

# LC-MS法测定人血浆中噻托溴铵的浓度及其吸入剂药动学研究

谭文明<sup>1\*</sup>, 丁黎<sup>2</sup>, 沈建平<sup>3</sup>(1.江门市中心医院药学部, 广东 江门 529030; 2.中国药科大学, 南京 210009; 3.南京医科大学第一附属医院国家药物临床研究机构, 南京 210009)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)38-3610-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.38.21

**摘要** 目的:建立测定人血浆中噻托溴铵浓度的方法,考察健康志愿者口腔吸入噻托溴铵粉雾剂1粒后的主要药动学参数。方法:以C<sub>18</sub>固相萃取小柱提取浓缩血浆中的活性成分tiotropium(含tiotropium 18 μg)后进行液-质联用(LC-MS)法分析,流动相为40 mmol/L乙酸铵缓冲液-甲醇(56:44);检测离子分别为 $m/z$  392.0 (tiotropium[M]<sup>+</sup>)、 $m/z$  192.3 (内标, [M-Cl]<sup>+</sup>),裂解电压为200 V。结果:tiotropium血药浓度在1.507~30.15 pg/ml范围内线性关系良好( $r=0.9996$ ),最低定量限为1.507 pg/ml;日内、日间RSD均≤7%,相对回收率为100.6%~108.6%,提取回收率为89.2%~96.4%。男女受试者的药动学参数分别为: $t_{1/2}$ (103.7±14.6)、(110.9±14.6)h,  $t_{max}$ (8.3±5.2)、(8.3±5.2)h,  $c_{max}$ (16.65±8.22)、(16.26±3.10) pg/ml, AUC<sub>0-24h</sub>(60.9±15.1)、(62.4±7.8) pg·h/ml。结论:本试验建立的分析方法灵敏、准确、简便。

**关键词** Tiotropium; 噻托溴铵粉雾剂; 固相萃取; 液-质联用法; 药动学

## Determination of Tiotropium in Human Plasma by LC-MS and Study of Pharmacokinetics of Its Inhalation Powder

TAN Wen-ming<sup>1</sup>, DING Li<sup>2</sup>, SHEN Jian-ping<sup>3</sup> (1. Dept. of Pharmacy, Jiangmen Central Hospital, Guangdong Jiangmen 529030, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 219000, China; 3. State Clinical Center, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 219000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To develop a method for the determination of tiotropium in human plasma and to investigate main pharmacokinetic parameters of tiotropium in healthy volunteers after oral inhalation of Tiotropium bromide inhalation powder. METHODS: C<sub>18</sub> solid phase extraction column was used to extract tiotropium (18 μg) and analyzed by LC-MS. The mobile phase consisted of 40 mmol/L ammonium acetate buffer solution-methanol (56:44). The selected ion monitoring (SIM) mode used target ions at  $m/z$  392.0 for tiotropium ([M]<sup>+</sup>) and  $m/z$  192.23 for benzyltriethyl ammonium chloride (IS, [M-Cl]<sup>+</sup>). The fragmentary voltage was 200 V. RESULTS: The linear range of tiotropium was 1.507-30.15 pg/ml ( $r=0.9996$ ). The lowest limit of quantification was 1.507 pg/ml. RSD of inter-day and intra-day were all lower than 7%; relative recoveries in male and female were 100.6%-108.6% and extraction recoveries were 89.2%-96.4%. The main pharmacokinetic parameters of tiotropium were as follows:  $t_{1/2}$  (103.7±14.6) h and (110.9±14.6) h;  $t_{max}$  (8.3±5.2)h and (8.3±5.2)h;  $c_{max}$  (16.65±8.22) pg/ml and (16.26±3.10) pg/ml; AUC<sub>0-24h</sub> (60.9±15.1) pg·h/ml and (62.4±7.8) pg·h/ml. CONCLUSIONS: The method is proved to be sensitive, accurate and convenient.

