

LC-MS 同时测定人血浆中氯哌丁、氯苯那敏和伪麻黄碱

胡晓, 张丽芳, 张红 (南昌大学医学院临床药理研究所, 南昌 330006)

摘要:目的 建立一种同时测定人血浆中氯哌丁、氯苯那敏和伪麻黄碱的 LC-MS, 并用于含上述组分的复方酚咖伪麻胶囊人体药动学研究。方法 以苯海拉明为内标, 血样经乙酸乙酯提取后, 采用 LC-MS 进行测定。色谱柱为 Shim-pack ODS 柱 (150 mm × 2.0 mm, 5 μ m); 流动相为含 0.5% 冰醋酸和 0.5 mmol · L⁻¹ 醋酸铵的水溶液及甲醇; 检测离子为 m/z 330.1 (氯哌丁)、 m/z 275.0 (氯苯那敏)、 m/z 166.0 (伪麻黄碱) 及 m/z 256.15 (内标); 裂解电压为 25 V。结果 氯哌丁、氯苯那敏和伪麻黄碱的线性范围分别为 0.5 ~ 50.0, 0.2 ~ 25.0 和 6.25 ~ 400.0 ng · mL⁻¹; 最低可定量浓度分别为 0.5, 6.25 和 0.2 ng · mL⁻¹; 日内、日间 RSD 小于 10%, 方法回收率均大于 85%。结论 该方法简便, 快速, 重复性好, 灵敏度高, 可用于含氯哌丁、伪麻黄碱和氯苯那敏的复方制剂临床药动学研究。

关键词: 氯哌丁; 氯苯那敏; 伪麻黄碱; 液相色谱-质谱联用; 药动学

中图分类号: R969.11

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2009)02-0106-03

Simultaneous Determination of Cloperastine, Chlorpheniramine and Pseudoephedrine Concentrations in Human Plasma by LC-MS

HU Xiao, ZHANG Lifang, ZHANG Hong (*Institute of Clinical Pharmacology, Medical College of Nanchang University, Nanchang 330006, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an LC-MS for simultaneous determine the concentration of cloperastine, chlorpheniramine and pseudoephedrine in human plasma and to apply this method to the pharmacokinetic and bioavailability study of above components after oral administration of a compound preparation. **METHODS** Using diphenhydramin hydrochloric as internal standard, plasma was extracted with ethyl acetate and separated by a C₁₈ column with the mobile phase of methanol-water (including 0.5% acetic acid and 0.5 mmol · L⁻¹ ammonium acetate). LC-MS was performed in the selected ion monitoring mode using target ions was at m/z 330.1 for cloperastine, m/z 275.0 for chlorpheniramine, m/z 166.0 for pseudoephedrine and m/z 256.15 for diphenhydramin hydrochloric (IS). The fragmentor voltage was 25 V. **RESULTS** The linear range of cloperastine, chlorpheniramine and pseudoephedrine in human plasma were 0.5 ~ 50.0, 0.2 ~ 25.0 and 6.25 ~ 400.0 ng · mL⁻¹, respectively. The limit of determination were 0.5, 6.25 and 0.2 ng · mL⁻¹, respectively. The recoveries of methodology were all more than 85%. The inter-day and intra-day RSD were all less than 10%. **CONCLUSION** This method has good sensitivity and precision. It is shown to be suitable for pharmacokinetics studies of different compound preparations containing low dosage of cloperastine, chlorpheniramine, pseudoephedrine.

KEY WORDS: cloperastine; chlorpheniramine; pseudoephedrine; LC-MS; pharmacokinetics

作者简介: 胡晓, 女, 硕士, 教授 Tel: (0791) 6361195 E-mail: huxiao1185@126.com

复方酚咖伪麻胶囊 (Compound paracetamol caffeine and pseudoephedrine hydrochloride capsule) 是由对乙酰氨基酚, 咖啡因, 盐酸伪麻黄碱, 马来酸氯苯那敏和盐酸氯哌丁等组成的复方制剂, 用于缓解普通感冒或流行性感冒引起的各种症状。上述各组分中, 关于人体血浆中盐酸氯哌丁的检测方法, 国内外均鲜有报道, 更没有和其他组分作为复方制剂同时使用的药动学的研究报道。本试验建立了一种高效、灵敏, 可同时测定人血浆中氯哌丁、氯苯那敏和伪麻黄碱浓度的 LC-MS 法, 可用于复方酚咖伪麻胶囊人体药动学或生物等效性研究。

