmol · L⁻¹ 醋酸铵溶液-甲酸 (40:60:1)。采用质谱检测系统, ESI 离子源, 正离子模式, 多级反应监测 (MRM) 方式, *m/z* 344→215 (氯马斯汀), *m/z* 256→167 (内标, 苯海拉明)。结果: 在 0.01 ~ 5.0 ng · mL⁻¹ 范围内, 氯马斯汀血药浓度呈良好的线性关系 (*r* = 0.9972), 精密度 RSD% 均小于 10%, 准确度在 90.8% ~ 102%。结论: 本测定方法灵敏准确, 适用于人血浆中氯马斯汀浓度的测定。

关键词: 氯马斯汀; 液相色谱质谱联用; 药代动力学; 生物等效性

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)08-1440-04

LC-MS/MS determination of clemastine concentration in human plasma

ZHAO Heng-li¹, WANG Hai-sheng¹, CHANG Kun¹, YU Jin-long¹,
CAO Ruo-ming², FANG Zeng-jun^{*}

(1. The Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, China;

2. Jinan Municipal Center for Disease Control and Prevention, Jinan 250012, China)

Abstract Objective: To develop a sensitive and selective LC-MS/MS method to quantitate clemastine in human plasma and study the pharmacokinetic and bioequivalability of clemastine in healthy volunteers after a single dose of 1.34 mg clemastine fumarate tablet. **Method:** After adding diphenhydramine as the internal standard, clemastine was extracted from plasma by extraction solvent [*N*-hexane-dichloromethane-dimethyl carbinol (30:20:1)]. The analyte was isocratically eluted on a Inertsil Hilic C₁₈ column (150 mm × 3.0 mm 5 μm) with acetonitrile-water (10 mmol · L⁻¹ ammonium acetate)-formic acid (40:60:1) by LC-MS/MS with positive ionization. Ions monitored in the multiple reaction monitoring (MRM) mode were *m/z* 344→215 for clemastine and *m/z* 256→167 for diphenhydramine (IS). **Result:** The linear range of the standard curve of clemastine was from 0.01 to 5.0 ng · mL⁻¹. RSD of precision was less than 10%, and the accuracy was between 90.8% - 102%. **Conclusion:** The method is highly sensitive and accurate, which is suitable for the pharmacokinetic study of clemastine.

Key words: clemastine; LC-MS/MS; pharmacokinetics; bioequivalability

富马酸氯马斯汀 (clemastine fumarate) 是第 2 代 H₁ 受体拮抗剂, 属吡咯烷类衍生物, 具有极强的 H₁ 受体拮抗作用, 可降低毛细血管的渗透性, 从而抑制过敏反应, 主要用于过敏性鼻炎、荨麻疹及其他过敏性皮肤病。该药口服剂量较小 (每天小于 6 mg), 血药浓度较低^[1], 难以进行定量分析, 笔者未见国内有关其药动学研究的文献报道。本文建立灵敏准确的 LC-MS/MS 分析方法, 该法操作简便, 分析周期

短, 定量限可达 0.01 ng · mL⁻¹, 可用于氯马斯汀口服给药的药代动力学和生物等效性研究。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 美国 Applied Biosystem Sciex 公司 API 4000 型串联四极杆质谱仪, 配有电喷雾离子源 (ESI) 及 Analyst 1.4.2 数据处理系统; 美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪。

1.2 药品与试剂 对照品富马酸氯马斯汀 (批号

* 通讯作者 Tel: (0531) 85875847; Fax: (0531) 85875290; E-mail: xiaolegold@163.com

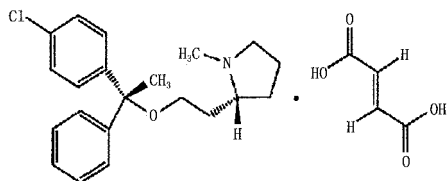


图1 富马酸氯马斯汀结构式

Fig 1 Structure of clemastine fumarat

100229 - 200803)、苯海拉明(批号 100201 - 200502) 购自中国药品生物制品检定所。试验制剂: 富马酸氯马斯汀片, 规格为 1.34 mg, 批号 20090402, 烟台大洋制药有限公司生产。参比制剂: 富马酸氯马斯汀片, 规格为 1.34 mg, 批号 090201, 山东力诺科峰制药有限公司生产; 乙腈、甲醇, 色谱纯, 美国 FISHER; 甲酸、乙酸胺色谱纯, 美国 TE-DIA; 正己烷, 分析纯, 江苏强盛化工有限公司; 异丙醇, 分析纯, 天津科密欧化学试剂有限公司; 二氯甲烷, 分析纯, 济南试剂总厂; 水为超纯去离子水 (18.2 MΩ)。

