

4.3 分离条件的优化

本实验曾分别以甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.5%冰醋酸、乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相,综合考察基线噪音、拖尾、分离度等因素,最终选择乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相。

本试验以清清颗粒为例,通过方法学验证、“一测多评”准确性的评价和方法的耐用性考察,对“一测多评”法应用于中药复方制剂的技术适用性及可行性进行了探讨。结果表明,采用“一测多评”法计算的结果与外标法所得结果无显著性差异,说明建立的不同化合物之间的校正因子具有较高的可信度,可在仅有1个对照品时,实现同步测定复方中多指标成分,为清清颗粒多指标质量控制模式提供新方法。

REFERENCES

[1] WANG Z M, GAO H M, FU X T, et al. Multi-components quantitation by one marker new method for quality evaluation of Chinese herbal medicine [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2006, 31(23): 1925-1928.
[2] REN A N, GAO R, TIAN Y Z. Optimization of extraction

technology for Qingqing granule by multi-index comprehensive evaluation method [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2008, 30(7): 1059-1062.
[3] BAO T D, LI Y J, YANG Q, et al. LC/MS determination of berberine and palmatin in rats plasma after oral administration of extracts Rhizoma Coptidis and its pharmacokinetics study [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2010, 16(13): 186-189.
[4] SHU J F. Determination of scopoletin, baicalin, baicalein and farrerol in Qinbaohong Zhike capsule by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(9): 1114-1117
[5] YANG L, XU Y J, TIAN R T, et al. HPLC fingerprinting of Radix Paeoniae Alba [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2007, 42(1): 71-74.
[6] WANG Y, YUAN J, XIAO J, et al. Pharmacokinetics of activeingredient of Radix Glycyrrhizae in rats with oral administration of Banxia Xinxin decoction and its different compatibilities [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 32(8): 1331-1338.
[7] DING L Y, ZHOU L, WANG L N, et al. Multi-components quantitation by one marker for simultaneous content determination of four components in *Psoralea corylifolia* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(5): 152-154.
[8] LAI Z F, XIA L Z. Determination of costuslactone in Muxiang Shunqi pills by QAMS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(4): 421-424.

收稿日期: 2014-06-11

衍生化 LC-MS 测定人血浆中消旋卡多曲活性代谢物浓度及生物等效性

俞佳¹, 马珂^{2*}, 袁京群³, 祁金文¹, 郑水莲¹, 毛小红¹(1.浙江省人民医院药学部, 杭州 310014; 2.浙江大学医学院附属邵逸夫医院药剂科, 杭州 310016; 3.浙江大学分析测试中心, 杭州 310029)

摘要:目的 建立一种衍生化 LC-MS 检测人血浆中消旋卡多曲活性代谢物 thiorphan(TP)浓度,同时评价消旋卡多曲 2 种规格散剂(10 mg·袋⁻¹和 30 mg·袋⁻¹)和国产颗粒剂在健康人体内的药动学及生物等效性。方法 采用 3 制剂 3 周期二重 3 × 3 拉丁方设计, 18 名健康男性志愿者交叉单剂量口服受试制剂 2 种规格消旋卡多曲散(10 mg·袋⁻¹和 30 mg·袋⁻¹)和参比制剂消旋卡多曲颗粒剂各 300 mg 后, 采用衍生化 LC-MS 测定不同时间血浆中活性代谢物 TP 浓度, 用 DAS 药动学程序进行药动学参数的计算及生物等效性评价。血浆样品中加入 p-BPB 衍生化试剂, 得到稳定的 TP 衍生化产物, 经乙酸乙酯萃取后, 选替米沙坦作内标。色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈(150 mm×2.1 mm, 5 μm); 流动相为 5 mmol·L⁻¹ 甲酸铵(甲酸调节 pH 至 3.0)-乙腈(45:55); 流速为 0.2 mL·min⁻¹; 采用 ESI+SRM 方式监测; TP 衍生化产物 *m/z* 452.10[M+H]⁺, 内标替米沙坦 *m/z* 515.30[M+H]⁺。结果 TP 线性范围为 6.28~1 256 ng·mL⁻¹, 最低检测浓度为 6.28 ng·mL⁻¹, 提取回收率在 77.5%~80.4%, 日内、日间精密度 RSD<15%。受试制剂消旋卡多曲散(10 mg·袋⁻¹), 消旋卡多曲散(30 mg·袋⁻¹)和参比制剂消旋卡多曲颗粒剂的主要药动学参数: *T*_{max} 分别为(1.8±1.2), (1.9±1.3)和(0.7±0.2)h, *t*_{1/2} 分别为(1.4±0.4), (1.2±0.7)和(1.1±0.8)h, *C*_{max} 分别为(802.0±356.5), (804.2±459.8)和(845.6±285.8)ng·mL⁻¹, *AUC*₀₋₈ 分别为(1 617.0±532.6), (1 628.9±672.1)和(1 621.0±532.2)ng·h·mL⁻¹, *AUC*_{0-∞} 分别为(1690.8±567.2), (1673.8±681.7)和(1 649.4±561.4)ng·h·mL⁻¹。2 种受试制剂的相对生物利用度分别为 99.8%和 100.5%。结论 本方法灵敏, 有效, 可准确检测人体血浆中 TP 的浓度。2 种受试制剂和

作者简介: 俞佳, 女, 硕士, 副主任药师
(0571)86006800 E-mail: srrshmake@126.com

Tel: (0571)85893117

E-mail: ymfz@126.com

*通信作者: 马珂, 女, 主任药师

Tel:

参比制剂具有生物等效性。

关键词: 消旋卡多曲; LC/MS; 血药浓度; 药动学; 生物等效性; 衍生化

中图分类号: R917.101; R969.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)03-0323-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.03.017