1 材料与方法

1.1 试药与仪器

甲醇 (色谱纯), Merck 公司生产; 复方酚咖伪麻胶囊供试制剂 (每粒含对乙酰氨基酚 150 mg, 马来酸氯苯那敏 1.25 mg, 盐酸氯哌丁 6 mg, 盐酸伪麻黄碱 15 mg, 咖啡因 12.5 mg, 批号: 060201, 江中药业股份有限公司研制; 盐酸氯哌丁对照品 (批号: 2006328, 纯度: 99.8%) 由江中药业股份有限公司提供; 马来酸氯苯那敏对照品 (批号: 10047-9904, 纯度: 99.8%)、盐酸伪麻黄碱对照品 (批号: 0714-9903, 纯度: 99.7%)、苯海拉明对照品 (批号: 01219202, 纯度: 99.8%) 均购自中国药品生物制品检定所。

岛津 LCMS-2010A 高效液相色谱-质谱联用仪; SCL-10Avp 系统控制器; LC-10ADvp 双泵; SIL-HTc 自动进样器; CTO-10Avp 柱温箱; Milli-Q Gradient A10 超纯水器 (Millipore Inc); Genie Vortex-2 振荡器; Thermo SPD-2010 离心浓缩装置; Sorvall Biofuge Stratos 台式高速冷冻离心机。

1.2 试验方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 Shim-pack ODS 柱 (150 mm × 2.0 mm, 5 μm), 柱温 35 °C。采用梯度洗脱方式: 流动相 A 为含 0.5% 冰醋酸和 0.5 mmol · L⁻¹ 醋酸铵的水溶液, 流动相 B 为甲醇, 流速为 0.2 mL · min⁻¹, 梯度洗脱程序如下: 0 ~ 2.0 min, B: 15%; 2 ~ 5 min, B: 15% ~ 65%; 5.0 ~ 8.0 min, B: 15% ~ 65%; 8.0 ~ 12.0 min, B: 15%。

1.2.2 质谱条件 离子化方式: 电喷雾离子化 (ESI); 选择性离子监测 (selected-ion monitoring, SIM); 曲型脱溶剂装置 (CDL) 温度 250 °C; 加热块 (block) 温度 200 °C; CDL 电压: 25 V; 检测电压: 1.60 kV; 检测离子: 氯哌丁 [M + H]⁺, *m/z* 330.1, 氯苯那敏 [M + H]⁺, *m/z* 275.0, 伪麻黄碱 [M +

H]⁺, *m/z* 166.0, 内标 [M + H]⁺, *m/z* 256.15; 雾化气流速 1.5 L · min⁻¹; 干燥气流速 2.0 L · min⁻¹。

1.2.3 血浆样品的处理

取血浆 0.5 mL, 精密加入 10 μL 内标 (5 μg · mL⁻¹ 苯海拉明), 再加 0.1 mol · L⁻¹ 碳酸钠 300 μL, 混匀后加 5 mL 乙酸乙酯, 振荡 5 min, 10 000 r · min⁻¹, 离心 5 min。取上清液 3.5 mL, 置 50 °C 离心浓缩装置中挥干, 以 200 μL 甲醇溶解残渣, 再经 18 000 r · min⁻¹, 离心 10 min 后, 取 5 μL 进样, 用峰面积进行定量分析。

1.2.4 人体药动学试验设计 获得伦理委员会批准, 20 名男性健康志愿者签署知情同意书, 禁食 12 h 后空腹口服复方酚咖伪麻胶囊供试制剂 3 粒, 并分别于服药前及服药后 0.17, 0.33, 0.67, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 h 于肘静脉采血 4.0 mL 置入肝素抗凝管内, 离心分离血浆, 置于 -20 °C 冷冻保存。

