

LC-ESI/MS 法测定血浆中枸橼酸喷托维林浓度及其应用

余克花¹, 温金华², 聂福根³, 熊玉卿^{2*}

(1. 南昌大学医学院实验教学部, 江西 南昌 330006; 2. 南昌大学医学院临床药理研究所, 江西 南昌 330006;
3. 南昌市第三医院, 江西 南昌 330009)

摘要: 建立快速、简捷、灵敏的 LC-ESI/MS 法测定人血浆中枸橼酸喷托维林的浓度, 并用于含此种成分的复方愈酚维林胶囊的药代动力学与生物等效性的研究。血浆样品经液-液萃取后以甲醇与含 0.4%冰乙酸和 4 mmol·L⁻¹ 乙酸铵的水 (43 : 57, v/v) 为流动相, 采用 ESI 源以 SIM 方式对血浆样品中枸橼酸喷托维林进行定量分析。研究表明, 枸橼酸喷托维林血浆浓度测定方法的线性范围为 1~160 ng·mL⁻¹, 日内、日间精密性 (RSD) 均小于 12.5%, 方法回收率为 92%~110%, 提取回收率大于 80%。本法操作简便、快速、灵敏度高、专属性强, 满足生物样本的分析要求, 可用于枸橼酸喷托维林的生物等效性与药代动力学研究。

关键词: 枸橼酸喷托维林; LC-ESI/MS; 生物等效性; 药代动力学

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 12-1402-04

Quantification of pentoxyverine citrate in human plasma by LC-ESI/MS method and its application

YU Ke-hua¹, WEN Jin-hua², NIE Fu-gen³, XIONG Yu-qing^{2*}

(1. Department of Experimental Teaching, College of Medicine, Nanchang University, Nanchang 330006, China;
2. Institute of Clinical Pharmacology, College of Medicine, Nanchang University, Nanchang 330006, China;
3. Nanchang Third Hospital, Nanchang 330009, China)

Abstract: A rapid and sensitive liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI/MS) method for quantification of pentoxyverine citrate in human plasma has been developed and applied for the bioequivalence and pharmacokinetics study. After extracted from plasma samples with ethyl acetate, analysis was performed in selected ion monitoring (SIM) mode with a positive electrospray ionization (ESI) interface with a mobile phase consisted of methanol and water (0.4% glacial acetic acid and 4 mmol·L⁻¹ ammonium acetate, 43 : 57, v/v). The linear concentration range of the calibration curves was 1.0~160.0 ng·mL⁻¹ for pentoxyverine citrate, inter- and intra-precision (RSD) was less than 12.5%, accuracy (RE) was in ±13.5% and absolute recovery was more than 80%. The method was proved simple, rapid, sensitive, specific and suitable for pharmacokinetic and bioequivalence study of Yufenweilin capsule containing pentoxyverine citrate.

Key words: pentoxyverine citrate; LC-ESI/MS; bioequivalence; pharmacokinetics

愈酚维林胶囊 (Yufenweilin capsule) 为含有愈创木酚甘油醚与枸橼酸喷托维林的复方制剂, 其中枸橼酸喷托维林为镇咳药, 有中枢与外周性镇咳作用, 其镇咳作用强度约为可待因的 1/3, 除对延髓的

呼吸中枢有直接的抑制作用外, 还有轻度的阿托品样作用^[1, 2]。

目前国内外有关枸橼酸喷托维林的测定方法较少, 主要是 HPLC 紫外检测^[1-3], 这些方法灵敏度较低, 多用于枸橼酸喷托维林含量的测定; 应用荧光分光光度法 (fluorescence spectrophotometry)^[4, 5]和选择性离子电容式传感器 (ion-selective capacitive sensor)

收稿日期: 2009-07-29.

