

## HPLC-MS/MS 法测定人体色甘酸钠血浆浓度及其药代动力学研究

徐晓燕<sup>1,2</sup>, 张蕊<sup>1</sup>, 袁桂艳<sup>1</sup>, 王本杰<sup>1</sup>, 刘晓燕<sup>1</sup>, 郭瑞臣<sup>1\*</sup>

(1. 山东大学 齐鲁医院 临床药理研究所, 山东 济南 250012; 2. 泰山医学院 药学院, 山东 泰安 271016)

**摘要:** 采用 HPLC-MS/MS 法测定人血浆中色甘酸钠浓度, 进行其滴鼻液和鼻用喷雾剂的药代动力学研究并评价其生物等效性。采用高效液相分离系统, 流动相为乙酸铵-甲醇(含 50% 乙腈)(15: 85), 固定相为 AGT Venusil XBP C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm) 色谱柱。采用质谱检测系统, ESI 离子源, 正离子模式, 多级反应监测(MRM) 方式,  $m/z$  469→263.1 (色甘酸钠),  $m/z$  447.2→327.1 (内标, 普伐他汀钠)。在 0.3–20 ng·mL<sup>-1</sup> 色甘酸钠血药浓度呈线性关系, 定量限为 0.3 ng·mL<sup>-1</sup>, 回收率在 94.1% 以上, 日内日间的 RSD 均小于 14.3%。单剂量给药色甘酸钠鼻用喷雾剂或滴鼻液, 其药代动力学参数  $T_{1/2}$  分别为 (1.82 ± 0.54) 和 (1.59 ± 0.52) h;  $T_{max}$  分别为 (0.47 ± 0.12) 和 (0.44 ± 0.15) h;  $C_{max}$  分别为 (9.79 ± 4.66) 和 (10.88 ± 4.05) ng·mL<sup>-1</sup>,  $AUC_{0-5h}$  分别为 (11.52 ± 3.46) 和 (12.63 ± 4.23) ng·mL<sup>-1</sup>·h。色甘酸钠鼻用喷雾剂相对生物利用度  $F_r$  为 (93.6 ± 13.8)%。本法灵敏度高, 适用于色甘酸钠治疗药物监测及其药代动力学和生物利用度研究。

**关键词:** 色甘酸钠; HPLC-MS/MS; 药代动力学; 生物利用度

中图分类号: R917; R969.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2008)09-0942-04

## HPLC-MS/MS method for determination of sodium cromoglycate concentration in human plasma and its pharmacokinetics

XU Xiao-yan<sup>1,2</sup>, ZHANG Rui<sup>1</sup>, YUAN Gui-yan<sup>1</sup>, WANG Ben-jie<sup>1</sup>,  
LIU Xiao-yan<sup>1</sup>, GUO Rui-chen<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Clinical Pharmacology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China;  
2. School of Pharmacy, Taishan Medical College, Tai'an 271016, China)

**Abstract:** The study established an HPLC-MS/MS method for determining the concentrations of sodium cromoglycate in human plasma and evaluated the pharmacokinetics of nasal drops and nasal spray. A C<sub>18</sub> column was used to separate sodium cromoglycate in plasma with a mobile phase of a mixture of ammonium-methanol (involves 50% acetonitrile) (15:85) at a flow rate of 0.4 mL·min<sup>-1</sup>. Electronic spray ionization (ESI) and multiple-reaction monitoring (MRM) were used for the determination of sodium cromoglycate in human plasma. The linear range of the standard curve of sodium cromoglycate was from 0.3 to 20 ng·mL<sup>-1</sup>, and the minimum concentration of detection was 0.3 ng·mL<sup>-1</sup>. The extraction recovery was more than 94.1%, intra-day and inter-day RSD were less than 14.3%. After a single dose of sodium cromoglycate, the main pharmacokinetic parameters of nasal spray and nasal drops were as follows,  $T_{1/2}$  (1.82 ± 0.54) h, (1.59 ± 0.52) h;  $T_{max}$  (0.47 ± 0.12) h, (0.44 ± 0.15) h;  $C_{max}$  (9.79 ± 4.66) ng·mL<sup>-1</sup>, (10.88 ± 4.05) ng·mL<sup>-1</sup>;  $AUC_{0-5h}$  (11.52 ± 3.46) ng·mL<sup>-1</sup>·h, (12.63 ± 4.23) ng·mL<sup>-1</sup>·h,  $F_r$  (93.6 ± 13.8)%. The method is sensitive, rapid and accurate. It is suitable for therapeutic drug monitoring and human pharmacokinetic study of sodium cromoglycate.

收稿日期: 2008-03-31.

\*通讯作者 Tel: 86-531-82169636, Fax: 86-531-86109975, E-mail: gre7636@126.com

**Key words:** sodium cromoglycate; HPLC-MS/MS; pharmacokinetics; bioavailability

色甘酸钠(sodium cromoglycate)为新型抗变态反应药,对速发型过敏反应有良好的抑制作用。临床可用于预防各型哮喘的发作及过敏性眼部疾患、过敏性鼻炎、过敏性结肠炎、消化道过敏等。色甘酸钠呈强酸性,极性较高,口服仅1%从胃肠道吸收,主要经鼻腔给药。色甘酸钠含量测定方法有紫外分光光度法<sup>[1]</sup>、高效液相色谱法<sup>[2-4]</sup>、反相高效液相色谱法<sup>[5]</sup>等,但由于给药剂量小,血浓度低,这些常规检测方法都无法满足生物样品微量色甘酸钠测定的要求。国外有文献<sup>[6]</sup>报道采用高效液相色谱-质谱联用,进行生物样品中色甘酸钠的测定,但其样品处理方法复杂,操作繁琐。本研究以普伐他汀钠为内标,采用HPLC-MS/MS法测定血浆中色甘酸钠浓度,操作简便,分析周期短,定量限达 $0.3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,可用于色甘酸钠鼻腔给药的药代动力学及生物利用度研究。

## 材料与方法

**仪器与试剂** Agilent 6410 Triple Quad LC-MS/MS, 1200series HPLC, Hip-ALS SL 进样器(美国安捷伦科学技术公司)。

色甘酸钠鼻用喷雾剂(试验制剂,T),山东京卫制药有限公司生产,批号S0704017。色甘酸钠滴鼻液(参比制剂,R),沈阳华益药业有限公司生产,批号20070301。色甘酸钠对照品由山东京卫制药有限公司提供,纯度99%。

**试验对象** 健康男性志愿者20名,体重( $67.4 \pm 4.6$ )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实验,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,试验方案通过伦理委员会批准。

**试验方案** 单剂两周期双交叉试验设计。20名健康志愿者随机分为两组并编号为1~20,试验当日晨抽取空白血样后,立即鼻腔给予色甘酸钠鼻用喷雾剂(T)或色甘酸钠滴鼻液(R),按照鼻腔给药操作流程要求,喷口向上倾斜45度,每鼻孔两喷。于用药后0.17, 0.33, 0.5, 0.67, 0.83, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0和5.0h取肘静脉血4mL,肝素抗凝,5000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5min,取血浆置Ep管-20℃低温保存。周期间清洗期为1

周。第2周期用药剂量、留样方法同第1周期。

**色谱条件及质谱条件** 色谱条件: AGT Venusil XBP  $\text{C}_{18}$ (250 mm  $\times$  4.6 mm ID, 5  $\mu\text{m}$ )色谱柱;流动相为乙酸铵-甲醇(含50%乙腈)(15:85),在线脱气;流速 $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;柱温30℃;进样量10  $\mu\text{L}$ 。质谱条件: ESI离子源,正离子模式,雾化压力280 kPa,干燥气( $\text{N}_2$ )流速 $10 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ,干燥气温度为350℃,毛细管电压4 kV,碰撞气为氮气,压力小于0.2 MPa。多级反应监测(MRM)方式,  $m/z$  469 $\rightarrow$ 263.1(色甘酸钠),  $m/z$  447.2 $\rightarrow$ 327.1(内标),色甘酸钠碰撞能量为20 V,碎片电压为150 V, EMV = 600;内标碰撞能量为20 V,碎片电压为100 V, EMV = 600。