2 方法

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Inertsil Hilic 柱 (150 mm × 3.0 mm 5 μm) 柱温: 35 °C; 流动相: 乙腈 - 水 (10 mmol · L⁻¹ 醋酸铵) - 甲酸 (40: 60: 1); 流速为 0.3 mL · min⁻¹。

2.1.2 质谱条件 离子源为电喷雾电离源 (ESI); 扫描方式为多反应监测 (MRM) 正离子扫描方式, 电喷雾电压 4.2 kV; 离子源温度 450 °C; 气帘气 0.14 MPa; 雾化气 0.34 MPa; 辅助气 0.38 MPa; 用于定量分析的离子对、解簇电压、碰撞诱导解离电压分别为: 苯海拉明: m/z 256 → 167, 35 V, 16 V; 氯马斯汀 m/z 344 → 215, 45 V, 23 V。

2.2 溶液配制

对照品溶液: 精密称取氯马斯汀对照品 10.2 mg, 以甲醇 - 水 (50: 50) 混合液为溶剂配成 200 μg · mL⁻¹ 储备液, 并依次稀释得 10 μg · mL⁻¹、100 ng · mL⁻¹ 和 10 ng · mL⁻¹ 4 °C 冷藏备用。

内标溶液: 精密称取苯海拉明对照品 10.1 mg, 用甲醇配成 200 μg · mL⁻¹ 储备液, 并依次稀释得 5 μg · mL⁻¹、50 ng · mL⁻¹ 和 5 ng · mL⁻¹ 4 °C 冷藏备用。

2.3 样品处理方法 精密量取血浆样品 0.5 mL, 加入甲醇 - 水 (50: 50) 溶剂 A 混合溶液 100 μL, 加入苯海拉明 (内标 5 ng · mL⁻¹) 50 μL 和 pH 为 11 的磷酸缓冲溶液 0.2 mL, 涡旋震荡 1 min。再加入

提取溶剂为正己烷 - 二氯甲烷 - 异丙醇 (30: 20: 1) 3.5 mL, 旋涡震荡 2 min, 3000 r · min⁻¹ 离心 10 min。吸取有机层于另一离心试管中, 于 35 °C 水浴上通氮气吹干, 残渣用流动相 50 μL 溶解, 取 5 μL 进样分析。

3 结果

3.1 方法专属性 对照品和内标二级质谱图见图 2, 空白血浆及志愿者血浆样本色谱图见图 3, 结果表明血浆中内源物质无干扰。

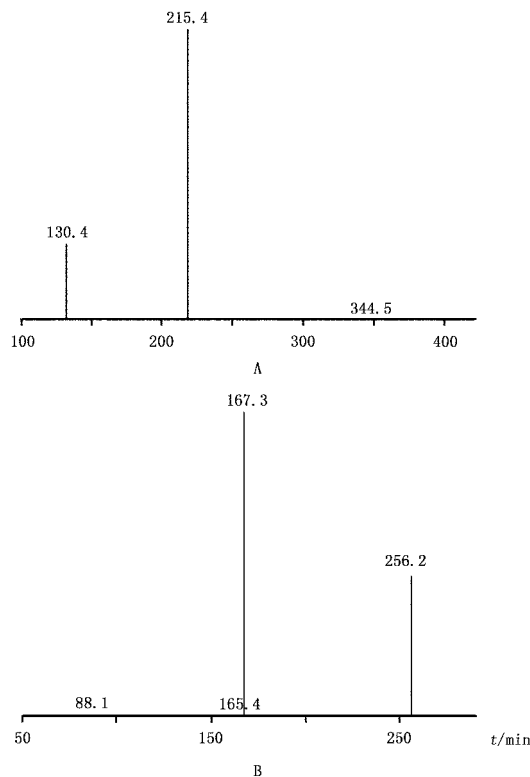


图2 氯马斯汀(A)和内标(B)的二级质谱图

Fig 2 Product ion mass - spectrograms of clemastine (A) and IS (B)

3.2 标准曲线 取多份空白血浆适量, 分别加入定量的氯马斯汀对照品溶液, 照“2.3”项下方法制备浓度为 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 ng · mL⁻¹ 标准曲线系列血浆, 按照上述试验条件测定, 采用加权 ($w = 1/x^2$) 最小二乘法进行线性回归, 观察氯马斯汀与内标的色谱图峰面积比与相应两者浓度比的相关性。氯马斯汀的直线回归方程为:

$$Y = 1.36X + 0.0267 \quad r = 0.9972$$

线性范围为 0.01 ~ 5.0 ng · mL⁻¹。本法定量下限 (LLOQ) 为 0.01 ng · mL⁻¹, 该浓度质控样品 ($n = 5$) 的精密度 RSD 为 10.4%, 准确度在 87.5% ~ 106.0% 之间。

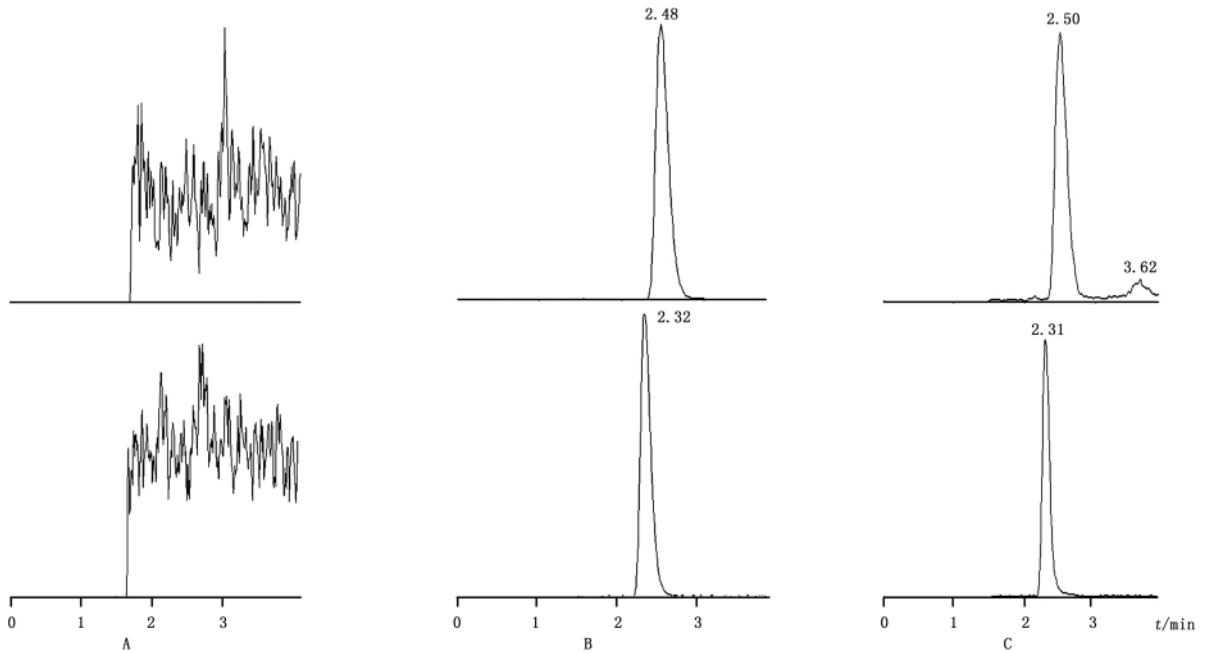


图3 氯马斯汀和内标的色谱图

Fig 3 Representative chromatograms for clemastine and IS in human plasma

A. 空白(blank plasma sample) B. 空白血浆 + 氯马斯汀(4.0 ng · mL⁻¹) + 内标(0.5 ng · mL⁻¹) (blank plasma sample spiked with clemastine at 4.0 ng · mL⁻¹) C. 受试者药后血浆 + 内标(IS at 0.5 ng · mL⁻¹ (volunteer plasma sample after administration spiked with IS)

3.3 提取回收率和基质效应 取空白血浆, 加入适量对照品溶液, 配成含氯马斯汀的低、中、高3个浓度(0.025, 0.1, 4.0 ng · mL⁻¹, 下同) 对照品血浆各5份, 按“2.3”项下方法处理, 测定得各浓度峰面积; 取空白血浆同法处理(将内标换成50% 甲醇水溶液), 处理后分别用含有相应浓度的氯马斯汀对照

品溶液和内标溶液复溶, 得各浓度峰面积; 取空白血浆按“2.3”项下方法(将对照品溶液换成50% 甲醇水溶液), 处理后分别用含有相应浓度的内标溶液复溶测定, 得峰面积; 取适量氯马斯汀和内标溶液测定, 得峰面积; 提取回收率结果见表1。基质效应其提取回收率见表1。

表1 血浆中氯马斯汀提取回收率、基质效应、精密度与准确度 (n = 5)

Tab 1 Recovery matrix effects of clemastine precision and accuracy in plasma

| C /ng · mL ⁻¹ | 提取回收率(extraction recovery) /% $\bar{x} \pm SD$ | 基质效应(matrix effects) /% $\bar{x} \pm SD$ | 日内(intra - day) | | 日间(inter - day) | |
|-----------------------------|---|---|------------------------|----------------|------------------------|----------------|
| | | | $\bar{x} \pm SD$ | 准确度 | $\bar{x} \pm SD$ | 准确度 |
| | | | /ng · mL ⁻¹ | (accuracy) /% | /ng · mL ⁻¹ | (accuracy) /% |
| 0.025 | 64.25 ± 5.03 | 83.15 ± 8.26 | 0.0233 ± 0.0022 | 93.2 | 0.0245 ± 0.0021 | 98 |
| 0.1 | 68.01 ± 4.79 | 86.23 ± 7.05 | 0.0908 ± 0.0053 | 90.8 | 0.1015 ± 0.0095 | 101.5 |
| 4.0 | 65.89 ± 4.28 | 87.09 ± 8.03 | 4.08 ± 0.24 | 102 | 3.88 ± 0.37 | 97 |

3.4 方法准确度及精密度试验 取低、中、高3个浓度(0.025, 0.1, 4.0 ng · mL⁻¹, 下同) 的氯马斯汀对照品血浆, 按“2.3”项下方法处理后, 进行进样分析。计算准确度和绝对回收率 (n = 5); 1 d 内测定5次, 计算日内变异; 每日测定1次, 连续测定5 d 计算日间变异。结果见表1。

3.5 稳定性试验 分别取含氯马斯汀低、中、高3个浓度的质控样品各5份, 测定冷冻前、冷冻14 d、室温放置6 h 时药物的浓度, 考察不同存放条件对氯马斯汀稳定性的影响, 试验结果见表2。

表2 氯马斯汀的稳定性考察 (n=5)

Tab 3 Stability of clemastine

| 保存条件 (storage condition) | C/ng · mL ⁻¹ (mean) | | SD | RSD /% |
|--|---------------------------------|-----------------|--------|-----------|
| | 配制浓度 (added) | 测定值 (found) | | |
| 2 次冻融(two freeze - thaw cycles) | 0.025 | 0.0255 | 0.0010 | 4.0 |
| | 0.1 | 0.103 | 0.006 | 5.7 |
| | 4.0 | 3.99 | 0.32 | 8.1 |
| -20 °C 存放 14 d[post - freezing (-20 °C) for 14 days] | 0.025 | 0.0241 | 0.0015 | 6.1 |
| | 0.1 | 0.104 | 0.010 | 9.5 |
| | 4.0 | 4.24 | 0.30 | 3.3 |
| 室温存放 6 h(room - temperature for 6 hours) | 0.025 | 0.0249 | 0.0016 | 6.4 |
| | 0.1 | 0.108 | 0.007 | 6.1 |
| | 4.0 | 4.06 | 0.37 | 9.1 |

3.6 样品采集与测定 健康男性志愿者 20 名, 体重(65.5 ± 4.8) kg。于试验前统一体格检查、肝、肾功能正常, 且无急、慢性疾病及家族遗传病史。试验前 2 周内无用药史, 3 月内未参加其他新药临床实验, 志愿者在试验前 2 周及试验期内禁烟酒。试验前签定书面知情同意书, 试验方案通过伦理委员会批准。20 名健康志愿者单剂量口服富马酸氯马斯汀的试验制剂(T) 或参比制剂(R) 1.34 mg, 分别于服药前(0 h) 和服药后 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 72 h 取肘静脉血 4 mL, 肝素抗凝, 3500 r · min⁻¹ 离心 5 min, 留取血浆, -20 °C 贮存。富马酸氯马斯汀片剂的主要药动学参数: $t_{1/2}$ 分别为(23.89 ± 7.39) h 和(23.46 ± 6.36) h, T_{max} 分别为(4.95 ± 1.54) h 和(4.50 ± 1.61) h, C_{max} 分别为(0.4585 ± 0.2502) ng · mL⁻¹ 和(0.5191 ± 0.2703) ng · mL⁻¹, AUC_{0-72} 分别为(12.966 ± 10.420) ng · mL⁻¹ · h 和(13.454 ± 8.686) ng · mL⁻¹ · h, $AUC_{0-\infty}$ 分别为(15.809 ± 15.621) ng · mL⁻¹ · h 和(15.828 ± 11.523) ng · mL⁻¹ · h。试验制剂的相对生物利用度 F 为(92.7 ± 22.3) %。平均血药浓度 - 时间曲线见图 4。

4 讨论

氯马斯汀临床应用剂量小, 人体血药浓度低, 定

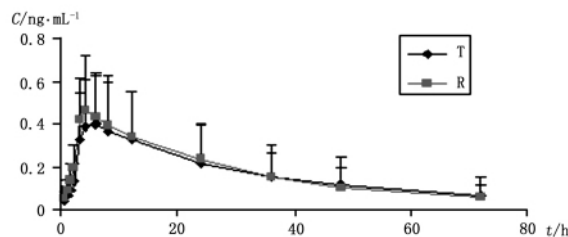


图4 口服 1.34 mg 富马酸氯马斯汀后的平均药时曲线

Fig 4 Plasma average concentration - time curves of clemastine after an oral dosage tablets (1.34 mg clemastine fumarate)

量分析难度较大, 有文献报道采用 GC、HPLC、HPLC - MS 等方法^[2-5] 进行分析测定, 但其灵敏度均无法满足生物样品中微量药物测定的要求。目前, 笔者尚未发现国内有文献报道采用高效液相色谱质谱联用法进行生物样品中氯马斯汀的测定, 本研究中建立的 LC - MS/MS 法血浆样品用量少, 操作步骤简便易行, 试验结果显示该法灵敏准确、专属性强、重现性好, 经方法学的全面考察确证其符合生物样品测定的要求, 适用于氯马斯汀血浆浓度测定及其药代动力学和生物利用度研究。

参考文献

- 1 Xie ZY, Liao QF, Li ZJ, et al. Development and full validation of a sensitive quantitative assay for the determination of clemastine in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2007, 44: 924
- 2 Natalia N. Davydova, Sally Usdin Yasuda, et al. Determination of clemastine in human plasma by gas chromatography with nitrogen phosphorus detection. *J Chromatogr B* 2000, 744: 177.
- 3 Hattori H, Yamamoto S, Iwata M, et al. Determination of diphenylmethane antihistaminic drugs and their analogues in body fluids by gas chromatography with surface ionization detection. *J Chromatogr B*, 1992, 581: 213
- 4 CONG Pei - hong(丛培红), MA Jie(马洁), ZHUO Cai - lan(卓彩兰) et al. Determination of the clemastine fumarate and its content uniformity in tablets by HPLC(HPLC 法测定富马酸氯马斯汀片的含量及含量均匀度). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2004, 24(4): 444
- 5 WANG Jin - long(王金龙), JIANG Jian - guo(姜建国). Determination of dissolution of clemastine fumarate tablet by HPLC(高效液相色谱法测定富马酸氯马斯汀片的溶出度). *China Pharm* (中国药业) 2007, 16(23): 8

(本文于 2010 年 10 月 19 日收到)