

LC/MS/MS法测定血浆中左羟丙哌嗪浓度及其药代动力学

肇丽梅^{1*}, 赵立², 孙亚欣¹, 邱枫¹, 郭善斌¹

(中国医科大学 附属第二医院 1. 临床药理研究室, 2. 呼吸内科, 辽宁 沈阳 110004)

摘要: 目的 建立测定血浆中左羟丙哌嗪的液相色谱-串联质谱法, 考察左羟丙哌嗪在中国健康志愿者体内的药代动力学行为。方法 血浆样品经液液提取后, 进行色谱分离, 在三重四极杆串联质谱仪上, 以多重反应离子监测(MRM)方式进行定量分析, 用于监测的离子为 m/z 237 \rightarrow m/z 120(左羟丙哌嗪)和 m/z 288 \rightarrow m/z 58(佐米曲普坦, 内标)。结果 左羟丙哌嗪的最低定量浓度为 $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 线性范围为 $0.25 - 500.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 精密度与准确度符合生物样品分析要求。结论 该法操作简便、快速、灵敏度高。可检测出健康志愿者 po 左羟丙哌嗪 60 mg, 其 24 h后的血药浓度, 适于临床药代动力学研究。

关键词: 左羟丙哌嗪; 液相色谱-串联质谱法; 药代动力学

中图分类号: R917; R969 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2004)12 - 0993 - 04

Determination of levodropropizine and its pharmacokinetics in human plasma using LC/MS/MS

ZHAO Li-mei^{1*}, ZHAO Li², SUN Ya-xin¹, QIU Feng¹, GUO Shan-bin¹

(1. Laboratory of Clinical Pharmacology, 2. Department of Respiratory Medicine, No. 2 Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China)

Abstract: Aim To develop a rapid and sensitive LC/MS/MS method for the analysis of levodropropizine in plasma and study the pharmacokinetics of levodropropizine in healthy Chinese volunteers. **Methods** Levodropropizine and zolmitriptan (internal standard, IS) were extracted from plasma samples and chromatographed on a C_{18} column and detected using a tandem mass spectrometer with a TurboIon Spray ionization interface. Quantitation was performed using multiple reaction monitoring (MRM) of the transitions of the m/z 237 \rightarrow m/z 120 for levodropropizine and m/z 288 \rightarrow m/z 58 for the IS. **Results** The limit of quantification of the method for levodropropizine was $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. The assay was linear over the concentration range from 0.25 to $500.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ and intra- and inter-day precision over this range were $<11.4\%$ with good accuracy. **Conclusion** The method is shown to be accurate, and suitable for clinical pharmacokinetic study of levodropropizine.

Key words: levodropropizine; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; pharmacokinetics

左羟丙哌嗪(levodropropizine)为苯丙哌嗪的衍生物,动物实验和人体试验显示该药具有良好的镇咳效应,与其消旋体羟丙哌嗪相比,具有较弱的中枢镇静作用,较好的镇咳、镇静效应比。因此,临床采用该药治疗干咳和持续性咳嗽^[1,2]。

有关测定左羟丙哌嗪体内浓度的报道较少,国

内仅见采用 HPLC, TLC法测定制剂中左羟丙哌嗪含量报道^[3,4], 尚未见其体内药物浓度测定及药代动力学过程研究。国外文献中有采用 HPLC方法^[5,6]和 GC/MS^[7]方法测定其体内浓度,并初步研究了其体内药代动力学过程。本文在上述研究基础上,首次建立了测定人体内左羟丙哌嗪浓度的液相色谱-串联质谱方法(LC/MS/MS),并将其成功地用于该药在中国健康志愿者体内的药代动力学研究。

收稿日期: 2004-02-25.

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 24 - 23925108,

E-mail: LMZhaol6@hotmail.com

材料与方法

仪器与试剂 美国 Applied Biosystem 公司 API 4000 型三重四极杆串联质谱仪, 配有离子喷雾离子化源及 Analyst 1.3 数据处理软件; 美国 Agilent 公司 Agilent 1100 高效液相色谱系统。

左羟丙哌嗪对照品 (光学纯度大于 99.5%, 含量 99.36%), 哈药集团制药六厂提供; 佐米曲普坦对照品 (含量为 99.7%), 赤峰博达药物研究所提供; 左羟丙哌嗪片 (哈药集团制药六厂, 每片含左羟丙哌嗪 60 mg)。

色谱条件 色谱柱为 Nucleosil C₁₈ 柱 (50 mm × 4.6 mm ID, 5 μm) (大连江申分离科学技术公司); 流动相: 甲醇-10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵甲酸 (45:54:1); 流速: 0.5 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。

