

种因素的作用下,颗粒慢慢聚集变大,因此在 24 h 后显微镜下可见大量细小黄色药物颗粒,并开始沉降吸附在肝癌细胞表面,48 h 后这一现象更为明显,然后在细胞吞噬作用下大量摄取药物颗粒,并在细胞内相关酶系统作用下瞬间释放出大量游离姜黄素,而表现出强烈的细胞杀伤效应,或许这一观点可以解释衍生物 Cur-OA₂ 上述作用现象。

REFERENCES

- [1] SHARMA R A, GESCHER A J, STEWARD W P. Curcumin: the story so far [J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41(13): 1955-1968.
- [2] YU M R, JIANG F S, DING Z S. Advances in studies on curcumin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2009, 40(5): 828-831.
- [3] BACHMEIER B E, KILLIAN P, PFEFFER U, et al. Novel aspects for the application of curcumin in chemoprevention of various cancers [J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2010(2): 697-717.
- [4] ZHENG S S, LI X Y, WANG Z S. Curcumin loaded PCL-PEG-PCL nanoparticle: preparation, characterization and *in vitro* release study [J]. *China J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2012, 29(6): 513-516.
- [5] LI Y, WANG P. Neuroprotective effects of curcumin [J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2009, 34(24): 3173-3175.
- [6] JIANG F S, YU T T, LIU X, et al. Biodistribution of curcumin and its derivatives new aspects for curcumin administration. 2011 International Conference on Remote Sensing, Environment and Transportation Engineering [C]. IEEE, 2011: 3878-3881.
- [7] MA Z, SHAYEGANPOUR A, BROCKS D R, et al. High-performance liquid chromatography analysis of curcumin in rat plasma: application to pharmacokinetics of polymeric micellar formulation of curcumin [J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21(5): 546-552.
- [8] GU J J, DENG Y J, WANG H, et al. Determination of curcumin in rat plasma by RP-HPLC [J]. *J Chengdu Med Col(成都医学院学报)*, 2009, 4(4): 241-244.
- [9] SCHIAVON O, PASUT G, MORO S, et al. PEG-Ara-C conjugates for controlled release [J]. *Eur J Med Chem*, 2004, 39(2): 123-133.
- [10] WANG Y, LI L, JIANG W, et al. Synthesis and evaluation of a DHA and 10-hydroxycamptothecin conjugate [J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13(19): 5592-5599.
- [11] ANAND P, KUNNUMAKKARA A B, NEWMAN R A, et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises [J]. *Mol Pharm*, 2007, 4(6): 807-818.
- [12] WEI X CH, DU Z Y, TU Z Q, et al. Advances in the research of structure-activity relationship of curcumin derivatives and analogues [J]. *Chem Res Appl(化学研究与应用)*, 2010, 22(5): 527-538.
- [13] WANG Y J, PAN M H, CHENG A L, et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1997, 15(12): 1867-1876.
- [14] WAHLSTRÖM B, BLENNOW G. A study on the fate of curcumin in the rat [J]. *Acta Pharmacol Toxicol*, 1978, 43(2): 86-92.
- [15] IRESON C R, JONES D J, ORR S, et al. Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine [J]. *Cancer Epidem Biomark Prevent*, 2002, 11(1): 97-104.
- [16] IRESON C, ORR S, JONES D J, et al. Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in humans and rat hepatocytes and in the rat *in vivo*, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E₂ production [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(3): 1058-1064.
- [17] SHOBA G, JOY D, JOSEPH T, et al. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers [J]. *Planta Med*, 1998, 64(4): 353-356.
- [18] SCHIAVON O, PASUT G, MORO S, et al. PEG-Ara-C conjugates for controlled release [J]. *Eur J Med Chem*, 2004, 39(2): 123-133.