2 结果

2.1 色谱行为

在上述色谱条件下, 氯哌丁、氯苯那敏和伪麻黄碱有较大的色谱峰和较好的分离度, 人血浆中杂质不干扰样品峰, 基线噪音小, 氯哌丁、氯苯那敏、伪麻黄碱和内标的保留时间分别为 7.6, 6.9, 2.1 和 7.2 min。

2.2 线性关系和灵敏度

取空白人血浆 0.5 mL, 加入不同量的盐酸氯哌丁对照品, 使其浓度分别为 0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 和 50.0 ng · mL⁻¹, 然后加入不同量的马来酸氯苯那敏对照品, 使其浓度分别为 0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 和 25.0 ng · mL⁻¹, 再加入不同量的盐酸伪麻黄碱对照品, 使其浓度分别为 0, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0, 400.0 ng · mL⁻¹, 按“1.2.3”项下方法操作, 记录样品和内标峰面积, 利用样品浓度 *C* 对样品与内标的峰面积比 *R* 作直线回归, 分别得氯哌丁的回归方程为 $R = 0.0433C + 0.0091$, $r = 0.9999$ ($n = 5$), 最低可定量浓度为 0.5 ng · mL⁻¹; 氯苯那敏的回归方程为 $R = 0.0233C - 0.0007$, $r = 0.9994$ ($n = 5$), 最低可定量浓度为 0.2 ng · mL⁻¹; 伪麻黄碱的回归方程为 $R = 0.0109C + 0.0039$, $r = 0.9992$ ($n = 5$), 最低可定量浓度为 6.25 ng · mL⁻¹。

2.3 回收率与精密度

取空白人血浆 0.5 mL, 加不同量的盐酸氯哌丁对照品, 使其浓度分别为 1.0, 5.0, 50.0 ng · mL⁻¹, 然后加入不同量的马来酸氯苯那敏对照品, 使其浓

度分别为 0.5, 2.0, 25.0 ng · mL⁻¹, 再加入不同量的盐酸伪麻黄碱对照品, 使其浓度分别为 12.5, 50.0, 400.0 ng · mL⁻¹, 按“1.2.3”项下方法操作, 记录样品与内标峰面积, 并代入到对照品的回归方程, 得到相应的浓度, 批内各浓度测定 5 次, 每日测定 1 批, 连续测定 3 批。结果上述各组份低、中、高浓度标准血样的回收率分别为: 氯哌丁 86.20%, 90.80% 和 88.78%; 氯苯那敏 94.65%, 87.40% 和 87.83%; 伪麻黄碱 90.32%, 89.71% 和 85.32%。各组份批内 RSD 均小于 5.0%, 低、中、高浓度批间 RSD 分别为: 氯哌丁 7.69%, 6.30% 和 3.96%; 氯苯那敏 5.37%, 4.55% 和 1.85%; 伪麻黄碱 3.80%, 4.40% 和 2.12%。

对来自 6 个不同个体的空白人血浆进行介质效应考查, 表明在本实验条件下样品及内标均无介质效应。

2.4 稳定性

取洁净的 Eppendorf 试管, 加 0.5 mL 空白血浆后加不同量的盐酸氯哌丁对照品, 使其浓度分别为 1.0, 10.0 和 40.0 ng · mL⁻¹, 然后加入不同量的马来酸氯苯那敏对照品, 使其浓度分别为 0.5, 5.0 和 20.0 ng · mL⁻¹, 再加入不同量的盐酸伪麻黄碱对照品, 使其浓度分别为 12.5, 100.0 和 400.0 ng · mL⁻¹, 考查在室温放置 6 h、-20 °C 冰箱冷冻 30 d 后再用 37 °C 恒温水浴解冻及反复冻融 3 次条件下血浆样本的稳定性。表明血浆中盐酸氯哌丁、马来酸氯苯那敏和盐酸伪麻黄碱低、中、高浓度的血浆样本在室温放置 6 h、反复冻融 3 次和冻存 30 d 均是稳定的, 测得值与新鲜配置的质控样本值进行比较, 浓度变化均在 85% ~ 115% 内, RSD 均小于 10%。