**KEY WORDS** Tiotropium; Tiotropium bromide inhalation powder; Solid phase extraction; LC-MS; Pharmacokinetics

噻托溴铵为异丙托溴铵的衍生物,是具有特异选择性的抗胆碱药物,用于治疗慢性阻塞性肺部疾病(COPD)疗效显著。噻托溴铵为选择性M1~M3受体拮抗药,能长时间阻滞胆碱能神经介导的支气管平滑肌收缩,为长效的抗胆碱药物,一次性吸入对支气管的扩张作用可持续24 h<sup>[1-2]</sup>。噻托溴铵粉雾剂为干粉吸入胶囊,每粒含噻托溴铵一水合物(C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>S<sub>2</sub>Br·H<sub>2</sub>O) 22.5 μg,相当于tiotropium阳离子(C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>S<sub>2</sub>) 18 μg,tiotropium是起作用的活性成分。由于噻托溴铵临床给药剂量小,人体中血药浓度很低,Disse等<sup>[3]</sup>用液相色谱/离子化喷雾-质谱联用(LC/Ion-spray MS)法测定血浆样品,最低定量限为4.8 pg/ml, Türcck等<sup>[4]</sup>以液-质联用(LC-MS/MS)法测定,最低定量限为2.43 pg/ml。笔者以C<sub>18</sub>固相萃取小柱提取浓缩血浆中的tiotropium,建立液相色谱-电喷雾离子化-质谱联用(LC-ESI-MS)法,其最低定量限为1.507 pg/ml。

本试验通过测定血浆中的浓度,观察健康受试者口腔吸入噻托溴铵粉雾剂后tiotropium的血药浓度经时过程,估算相应的药动学参数,为临床用药提供参考依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Agilent 1100(1956 SL)液相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦公司)。3 ml规格的C<sub>18</sub>固相萃取小柱(Supelclean™ LC-18 SPE Tube, SUPELCO USA);甲醇为色谱纯。

### 1.2 药品与试剂

噻托溴铵-水合物对照品(江苏正大天晴药业股份有限公司,含量:99.9%,批号:20030821);苄基三乙基氯化铵对照品(内标,中国药科大学药化教研室,含量:99.8%,批号:20040312);噻托溴铵粉雾剂(江苏正大天晴药业股份有限公司,规格:tiotropium 18 μg/粒,批号:20030821)。

## 2 方法

### 2.1 色谱与质谱条件

\* 副主任药师, 硕士研究生。研究方向:体内药物分析和临床药理学。电话:0750-3165994。E-mail:2307757932@qq.com

色谱柱:Agilent C<sub>18</sub>反相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:40 mmol/L 乙酸铵缓冲液-甲醇(56:44);流速:0.6 ml/min;柱温:22 ℃;进样量:90 μl;离子极性:正离子;离子化方式:气动辅助电喷雾离子化;离子检测方式:选择性离子检测(SIM);检测对象为 *m/z* 392.0(tiotropium[M]<sup>+</sup>)、*m/z* 192.3(内标, [M-Cl]<sup>+</sup>);裂解电压:200 V;干燥气流速:13 L/min;雾化室压力:414 kPa;干燥气温度:350 ℃。

## 2.2 血浆样品的处理

取血浆样品 2 ml 置 10 ml 玻璃离心管中,精密加入苄基三乙基氯化铵溶液(内标, 499 μg/L)20 μl 混匀,上 C<sub>18</sub> 固相萃取小柱,以 1 ml 纯水洗脱,弃去洗脱液;再以 2 ml 甲醇洗脱液(含 0.5% 冰乙酸和 0.5% 三乙胺)洗脱,收集甲醇洗脱液,于 50 ℃ 水浴以氮气流吹干。残渣以 120 μl 流动相溶解,以离心半径 8 cm、16 000 r/min 离心 6 min,吸取上清液 90 μl 进行 LC-MS 分析。

## 2.3 临床试验方案

12 名健康受试者(男女各半),女性的体质量为 50~56 kg,年龄为 21~27 岁;男性的体质量为 60~66 kg,年龄为 20~25 岁。12 名健康受试者口腔吸入噻托溴铵粉雾剂 1 粒(tiotropium 18 μg/粒)。试验前禁食过夜至少 10 h(不禁水),于次日早晨 7:20 空腹口服吸入受试制剂,用药 2 h 后方可再饮水,4 h 后进统一餐。受试者于服药前及服药后 5、15、30、45 min 及 1、1.5、2、4、6、9、12、15、24 h 时分别采血 5 ml 于肝素化试管中,分离出血浆,于 -20 ℃ 保存待测。

## 3 结果

### 3.1 色谱行为

在本试验所采用的 LC-MS 条件下,tiotropium 保留时间为 13.6 min,苄基三乙基氯化铵(内标)保留时间约为 5.5 min(见图 1),峰形良好,无杂峰干扰测定。本方法具有较高的专属性。