质谱参数 离子源为离子喷雾离子化源; 离子喷射电压 5.2 kV; 温度 500 °C; 源内气体 1 (GS1, N₂) 压力 276 kPa; 气体 2 (GS2, N₂) 压力 207 kPa; 气帘气体 (N₂) 压力 172.5 kPa; 正离子方式检测; 扫描方式为多重反应监测 (MRM); 碰撞气 (N₂) 压力 20.7 kPa; DP 电压及碰撞诱导解离 (CID) 电压分别为 75 V 和 50 V (左羟丙哌嗪), 38 V 和 44 V (佐米曲普坦); 用于定量分析的离子反应分别为 m/z 237 → m/z 120 (左羟丙哌嗪) 和 m/z 288 → m/z 58 (佐米曲普坦)。

给药与血浆样品采集 经医学伦理委员会批准, 选择健康男性志愿者 22 名, 空腹 12 h 后, 分别口服左羟丙哌嗪片 1 片。于服药前 (0 h) 和服药后 0.17, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 9.0, 12.0, 24.0 h, 经静脉留置针取前臂静脉血 4.0 mL, 置肝素化试管中, 4 °C 离心, 分离血浆, 保存于 -20 °C 冰箱中, 冷冻待测。血浆样品采集过程需避光。

血浆样品处理 精密取血浆 0.2 mL, 置具塞试管中, 加入内标溶液 (10 μg·L⁻¹ 佐米曲普坦甲醇溶液) 100 μL, 加入甲醇-水 (50:50) 混合溶液 100 μL, 混匀。以 Na₂CO₃ 溶液 (1 mol·L⁻¹) 100 μL 碱化, 乙醚-二氯甲烷 (3:2) 3 mL 提取, 涡流混合 1 min, 往复振荡 10 min, 离心 5 min (3 500 r·min⁻¹), 取上层有机相于另一试管中, 40 °C 空气流下吹干, 残留物加入流动相 200 μL 溶解, 涡流混合, 取 20 μL 进行 LC/MS/MS 分析。

数据处理 采用梯形法计算 AUC_{0-∞} 值, 以半对数作图法, 由消除相末端浓度点计算, K_e 和 T_{1/2}, 以

末端点和 K_e 的比值计算 AUC_{0-∞}, 达峰时间 (T_{max}) 和达峰浓度 (C_{max}) 采用实测值。

结果

1 质谱分析

左羟丙哌嗪和内标在离子喷雾离子化方式下, 主要生成 [M+H]⁺ 准分子离子峰, 分别为 m/z 237 和 m/z 288。选择性对 [M+H]⁺ 进行产物离子扫描 (见图 1), 生成的主要碎片离子分别为 m/z 120 和 m/z 58, 将这些主要碎片离子作为定量分析时监测的产物离子。

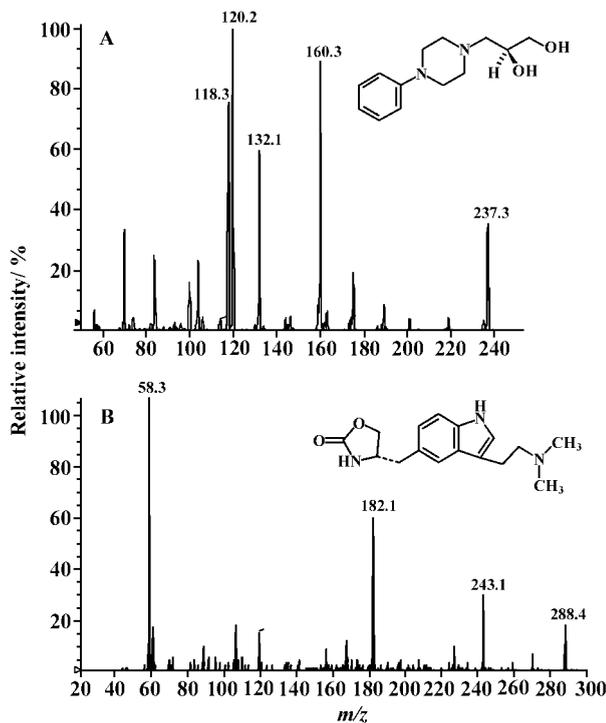


Figure 1 Full scan MS-MS spectra of levopropizine (A) and zolmitriptan (B)