Determination of Racecadotril's Active Metabolite by a New Derivative LC-MS Method and Their Bioequivalence in Healthy Chinese Volunteers

YU Jia¹, MA Ke^{2*}, YUAN Jingqun³, QI Jinwen¹, ZHENG Shuilian¹, MAO Xiaohong¹(1.Department of Pharmacy, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, China; 2.Department of Pharmacy, Sir Run Run Shaw Hospital Affiliated to School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China; 3.Center of Analysis and Measurement of Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a LC/MS test method for determining the concentration of thiorphan(TP, the active metabolite of racecadotril) in the human plasma, the pharmacokinetics and bioequivalence of two racecadotril pulvis(10 mg, 30 mg) and racecadotril granule(10 mg) in healthy human body. **METHODS** A single oral dose 300 mg of three preparations was randomly given to 18 healthy volunteers in a three cycle duplex 3×3 latin square crossover design. The concentration of TP in plasma, which was an active metabolite of racecadotril, was determined by LC-MS at different time. The pharmacokinetics parameters were calculated and the bioequivalence of three formulations were evaluated by DAS program. The p-BPB was added to the plasma as a derivative agent to achieve a stable TP-derivative. The TP-derivative was then extracted from the plasma using ethyl acetate. The method used telmisartan as internal standard material. In the test method, Zorbax SB-C₁₈(150 mm×2.1 mm, 5 μm) was used as chromatogram column, 5 mmol·L⁻¹ ammonium formate(adjust pH to 3.0 with formic acid)-acetonitrile (45 : 55) as mobile phase, the flow rate 0.2 mL·min⁻¹, ESI+SRM as detector. **RESULTS** The analytical method validation of TP was as follows: linear range 6.28–1 256 ng·mL⁻¹, detection limit 6.28 ng·mL⁻¹, extraction rate 77.5%–80.4%, precision of within and between day(RSD) both <15%. The main pharmacokinetic parameters of racecadotril pulvis(10 mg), racecadotril pulvis(30 mg) and reference granules were as follows: T_{max} (1.8±1.2), (1.9±1.3) and (0.7±0.2)h, $t_{1/2}$ (1.4±0.4), (1.2±0.7) and (1.1±0.8)h, C_{max} (802.0±356.5), (804.2±459.8) and (845.6±285.8)ng·mL⁻¹, AUC_{0-8} (1 617.0±532.6), (1 628.9±672.1) and (1 621.0±532.2)ng·h·mL⁻¹, $AUC_{0-∞}$ (1 690.8±567.2), (1 673.8±681.7) and (1 649.4±561.4)ng·h·mL⁻¹, respectively. The relative bioavailability of 2 test pulvis versus reference granule were 99.8% and 100.5%, respectively. **CONCLUSION** The test method of determining the concentration of TP in human plasma is sensitive and precise. Study shows that the two test racecadotril pulvises are bioequivalent to reference granule.

KEY WORDS: racecadotril; LC/MS; plasma concentration; pharmacokinetics; bioequivalence; derivarization

消旋卡多曲是一种新型作用机制的抗腹泻药,由法国 Bioproject 公司开发,1993 年首先在法国上市,商品名 Tiorfan。消旋卡多曲为前体药物,经胃肠吸收后迅速水解成活性代谢物 Thiorphan(TP),化学名为(R, S)-N-(1-氧代-2-巯甲基-3-苯丙基甘氨酸),是脑啡肽酶的选择性抑制剂,通过抑制脑啡肽酶的活性,激活胃肠道黏膜细胞上的 δ 阿片受体,阻止 PGE₂(前列腺素 2)诱导的结肠腺苷酸环化酶的激活,引起黏膜细胞内 cAMP 水平的降低,进而抑制水和电解质过度分泌达到抗腹泻的作用^[1-3]。

TP 结构中含有一个游离的巯基,极易被氧化成二硫化物。文献报道的测定 TP 采用的方法有 HPLC-UV^[4-7]和 HPLC-MS/MS^[8-11]。本实验采用新建立的衍生化 LC-MS 测定人血浆中 TP 的浓度,

以四川百利药业有限责任公司生产的消旋卡多曲颗粒剂(商品名:杜拉宝,10 mg·袋⁻¹)为参比制剂,对万特制药(海南)有限公司生产的2种规格消旋卡多曲散(10 mg·袋⁻¹和 30 mg·袋⁻¹)的生物利用度和生物等效性进行研究,以供临床用药参考。

1 材料与方法

1.1 仪器

Agilent HP1100LC-MSD 高效液相色谱-质谱联用仪(含 Agilent1100 二元输液泵,柱温箱,自动进样器,电喷雾离子化接口的四极杆质谱检测器,色谱工作站 Agilent ChemStation); XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂); Biofuge stratos 高速冷冻离心机(美国 SORVALL 公司); 吉尔森可调移液枪(美国吉尔森公司); AX-205 电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; MDF-U32V 超低

温冰箱(日本三洋公司)。

1.2 药品和试剂

TP 对照品(Fluka 公司, 批号: 508421, 含量: 99.8%); 受试制剂 A[消旋卡多曲散, 批号: 041201, 规格: 10 mg·袋⁻¹]、受试制剂 B[消旋卡多曲散, 批号: 041201, 规格: 30 mg·袋⁻¹]均由万特制药(海南)有限公司生产研制; 参比制剂 R[消旋卡多曲颗粒剂(商品名为“杜拉宝”), 四川百利药业有限责任公司, 批号: 050402, 规格: 10 mg·袋⁻¹]; 受试制剂和参比制剂检验质量均合格; 内标替米沙坦对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 10178-0005, 含量: 99.50%); 空白血浆(浙江省血液中心)。对溴苯甲酰甲基溴(*p*-BPB, 美国 Sigma-Aldrich 公司, 含量: 98%); 色谱纯乙腈(德国 Merck 公司); 实验用水均为娃哈哈饮用纯净水, 其余试剂均为分析纯。