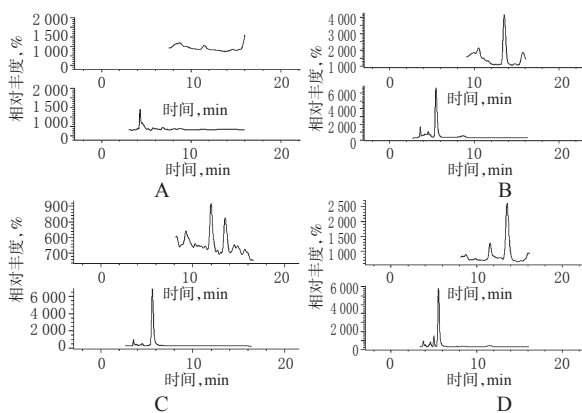


图 1 血浆样品谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+tiotropium (18.09 pg/ml)+内标; C. 空白血浆+tiotropium (1.507 pg/ml)+内标; D. 受试者用药 5 min 血浆样品(含 tiotropium 8.589 pg/ml)+内标

Fig 1 LC-MS chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma+tiotropium (18.09 pg/ml)+IS; C. blank plasma+tiotropium (1.507 pg/ml)+IS; D. plasma from volunteer 5 min after administration of 8.589 pg/ml tiotropium+IS

### 3.2 线性关系及灵敏度考察

取 10 ml 玻璃离心管数支,分别精密加入适量的 tiotropium

标准甲醇溶液、内标溶液 20 μl,加入空白血浆 2 ml 混匀,配成质量浓度分别为 1.507、3.015、6.030、12.06、18.09、24.12、30.15 pg/ml 的 tiotropium 标准含药血浆,分别于不同的日期作 5 条标准曲线,按“2.2”项下操作,记录色谱图,计算 tiotropium 峰面积  $A_i$  和内标峰面积  $A_s$  的比值  $f_i$ ,以平均比值  $f_i(f_i=A_i/A_s)$  为纵坐标,以血浆加入质量浓度  $c$  为横坐标,作权重回归计算,得回归方程如下: $f_i = -0.001\ 261 + 0.036\ 159 \times c$  ( $r = 0.999\ 56$ , 权重系数  $w = 1/c$ ),结果表明,tiotropium 血药浓度在 1.507~30.15 pg/ml 范围内线性关联良好。按上述条件测得的 tiotropium 血药浓度最低定量限为 1.507 pg/ml(信噪比约为 10)。

### 3.3 精密度试验

取 10 ml 玻璃离心管数支,按“3.2”项下配制含 tiotropium 质量浓度分别为 1.507、6.030、18.09、30.15 pg/ml 的标准含药血浆(每个浓度做 5 份样品)及一条随行标准曲线,按“2.2”项下操作。每天做一批及一条随行标准曲线,连续做 3 天,共 3 批,每批每个浓度做 5 份样品,求得实测浓度,计算日内和日间精密度。4 种质量浓度日内、日间 RSD 均 < 10%,符合生物样品分析方法的基本要求,结果详见表 1。

表 1 精密度、回收率及基质效应试验结果( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Tab1 Results of precision, recovery and matrix effect tests ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

加入质量浓度, pg/ml	精密度		提取回收率, %	准确度, %	基质效应, %
	日内 RSD, %	日间 RSD, %			
1.507	6.3	7.0	89.2 ± 8.5	108.6 ± 7.1	87.6 ± 9.3
6.030	3.7	5.9	91.8 ± 5.5	105.0 ± 4.3	91.1 ± 7.5
18.09	3.2	4.0	92.0 ± 4.9	101.3 ± 2.9	93.6 ± 5.5
30.15	1.1	1.3	96.4 ± 2.2	100.6 ± 1.5	95.6 ± 3.5

### 3.4 准确度(相对回收率)试验

取 10 ml 玻璃离心管数支,按“3.2”项下配制含 tiotropium 浓度分别为 1.507、6.030、18.09、30.15 pg/ml 的标准含药血浆,按“2.2”项下操作,计算所得质量浓度与加入质量浓度的比值即为相对回收率。结果 4 种质量浓度平均相对回收率符合要求,详见表 1。