2 方法专属性

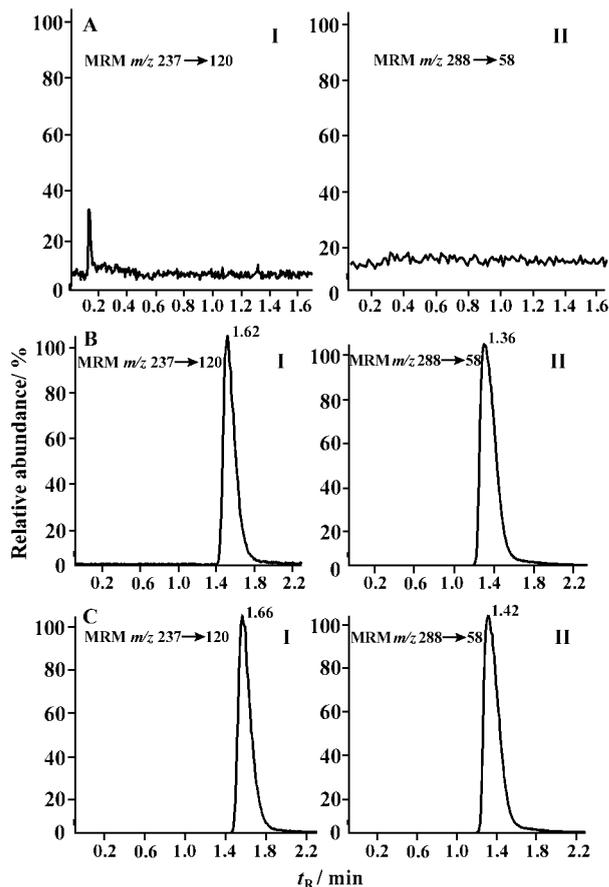
取空白血浆 0.2 mL, 分别按照“血浆样品处理”项下操作, 进行分析。结果表明样品中内源性物质不干扰左羟丙哌嗪和佐米曲普坦的测定。空白血浆色谱图、空白血浆加标准品色谱图、志愿者给药后采集的血浆样品色谱图见图 2。

3 标准曲线和线性范围

取空白血浆 0.2 mL 7 份, 置 10 mL 带塞试管中, 依次加入左羟丙哌嗪系列溶液, 使左羟丙哌嗪血浆质量浓度为 0.25, 0.50, 2.00, 10.0, 40.0, 125.0 和 500.0 μg·L⁻¹。按“血浆样品处理”项下依法操作, 进样 20 μL, 记录色谱图; 以生物样品中待测物

浓度为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标,用加权($W=1/x^2$)最小二乘法进行回归运算,求得标准曲线回归方程。

测定血浆样品标准曲线的回归方程为: $A_3/A_1 = 0.0193C + 0.0148$, $r = 0.9949$, 定量下限为 $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



A: Blank plasma sample; B: Blank plasma substitute spiked with levopropizine ($2.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) and zolmitriptan (IS); C: Plasma sample 2 h after *po* 60 mg levopropizine to one healthy volunteer. I and II refer to levopropizine and zolmitriptan, respectively

Figure 2 Chromatograms of levopropizine and zolmitriptan (IS) by multiple reaction monitoring (MRM) scan mode

4 精密度和准确度

取空白血浆 0.2 mL ,按“标准曲线和线性范围”项下方法制备左羟丙哌嗪低、中、高 3 个浓度(分别为 $0.50, 40.0$ 和 $400.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)的血浆样品,每个浓度进行 6 样本分析,连续测定 3 批,计算本方法的精密度与准确度。

测定血浆样品中左羟丙哌嗪方法的精密度与准确度结果见表 1。

5 提取回收率

取空白血浆 0.2 mL ,按“标准曲线和线性范围”项下方法制备左羟丙哌嗪低、中、高 3 个浓度(分别为 $0.50, 40.0$ 和 $400.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)的血浆样品,每个浓度进行 5 样本分析。以提取后的色谱峰面积与相同浓度样品未经提取获得的色谱峰面积之比,考察样品的提取率。低、中、高 3 个浓度下血浆中待测物的提取回收率分别为 $40.3\%, 48.1\%$ 和 54.3% 。结果表明,本法的绝对回收率稳定,能满足样品分析的要求。

Table 1 Precision and accuracy of the LC/MS/MS method for determination of levodroprodine in human plasma (in a preliminary study)

Concentration / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$		RSD / %		Relative error / %
Added	Measured	Within-run	Between-run	
0.50	0.50	11.4	8.10	-0.4
40.0	42.1	2.90	6.22	5.2
400.0	385.5	5.90	7.00	-3.6