1.3 实验设计

本研究试验制剂和参比制剂同为普通制剂, 故本试验只进行单次口服给药的单中心试验, 采用随机、开放、3 制剂 3 周期二重 3×3 拉丁方设计。受试者共 18 名健康男性, 平均年龄为(21±1)岁, 身高(170±5)cm, 体质量(61.2±4.7)kg, BMI 为 20.7±0.9。试验前经病史询问, 体格检查和实验室检查证明健康。受试者无药物过敏史和药物依赖史, 无精神病史以及其他慢性病史。受试前 2 周及试验期间未服用其他药物, 试验期间戒烟、酒和过分油腻食物, 试验期间饮食统一。受试者在试验前对试验过程及可能发生的不良反应完全了解, 签署知情同意书。试验经浙江省人民医院伦理委员会同意后, 采用 DAS2.0 软件将受试者随机分为 6 组, 每组 3 人, 分 3 个周期交叉口服受试制剂 A、受试制剂 B 或参比制剂 R, 并由医生监护服药后反应情况。每次试验间隔为 7 d。受试者于受试的前晚起禁食 12 h, 禁水 2 h。于次日晨 7:30 分别空腹口服受试制剂 A、受试制剂 B、参比制剂 R, 剂量均为 300 mg·人⁻¹, 用 250 mL 温开水送服。服药 2 h 后方可饮水, 4 h 后统一进标准餐。受试者于服药前(0 h)及服药后 0.25, 0.50, 1.0, 1.25, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8 h 肘静脉取血 3 mL, 立即置含有 0.1 mol·L⁻¹ EDTA 50 μL 和 0.2 mol·L⁻¹ 抗坏血酸 50 μL 混合溶液的肝素抗凝试管中, 4 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 立即分离血浆 500 μL 共 3 份, 其中 1 份至 15 mL 塑料离心管中, 加入衍生

化试剂 100 mg·mL⁻¹ *p*-BPB 乙腈溶液 100 μL, 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 50 μL, 涡旋混合(从采血至加入 NaOH 混合后操作时间<15 min), 于暗处反应 30 min, 再加入 1 mol·L⁻¹ HCl 75 μL, 涡旋混合后, 并于-80 °C 保存供血药浓度测定用, 另 2 份同法平行操作^[12]。18 例入选的受试者全部完成试验。

1.4 血药浓度测定

1.4.1 TP 对照品溶液的配制 精确称取 TP 对照品适量, 以乙腈溶解, 定量配制成 62.8 μg·mL⁻¹ 贮备液, 密封-20 °C 保存。用乙腈依次稀释 TP 贮备液, 获得浓度依次为 31.4, 15.7, 3.14, 0.628 和 0.314 μg·mL⁻¹ 对照品系列溶液(临时配制)。

1.4.2 内标溶液配制 精密称取 10.30 mg 替米沙坦对照品, 置于 100 mL 量瓶, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 颠倒及振荡摇匀, 得到 103 μg·mL⁻¹ 替米沙坦贮备液, 密封-20 °C 保存。用乙腈稀释至 5.15 μg·mL⁻¹ 作为内标 TP 工作液(临时配制)。

1.4.3 未知血样处理及测定 未知血浆样品解冻后加入 1 mol·L⁻¹ HCl 150 μL 及内标替米沙坦溶液 5.15 μg·mL⁻¹ 50 μL, 旋涡混合 30 s, 加入乙酸乙酯 5 mL, 涡旋振荡 5 min, 5 500 r·min⁻¹ 离心 20 min。置-20 °C 冰箱冷冻 40 min 后, 转移上清液, N₂ 吹干。残留物用 100 μL 流动相溶液涡旋 1 min 溶解, 20 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液 20 μL 进 HPLC-MS 测定。

1.4.4 已知血样处理及测定 取 500 μL 血浆, 加入 50 μL 0.2 mol·L⁻¹ 抗坏血酸及 50 μL 0.1 mol·L⁻¹ EDTA-2Na, 置 15 mL 具塞离心试管中, 迅速加入 100 mg·mL⁻¹ *p*-BPB 乙腈溶液, 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 50 μL, 旋涡混合, 于暗处反应 15 min, 加入 1 mol·L⁻¹ HCl 225 μL 及内标替米沙坦溶液 5.15 μg·mL⁻¹ 50 μL, 旋涡混合 30 s, 按“1.4.3”项下“加入乙酸乙酯 5 mL”起同样操作。

1.4.5 色谱与质谱条件 色谱条件: 预柱: C₈ (10 mm×2.1 mm, 5 μm); 分析柱: Zorbax SB-C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 5 μm); 流动相: 5 mmol·L⁻¹ 甲酸铵(甲酸调节 pH 至 3.0)-乙腈(45:55); 流速: 0.2 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μL; 柱温: 35 °C。

质谱条件: 离子源为电喷雾离子源(ESI 源), 正离子检测, 保护气 N₂ 流速 13 L·min⁻¹, 干燥气温度 350 °C, 雾化气压力 30 psi, 毛细管电压 4 000 V, 选择性离子检测(SRM): TP 衍生化产物 *m/z* 452.10[M+H]⁺, 内标替米沙坦 *m/z* 515.30 [M+H]⁺, 碎片电压 100 V。相关离子的质谱图见图 1。