收稿日期: 2012-06-12

溴吡斯的明血药浓度的 HPLC-MS/MS 测定及其在人体的药动学研究

张照伟, 周虹云* (浙江省金华市中心医院, 浙江 金华 321000)

摘要: 目的 建立 HPLC-MS/MS 测定人血浆中溴吡斯的明的药物浓度, 并研究溴吡斯的明片在健康人体内的药动学。方法 采用 HPLC-MS/MS 检测法, 用乙腈沉淀蛋白法处理血浆样本。采用 Shimadzu Shim-Pack VP-ODS 色谱柱(150 mm×2.0 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(含 5 mmol·L⁻¹ 醋酸铵和 0.1% 甲酸), 梯度洗脱; 流速: 0.2 mL·min⁻¹; 采用三重四级杆质谱仪, 电喷雾离子源, 正离子模式, 选择性离子检测, 溴吡斯的明和内标新斯的明的检测离子分别为 *m/z* 181.1→72.2, *m/z* 223.1→208.1。20 名健康受试者口服溴吡斯的明片 60 mg 后, 在不同时间点采集血浆样品, 采用建立的 HPLC-MS/MS 条件测定溴吡斯的明血药浓度, 计算药动学参数。**结果** 溴吡斯的明血药浓度在 0.5~100 ng·min⁻¹ 内样品峰面积比与浓度线性关系良好(*r*=0.996 9), 绝对回收率, 日内、日间精密度, 冷冻、冻融、室温稳定性均符合生物样品分析要求。20 名

作者简介: 张照伟, 女, 硕士, 药师 Tel: 15058504824 E-mail: quhaizhijia@163.com *通信作者: 周虹云, 男, 主管药师 Tel: (0579)82552138 E-mail: hongyunzhou74@163.com

健康受试者口服溴吡斯的明片 60 mg 后的主要药动学参数如下： $C_{\max}$ 为 $(43.26 \pm 10.33) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ； $T_{\max}$ 为 $(1.77 \pm 0.48) \text{ h}$ ； $t_{1/2}$ 为 $(5.11 \pm 0.96) \text{ h}$ ； AUC_{0-1} 为 $(204.8 \pm 64.93) \text{ ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ ； $\text{AUC}_{0-\infty}$ 为 $(212.42 \pm 68.31) \text{ ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结论 该方法简单、准确、灵敏，适用于溴吡斯的明血药浓度测定和药动学研究。

关键词：溴吡斯的明；HPLC-MS/MS；药动学；血药浓度

中图分类号：R969.1

文献标志码：B

文章编号：1007-7693(2013)03-0294-06

Pharmacokinetics of Pyridostigmine Bromide Tablets in Healthy Volunteers Using HPLC-MS/MS Method

ZHANG Zhaowei, ZHOU Hongyun* (Jinhua Central Hospital, Jinhua 321000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC-MS/MS method for determination of the concentration of pyridostigmine bromide in human plasma and to study its application on pharmacokinetic. **METHODS** A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method was developed and validated for the determination and pharmacokinetic study of pyridostigmine bromide in human plasma using neostigmine methylsulfate as internal standard (IS). The chromatographic separation was performed on a SHIMADZU VP-ODS(150 mm×2.0 mm, 5 μm) analytical column using a mobile phase consisting of methanol and water containing 5 mmol·L⁻¹ ammonium acetate and 0.1% formic acid with gradient elution at a flow rate of 0.2 mL·min⁻¹. The detection was carried out on a triple quadrupole tandem mass spectrometer by selective reaction monitoring (SRM) via electrospray ionization interface with positive mode, monitoring the transition of the molecular ions m/z 181.1→72.2 for PB and 233.1→208.1 for IS. **RESULTS** Validation of the method demonstrated that the linear calibration curves covered the range of 0.5–100 ng·mL⁻¹, and the correlation coefficient was 0.996 9. The method was proved to be sensitive, specific, precise, accurate, and robust, revealing that it was appropriate for determination of pyridostigmine bromide in human plasma and successfully applied to the pharmacokinetics study after an oral administration of 60 mg pyridostigmine bromide tablets to twenty Chinese healthy volunteers. The mean of $C_{\max}$ and $T_{\max}$ were $(43.26 \pm 10.33) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(1.77 \pm 0.48) \text{ h}$, respectively. Plasma concentration declined with a $t_{1/2}$ of $(5.11 \pm 0.96) \text{ h}$. AUC_{0-24} and $\text{AUC}_{0-\infty}$ values obtained were $(204.8 \pm 64.93) \text{ ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(212.42 \pm 68.31) \text{ ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. **CONCLUSION** This paper describes a sensitive, specific and robust HPLC-MS/MS method for the determination of pyridostigmine bromide in human plasma. The method offers a simple, economic, rapid and efficient extraction procedure, which is successfully applied to pharmacokinetic studies. The pharmacokinetic parameters in this paper can provide a theoretical basis for clinical medication.