2.5 方法应用

20 名健康男性志愿者单剂量口服复方酚咖伪麻胶囊供试制剂 3 粒后, 用本法测定血浆中氯哌丁、氯苯那敏和伪麻黄碱浓度, 采用 BAPP 2.0 程序(中国药科大学药代中心编制)计算所得口服复方酚咖伪麻胶囊的主要药动学参数见表 1, 其中 t_{max} , C_{max} 为试验实测值, AUC 以梯形面积法计算, 各成分的主要药动学参数与文献^[14]报道基本一致。

3 讨论

在复方制剂的药动学或生物等效性研究中, 建立同时测定血浆样品中多组分的分析方法, 不仅能缩短临床试验周期, 而且可以减少受试者血浆样品用量。而 HPLC-MS 联用测定法具有灵敏度高, 选择性强, 且多组分同时测定时不需完全分离的特点, 这

使其在复方制剂药动学研究中具有独特的优势。

表 1 口服复方酚咖伪麻胶囊后的主要药动学参数($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Main pharmacokinetic parameters after a single oral administration of compound paracetamol caffeine and pseudoephedrine hydrochloride capsule in 20 volunteers($\bar{x} \pm s$)

参数	氯哌丁	氯苯那敏	伪麻黄碱
t_{max}/h	3.0 ± 0.4	3.1 ± 1.5	1.5 ± 1.0
$t_{1/2}(ke)/h$	26.2 ± 4.8	24.6 ± 6.8	7.5 ± 1.7
MRT/h	34.7 ± 7.4	34.4 ± 9.4	10.4 ± 1.9
$C_{max}/ng \cdot mL^{-1}$	8.7 ± 2.9	7.2 ± 3.1	227.4 ± 60.3
$AUC_{0-7}/ng \cdot h \cdot mL^{-1}$	131.8 ± 53.8	160.6 ± 43.5	2 072.1 ± 369.3
$AUC_{0-\infty}/ng \cdot h \cdot mL^{-1}$	161.1 ± 65.6	187.3 ± 61.2	2 127.4 ± 388.1

虽然, 国内有关于人血浆中氯苯那敏和伪麻黄碱单独或同时测定的 HPLC 及 LC/MS/MS 的文献报道^[14], 但人血浆中盐酸氯哌丁的检测方法在国内外均鲜有报道, 更没有和其他组分作为复方制剂同时使用的药动学的研究报道。本试验建立的同时测定人血浆中盐酸氯哌丁、马来酸氯苯那敏和盐酸伪麻黄碱的 HPLC-MS 选择性高, 且灵敏、快速。血浆中盐酸氯哌丁、马来酸氯苯那敏和盐酸伪麻黄碱最低可定量浓度分别可达到 0.5, 0.2 和 6.25 ng · mL⁻¹。血浆样品经乙酸乙酯萃取后, 采用梯度洗脱并配合电喷雾离子化, 选择性离子监测方式进行定量分析, 血浆中杂质及复方制剂中其他组分不干扰样品峰。可适用于含盐酸氯哌丁、马来酸氯苯那敏和盐酸伪麻黄碱复方制剂的药动学研究。

REFERENCES

[1] QIAO H L, TIAN X, GUO Y Z, et al. Study of relative bioavailability of chlorpheniramine maleate tablets in healthy volunteers [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther (中国临床药理学与治疗学), 2005, 10(12): 1416-1419.

[2] YANG H Y, CHEN X Y, XU H Y, et al. Determination of pseudoephedrine in the human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2001, 18(2): 116-119.

[3] GE Q H, ZHOU Z, ZHI X J, et al. Simultaneous determination of pseudoephedrine and chlorpheniramine in human plasma by HPLC-UV detection method [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2004, 39(4): 281-284.

[4] REN S, CHEN X Y, DUAN X T, et al. Simultaneous determination of ephedrine and chlorpheniramine in human plasma by a highly sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometric method [J]. Acta Pharm Sin (药学报) 2006, 41(2): 188-192.

收稿日期: 2008-01-04