### 对照品及内标溶液配制

色甘酸钠对照品溶液的配制 精密称取色甘酸钠对照品10.6 mg,以水配成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 储备液。取储备液100  $\mu\text{L}$ ,用流动相稀释为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 储备液I。取储备液I,用流动相依次稀释得到 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 储备液II、 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 储备液III和 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 储备液IV,4℃冷藏备用。

内标溶液的配制 精密称取普伐他汀钠对照品12.5 mg,用甲醇配成 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 普伐他汀钠溶液。用甲醇依次稀释得 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 储备液I和 $250 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液II,4℃冷藏备用。

**样本处理** 取血浆样品1 mL,加入 $250 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 普伐他汀钠内标溶液20  $\mu\text{L}$ ,过Waters Scp-pak小柱(1 mL Vac  $\text{C}_{18}$ ,用前经甲醇2 mL和水2 mL活化),再用水1 mL洗涤,弃去洗涤液。甲醇1 mL洗脱,洗脱液于40℃水浴 $\text{N}_2$ 吹干,残留物用流动相100  $\mu\text{L}$ 复溶,进样10  $\mu\text{L}$ 。

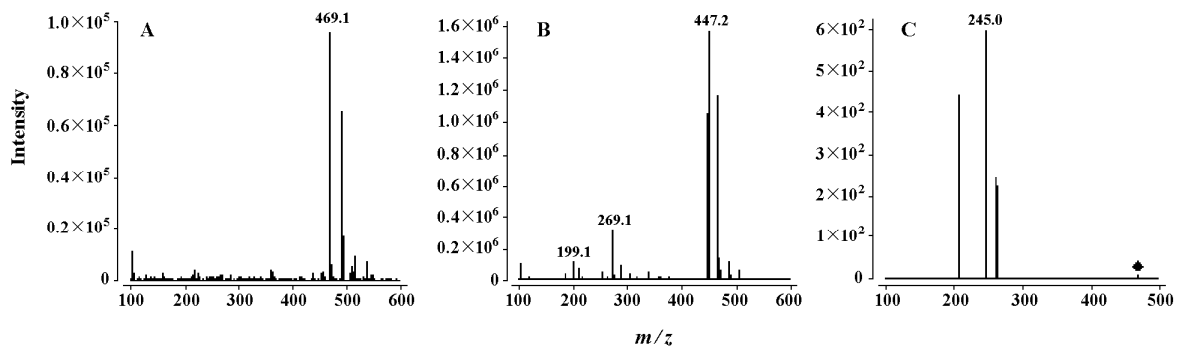
## 结果

### 1 方法专属性

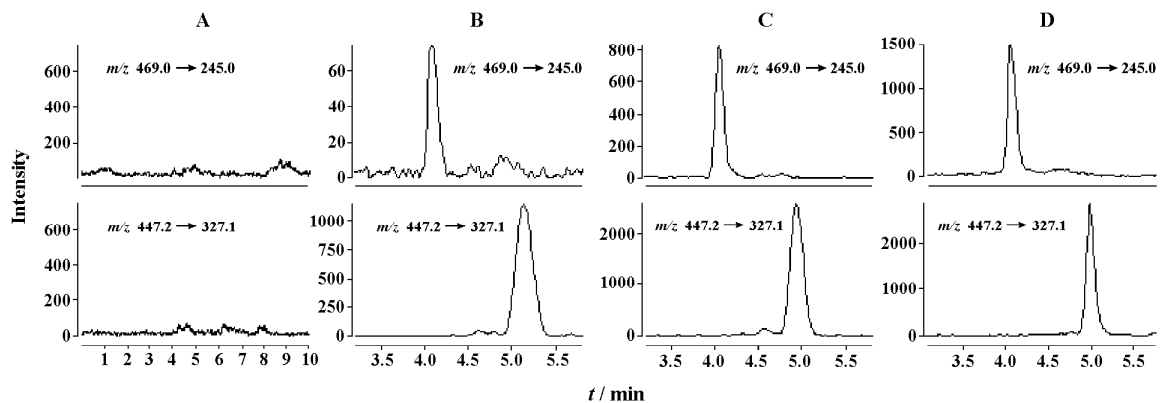
对照品和内标质谱图见图1,空白血浆及志愿者血浆样本色谱图见图2,表明血浆中内源物质无干扰。