KEY WORDS: pyridostigmine bromide; HPLC-MS/MS; pharmacokinetics; plasma concentration

溴吡斯的明(pyridostigmine bromide), 化学名为溴化-3-二甲氨基甲酰氧基-1-甲基吡啶, 为可逆性胆碱酯酶抑制剂(AchE), 能够可逆性地与胆碱酯酶结合, 使胆碱能神经末梢释放的乙酰胆碱破坏减少, 突触间隙中乙酰胆碱积聚, 出现毒覃碱样(M)和烟碱样(N)胆碱受体兴奋作用。此外, 对运动终板上的烟碱样胆碱受体(N₂受体)有直接兴奋作用, 并能促进运动神经末梢释放乙酰胆碱, 从而提高胃肠道、支气管平滑肌和全身骨骼肌的肌张力^[1-3]。溴吡斯的明是可逆性胆碱酯酶抑制剂的一种离子化的、亲水性的氨基甲酸酯类衍生物, 其化学结构中含有一个带正电荷的“季铵盐”基团, 阻碍其透过血脑屏障, 从而限制了它在中枢神经系统的作用^[4]。目前广泛应用于治疗重症肌无力, 手术后功能性胀气及尿潴留等, 与新斯的明相似, 作用稍弱, 但维持时间较持久, 不良反应少。此外, 溴吡斯的明还可用于治疗有机磷中毒、肥胖、脊

髓灰质炎、痴呆和癫痫等。

国外有文献报道其临床疗效与血药浓度密切相关^[5]。其血药浓度测定方法主要有放射免疫法、气相色谱法、离子对色谱法、高效液相色谱法等^[6-13], 但存在样品处理复杂, 分析时间久, 灵敏度不够高等缺点。与已有文献相比, 本实验采用 LC-MS/MS 测定人血浆中溴吡斯的明浓度, 样品处理简单, 专属性更强, 灵敏度更高, 分析时间短, 并用于研究溴吡斯的明在人体内的药动学特征, 为临床用药合理用药提供依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

溴吡斯的明片(上海三维制药有限公司, 批号: 200909C21, 规格: 60 mg·片⁻¹); 溴吡斯的明对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 101201-200503, 含量: 99.4%); 内标甲硫酸新斯的明(中国药品生物制品检定所, 批号: 100550-

200401, 含量: 99.9%)。甲醇、乙腈均为色谱纯(美国 Tedia 公司); 甲酸和醋酸铵均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司); 去离子水来自纯水机(美国 Thermo 公司)。

1.2 仪器

TSQ QUANTUM ACCESS 三重四极杆串联质谱仪, 配备电喷雾离子源(ESI)源及 Xcalibur 2.0.7 数据处理系统(美国 Thermo Scientific 公司); 岛津 LC-20AD 液相泵, 岛津 CBM-20A 系统控制器, 岛津 CTO-20A 柱温箱, SIL-20AC 自动进样器(日本岛津公司); BS124S 电子天平(赛多利斯公司); XW-80C 旋涡混合器(上海医大仪器厂); 1612-1 高速离心机(上海手术器械厂)。

1.3 色谱及质谱条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱: Shimadzu Shim-pack VP-ODS(2.0 mm×150 mm, 5 μm); 柱温: 40 °C; 流动相: A 为甲醇, B 为水相(含 5 mmol·L⁻¹ 醋酸铵和 0.1% 甲酸), 进行梯度洗脱, 梯度如下: 0~1.0 min, B85%; 1.0~1.5 min, B35%; 1.5~4 min, B35%; 4.0~4.5 min, B85%; 4.5~5.0 min, B85%; 5.5 min; 流速: 0.2 mL·min⁻¹; 进样量: 5 μL。