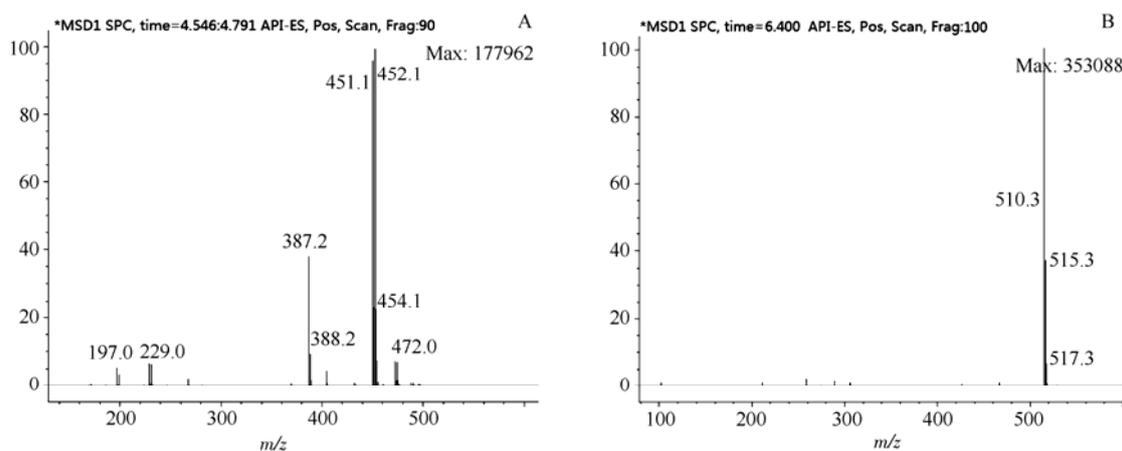


图1 TP衍生物和内标替米沙坦的产物 $[M+H]^+$ 离子全扫描质谱图
A-TP衍生物; B-替米沙坦。

Fig. 1 MS scan image of TP derivative and internal standard telmisartan $[M+H]^+$
A-TP derivative; B-telmisartan.

1.4.6 TP衍生物(TP-*p*-BPB)的合成^[13] 称取TP对照品0.13 g和*p*-BPB 0.16 g溶于甲醇10 mL中,加入 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH溶液调节pH至7.0,于70 °C水浴中回流1 h,于室温下氮气流吹干,用磷酸盐缓冲液(pH 7.0) 10 mL溶解,再用乙酸乙酯10 mL洗涤2次,水层用 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸调节pH至2.0,再用乙酸乙酯10 mL洗涤2次,合并有机层,于室温下氮气流吹干,即得白色结晶产物,经¹H-NMR验证,产物即TP的衍生化产物。

1.5 统计学处理

用DAS 2.0软件处理血药浓度数据,求算各主要药动学参数,对数转换后的 C_{\max} 、AUC进行方差分析和双单侧*t*检验,对 T_{\max} 进行非参数检验,评价和判断药物间的生物等效性。

2 结果

2.1 测定方法的确证

2.1.1 方法专属性 分别取6名受试者的空白血浆500 μL,除不加内标外,按“1.4.4”项下方法操作,进行LC-MS分析,获得空白血浆样品的色谱图,见图2A。将一定浓度的对照品溶液、内标溶液加入空白血浆中,同法操作,得色谱图,分别见图2B、2C。其中TP衍生化产物的保留时间为6.3 min,内标替米沙坦的保留时间为6.2 min;取健康受试者给药后收集的血浆样品,按“1.4.3”项下方法操作,得色谱图,见图2D。结果表明,空白血浆中内源性物质不干扰待测物TP衍生化

产物及内标替米沙坦的测定。

2.1.2 标准曲线和定量下限 取空白血浆,加TP对照品系列溶液,配成血浆中含TP分别为6.28, 12.56, 62.8, 314, 628和1 256 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆样品,按“1.4.4”项下方法操作,进行LC-MS分析,记录色谱图。以待测物与内标物的峰面积比值为横坐标,待测物浓度为纵坐标,用加权($W=1/X$)最小二乘法进行回归运算,求得直接回归方程即为标准曲线: $Y=1.598+313.099X$, $r=0.991$,TP在6.28~1 256 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

取空白血浆,加入TP 628 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品溶液,配制成相当于TP血浆浓度为6.28 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品,进行5样本分析,并根据随行标准曲线计算每一样本的测得浓度,求得该浓度下TP的RSD为11.97%,平均相对偏差为4.01%。该结果表明LC-MS测定血浆中TP的定量下限可达6.28 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($S/N=10:1$)。

2.1.3 精密度和回收率 配制低、中、高不同浓度TP(12.56, 314和1 256 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的质量控制(QC)样品,日内每个浓度各做6份,隔日每个浓度平行各做3份,连续4 d,按“1.4.4”项下方法操作,以随行标准曲线计算方法回收率、日内、日间精密度。结果见表1。试验表明,TP低、中、高浓度的日内RSD为0.9%~8.0%,日间RSD为8.3%~14.1%,均<15%。回收率为97.0%~111.8%,本试验所建立的LC-MS测定TP的日内和日间精密度达到试验要求。