### 2 标准曲线制备

取空白人血浆适量置10 mL试管中,分别配成含色甘酸钠0.3, 0.5, 1, 2, 4, 8, 10和20  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 系列空白血浆溶液。按“样本处理”项下提取,进样测定。以色甘酸钠与普伐他汀钠峰面积比(Y)



**Figure 1** First mass-spectrogram of sodium cromoglycate (A) and pravastatin sodium (internal standard, B), second mass-spectrogram of sodium cromoglycate (C)



**Figure 2** Chromatograms of blank plasma (A), the minimum concentration of detection (B), blank plasma plus sodium cromoglycate and internal standard (IS, C) and plasma sample 1 hour after single dose of sodium cromoglycate of volunteer No. 1 plus IS (D)

为纵坐标, 色甘酸钠浓度( $X$ )为横坐标绘制标准曲线, 计算色甘酸钠回归方程( $n=8$ )为:  $Y=0.5114X+0.0011$ ,  $r=0.9939$ 。线性范围为  $0.3 \sim 20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 定量限为  $0.3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 3 回收率及精密度试验

取低、中、高 3 个浓度 ( $0.5, 4$  和  $15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的色甘酸钠对照品血浆, 按“样本处理”项处理后进行样分析。计算提取相对回收率和绝对回收率 ( $n=5$ ); 一日内测定 5 次, 计算日内变异; 每日测定 1 次, 连续测定 5 日计算日间变异。3 个浓度的相对回收率分别为 94.80%, 101.80% 和 91.80%; 绝对回收率分别为 94.69%, 94.11% 和 95.84%。3 个浓度测定的日内精密度分别为 14.30%, 3.93% 和 4.64%; 日间精密度分别为 9.99%, 9.80% 和 4.70%。

### 4 稳定性试验

分别取含色甘酸钠低、中、高 3 个浓度 ( $0.5, 4$  和  $15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的质控样品各 5 份, 测定冷冻前、冻融 1 次、冻融 2 次、冷冻 24 h 和冷冻 7 d 时药物的浓度, 考察冻融和存放时间对色甘酸钠稳定性的影响, 试验结果表明色甘酸钠在上述条件下稳定, RSD% 均小于 12%。

### 5 试验制剂和参比制剂喷出剂量考察试验

为保证给药剂量的准确性, 在给药前进行给药剂量考察试验, 以确定给药剂量。试验制剂色甘酸钠鼻用喷雾剂规格  $0.26 \text{ g}/100 \text{ 喷}/13 \text{ mL}$  ( $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ); 参比制剂色甘酸钠滴鼻液规格  $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。按照实际鼻腔给药操作流程要求喷口向上倾斜 45 度向 Ep 管中喷入药物 (每管两喷), 称重, 计算试验制剂与参比制剂的校正因子。结果见表 1。

**Table 1** Dose of extrusion of sodium cromoglycate test and reference preparation ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

	T/g	R/g	T/R
$\bar{x} \pm s$	0.24 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.89 ± 0.05
RSD/%	3.01	4.14	5.64

T: Test preparation (sodium cromoglycate nasal spray); R: Reference preparation (sodium cromoglycate nasal drops)