1.3.2 质谱条件 采用电喷雾离子源正离子模式, 选择性离子检测(SRM), 喷雾电压为 3.5 kV; 加热毛细管温度为 350 °C; 鞘气(N₂)压力为 40 Arb; 辅助气(N₂)压力为 5 Arb; 碰撞气(Ar)压力为 1.5 mTorr; 用于定量分析中的离子反应: 溴吡斯的明(*m/z* 181.1→*m/z* 72.2), 碰撞电压 20 eV; 内标甲硫酸新斯的明(*m/z* 223.1→*m/z* 208.1), 碰撞电压 19 eV。

1.4 对照品和内标储备液的配制

1.4.1 溴吡斯的明对照溶液制备 精密称取溴吡斯的明对照品 50.04 mg 于 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 摇匀, 得到浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的溴吡斯的明标准储备液, 于 4 °C 冰箱中存放备用。

1.4.2 甲硫酸新斯的明(内标)对照溶液配制 精密称取甲硫酸新斯的明对照品 24.94 mg 于 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 配成浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的甲硫酸新斯的明储备液, 于 4 °C 冰箱中存放备用。

1.5 血浆样品处理与测定

精密移取酸化的人血浆样品 250 μL(受试者血浆样品 200 μL+10%的乙酸 50 μL)至 1.5 mL 塑料

离心管, 精密加入 20 μL 内标甲硫酸新斯的明溶液(40 ng·mL⁻¹), 混匀后加入乙腈 600 μL, 涡旋振荡 30 s, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 5 μL, 进行 LC-MS/MS 分析测定。

1.6 标准曲线及质控样品的制备

精密量取溴吡斯的明储备液, 用甲醇稀释成浓度为 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1 000 ng·mL⁻¹ 的对照品溶液。取 1.5 mL 塑料离心管 9 个, 分别精密加入 20 μL 不同浓度的溴吡斯的明标准品溶液, 置 40 °C 恒温水浴挥干, 再加入健康人空白血浆 200 μL, 使溴吡斯的明浓度分别为 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0 ng·mL⁻¹, 然后再加入 10%的乙酸 50 μL 酸化血浆样品, 待处理测定。同法配制 1, 10, 50 ng·mL⁻¹ 的血浆样品, 作为低、中、高浓度的质控样品, 然后再加入 10%的乙酸 50 μL 酸化血浆样品, 待处理测定。

1.7 试验方案

20 名中国健康男性志愿者, 均无烟酒嗜好, 无药物过敏史、药物依赖史及慢性病史, 2 周内未服用任何其他药物, 体质量(64.9±6.8)kg, 身高(172.9±5.6)cm, 年龄(24±2)岁, 经体检合格后参加试验, 并签署知情同意书。本试验方案经医学伦理委员会审批通过。受试者在试验前 2 周及试验期间未服用其他任何药物, 试验期间统一饮食。受试者服药前一天禁食过夜, 试验开始当天早晨空腹口服溴吡斯的明片 60 mg, 于服药前和服药后 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 16.0, 24.0 h 由肘静脉取血样 3 mL, 置肝素化离心试管中混匀, 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上层血浆 200 μL, 加入 10%的乙酸 50 μL 酸化血浆, 于-20 °C 冷冻保存待测。

1.8 数据处理

采用 DAS 2.0 软件处理血药浓度-时间数据, 利用统计矩法得到相应的药动学参数。其中峰浓度(*C*_{max})、达峰时间(*T*_{max})为实测值, 曲线下面积(AUC)用梯形法计算得到。