6 稳定性考察

左羟丙哌嗪具有光不稳定性,因此,试验均在避光条件下进行。经考察,血浆样品经处理后,室温下避光放置 24 h 稳定。

7 左羟丙哌嗪体内药代动力学

22 名健康志愿者口服左羟丙哌嗪片后,其平均血药浓度-时间曲线见图 3。从图 3 可见,左羟丙哌嗪口服,吸收较快,平均达峰时间为 $(0.8 \pm 0.4) \text{ h}$,体内平均峰浓度(C_{max})为 $(269 \pm 110) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $T_{1/2}$ 为 $(2.7 \pm 1.1) \text{ h}$,采用梯形法计算, AUC_{0-1} 和 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 分别为 $(957 \pm 584) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(971 \pm 588) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

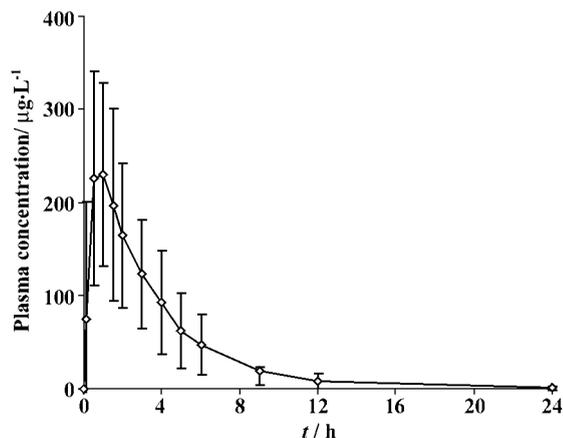


Figure 3 Mean plasma concentration-time curve of levodroprodine after *po* 60 mg levodroprodine to 22 volunteers ($n = 22, \bar{x} \pm s$)

讨论

据文献^[5-7]报道,采用 HPLC和 GC方法测定血浆中左羟丙哌嗪浓度,不仅检测灵敏度较低,而且分析周期较长。在本文建立的 LC/MS/MS方法中,采用 MRM(多重反应监测)扫描方式,同时对待测物的母离子和产物离子进行检测,提高了方法的灵敏度和选择性(最低定量浓度为 $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。本文采用改进的进样程序^[8],使每份样品的分析时间仅为 2 min,大大提高了分析速度。

左羟丙哌嗪为碱性化合物,本文考察了不同碱化试剂对样品回收率的影响,发现血浆样品经 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ 碱化处理后,经乙醚-二氯甲烷(3:2)提取,可获得稳定的提取回收率。同时,采用乙醚-二氯甲烷混合提取溶剂,不仅提取回收率稳定,而且易于操作,缩短样品处理周期。

左羟丙哌嗪口服吸收较快,在本文考察的 22 名志愿者中,血浆浓度达峰时间最短为 15 min。本文的实验结果,为进一步研究该药的体内过程提供了参考。

致谢:吉林大学药物代谢研究中心为本文工作提供支持。

References:

[1] Bossi R, Braga PC, Centanni S, *et al.* Antitussive activity and respiratory system effects of levodropropizine

in man [J]. *Arzneimittelforschung*, 1988, **38**(8):1159 - 1162.

[2] Munt PL, Clavenna G, Algate DR, *et al.* Antitussive effects of levodropropizine in the dog [J]. *Arzneimittelforschung*, 1994, **44**(2):153 - 155.

[3] Zhang Q, Liu J, Huang F, *et al.* RP-HPLC and TLC method for testing related substances in levodropropizine [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2001, **10**(6):437 - 439.

[4] Lu JH, Zhao YP. Content of compound levodropropizine synp determined by HPLC [J]. *China Pharm* (中国药师), 2002, **5**(1):35 - 36.

[5] Tagliaro F, Moffa M, De Battisti Z, *et al.* High-performance liquid chromatographic determination of levodropropizine in human plasma with fluorometric detection [J]. *J Chromatogr B*, 1996, **685**(1):165 - 170.

[6] Borsa M, Glavenna G, Ferrari MP, *et al.* Linearity of levodropropizine, a new antitussive drug, in the healthy volunteer [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 1991, (3):178 - 184.

[7] Zaratin P, De Angelis L, Cattabeni F. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of levodropropizine plasma levels in healthy volunteers [J]. *Arzneimittelforschung*, 1988, **38**(8):1156 - 1158.

[8] Wang YW, Tang YB, Wu Y, *et al.* An automatic and high effective injection program for LC-MS analysis [J]. *J Chin Mass Spectrom Soc* (质谱学报), 2003, **21**(Suppl):19 - 20.