## 6 质量控制 (QC) 试验

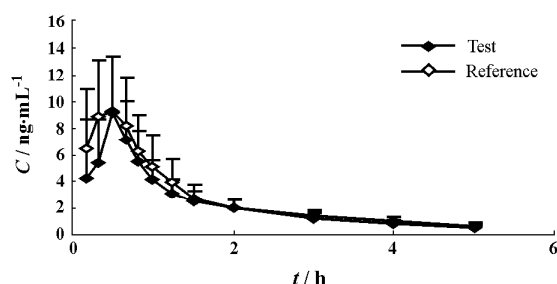
在未知样品测定过程中, 随行测定低、中、高浓度(0.5, 4 和 15  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的质控样品, 使其均匀分布在未知样品测试顺序中, 以考察分析方法的准确性。结果 3 个浓度 QC 样品的相对标准偏差小于 12%, 符合体内药物分析的要求。

## 7 血药浓度

20 名志愿者鼻腔给予色甘酸钠试验制剂和参比制剂后, 血药浓度-时间曲线见图 3。

## 8 药代动力学参数

将单剂给药色甘酸钠后的血药浓度-时间数据用 DAS 2.0 软件处理进行拟合, 结果表明其在人体



**Figure 3** Mean time-concentration curves after a single dose of sodium cromoglycate test and reference.  $n = 20, \bar{x} \pm s$

**Table 2** Pharmacokinetic parameters after a single dose of sodium cromoglycate test and reference ( $n = 20, \bar{x} \pm s$ )

Parameter	T	R
$T_{1/2}/\text{h}$	1.82 ± 0.54	1.59 ± 0.52
$C_{\text{max}}/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	9.79 ± 4.66	10.88 ± 4.05
$T_{\text{max}}/\text{h}$	0.47 ± 0.12	0.44 ± 0.15
$\text{AUC}_{0-5\text{h}}/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$	11.52 ± 3.46	12.63 ± 4.23
$\text{AUC}_{0-\text{inf}}/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$	13.22 ± 3.90	13.85 ± 4.40
$F_r$	93.6% ± 13.8%	

内代谢过程基本符合二室模型, 其主要药代动力学参数见表 2。

## 讨论

色甘酸钠临床应用剂量小, 人体血药浓度低, 常规检测方法都无法满足生物样品中微量药物测定的要求。本研究操作简便, 灵敏度和准确度高、专属性强、重现性好, 经方法学考察确证其回收率和日内、日间精密度均符合生物样品测定的要求, 适用于血中色甘酸钠浓度测定及其药代动力学和生物利用度研究。

本研究中试验制剂与参比制剂均为鼻腔给药, 为保证给药剂量的准确性, 在给药前规范了鼻腔给药的操作流程并进行了给药剂量考察试验, 计算出试验制剂与参比制剂的校正因子进行参数校正, 以确保二者药代动力学参数的可比性, 为鼻腔给药的药代动力学研究提供了参考。

## References

- [1] Guo YR, Meng DP, Lu M. Quality control of sodium cromoglycate nasal drops [J]. China Pharm (中国药业), 2004, 13:56-57.
- [2] Huang TM, Yang H, Liu Z. Determination of the content of dexamethasone sodium phosphate and sodium cromoglycate by HPLC [J]. Fudan Univ J Med Sci (复旦大学学报 医学版), 2005, 32:484-485.
- [3] Aswania OA, Corlett SA, Chrystyn H. Development and validation of an ion-pair liquid chromatographic method for the quantification of sodium cromoglycate in urine following inhalation [J]. J Chromatogr B, 1997, 690: 373-378.
- [4] Guo YR, Lu M. Determination of sodium cromoglycate nasal drops by RP-HPLC [J]. China Pharm (中国药师), 2004, 7:360-361.
- [5] Aswania OA, Corlett SA, Chrystyn H. Validation of a high performance liquid chromatography assay for urinary nedocromil sodium following oral and inhaled administration [J]. J Chromatogr B, 1998, 718:290-295.
- [6] Ozoux ML, Girault J, Malgouyat JM. Determination of sodium cromoglycate in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry in the turbo ion spray mode [J]. J Chromatogr B, 2001, 765:179-185.