### 3.5 绝对回收率(提取回收率)试验

tiotropium 对照溶液的配制:取 10 ml 玻璃离心管数支,分别精密加入不同量的 tiotropium 标准甲醇溶液,用甲醇配成浓度分别为 1.507、6.030、18.09、30.15 pg/ml 的 tiotropium 甲醇溶液,每份 2 ml,每种浓度各做 2 份,加入内标溶液 20 μl 混匀,50 ℃ 水浴中以氮气流吹干后,以流动相 120 μl 溶解残渣,进样 90 μl 分析,记录色谱图。计算 tiotropium 和内标的峰面积比值  $f_i(f_i=A_i/A_s)$ ,求得各浓度对照样品峰面积比值的平均值  $\bar{f}_i$ 。tiotropium 样品溶液的配制:取 10 ml 玻璃离心管数支,分别精密加入不同量的 tiotropium 标准甲醇溶液,加入 2 ml 空白血浆,混匀,配成质量浓度分别为 1.507、6.030、18.09、30.15 pg/ml 的 tiotropium 血浆样品,加入内标溶液 20 μl,每种浓度各做 5 份;上 C<sub>18</sub> 固相萃取小柱,以 1 ml 纯水洗脱,弃去洗脱液,再以 2 ml 甲醇(含 0.5% 冰乙酸和 0.5% 三乙胺)洗脱,收集甲醇洗脱液,涡旋混匀,50 ℃ 水浴中以氮气流吹干,以流动相 120 μl 溶解残渣,进样 90 μl 分析,记录色谱图,计算 tiotropium 和内标的峰面积比值  $f_i(f_i=A_i/A_s)$ 。将上述  $f_i$  和  $\bar{f}_i$  的比值代入公式  $R\% = f_i/\bar{f}_i \times 100\%$ ,求得 tiotropium 的绝对回收率(R%)。结果 4 种质量浓度平均绝对回收率均 > 85%,详见表 1。

### 3.6 基质效应

取空白血浆按照“2.2”项操作至“收集甲醇洗脱液”,在甲醇洗脱液中加入噻托溴铵对照品溶液适量使成1.507、6.030、18.09、30.15 pg/ml的不同质量浓度血浆样本各5份,进行LC-MS测定;与用流动相制得的相同质量浓度的对照品溶液分别比较。结果显示血浆样本测定的基质效应在85%~115%范围之内,详见表1。

### 3.7 药动学研究

12名健康受试者口服吸入江苏正大天晴药业股份有限公司研制的噻托溴铵粉雾剂1粒后,tiotropium的平均药-时曲线见图2;德国健康受试者分别吸入单剂量tiotropium 10 μg的平均药-时曲线见图3。采用中国药科大学药代中心杨劲编写的BAPP 2.0软件计算主要药动学参数,结果见表2。

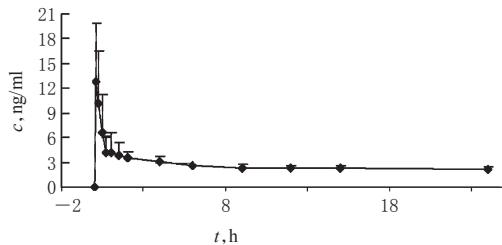


图2 12名中国健康受试者分别吸入单剂量噻托溴铵 18 μg后的平均药-时曲线( $\bar{x} \pm s$ )

Fig 2 Mean plasma concentration-time curves of tiotropium in 12 healthy volunteers after inhalation of a single dose of tiotropium 18 μg( $\bar{x} \pm s$ )

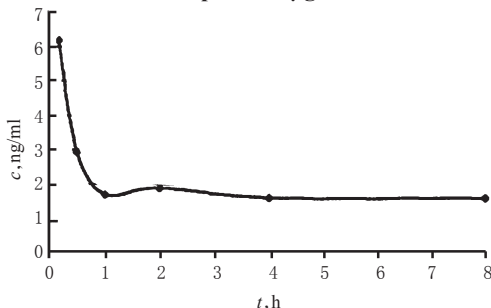


图3 德国健康受试者分别吸入单剂量噻托溴铵 10 μg后的平均药-时曲线( $\bar{x} \pm s$ )

Fig 3 Mean plasma concentration-time curves of tiotropium in German volunteers after inhalation of a single dose of tiotropium 10 μg( $\bar{x} \pm s$ )

表2 12名受试者分别吸入单剂量噻托溴铵 18 μg的主要药动学参数( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

Tab 2 Main pharmacokinetic parameters of tiotropium in 12 volunteers after inhalation of a single dose of tiotropium 18 μg( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

药动学参数	男性受试者(n=6)	女性受试者(n=6)
$c_{max}$ , pg/ml	16.65 ± 8.22	16.26 ± 3.10
$t_{max}$ , min	8.3 ± 5.2	8.3 ± 5.2
$t_{1/2}$ , h	103.7 ± 14.6	110.9 ± 14.6
MRT, h	145.6 ± 22.0	157.0 ± 21.3
$AUC_{0-24h}$ , pg·h/ml	60.9 ± 15.1	62.4 ± 7.8
$AUC_{0-\infty}$ , pg·h/ml	397.6 ± 99.6	401.6 ± 79.7
CL/F, L/h	47.8 ± 12.5	46.2 ± 8.6
$V_d/F$ , L	6 953.9 ± 951.9	7 327.2 ± 1 328.8

$t$ 检验的结果表明女性和男性受试者的药动学参数 $c_{max}$ 、 $AUC$ 、 $t_{1/2}$ 、 $MRT$ 、 $CL/F$ 及 $V_d/F$ 差异无显著性意义( $P>0.05$ )。Wilcoxon检验的结果表明女性和男性受试者的药动学参数 $t_{max}$ 差异无显著性意义( $P>0.05$ )。

## 4 讨论

中国12名健康受试者单剂量口腔吸入tiotropium 18 μg后,8名在5 min达到血药浓度峰值,估算的消除半衰期 $t_{1/2}$ 为(107.3 ± 14.4)h,与文献报道<sup>[3-4]</sup>基本一致,另有4名受试者tiotropium的 $t_{max}$ 为15 min。德国受试者单剂量口腔吸入tiotropium 10 μg的平均药-时曲线见图3<sup>[4]</sup>。我国健康受试者口腔吸入噻托溴铵粉雾剂后的1~4 h内,tiotropium的血药浓度也有双峰现象,推测是由口腔吸入这种特殊的给药方式导致,沉积在气道的tiotropium被再次吸收出现第2个血药峰值。用Win-Nonlin软件对其药-时数据进行拟合,求得tiotropium在中国健康受试者体内呈现三室模型,Türk等<sup>[4]</sup>认为其在人体内为四室模型。

Tiotropium中的季铵基团具有较强的极性,在 $C_{18}$ 反相色谱柱上保留很弱,难与血浆中的内源性物质分离,血浆中的内源性物质会对其产生介质效应,降低质谱响应。但因为tiotropium的季铵基是一个阳离子基团,比起其他含有仲胺、叔胺的有机药物,其在电喷雾离子化之前就已经在流动相内充分地离子化了,这有利于ESI过程。同时,因为ESI的机制为一种表面离子化技术,tiotropium分子中还有弱极性基团,具有表面活性的化合物占据了液滴的表面,容易生成气态离子,最适合于用LC-ESI-MS测定。所以尽管有介质效应,但由于tiotropium的表面活性使得其质谱响应非常强,我们有可能检测到血浆中pg/ml级的tiotropium。

在测定过程中发现采用10 mmol/L醋酸铵水溶液作水相时,tiotropium的色谱峰形严重拖尾;醋酸铵的浓度加大为40 mmol/L时,消除了亲硅羟基效应,色谱峰变得对称。

Türk等<sup>[4]</sup>认为通过吸入装置用药会引起较大的个体内部和个体之间的差异,所以笔者在试验开始前让每位受试者都练习使用吸入装置,尽量减小口腔吸入给药过程带来的差异。

## 参考文献

- [1] Barnes PJ, Belvisi MG, Mak JCW, *et al.* Tiotropium bromide(Ba 679 BR), a novel long-acting muscarinic antagonist for the treatment of obstructive airways disease[J]. *Life Sci*, 1995, 56(11/12): 853.
- [2] Littner MR, Ilowite JS, Tashkin DP, *et al.* Long-acting bronchodilation with once-daily dosing of tiotropium (Spiriva) in stable chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 161(4 Pt 1): 1 136.
- [3] Disse B, Speck A. G, Rominger KL, *et al.* Tiotropium (Spiriva™): mechanical considerations and clinical profile in obstructive lung disease[J]. *Life Sci*, 1999, 64(6/7): 457.
- [4] Türk D, weber W, Sigmund R, *et al.* Pharmacokinetics of intravenous, single-dose tiotropium in subjects with different degrees of renal impairment[J]. *J Clin Pharmacol*, 2004(44): 163.

(收稿日期:2013-05-22 修回日期:2013-07-17)