

LC-MS/MS法测定人血浆中苯海拉明血药浓度及其制剂的生物等效性研究

刘世军^{1*}, 曹若明², 崔 晞^{3#}, 孙克明¹, 刘宪勇¹, 张 敏¹, 郑慧敏¹(1. 武警山东总队医院药剂科, 济南 250014; 2. 济南市疾病预防控制中心, 济南 250012; 3. 山东大学公共卫生学院卫生检验研究所, 济南 250012)

中图分类号 R969.1; R976 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)10-0913-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.10.18

摘要 目的: 建立测定人血浆中苯海拉明血药浓度的方法, 并进行其生物等效性研究。方法: 血样经处理后, 采用高效液相色谱串联质谱电喷雾(LC-MS/MS)法进行测定。色谱柱为 Intersil Hilic (150 mm×3.0 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(10 mmol/L 乙酸铵)-甲酸(40:60:1, V/V/V); 电喷雾电离(ESI)离子源, 正离子模式, 多级反应监测(MRM)方式检测, 离子对分别为 m/z 256→167(苯海拉明)、 m/z 344→215(氯马斯汀, 内标)。结果: 苯海拉明血药浓度在 0.5~125 ng/ml 范围内线性关系良好($r=0.9965$); 日内、日间 RSD 均 < 8%, 方法回收率为 99.4%~103.4%, 提取回收率为 71.9%~75.3%。受试者口服氨麻美芬片受试制剂与参比制剂后苯海拉明的主要药动学参数分别为: $t_{1/2}$ (9.892±1.615)、(10.745±3.227)h, t_{max} (2.00±0.81)、(1.78±0.55)h, c_{max} (90.4±20.6)、(103.0±30.1)h, AUC_{0-36h} (806.293±211.453)、(827.856±223.996)h。结论: 本方法灵敏、准确, 适用于苯海拉明血药浓度测定及其生物利用度研究; 2种制剂生物等效。

关键词 苯海拉明; 高效液相色谱串联质谱电喷雾法; 生物等效性; 药动学

Determination of Diphenhydramine in Human Plasma by LC-MS/MS and Bioequivalence Study of Its Preparation

LIU Shi-jun¹, CAO Ruo-ming², CUI Xi³, SUN Ke-ming¹, LIU Xian-yong¹, ZHANG Min¹, ZHENG Hui-min¹(1. Dept. of Pharmacy, Shandong Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Jinan 250014, China; 2. Jinan Center for Disease Control and Prevention, Jinan 250012, China; 3. Institute of Chemistry and Bacterial Detection, College of Public Health, Shandong University, Jinan 250012, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for the determination of diphenhydramine in human plasma, and to study bioequivalence of its preparation in healthy volunteers. METHODS: After blood sample processing, LC-MS/MS method was used. The determination was performed on Inertsil Hilic column (150 mm×3.0 mm, 5 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-water (10 mmol/L ammonium acetate)-formic acid (40:60:1, V/V/V). ESI was applied and operated in positive ion mode: m/z 256→167 for diphenhydramine and m/z 344→215 for clemastine (IS) under multiple reaction monitoring (MRM) mode. RESULTS: The linear ranges of diphenhydramine were 0.5-125 ng/ml ($r=0.9965$); RSDs of intra-day and inter-day were less than 8%, and method recoveries were 99.4%-103.4% and extraction recoveries were 71.9%-75.3%. Main pharmacokinetic parameters of test preparation and reference preparation after oral administration were as follows: $t_{1/2}$ were (9.892±1.615) h and (10.745±3.227)h; t_{max} were (2.00±0.81) h and (1.78±0.55)h; c_{max} were (90.4±20.6)h and (103.0±30.1)h; AUC_{0-36h} were (806.293±211.453)h and (827.856±223.996)h. CONCLUSIONS: The method is sensitive and accurate, which is suitable for the determination of plasma concentration and bioequivalence study of diphenhydramine. Two preparations are bioequivalent.

KEY WORDS Diphenhydramine; LC-MS/MS; Bioequivalence; Pharmacokinetics

苯海拉明(Diphenhydramine)为抗组胺药, 具有抗组织胺H₁受体的作用, 对中枢神经有较强的抑制作用, 亦有阿托品样作用, 适用于皮肤黏膜的过敏性疾病, 如荨麻疹、枯草热、过敏性鼻炎等, 还可用于预防晕船、晕车、晕飞机等晕动病。本试验拟建立灵敏、准确的高效液相色谱串联质谱电喷雾(LC-MS/MS)法测定苯海拉明在人血浆中的血药浓度, 对其在人体内的药动学特性及其生物等效性进行研究。

1 材料

1.1 仪器

API 4000 型串联四级杆质谱仪, 配有电喷雾离子源(ESI)及 Analyst 1.4.2 数据处理系统(美国 Applied Biosystem Sciex 公司); 1100 高效液相色谱仪, 包括 G1312A 紫外检测器、G1312A 四元梯度泵、G1313A 自动进样器、G1316A 柱温箱(美国 Agilent 公司); AG135 电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器上

酸氨氯地平在健康志愿者体内药代动力学及生物等效性[J]. 中国医科大学学报, 2008, 37(4): 515.