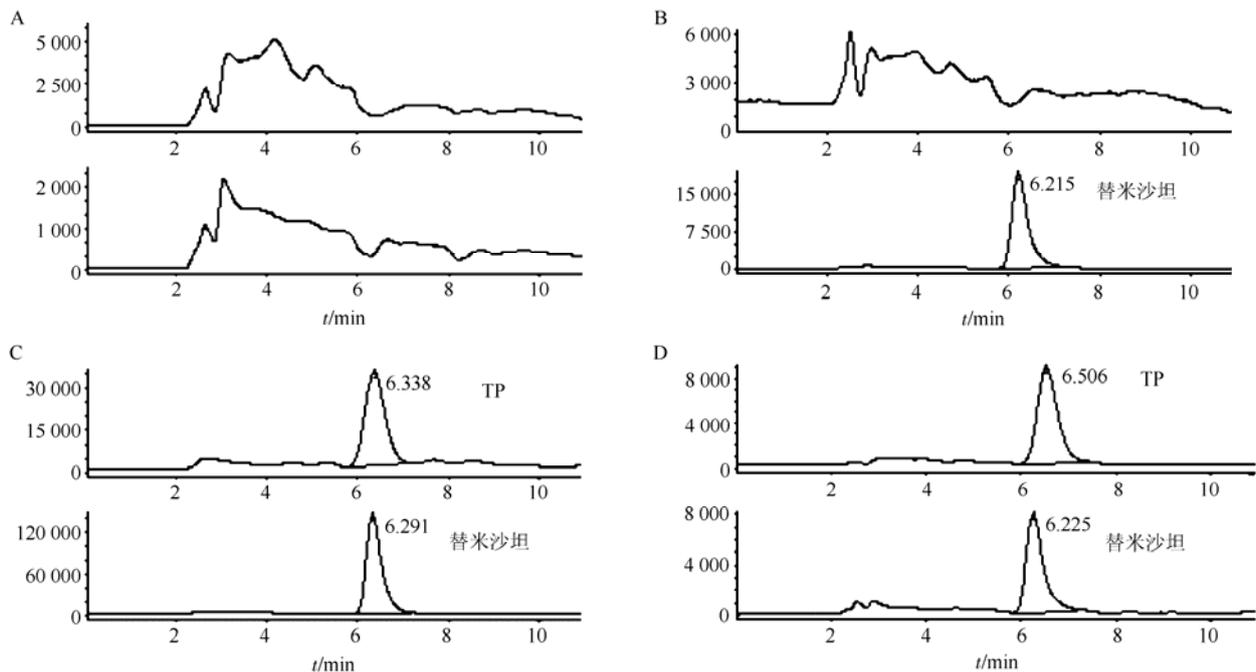


图 2 测定血浆中 TP 衍生产物和内标替米沙坦的典型色谱图

A-空白血浆; B-空白血浆中加入内标替米沙坦; C-空白血浆中加入 TP 和内标替米沙坦; D-受试者服用卡多曲受试制剂 30 min 后血浆样品。

Fig. 2 Typical chromatograph image of TP derivative and internal standard telmisartan in plasma

A-blank plasma; B-blank plasma + internal standard telmisartan; C-blank plasma + TP + internal standard telmisartan; D-30 min plasma sample after volunteer administered the racecadotril test formulation.

表 1 LC/MS 法测定血浆中 TP 的精密度、回收率和提取回收率

Tab. 1 Precision, accuracy and extraction recovery of TP in plasma determined by LC/MS

药品	浓度/ ng·mL ⁻¹	精密度		回收率/% (n=6)	提取回收率(n=5)	
		日内 RSD/% (n=6)	日间 RSD/% (n=18)		平均值/ %	RSD/ %
TP	12.56	8.0	14.1	97.0±7.8	79.1±5.9	7.5
	314	6.8	8.3	106.5±7.2	80.4±8.7	10.8
	1 256	0.9	11.1	111.8±1.0	77.5±8.5	11.0
替米沙坦	515				80.8±1.9	2.31

2.1.4 提取回收率 取空白血浆, 按“2.2.2”项下方法制备 TP 低、中、高 3 个浓度(12.56, 314 和 1 256 ng·mL⁻¹)的样品, 每一浓度进行 5 样本分析。同时以相应浓度的 TP 衍生物产物和内标进行色谱分析, 以每一浓度 2 种处理方法的峰面积比值计算提取回收率。结果见表 1。TP 血浆样品的提取回收率均>75%, RSD<15%。内标替米沙坦的提取回收率>80%, RSD<10%。

2.1.5 基质效应 取 5 个不同来源受试者空白血浆 500 μL, 经液-液萃取处理后, 残渣加入 TP 衍生物产物(对应 TP 血浆浓度 12.56, 314 和 1 256 ng·mL⁻¹)和内标溶液(对应内标替米沙坦血

浆浓度 515 ng·mL⁻¹)进行 LC-MS 分析, 获得相应峰面积, 与相同溶液直接进样的峰面积之比计算基质效应, 数据见表 2。结果表明本方法的基质效应可忽略不计。

表 2 LC/MS 法测定血浆中 TP 和替米沙坦的基质效应(n=5)

Tab. 2 Matrix effect of TP and telmisartan in plasma determined by LC/MS(n=5)

药品	浓度/ng·mL ⁻¹	基质效应/%	RSD/%
TP	12.56	80.0±4.8	6.0
	314	81.6±4.3	5.3
	1256	83.7±1.1	1.3
替米沙坦	515	86.0±1.9	2.2

2.1.6 稳定性考察 本试验考察从采血到加入衍生试剂的时间间隔为 15 min 时, 血浆药物含量的稳定性。取空白血浆 6 份, 按“2.2.2”项下方法配制中浓度的 TP 血浆样品(314 ng·mL⁻¹) 500 μL, 加入 50 μL 0.2 mol·L⁻¹ 抗坏血酸及 50 μL 0.1 mol·L⁻¹ EDTA-2Na, 置 15 mL 具塞离心试管中, 其中 3 份迅速加入 100 mg·mL⁻¹ p-BPB 乙腈溶液 100 μL, 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 50 μL, 涡旋混合(从采血至加入 NaOH 混合后操作时间<15 min), 于暗处反应 15 min 后加入 225 μL 1 mol·L⁻¹ HCl, 另 3 份