*通讯作者 Tel: 86-791-6361195, E-mail: xyq1126@yahoo.com.cn

法^[6]难以满足枸橼酸喷托维林血浆样本测定要求。本试验首次建立快速、简捷、灵敏的 LC-ESI/MS 的枸橼酸喷托维林测定方法,并用于枸橼酸喷托维林的生物等效性的研究。

材料与方 法

仪器与试剂 岛津 LCMS-2010A 液相色谱-质谱联用仪,配有电喷雾离子化源 (ESI 源) 和 Shimadzu 3.4 软件; 2010A 型液相色谱仪。补充色谱柱: 日本岛津, Shim-pack, VP-ODS, 150L×2.0。

愈酚维林胶囊 (供试制剂), 含枸橼酸喷托维林 25 mg, 批号: 080601, 由江西药都仁和制药有限公司提供; 愈酚维林片 (参比制剂), 含枸橼酸喷托维林 25 mg, 批号: 080301, 由地奥集团成都药业股份有限公司提供。枸橼酸喷托维林对照品含量为 99.9%, 由江西药都仁和制药有限公司提供。用甲醇配制成相当于 0.54 mg·mL⁻¹ 枸橼酸喷托维林贮备液, 临用时稀释至相应的浓度。罗红霉素对照品购自中国药品生物制品检定所, 含量为 99.4%, 用甲醇配制成相当于 1.27 mg·mL⁻¹ 贮备液, 临用时稀释至 0.6 μg·mL⁻¹。空白血浆由江西中心血站提供。

色谱质谱条件 色谱柱 (150 mm × 2.0 mm ID, 5 μm) 为 Shimadzu Pack VP-ODSC₁₈ (日本岛津公司), 流动相为甲醇-水 (含 0.4% 冰乙酸和 0.4 mmol·mL⁻¹ 乙酸铵, 43 : 57), 流速为 0.2 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C。离子源为电喷雾离子源 (ESI), 扫描方式为选择性离子监测 (selected-ion monitoring, SIM): 曲型脱溶剂装置 (CDL) 温度为 250 °C, 加热块 (block) 温度为 200 °C, CDL 电压为 25 V, 检测电压为 1.60 kV; 定量分析的正离子 [M+H]⁺: 喷托维林 *m/z* 334.0, 内标 (罗红霉素) *m/z* 837.5: 雾化气流速为 1.5 L·min⁻¹, 干燥气流速为 2.0 L·min⁻¹。

血浆样品处理 取服药后血浆 0.4 mL, 精密加入内标 (罗红霉素, 0.6 μg·mL⁻¹) 40 μL, 混匀, 加乙酸乙酯 4.0 mL, 振荡 4 min, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上层有机相于另一试管中, 置 50 °C 干浴锅中氮气挥干, 以 50% 甲醇 0.15 mL 溶解残渣, 20 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 0.10 mL, 进样 10 μL, 进行 LC-ESI/MS 定量分析。

分析方法考察

标准曲线制备及其定量限 取空白血浆 0.4 mL, 加不同量的枸橼酸喷托维林的对照溶液, 使血浆样品质量浓度分别为 0、1、2.0、5.0、10.0、40.0、80.0 和 160.0 ng·mL⁻¹, 按“血浆样品处理”项下操作, 记

录样品和内标峰面积, 利用样品浓度对样品与内标峰面积比作直线回归, 得标准曲线。取 5 份空白血浆 400 μL, 加入枸橼酸喷托维林对照溶液, 配制成相当于 1 ng·mL⁻¹ 的血浆样品进行分析。

精密度与方法回收率 取空白血浆 400 μL, 加入不同浓度的枸橼酸喷托维林的对照品, 使得枸橼酸喷托维林质量浓度分别为 2、10 和 80 ng·mL⁻¹, 按“血浆样品处理”项下操作, 记录样品与内标峰面积比值, 代入同一条工作曲线, 算得浓度, 与配置浓度比较, 求得精密度与方法回收率。

提取回收率测定 取含枸橼酸喷托维林 2.0、10.0 和 80.0 ng·mL⁻¹ 的系列血浆样品各 5 份, 依前述血样处理方法提取后, 以 50% 甲醇 0.15 mL 溶解处理, 记录喷托维林的峰面积; 同时另取空白血浆 0.4 mL, 除不加系列对照溶液和内标外, 按“血浆样品的处理”项下操作, 向提取的上清液中加入相应浓度的对照溶液各 20 μL 和内标 40 μL, 涡流混合, 50 °C 干浴锅中氮气流下吹干。残留物以 50% 甲醇 0.15 mL 溶解, 进样分析, 获得相应峰面积, 以上述两种处理方法的峰面积比值计算提取回收率。

稳定性考察 本文通过考察低、中、高 3 浓度的枸橼酸喷托维林的血浆样品室温放置 6 h, 血浆样本反复冻融 3 次, 血浆样本长期冷冻 30 天和提取处理后样本在自动进样器中放置 24 h 的稳定性考察。

基质效应考察 取 6 名受试者的空白血浆 400 μL, 除不加对照溶液与内标外, 按“血浆样品的处理”项下操作, 向获得的上清液中加入低、中、高浓度的对照溶液 20 μL 和内标 40 μL, 涡流混合, 40 °C 空气流下吹干。残留物以 50% 甲醇 0.15 mL 溶解, 每个浓度进样 6 次, 获得相应峰面积; 另取上述低、中、高浓度的对照溶液 20 μL 与内标 40 μL, 40 °C 空气流下吹干, 残留物以 50% 甲醇 0.15 mL 溶解。每个浓度进样 6 次, 获得相应峰面积, 提取后的峰面积与之相比, 比值计算基质效应。内标同样进行考察。

实验设计 20 名男性健康志愿受试者, 经南昌大学第一附属医院医学伦理委员会批准, 签署知情同意书, 然后随机分成两组: 一组受试者先服用供试制剂, 后服用参比制剂; 另一组受试者先服用参比制剂, 后服用供试制剂。两种服药方式间隔一周。受试者禁食 12 h 后分别空腹口服含枸橼酸喷托维林 50 mg 的愈酚维林供试制剂或参比制剂, 用温开水约 200 mL 送服, 给药 2 h 后方可自由饮水, 给药 4 h 后统一进标准饮食。每例受试者均于用药前 0.5 h 在前臂静脉安置留置针抽血, 服药前采空白血约 3.0 mL, 再分

别于服药后 0.167、0.333、0.5、0.75、1.0、1.25、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0、8.0、12.0、24.0 和 36.0 h 采血 3.0 mL, 立即以 $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上层血浆于塑料试管中, 再置于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中冷冻保存待测。

结果

1 方法的专属性

1.1 血浆样品色谱分析 分别取 6 名受试者的空白血浆 $400\ \mu\text{L}$, 除不加内标外, 按“血浆样品处理”项下操作, 进行 LC-MS 分析, 获得空白血浆样品的色谱图 1A; 将一定浓度的对照溶液和内标溶液加入空白血浆中, 依同法操作, 得色谱图 1B; 取受试者给药 1.25 h 后时间点的血浆样品, 依同法操作, 得色谱图 1C。在本试验条件下, 枸橼酸喷托维林与内标有较好的色谱峰, 人血浆中杂质不干扰样品峰, 基线噪音小。枸橼酸喷托维林与内标罗红霉素的保留时间分别约为 2.98 和 6.29 min。在此条件下所测得的结果能代表枸橼酸喷托维林浓度。

1.2 血浆中枸橼酸喷托维林标准曲线制备及其定量

限 (LOQ) 枸橼酸喷托维林得回归方程 $y = 0.063x + 0.004$, $r = 0.999\ 95$, ($n = 5$), 线性范围 $1.0\sim 160.0\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。枸橼酸喷托维林溶液配制相当于 $1\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆样品, 色谱分析测得结果分别为 1.02、1.08、0.98、0.94 和 $0.98\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, RSD 为 5.08%, 准确度为 0.02%, 表明 LC-ESI/MS 法测定血浆中喷托维林 LOQ 可达 $1\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.3 精密度与方法回收率 测得批内变异和连续 3 天内的批间变异, 结果见表 1。

1.4 提取回收率测定 枸橼酸喷托维林 3 个浓度血浆提取回收率分别为 85%、82%和 80%。

Table 1 Precision and accuracy of the determination of pentoxyverine citrate in plasma samples ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

Pentoxyverine citrate	Concentration/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$		Precision/%	Recovery/%
	Spiked	Measured		
Inter-day	2	1.94 ± 0.21	10.99	97.15
	10	10.73 ± 0.56	5.20	107.28
	80	85.98 ± 2.06	2.40	101.15
Intra-day	2	1.89 ± 0.07	3.81	91.80
	10	10.78 ± 0.34	3.17	109.12
	80	86.51 ± 3.74	4.32	109.81

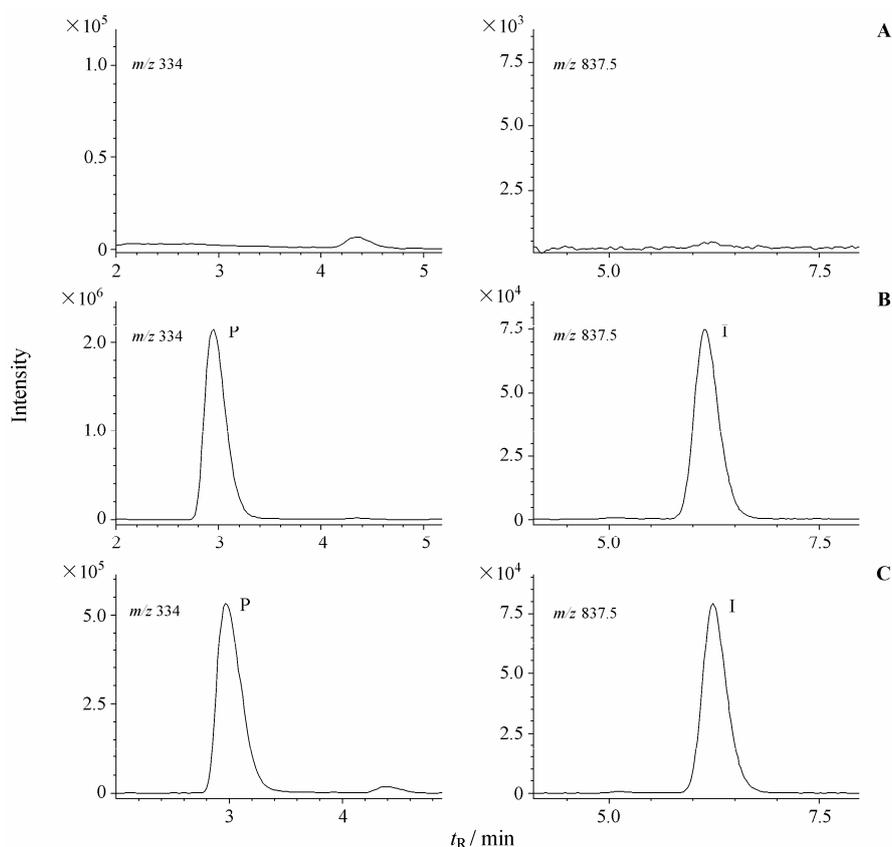


Figure 1 Chromatograms of pentoxyverine and pentoxyverine citrate in human plasma. A: Blank plasma; B: Blank plasma spiked with pentoxyverine citrate ($64\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) and roxithromycin ($200\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$); C: Plasma sample 1.25 h after an oral dose of 50 mg pentoxyverine citrate. P: Pentoxyverine citrate; I: Roxithromycin

1.5 样本稳定性考察 结果表明在所述各试验条件下 RSD 均小于 14.5%, 稳定性好。

1.6 基质效应考察 以峰面积比值计算基质效应, 得枸橼酸喷托维林和内标结果比值均在 85% 和 115% 之间, 表明不存在基质效应。

2 药代动力学研究

枸橼酸喷托维林平均血浆浓度-时间曲线见图 2。20 名受试者口服愈酚维林胶囊供试制剂后, 估算的枸橼酸喷托维林半衰期为 (3.73 ± 2.12) h, 峰时间和峰浓度分别为 (1.20 ± 0.37) h 和 (117.00 ± 53.69) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-36\text{h}}$ 为 (528.10 ± 306.58) $\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ 为 (534.29 ± 311.58) $\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。口服参比制剂后估算的枸橼酸喷托维林半衰期为 (4.41 ± 2.07) h, 峰时间和峰浓度分别为 (1.33 ± 0.31) h 和 (119.11 ± 58.80) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-36\text{h}}$ 为 (574.04 ± 310.98) $\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ 为 (580.97 ± 315.51) $\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。上述结果表明两制剂在吸收速率、吸收程度上具有生物等效性。

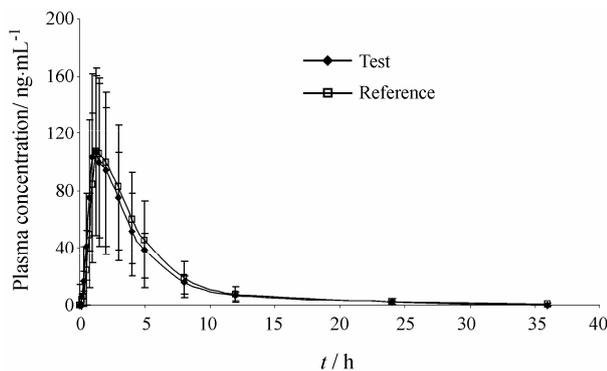


Figure 2 Mean concentration-time curve after oral administration of 50 mg pentoxyverine citrate in 20 healthy volunteers

讨论

目前国内对喷托维林主要是通过 HPLC 方法进行含量测定, 灵敏度较低, 不能满足喷托维林血样样本浓度分析的要求。本实验室在国内首次建立的 LC-ESI/MS 法测定血浆中枸橼酸喷托维林的浓度,

具有快速、简捷、灵敏的特点。通过比较正己烷、乙醚、乙酸乙酯及二氯甲烷等有机溶剂液-液萃取效果, 发现乙酸乙酯液-液萃取时色谱峰良好, 提取率高, 血浆样品处理方法简单、易操作, 杂峰干扰最少。血浆样品通过液-液萃取后, 采用 ESI 源, 通过 SIM 选择性扫描进行定量分析。流动相中加入具有挥发性的醋酸铵, 有利于测试对象的离子化, 提高检测效果: 用 50% 甲醇溶解血浆样品处理后的残渣, 进样后枸橼酸喷托维林的峰形好, 杂峰干扰少, 响应度高。

通过系列的方法学考察, 本方法能满足生物样本分析的要求。20 名受试者口服等剂量的愈酚维林复方制剂后, 两种制剂中该成分在吸收速率与吸收程度方面均具有生物等效。

References

- [1] Wu J. Determination of pentoxyverine citrate tablets by ion-pair RP-HPLC [J]. *China Pharm (中国药师)*, 2008, 11: 1333-1334.
- [2] Jiang Y, Ding XY, Xie Z, et al. RP-HPLC for rapid and simultaneous determination of three components in Yuchuang Weilin Namin capsules [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析)*, 2008, 28: 284-287.
- [3] Yuan HF. Determination of pentoxyverine citrate in guaifenesin pentoxyverine citrate and chlorphenamine maleate tablets by HPLC [J]. *China Pharm (中国药业)*, 2009, 18: 19-20.
- [4] Liu B, Li YJ, Wang JZ, et al. Determination of pentoxyverine citrate by fluorescence [J]. *Chem Res (化学研究)*, 2004, 15: 40-42.
- [5] Zhang HZ, Nie F, Lu JR. Flow injection chemiluminescence method for the determination of pentoxyverine citrate based on NCS-dichlorofluorescein post-chemiluminescence reaction [J]. *Spectrochim Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc*, 2009, 72: 858-862.
- [6] Yin F. Capacitive sensors using electropolymerized *o*-phenylenediamine film doped with ion-pair complex as selective elements for the determination of pentoxyverine [J]. *Talanta*, 2004, 63: 641-646.