[6] Zou QG, Zhan Y, Ge ZX, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of amlo-

* 主任药师。研究方向: 临床药学。电话: 0531-83197332。E-mail: lsj60j@126.com

通信作者: 教授, 博士研究导师。研究方向: 微量元素与健康。电话: 0531-88382554。E-mail: cuixi@sdu.edu.cn

dipine in human plasma and its application in a bioequivalence study[J]. *Arzneimittel Forschung*, 2009, 59(8): 383.

[7] 马涛, 张志涛, 王清清, 等. 苯磺酸氨氯地平片人体生物等效性研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2008, 33(3): 344.

[8] 郝光涛, 白少柏, 曲恒燕, 等. 苯磺酸氨氯地平片人体相对生物利用度和生物等效性研究[J]. 中南药学, 2011, 9(8): 600.

(收稿日期: 2012-08-17 修回日期: 2012-12-02)

海有限公司)。

1.2 药品与试剂

苯海拉明标准品(中国药品生物制品检定研究院,批号:100066-200506,纯度:99.1%);富马酸氯马斯汀标准品(内标,中国药品生物制品检定研究院,批号:100229-200803,纯度:99.0%);受试制剂:氨麻苯美片(瑞阳制药有限公司,规格:每片含盐酸苯海拉明25 mg),参比制剂:氨麻苯美片(拜耳医药保健有限公司启东分公司,规格:每片含盐酸苯海拉明25 mg),2种制剂含量差异均在5%之内。乙腈、甲醇、甲酸、乙酸铵为色谱纯,盐酸、二氯甲烷、正己烷、异丙醇为分析纯,水为超纯去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

色谱柱:Inertsil Hilic柱(150 mm×3.0 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(10 mmol/L 乙酸铵)-甲酸(40:60:1,V/V);流速:0.3 ml/min;柱温:35℃;离子源:电喷雾电离源(ESI);扫描方式:多反应监测(MRM),正离子扫描方式;电喷雾电压:4 600 V;离子源温度:450℃;气帘气:20 psi;雾化气:50 psi;辅助气:40 psi;用于定量分析的苯海拉明和内标的离子对分别为 m/z 256→152和 m/z 344→215。

2.2 标准溶液的配制

2.2.1 苯海拉明标准溶液:准确称取苯海拉明标准品10.0 mg,用甲醇配成200 μg/ml的贮备液,并依次稀释得5、50、500 ng/ml的溶液,4℃冷藏备用。

2.2.2 内标溶液:准确称取富马酸氯马斯汀标准品10.0 mg,以甲醇-水混合液为溶剂配成200 μg/ml的贮备液,并依次稀释得10、100、1 000 ng/ml的溶液,4℃冷藏备用。

2.3 血样处理

精密量取血浆样品0.2 ml,加入甲醇-水(50:50,V/V)0.1 ml,加入内标(10 ng/ml 氯马斯汀)溶液0.1 ml、磷酸缓冲溶液(pH11)0.2 ml,涡旋震荡1 min。再加入提取溶剂(正己烷-二氯甲烷-异丙醇(30:20:1,V/V/V)3 ml,涡旋震荡2 min,往复振荡15 min,3 000 r/min离心10 min。吸取有机层于另一离心试管中,于35℃水浴上通氮气吹干,残渣用流动相0.1 ml溶解,取5 μL进样分析。

2.4 方法专属性

对照品和内标二级质谱图见图1;高效液相色谱图见图2。结果表明血浆中内源物质无干扰。

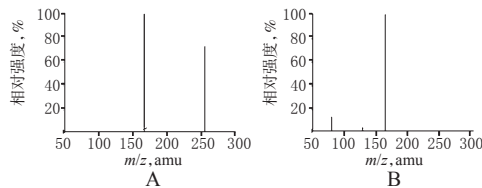


图1 二级质谱图

A. 苯海拉明; B. 内标

Fig 1 MS² spectrogram

A. diphenhydramine; B. IS

2.5 标准曲线的制备

取多份空白血浆适量,分别加入定量的苯海拉明标准溶液,配制标准曲线系列血浆样品,其中含药物质量浓度为0.5、2.5、12.5、25、50、125 ng/ml;按照“2.3”项下方法处理,采用加权($W=1/x^2$)最小二乘法进行线性回归,考察苯海拉明标准品与内标的色谱图峰面积比(y)与相应浓度(x)的相关性。得苯海

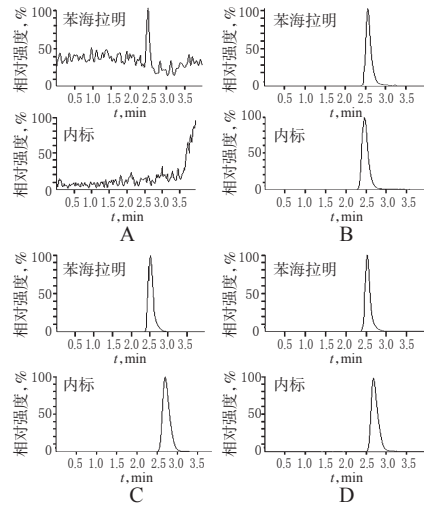


图2 高效液相色谱图

A. 空白血浆; B. 苯海拉明标准品+内标; C. 空白血浆+苯海拉明标准品+内标; D. 受试者血浆样品+内标

Fig 2 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. diphenhydramine standard+IS; C. blank plasma+diphenhydramine standard+IS; D. plasma sample of volunteer+IS

拉明的直线回归方程为 $y=0.264x+0.0349$ ($r=0.9965$)。结果表明,苯海拉明血药浓度在0.5~125 ng/ml范围内线性关系良好。

2.6 回收率及精密度试验

取低、中、高(1.25、12.5、100.0 ng/ml)3个质量浓度的苯海拉明血浆,按照“2.3”项下方法处理后进样分析。计算准确度(方法回收率)和绝对回收率($n=5$);同日内测定5次,计算日内RSD;每日测定1次,连续测定5 d,计算日间RSD,结果见表1。

表1 精密度及回收率试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Results of precision and recovery tests($\bar{x} \pm s, n=5$)

血药浓度, ng/ml	日内精密度		日间精密度		方法回收率, %	绝对回收率, %
	日内测得值, ng/ml	日内RSD, %	日间测得值, ng/ml	日间RSD, %		
1.25	1.40±0.05	3.38	1.33±0.10	7.34	101.9±6.3	72.7±4.6
12.5	12.6±0.6	4.5	12.4±0.5	4.1	103.4±1.2	75.3±3.9
100.0	99.0±2.2	2.2	97.6±5.3	5.5	99.4±3.2	71.9±5.2

2.7 稳定性试验

分别取含苯海拉明低、中、高3个质量浓度的质控样品各5份,测定-20℃冷冻保存14 d、2次冷冻-冻融、室温放置6 h时药物的浓度,考察不同存放条件对苯海拉明稳定性的影响。试验结果显示,苯海拉明在以上存放条件下,质控样本测试结果RSD均<8%,提示苯海拉明血浆样品在上述条件下保存稳定性较好。

2.8 样品采集与测定

健康男性志愿者20名,体质量(64.7±4.6)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个月内未参加其他新药临床试验,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,试验方案通过医院医学伦理委员会批准。20名健康志愿者单剂量口服氨麻苯美片受试制剂或参比制剂2片,分别于服药前(0 h)和服药后0.33、0.67、1、1.5、2、3、4、6、8、10、12、14、24、36 h时取肘静脉血4 ml,肝素抗凝,3 500 r/min离心5 min,留取血浆,-20℃贮存。采用LC-MS/MS法测定血浆中苯海拉明的浓度,DAS 2.0软件分析其主要药动学参

辛伐他汀在年轻健康受试者中的群体药动学研究

朱立勤^{1*}, 章袁², 季双敏³, 庄艳楠⁴, 陈敬国⁴(1.天津市第一中心医院, 天津 300192; 2.天津医科大学, 天津 300070; 3.北京大学医学部, 北京 100191; 4.天津中医药大学, 天津 300193)

中图分类号 R969.1; R972⁶ 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)10-0915-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.10.19

摘要 目的: 考察口服辛伐他汀在年轻健康受试者体内的群体药动学模型。方法: 利用中国知网(CNKI)、万方数据库、维普数据库、PubMed电子检索系统等收集与辛伐他汀药动学相关的文献共29篇, 以文中涉及到的474名年轻健康受试者为研究对象, 运用非线性混合效应模型(NONMEM)建立辛伐他汀的药动学模型。考察年龄、体质量、身高等对药动学参数的影响, 并以Bootstrap法进行模型验证。结果: 本研究建立了年轻人口服辛伐他汀一级吸收和消除的一房室药动学模型。体内的辛伐他汀表观清除率(CL/F)、表观分布容积(V/F)和口服吸收系数(K_a)的群体典型值分别为1 630 L/h、4 320 L、1.46 h⁻¹; 年龄、体质量、身高等因素加入模型之后, 基本模型并未有明显改善($P>0.05$)。结论: 年轻人CL/F和V/F值高于文献中的老年人群值。

关键词 辛伐他汀; 年轻受试者; 非线性混合效应模型; 群体药动学

Population Pharmacokinetics Study of Simvastatin in Young Healthy Volunteers

ZHU Li-qin¹, ZHANG Yuan², JI Shuang-min³, ZHUANG Yan-nan⁴, CHEN Jing-guo⁴(1.Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China; 2.Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 3.Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China; 4. Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the population pharmacokinetics (PPK) model of simvastatin in young healthy volunteers with oral administration. METHODS: 474 young healthy volunteers in 29 literatures of simvastatin literatures retrieved from CNKI, Wanfang database, VIP, PubMed were chosen as research object. Nonlinear mixed effect modeling (NONMEM) was employed to establish the PPK model of simvastatin. The fixed effects including age, weight, height on pharmacokinetic parameters of PPK were estimated. The final PPK model was validated by Bootstrap method. RESULTS: One-compartment models with first-order absorption and elimination were built. The typical population values, such as CL/F, V/F and K_a , were 1 630 L/h, 4 320 L and 1.46 h⁻¹ in youngers. The basic model couldn't be improved after involved the fixed effects, such as age, weight, height ($P>0.05$). CONCLUSIONS: CL/F and V/F of the youngers are higher than those of the elders from literature.

KEY WORDS Simvastatin; Young volunteers; NONMEM; Population pharmacokinetics

数, 结果见表2; 苯海拉明平均药-时曲线见图3。

表2 20名健康志愿者口服氨麻苯美片受试制剂与参比制剂后苯海拉明的主要药动学参数($\bar{x} \pm s, n=20$)

Tab 2 Main pharmacokinetic parameters of diphenhydramine in 20 healthy volunteers after oral administration of test preparation and reference preparation ($\bar{x} \pm s, n=20$)

参数	试验制剂	参比制剂
$t_{1/2}$, h	9.892 ± 1.615	10.745 ± 3.227
t_{max} , h	2.00 ± 0.81	1.78 ± 0.55
c_{max} , ng/ml	90.4 ± 20.6	103.0 ± 30.1
AUC _{0-36h} , ng·h/ml	806.293 ± 211.453	827.856 ± 192.449
AUC _{0-∞} , ng·h/ml	869.941 ± 242.684	904.895 ± 223.996

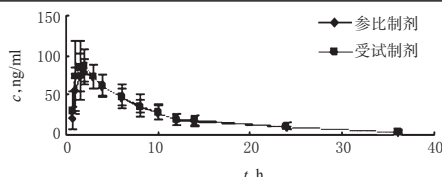


图3 20名健康志愿者口服氨麻苯美片受试制剂与参比制剂后苯海拉明的平均药-时曲线($n=20$)

Fig 3 Mean plasma concentration-time curves of diphenhydramine in 20 healthy volunteers after oral administration of test preparation and reference preparation ($n=20$)

*主任药师, 博士。研究方向: 临床药理学。电话: 022-23626417。

E-mail: zlq0713@yahoo.com.cn

3 讨论

已有文献报道采用液-质联用(LC-MS)法、高效液相色谱(HPLC)法、气相色谱(GC)法^[1-4]等测定血浆中苯海拉明的浓度。但LC-MS法灵敏度欠佳, HPLC法往往专属性不强、耗时较长, 而GC法在样品处理上又比较繁琐。上述方法对单独组分的确定尚存在问题, 因此很难满足同时测定多种待测物的需要。本研究建立的LC-MS/MS法, 血浆样品用量少, 操作步骤简便易行, 且测试速度快, 样品检测时间仅3 min。试验结果证实, 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, 适用于苯海拉明血浆浓度测定及其药动学和生物利用度研究。2种制剂生物等效。

参考文献

- [1] 朱运贵, 王峰, 肖钦雯. 盐酸苯海拉明片在中国健康人体内的药动学研究[J]. 中国药房, 2006, 17(14): 1 084.
- [2] 邹梅, 程刚, 安峰. 扑苯黄片相对生物利用度的研究[J]. 中国药理学杂志, 2002, 37(1): 36.
- [3] Chao ST, Prather D, Pinson D, et al. Effect of food on bioavailability of pseudoephedrine and brompheniramine administered from gastrointestinal therapeutic system[J]. Pharm Sci, 1991, 80(5): 432.
- [4] 韩莹, 陈笑艳, 谢智勇, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定人血浆中伪麻黄碱和苯海拉明[J]. 药学报, 2003, 38(1): 67.

(收稿日期: 2012-10-24 修回日期: 2012-12-27)