在 15 min 时加入 100 mg·mL⁻¹ *p*-BPB 乙腈溶液 100 μL, 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 50 μL, 涡旋混合, 于暗处反应 30 min 后加入 225 μL 1 mol·L⁻¹ HCl, 接着 6 份血样均按“1.4.4”自“加入内标替米沙坦”起同样操作, 结果表明衍生试剂在 15 min 内加入不影响药物含量的测定(RSD 为 1.66%)。

考察血浆样品衍生反应后在-80 °C 冷冻放置 30 d 的稳定性和经液-液萃取处理后的血浆样品进样液室温放置 48 h 的稳定性。冷冻稳定性考察时, 取空白血浆 500 μL, 按“2.2.2”项下方法配制 TP 低、中、高 3 个浓度的血浆样品(12.56, 314 和 1 256 ng·mL⁻¹)500 μL 各 3 份, 分别加入 50 μL 0.2 mol·L⁻¹ 抗坏血酸及 50 μL 0.1 mol·L⁻¹ EDTA-2Na, 置 15 mL 具塞离心试管中, 迅速加入 100 mg·mL⁻¹ *p*-BPB 乙腈溶液 100 μL, 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 50 μL, 涡旋混合, 于暗处反应 15 min, 加入 1 mol·L⁻¹ HCl 75 μL, 放入-80 °C 冰箱冷冻保存。于 0, 15, 30 d 各浓度分别取 1 份解冻后, 按“1.4.3”项下方法进行 HPLC-MS 测定。数据表明 TP 血浆样品-80 °C 冷冻放置 30 d 稳定(RSD 均 <15%); 进样液稳定性考察时, 配制 TP 低、中、高 3 个浓度的血浆样品(12.56, 314 和 1 256 ng·mL⁻¹)500 μL 各 1 份, 按“1.4.3”所得进样液室温放置, 于 0, 24 和 48 h 进行 HPLC-MS 测定, 数据表明进样液在室温放置 48 h 稳定(RSD 均 <15%)。

2.2 生物等效性评价

2.2.1 血药浓度-时间曲线 18 名健康受试者自身交叉单剂量口服 3 种消旋卡多曲制剂后, 平均血药浓度-时间曲线见图 3。

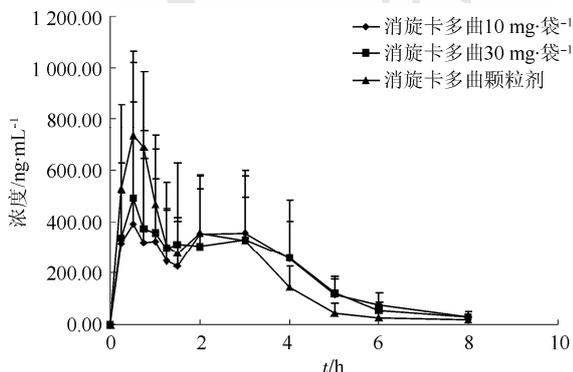


图 3 18 名健康受试者单剂口服 3 种消旋卡多曲制剂 300 mg 的平均血药浓度-时间曲线

Fig. 3 Mean plasma concentration-time curve after 18 healthy subjects administered 3 racecadotril preparations (300 mg single dose) respectively

2.2.2 药动学参数 18 名健康受试者单剂口服 3 种消旋卡多曲制剂 300 mg 的主要药动学参数见表 3。

表 3 健康受试者单剂口服 3 种消旋卡多曲制剂 300 mg 的主要药动学参数(n=18)

Tab. 3 Major pharmacokinetic parameters after 18 healthy subjects administered 3 racecadotril preparations (300 mg single dose) respectively(n=18)

参数	受试散剂 A	受试散剂 B	参比颗粒剂 R
AUC _{0-t} /ng·h·mL ⁻¹	1 617.0±532.6	1 628.9±672.1	1 621.0±532.2
AUC _{0-∞} /ng·h·mL ⁻¹	1 690.8±567.2	1 673.8±681.7	1 649.4±561.4
C _{max} /ng·mL ⁻¹	802.0±356.5	804.2±459.8	845.6±285.8
T _{max} /h	1.8±1.2	1.9±1.3	0.7±0.2
t _{1/2} /h	1.4±0.4	1.2±0.7	1.1±0.8

2.2.3 生物等效性评价 受试制剂和参比制剂的主要药动学 AUC 和 C_{max} 经对数转换后进行方差分析, 结果显示 AUC_{0-t}、AUC_{0-∞}、C_{max} 在制剂和周期间差异均无统计学意义, 在个体间差异有统计学意义(P<0.05)。双单侧 t 检验结果表明, 消旋卡多曲散(规格: 10 mg·袋⁻¹)和消旋卡多曲散(规格: 30 mg·袋⁻¹)的 AUC_{0-t} 90% 的置信区间分别为 87.0%~120.5%, 82.3%~114.0%; AUC_{0-∞} 分别为 84.7%~117.3%, 81.2%~112.5%, 均在参比颗粒剂 80~125% 内; C_{max} 的置信区间分别为 76.6%~112.3%, 71.2%~104.3%, 均在参比制剂 70%~143% 内。T_{max} 经非参数检验(Wilcoxon 符号秩检验)差异有统计学意义(P<0.05)。2 种受试制剂和参比制剂具有生物等效性。以 3 种制剂的 AUC_{0-t} 计算, 单次口服试验制剂消旋卡多曲散(规格: 10 mg·袋⁻¹)和消旋卡多曲散(规格: 30 mg·袋⁻¹)的相对生物利用度分别为(99.8±6.1)%、(100.5±4.9)%。