2 结果

2.1 专属性试验

在色谱质谱条件下测得空白血浆、空白血浆加对照品及内标和受试者给药后血浆色谱图见图 1。结果显示, 溴吡斯的明和内标的峰形良好, 且无内源性杂质干扰。

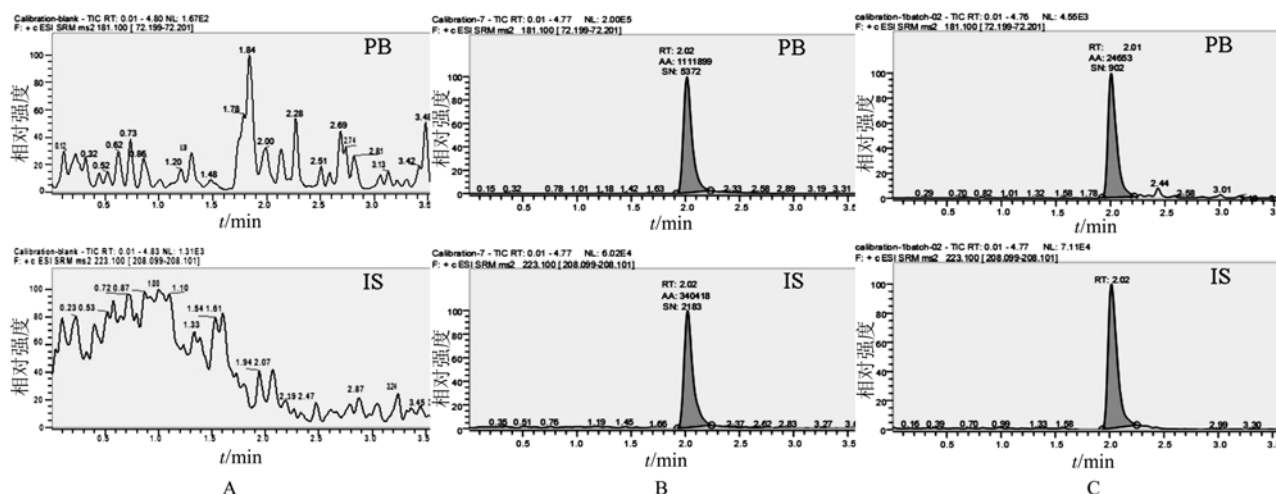


图1 人血浆中的溴吡斯的明和内标的 LC-MS/MS 色谱图

A-空白血浆; B-空白血浆+内标; C-血浆样品

Fig 1 Representative SRM chromatograms of pyridostigmine bromide and IS in human plasma

A-blank plasma; B-blank plasma spiked with pyridostigmine bromide and IS; C-healthy volunteer plasma sample

2.2 标准曲线和最低定量限

以溴吡斯的明峰面积(A_s)和内标峰面积(A_i)的比值(A_s/A_i)对溴吡斯的明血药浓度(C)进行权重回归, 得回归方程: $A_s/A_i = 0.032\,537\,5 + 0.071\,554C$, $r = 0.996\,9$, 权重系数为 $1/C^2$ 。结果表明, 溴吡斯的明血药浓度在 $0.5 \sim 100\, \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好, 最低定量限为 $0.5\, \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($\text{RSD} = 8.46\%$, $n = 6$)。

2.3 精密度试验

按“1.6”项下方法制备 $200\, \mu\text{L}$ 的低、中、高 3 个浓度的血浆样品(分别为 $1, 10, 50\, \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), 然后加入 10% 的乙酸 $50\, \mu\text{L}$ 酸化血浆, 按“1.5”项下方法处理测定。每个浓度配制 5 个平行样本, 进行日内精密度和连续 3 d 的日间精密度考察, 分别计算日内及日间精密度的 RSD 。结果显示, 人血浆中溴吡斯的明的测定方法具有良好的精密度, 见表 1。

表 1 人血浆中溴吡斯的明测定方法的准确度($n = 5$)

Tab 1 Accuracy and precision for pyridostigmine bromide in human plasma samples($n = 5$)

浓度/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	日内 精密度/%	RSD/ %	日间 精密度/%	RSD/ %
1	98.0	5.52	97.0	7.24
10	98.9	3.18	98.7	3.24
50	101.0	1.68	100.7	2.87

2.4 提取回收率

取人空白血浆 $200\, \mu\text{L}$, 按“1.6”项下方法制备低、中、高 3 个浓度(分别为 $1, 5, 50\, \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), 然后加入 10% 的乙酸 $50\, \mu\text{L}$ 酸化血浆, 按“1.5”

项下处理测定; 另取人空白血浆 $200\, \mu\text{L}$ 至 $1.5\, \text{mL}$ 塑料离心管中, 然后加入 10% 的乙酸 $50\, \mu\text{L}$ 酸化血浆, 混匀后加入乙腈 $600\, \mu\text{L}$, 涡旋振荡 $30\, \text{s}$, $12\,000\, \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 $10\, \text{min}$, 取尽上清液至 $1.5\, \text{mL}$ 塑料离心管中, 然后加入溴吡斯的明和内标, 混匀, $12\,000\, \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 $10\, \text{min}$, 取上清液进样测定。每个浓度配制 5 个平行样本, 分别进样测定, 以 2 种方法所获同浓度样液的峰面积比值计算提取回收率。结果测得, 血浆中低、中、高 3 个质量浓度的溴吡斯的明的提取回收率分别为 $(97.1 \pm 3.8)\%$ 、 $(99.3 \pm 1.2)\%$ 和 $(99.7 \pm 1.1)\%$, 内标的提取回收率为 $(95.3 \pm 3.7)\%$ 。

2.5 稳定性考察

按“1.6”项下方法制备 $200\, \mu\text{L}$ 的低、中、高 3 个浓度的血浆样品(分别为 $1, 10, 50\, \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), 然后加入 10% 的乙酸 $50\, \mu\text{L}$ 酸化血浆, 分别进行室温稳定性试验、处理后稳定性试验、冷冻稳定性试验和冻融稳定性试验, 然后按“1.5”项下处理测定。

低、中、高 3 个浓度的血浆样品在室温下放置 $6\, \text{h}$ 回收率分别为 $(98.01 \pm 8.37)\%$ 、 $(94.4 \pm 4.84)\%$ 和 $(94.31 \pm 4.20)\%$; 在 $-20\, ^\circ\text{C}$ /室温反复冻融 3 次, 回收率分别为 $(106.0 \pm 6.00)\%$ 、 $(98.70 \pm 3.20)\%$ 和 $(99.82 \pm 2.30)\%$; 在 $-20\, ^\circ\text{C}$ 冷冻 $20\, \text{d}$, 回收率分别为 $(104.2 \pm 4.86)\%$ 、 $(99.48 \pm 2.32)\%$ 和 $(102.1 \pm 4.59)\%$; 样品处理后在 $4\, ^\circ\text{C}$ 进样器中放置 $24\, \text{h}$, 回收率分别为 $(96.00 \pm 5.16)\%$ 、 $(97.20 \pm 3.97)\%$ 和

(92.08±3.40)%。结果表明溴吡斯的明在上述条件下稳定性均良好。

2.6 基质效应

取人空白血浆 200 μL , 按“1.6”项下方法制备低、中、高 3 个浓度(分别为 1, 5, 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 然后加入 10%的乙酸 50 μL 酸化血浆, 按“1.5”项下方法处理测定, 即得到基质样品数据。取超纯水 200 μL , 按“1.6”项下方法制备低、中、高 3 个浓度(分别为 1, 5, 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 然后加入 10%的乙酸 50 μL 酸化样本, 按“1.5”项下方法处理测定, 即得到对照样品数据。以上 2 种样液每个浓度平行 5 份, 分别进样测定, 以不同浓度的 2 种样液的峰面积比值计算基质效应。结果血浆中低、中、高 3 个浓度的溴吡斯的明的基质效应分别为(99.5±6.7)%、(98.4±2.7)%和(102.1±2.0)%, 内标的基质效应为(102.9±3.4)%。结果表明, 本方法的基质效应可忽略不计。

2.7 血药浓度-时间曲线

20 例受试者单剂口服溴吡斯的明片后的平均血药浓度-时间曲线见图 2。

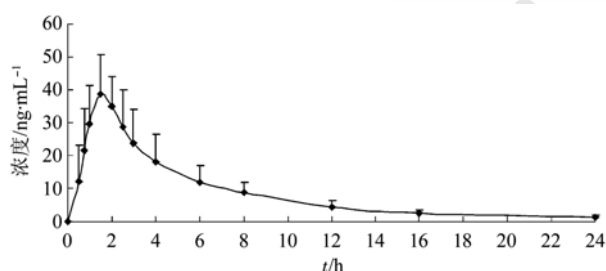


图 2 溴吡斯的明的平均血药浓度-时间曲线($n=20$, $\bar{x}\pm s$)

Fig 2 Average concentration-time curves after oral administration of 60 mg pyridostigmine bromide tablets in 20 healthy volunteers($n=20$, $\bar{x}\pm s$)

2.8 药动学参数

由测得的血药浓度数据, 利用 DAS2.0 软件计算药动学参数。溴吡斯的明在健康人体的药动学参数如下: $C_{\max}$ 为(43.26±10.33) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $T_{\max}$ 为(1.77±0.48)h, AUC_{0-t} 为(204.8±64.93) $\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ 为(212.42±68.31) $\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$, $t_{1/2}$ 为(5.11±0.96)h。

3 讨论

本实验建立了一种灵敏、准确的 HPLC-MS/MS 测定血浆中溴吡斯的明中的浓度, 并且利用该方法研究溴吡斯的明片在人体的药动学。利用串联质谱的高灵敏性和高选择性, 在样品处理

过程中采用直接乙腈沉淀法^[14], 可以达到简单、方便和快捷的目的, 能够满足大批量血浆样品的测定。在稳定性考察中, 笔者发现溴吡斯的明在血浆中不稳定, 而加入乙酸酸化血浆之后溴吡斯的明能够保持稳定, 因此, 在采集受试者的血浆之后, 迅速加入乙酸溶液进行酸化, 来稳定血浆样品。本方法操作简便、重复性好, 灵敏度和专属性高。基质效应, 回收率, 日内、日间精密度和准确度都满足生物样品分析要求, 适用于体内溴吡斯的明血药浓度的测定, 可为今后临床患者血药浓度检测和药动学研究提供方法学依据。

利用本法测定了 20 例健康志愿者单剂量口服溴吡斯的明片 60 mg 后血浆药物浓度, 并对其药动学参数进行计算。结果表明, 溴吡斯的明片在健康人体内吸收迅速, 个别受试者的 AUC 个体差异较大, 故临床应用溴吡斯的明时剂量应个体化。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010) Vol II(中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: Appendix 1089-1091.
- [2] YANG B F, SU D F. Pharmacology(药理学) [M]. 6th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003: 70.
- [3] ZHAO B, MOOCHHALA S M, LU J, et al. Determination of pyridostigmine bromide and its metabolites in biological samples [J]. J Pharm Sci, 2006, 9(11): 71-81.
- [4] HUANG Y T, CHENG C J, LAI T F, et al. An investigation of acetylcholine released in skeletal muscle and protein unbound drug released in blood based on the pyridostigmine bromide (pretreatment drug) sustained-release pellets by microdialysis technique in the rabbit model [J]. Neurosci Lett, 2007, 416(3): 302-306.
- [5] CALVEY T N, CHAN K. Plasma concentration and pharmacological effects of pyridostigmine in patients with myasthenia gravis [J]. Br J Clin Pharmacol, 1977, 4(3): 404.
- [6] ELLIN R I. Method for isolation and determination of pyridostigmine and metabolites in urine and blood [J]. J Chromatogr, 1982(228): 235-244.
- [7] Guidance of Bioavailability and Bioequivalence studies for Chemical Pharmaceutical Preparations in Healthy Volunteers (化学药物制剂人体生物利用度和生物等效性研究技术指导原则) [S]. 2005: 1-27.
- [8] ZHANG J P, GUO C. Bioanalytical methodology validation [J]. China Pharm(中国药师), 2006, 9(4): 3771.
- [9] ZHANG D F. Determination of pyridostigmine bromide in human plasma by reversed phase ion pair chromatography and its application in bioequivalence [J]. Cent South Pharm(中南药学), 2009, 7(4): 285-288.
- [10] BREYER-PFAFF U, MAIER U, BRINKMANN A M, et al. Pyridostigmine kinetics in healthy subjects and patients with myasthenia gravis [J]. Clin Pharmacol Ther, 1985, 37(5): 495-501.
- [11] AQUILONIUS S M, ECKERNAS S A, HARTVIG P, et al. Pharmacokinetics and oral bioavailability of pyridostigmine in man [J]. Eur J Clin Pharmacol, 1980, 18: 423-428.

- [12] POHLMANN J L, COHAN S K. Simplified detection of quaternary ammonium compounds by gas chromatography [J]. J Chromatogr, 1977(131): 297-301.
- [13] NEEDHAM S R, YE B, SMITH J R, ET AL. Richard smith. development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of pyridostigmine bromide from guinea pig plasma [J]. J

Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003, 796(2): 347-354.

- [14] YE Z, ZHOU Q. Assay of Fexofenadine Concentrations in Human Plasma by HPLC with Fluorescence Detector [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2012, 29(8): 736-739.

收稿日期: 2012-07-26

氢化黄原素的质量标准研究

张金钟, 仲婕*, 朱德领, 李保山, 施明珠, 金艳, 殷爱军(杭州天龙药业有限公司, 杭州 310021)

摘要: 目的 建立氢化黄原素质量标准。方法 采用高效液相色谱法(HPLC)测定纯度, 采用薄层色谱法(TLC)进行鉴别; 并对干燥失重和灼烧残渣进行限度控制。结果 氢化黄原素的 TLC 斑点清晰, 专属性强; HPLC 主峰与相邻杂质分离度 >1.5, 主峰的重现性、日内精密度分别为 0.72%, 1.04%; 干燥失重不超过 3%, 灼烧残渣不超过 0.5%。结论 所建立的方法专属性好, 操作方便, 重现性好, 结果可靠, 可用于氢化黄原素的质量控制。

关键词: 氢化黄原素; 质量标准; 纯度测定; 鉴别方法

中图分类号: R927.11

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)03-0299-04

Study on Quality Standard for Xanthane Hydride

ZHANG Jinzhong, ZHONG Jie*, ZHU Deling, LI Baoshan, SHI Mingzhu, JIN Yan, YIN Aijun (Hangzhou Tianlong Pharmaceutical Co. Ltd., Hangzhou 310021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the quality standards for xanthane hydride. **METHODS** The xanthane hydride was identified by thin layer chromatography(TLC), and its purity was determined by HPLC. **RESULTS** The TLC spots were clear and specific. The HPLC method results showed that, the degree of the separation between xanthane hydride and the next impurity was >1.5. The precision and repeatability were 0.72% and 1.04%, respectively. The loss on drying was less than 3% and the residue on ignition was lower than 0.5%. **CONCLUSION** A quick, easy and accurate method was established and used in the process of oligonucleotides synthesis.

KEY WORDS: xanthane hydride; quality standards; purity determination; identification

氢化黄原素, 别名 3-氨基-1,2,4-二噻唑-5-硫酮, 分子式 $C_2H_2N_2S_3$, 黄色晶体, 常用于有机合成, 是硫代反义寡核苷酸固相合成的硫代步骤中常用的硫代试剂之一。硫代反义寡核苷酸是用硫原子将反义寡核苷酸磷酸骨架上的非成键氧原子取代而形成的一类反义寡核苷酸类似物, 由于寡核苷酸硫代修饰以后, 克服了反义寡核苷酸在血清中被酶降解的特性^[1], 因此在治疗癌症以及抑制基因的表达方面有着重要的作用^[2-4]。在硫代寡核苷酸的固相合成中, 一旦载体上的寡核苷酸与亚磷酸胺核苷偶联以后, 就需要对新偶联上的核苷酸硫代氧化, 硫代反应的收率影响硫代反义寡核

苷酸的产品纯度, 硫代的不完全会引入氧代的杂质, 因此硫代试剂的质量对硫代反义寡核苷酸的合成以及终产品的含量有着重要的影响。

目前, 氢化黄原素的质量标准未见有报道, 而且国标和中国药典均未收载其质量标准。作为一个重要的寡核苷酸合成原料, 本实验室对氢化黄原素的质量标准进行了研究。

1 主要仪器和试剂

Varian Inova 600 超导高分辨核磁共振谱仪(美国 VARIAN); Waters 2695 高效液相色谱仪带 Waters-2490 二极管阵列检测器(美国 Waters 公司); Ultimate-3000 高效液相色谱仪带 Ultimate-

基金项目: “十二五”国家重大新药创制科技重大专项(2011ZX09102-001-07、2011ZX09102-009-09)

作者简介: 张金钟, 男, 硕士, 工程师 Tel: (0571)81635631 E-mail: zhjzhong1975@gmail.com *通信作者: 仲婕, 女, 副研究员, 硕士 Tel: (0571)81635632 E-mail: law1022@163.com