2.2.4 安全性评价 18 名健康受试者在 3 次给药期间, 耐受性良好, 均未出现与药物有关的不良反应。

3 讨论

本试验采用 *p*-BPB 衍生试剂在血浆中进行 TP 的衍生反应, 衍生反应快速完全, 得到稳定的 TP 衍生产物。并以液-液萃取为基础, 建立了只用单级质谱 LC/MS 完成测定血浆中 TP 衍生产物浓度, 可用于求算血浆中 TP 的浓度, 具有灵敏度高、精密度良好、专属性强等特点, 定量下限可达 6.28 ng·mL⁻¹, 优于目前文献报道的

HPLC-UV法^[4-7],其最低定量下限为25 ng·mL⁻¹,与HPLC-MS/MS法^[9]达到的最低定量下限6.25 ng·mL⁻¹非常接近,能符合生物样本的测定要求,为消旋卡多曲制剂的人体药动学和生物利用度提供了可靠的方法。

血浆样品处理方法的选择,目前对含TP血浆的处理方法主要有沉淀法和固相萃取法(SPE),其中沉淀法需保持在低温条件下处理血样^[11]。本试验采用酸化后对TP衍生化产物进行液-液萃取法,成本低,且能提高检测灵敏度。考察了乙酸乙酯、氯仿、乙醚等有机溶剂萃取,结果表明采用乙酸乙酯作为萃取剂,毒性低,提取回收率较高(>75%),重复性好(RSD<15%),不易乳化,简便易行。

血浆样品稳定性的考察,由于TP在血浆蛋白中不稳定,易被氧化成二硫化物,从而影响其含量的测定。国内外文献^[6,8,11]报道采用饱和和焦亚硫酸钠、L-半胱氨酸、抗坏血酸作为抗氧化剂;本试验采用抗坏血酸和EDTA-2Na作为抗氧化剂,并加入p-BPB衍生化试剂,得到稳定的TP衍生化产物,根据标准曲线浓度和响应值成正比的结果,显示出加入该抗氧化剂,血浆中TP稳定性良好。同时根据文献^[12],应控制从采血到加入衍生化试剂的时间间隔,否则血浆中TP药物含量将损失。本试验考察了在加入抗氧化剂下,控制采血到加入衍生化试剂的时间间隔在15 min以内,血浆药物含量的变化情况,经试验发现,衍生化试剂在15 min内加入不影响药物含量的测定。

TP和p-BPB皆对光敏感,标准液配好后须用棕色试剂瓶贮存。TP中的巯基在血浆蛋白的作用下,光照会加速巯基氧化,因此采集的血样须在15 min内离心分离出血浆,立即加入衍生化试剂置于避光处反应。本试验还考察了TP和p-BPB反应时间对反应的影响,结果发现,TP与p-BPB反应时间在5~15 min内回收率逐渐升高,15 min后趋于稳定。实验选择在室温下暗处静置反应30 min。

本试验中,受试散剂(10 mg·袋⁻¹)和(30 mg·袋⁻¹)和参比颗粒剂 T_{max} 分别为(1.8±1.2)、(1.9±1.3)和(0.7±0.2)h,颗粒剂的吸收速度要快于散剂,且有显著性差异($P<0.05$),可能与它们的制剂工艺有关。文献^[5]报道健康受试者服用600 mg消旋卡多曲颗粒剂后TP的 C_{max} 、 $T_{1/2}$ 和 AUC_{0-8} 分别为(1 309±244)ng·mL⁻¹, (1.355±0.255)h, (3 500±

500)ng·h·mL⁻¹,与本试验测得的数据较为接近。从药-时曲线来看,受试散剂A和B存在明显的双峰现象,与文献报道^[11,13]一致,分析原因可能与制剂工艺与处方有关^[14]。

本试验结果表明,2种规格国产消旋卡多曲散(10 mg·袋⁻¹和30 mg·袋⁻¹)与市售国产消旋卡多曲颗粒剂(10 mg·袋⁻¹)在正常人体内的处置过程基本一致,2种散剂和颗粒剂经方差分析、双单侧 t 检验判断,证明3种制剂生物等效。在个体差异方面,本试验3种制剂 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 C_{max} 对数转换后经方差分析,个体间差异有统计学意义($P<0.05$),说明存在个体差异较大的现象,临床应用时应注意个体化给药。

REFERENCES

- [1] PRIMI M P, BUENO L, BAUMER P, et al. Racecadotril demonstrates intestinal antisecretory activity *in vivo* [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 1999, 13 (Suppl 6): 3-7.
- [2] SHOOK J E, LEMCKE P K, GEHRIG C A, et al. Antidiarrheal properties of supraspinal mu and delta and peripheral mu, delta and kappa opioid receptors: inhibition of diarrhea without constipation [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1989, 249(1): 83-90.
- [3] RACHMILEWITZ D, KARMELI F, CHOREV M, et al. Effect on opiates on human colonic adenylate cyclase activity [J]. *Eur J Pharmacol*, 1983, 93 (3-4): 169-173.
- [4] EUGENIE A P K, JAN D H, PIETER V. A stability study involving HPLC analysis of aqueous thiorphan solutions in the presence of human serum albumin [J]. *Pharm Dev Technol*, 1998, 3(2): 185-192.
- [5] XU F, SHANG B C, DU J R, et al. HPLC determination and pharmacokinetics study of racecadotril in human plasma [J]. *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志), 2006, 26(11): 1355-1358.
- [6] FAN X, LING L Y, GUI L X. A rapid and validated HPLC method to quantify racecadotril metabolite, Tiorphan, in human plasma using solid-phase extraction [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 861(2): 130-135.
- [7] QIN Y P, YU Q, LIANG M, et al. Relative bioavailability of racecadotril orally disintegrating tablets in healthy volunteers [J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2006, 15(19): 1691-1693.
- [8] YU X, JIN C H, FEI L, et al. Quantitative analysis of racecadotril metabolite in human plasma using a liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 852(2): 101-107.
- [9] ZHONG J Q, QIN Y P, YU Q, et al. Quantitative determination of active racecadotril metabolites in human plasma with high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*(分析化学), 2006, 36(1): 91-94.
- [10] XU Y, HUANG J C, LIU F, et al. Quantitative analysis of racecadotril metabolite in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chin Mass Spec Soc*(质谱学报), 2006, 27(Suppl): 88-89.
- [11] LI J C, DONG H J, GAO S. Determination of the active

metabolite of racecadotril in human serum by LC/MS/MS and its application to relative bioavailability of two domestic preparation [J]. Chin Pharm J(中国药杂志), 2008, 46(13): 1018-1021.

- [12] ZHONG D F, LI X Q, WANG A M, et al. Determination of captopril plus its disulfide metabolites in human plasma [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 1998, 33(8): 605-609.
- [13] ZHENG W, QIN Y P, YU Q, et al. Study on the relative

bioavailability of racecadotril dispersed tablet in healthy volunteers [J]. Mod Prev Med(现代预防医学), 2007, 34(4): 875-878.

- [14] CHEN X, MA Y M, ZHONG J. Research progress in double peak phenomenon of concentration-time curve [J]. Chinese J New Drugs Clin Remed(中国新药与临床杂志), 2012, 31(8): 432-437.

收稿日期: 2014-08-25

UHPLC-MS/MS 同时测定人血浆中辛伐他汀及其代谢产物

黄娟, 冯仕银, 王蓝天, 李楠, 杜晓琳, 雍小兰* (中国人民解放军成都军区总医院临床药学科, 成都 610083)

摘要: 目的 采用 UHPLC-MS/MS 同时测定人血浆中辛伐他汀及其代谢产物辛伐他汀酸, 并研究辛伐他汀、辛伐他汀酸在人体内的药理学特征。方法 血浆样品以乙醚萃取, 采用 UHPLC-MS/MS 进行分析。色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 3.5 μm); 乙腈-1 mmol·L⁻¹ 醋酸铵(甲酸调 pH 4.5)为流动相梯度洗脱, 流速: 0.2 mL·min⁻¹。采用电喷雾离子源(ESI), 以多反应监测方式(MRM)进行定量分析。辛伐他汀和内标洛伐他汀在正离子模式下定量分析, 离子对分别为 m/z 419.4→199.3 和 m/z 405.3→199.3; 辛伐他汀酸和内标洛伐他汀酸在负离子模式下定量分析, 离子对分别为 m/z 435.5→115.2 和 m/z 421.4→101.2。结果 辛伐他汀和辛伐他汀酸的线性范围均为 0.2~50 ng·mL⁻¹ ($r>0.99$), 最低定量限均为 0.2 ng·mL⁻¹, 日内和日间精密度(RSD)均≤11.10%, 提取回收率均≥63.71%。结论 该方法专属性强、灵敏度高、重现性好, 适用于辛伐他汀的药理学研究。

关键词: 辛伐他汀; 辛伐他汀酸; 液质联用; 药理学

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)03-0330-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.03.018

Determination of Simvastatin and Simvastatin Acid in Human Plasma by UHPLC-MS/MS

HUANG Juan, FENG Shiyin, WANG Lantian, LI Nan, DU Xiaolin, YONG Xiaolan* (Department of Clinical Pharmacy, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a UHPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of simvastatin and its metabolite simvastatin acid in human plasma. **METHODS** The sample was extracted with diethylether and then separated on an Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 3.5 μm), with acetonitrile and 1 mmol·L⁻¹ ammonium acetate (pH was adjusted to 4.5 by formic acid) as mobile phase eluted by a gradient program at a flow rate of 0.2 mL·min⁻¹. Detection was performed with multiple reactions monitoring (MRM) using electrospray ionization (ESI). The positive ion scan mode was used to detect simvastatin and lovastatin (IS) while the negative ion scan mode was used to detect simvastatin acid and lovastatin acid (IS). The MRM transitions of m/z 419.4/199.3 and m/z 405.3/199.3 were used to quantify simvastatin and lovastatin while m/z 435.5/115.2 and m/z 421.4/101.2 were used to quantify simvastatin acid and lovastatin acid. **RESULTS** The calibration curves were linear over the concentration range of 0.2–50 ng·mL⁻¹ ($r>0.99$) with the lower limit of quantitation 0.2 ng·mL⁻¹. Both inter- and intra-day relative standard deviations were ≤11.10%. The extraction recoveries of simvastatin and simvastatin acid were ≥63.71%. **CONCLUSION** The UHPLC-MS/MS method is selective, sensitive, reliable and suitable for pharmacokinetic study of simvastatin.

KEY WORDS: simvastatin; simvastatin acid; UHPLC-MS/MS; pharmacokinetics

辛伐他汀是 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶 (HMG-CoA) 抑制剂, 为降血脂药。其属于前体药物, 口服吸收到达肝脏后, 大部分转化为活性代

谢物辛伐他汀酸而发挥作用。辛伐他汀口服剂量较小, 血浆中干扰物质多, 药物浓度低, 因此对分析方法的检测灵敏度和选择性要求较高。目前测

作者简介: 黄娟, 女, 药师 Tel: (028)86570439 E-mail: huangjuanchj@qq.com
(028)86571275 E-mail: yongxlan@163.com

*通信作者: 雍小兰, 女, 副主任药师 Tel: