

高灵敏度 LC/MS/MS法同时测定人血浆中麻黄碱和氯苯那敏

任 爽, 陈笑艳, 段小涛, 钟大放*

(沈阳药科大学 药物代谢与药物动力学实验室, 辽宁 沈阳 110016)

关键词: 麻黄碱; 氯苯那敏; 液相色谱-串联质谱法; 药代动力学

中图分类号: R969.11 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2006)02-0188-05

Simultaneous determination of ephedrine and chlorpheniramine in human plasma by a highly sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometric method

REN Shuang, CHEN Xiao-yan, DUAN Xiao-tao, ZHONG Da-fang*

(Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Aim To develop and validate a liquid chromatography-tandem mass spectrometric (LC/MS/MS) method for the simultaneous quantification of ephedrine and chlorpheniramine in human plasma after oral administration of a compound preparation. **Methods** The analytes and the internal standard, diphenhydramine, were isolated from plasma by protein precipitation with methanol, then chromatographed on a Zorbax SB-C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm ID) using a mobile phase consisted of methanol-water-formic acid (80:20:0.5, v/v), at a flow rate of 0.5 mL·min⁻¹. A tandem mass spectrometer equipped with electrospray ionization source was used as detector and was operated in the positive ion mode. Selected reaction monitoring (SRM) using the precursor to produce ion combinations of *m/z* 166→115, *m/z* 275→230 and *m/z* 256→167 were used to quantify ephedrine, chlorpheniramine and the internal standard, respectively. **Results** The linear concentration ranges of the calibration curves for ephedrine and chlorpheniramine were 0.50 - 200 μg·L⁻¹ and 0.050 - 20.0 μg·L⁻¹, respectively. The lower limits of quantification were 0.50 μg·L⁻¹ for ephedrine and 0.050 μg·L⁻¹ for chlorpheniramine, individually. The intra- and inter-day relative standard deviation (RSD) across three validation runs over the entire concentration range was less than 9.3% for both ephedrine and chlorpheniramine. The inter-day accuracy (RE) was within ±3.4% for the analytes. Each sample was chromatographed within 3.3 min. The method was successfully used in pharmacokinetics study of ephedrine and chlorpheniramine in human plasma after oral administration of a compound preparation containing 5 mg ephedrine hydrochloride, 1 mg chlorpheniramine maleate, 50 mg phenytoin, 12.5 mg theophylline, 12.5 mg theobromine and 7.5 mg caffeine. No interaction among the six components was observed on their pharmacokinetic parameters. **Conclusion** The method was proved to be highly sensitive, selective, and suitable for pharmacokinetics investigations of different compound preparations containing low dosage of both ephedrine and chlorpheniramine.

Key words: ephedrine; chlorpheniramine; LC/MS/MS; pharmacokinetics

麻黄碱是存在于草麻黄和木贼麻黄等植物中的生物碱,属拟肾上腺素类药物,包括互为差向异构体的麻黄碱和伪麻黄碱两种活性不同的成分;氯苯那敏为丙胺类组胺 H₁ 受体拮抗剂,作用较强,用量

收稿日期: 2005-06-01.

* 通讯作者 现址:中国科学院上海药物研究所

Tel / Fax: 86 - 21 - 50800738,

E-mail: zhongdf@china.com

少,中枢抑制作用小,为常用抗过敏药,临床上可用于缓解各种感冒症状,与麻黄碱联合应用,用于缓解支气管哮喘与慢性喘息性支气管炎所致支气管痉挛。

文献报道的单独测定生物样品中麻黄碱和氯苯那敏的方法主要有放射免疫分析法^[1]、高效液相色谱-荧光检测法^[2,3]及紫外检测法^[4,5]、气相色谱-质谱联用法^[6]。由于麻黄碱和氯苯那敏的理化性质和血药浓度相差较大,上述方法较难实现两种药物的同时测定。曾有文献^[7]报道采用 HPLC-UV法同时测定血浆中的伪麻黄碱和氯苯那敏,但由于灵敏度低(血浆用量为 1.5 mL时,伪麻黄碱和氯苯那敏定量下限分别为 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),分析时间长,无法满足高通量生物样品测试及临床药代动力学研究的要求。

本实验室曾建立了 LC/MS/MS法^[8]同时测定健康受试者口服含盐酸伪麻黄碱(60 mg)和马来酸氯苯那敏(4 mg)复方制剂后血浆中伪麻黄碱和氯苯那敏的浓度,血浆用量为 0.5 mL,定量下限分别为 2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在本试验中,待研究复方制剂中麻黄碱和氯苯那敏含量显著降低(盐酸麻黄碱为 5 mg片,马来酸氯苯那敏 1 mg片),目前尚无在此剂量下的药代动力学研究,因而仍需对该方法加以改进以获得更高的灵敏度以拓展药代动力学研究。

本文旨在建立更灵敏的液相色谱-串联质谱法同时测定人血浆中麻黄碱和氯苯那敏,并将其应用于含低剂量麻黄碱和氯苯那敏复方制剂的药代动力学研究。

材料与方法

药品与试剂 盐酸麻黄碱(纯度 >99%)和马来酸氯苯那敏(纯度 >99%)由山西三九同达药业有限公司提供;内标盐酸苯海拉明(纯度 >99.7%)购自中国药品生物制品检定所;复方妥英麻黄茶碱片,由大同星火药业有限责任公司研制(规格为每片含盐酸麻黄碱 5 mg,马来酸氯苯那敏 1 mg,苯妥英 50 mg,茶碱 12.5 mg,可可碱 12.5 mg,咖啡因 7.5 mg;批号 20040904);甲醇、乙腈为色谱纯,购于天津市康科德科技有限公司;甲酸为分析纯,购于沈阳化学试剂厂。

仪器 美国 Thermo Finnigan公司 TSQ Quantum Ultra型液相色谱-串联质谱仪,配有电喷雾离子源(ESI)以及 Xcalibur 1.4数据处理系统;日本岛津公

司 LC-10 ADvp高效液相色谱输液泵;日本岛津公司 SIL-HT型自动进样器。

色谱条件 Zorbax SB-C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm ID, 5 μm),美国 Agilent公司;流动相为甲醇-水-甲酸(80:20:0.5, v/v);流速 0.5 mL·min⁻¹,柱温 20 °C。

质谱条件 离子源为电喷雾离子源(ESI源),源喷射电压为 3.8 kV,加热毛细管温度为 320 °C,鞘气(N₂)压力 0.6 MPa,辅助气(N₂)压力为 3 L·min⁻¹,正离子方式检测;扫描方式为选择反应监测(SRM);碰撞气(Ar)压力 0.16 Pa。碰撞诱导解离(CID)电压分别为 30 eV(麻黄碱),25 eV(氯苯那敏)和 25 eV(内标苯海拉明);用于定量分析的离子反应分别为 m/z 166 → 115(麻黄碱), m/z 275 → 230(氯苯那敏)和 m/z 256 → 167(苯海拉明),扫描时间为 0.3 s。

血浆样品处理 向 100 μL 血浆中分别加入甲醇-水溶液(50:50, v/v) 50 μL , 40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯海拉明的甲酸(1%)甲醇溶液 100 μL ,混匀;加乙腈 300 μL 沉淀蛋白,涡流混合 1 min,离心 5 min(2 500 × g),取上清液 10 μL 进行 LC/MS/MS分析。

结果

1 质谱分析

麻黄碱和氯苯那敏在 ESI离子化方式下,主要生成 $[M+H]^+$ 准分子离子峰,分别为 m/z 166 和 m/z 275。选择性对准分子离子峰 $[M+H]^+$ 进行二级质谱分析(图 1),获得的麻黄碱和氯苯那敏基峰碎片离子分别为 m/z 115 和 m/z 230,用于 SRM定量分析。内标是以准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为母离子,以生成的主要碎片离子 m/z 167进行定量分析。

2 方法的选择性

取 6名受试者的空白血浆 100 μL ,除不加内标外,其他按“血浆样品处理”项下操作,进样 10 μL ,得色谱图 2A;将一定浓度的标准溶液和内标溶液加入空白血浆中,依同法操作,得色谱图 2B。麻黄碱、氯苯那敏和内标苯海拉明的保留时间分别为 2.84, 2.96 和 2.98 min。取受试者给药后的血浆样品,依同法操作,得色谱图 2C。结果表明,空白血浆中的内源性物质以及同服用的其他组分不干扰麻黄碱、氯苯那敏和内标苯海拉明的测定。

3 标准曲线和线性范围

取空白血浆 100 μL ,加标准系列溶液 50 μL ,配制成相当于麻黄碱血浆浓度为 0.50, 1.0, 2.0, 5.0, 15.0, 40.0, 100 和 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,相当于氯苯那敏血

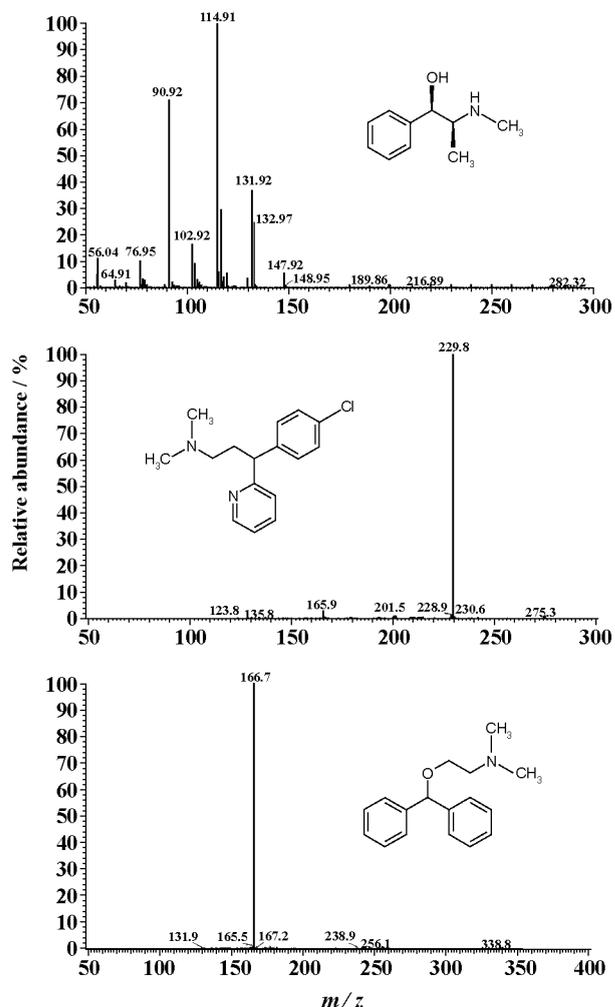


Figure 1 Product ion mass spectra of $[M + H]^+$ of ephedrine (A), chlorpheniramine (B) and diphenhydramine (C)

浆浓度为 0.050, 0.10, 0.20, 0.50, 1.50, 4.0, 10.0 和 20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品,按“血浆样品处理”项下依法操作,每一浓度进行双样本分析,标准曲线采用加权 ($W = 1/x^2$) 最小二乘法进行回归运算^[9],求得麻黄碱的典型回归方程为 $y = -5.436 \times 10^{-5} + 7.221 \times 10^{-4} x$, $r = 0.9964$; 氯苯那敏的典型回归方程为 $y = 2.539 \times 10^{-2} + 2.44 \times 10^{-1} x$, $r = 0.9942$,其中 y 代表待测物与内标峰面积比值, x 代表待测物浓度, r 为相关系数。根据标准曲线,麻黄碱的线性范围为 0.50 ~ 200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,氯苯那敏的线性范围为 0.050 ~ 20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,麻黄碱和氯苯那敏的定量下限分别为 0.50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 0.050 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,均优于以往文献^[1-7]报道。

4 精密度与准确度

取空白血浆 100 μL ,加入相应标准系列溶液 50 μL ,配制低、中、高 3 个浓度(麻黄碱血浆浓度为 0.50,

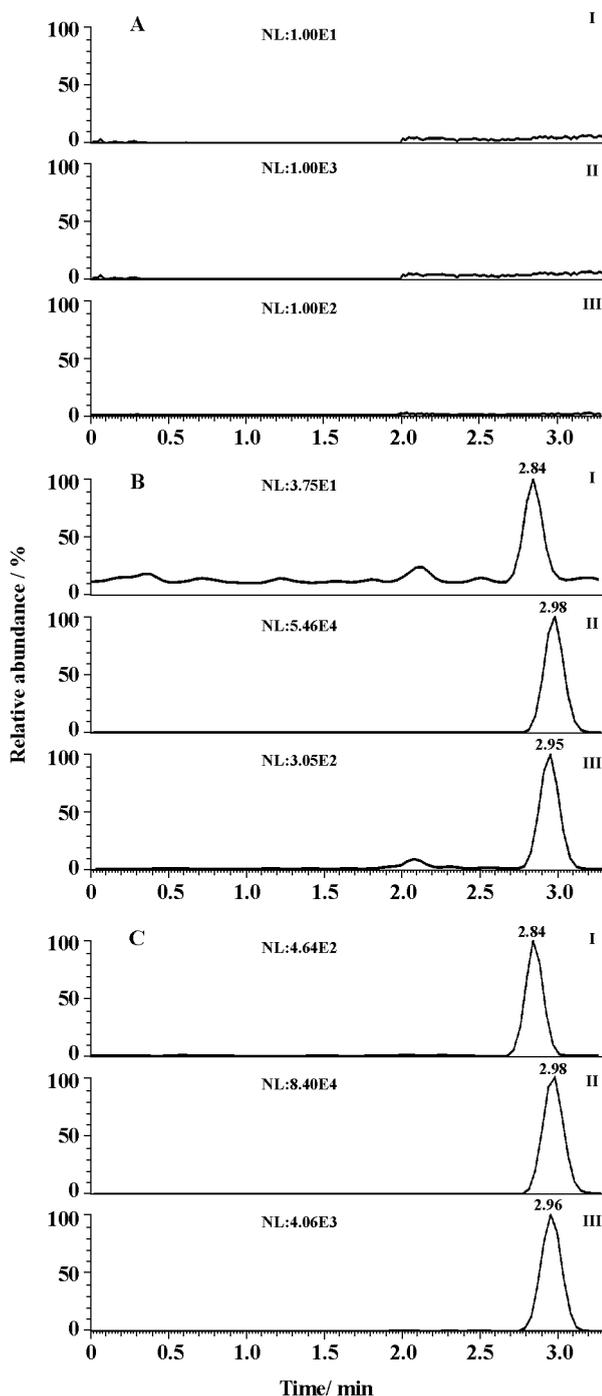


Figure 2 Typical chromatograms of ephedrine, chlorpheniramine and diphenhydramine (internal standard, IS) in human plasma by selected reaction monitoring (SRM) scan mode. A: Blank plasma sample; B: Plasma spiked with 0.50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ephedrine, 0.050 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ chlorpheniramine and 20 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ IS; C: Plasma sample 3 h after oral administration of a compound formulation containing 5 mg ephedrine hydrochloride, 1 mg chlorpheniramine maleate, 50 mg phenytoin, 12.5 mg theophylline, 12.5 mg theobromine and 7.5 mg caffeine to a healthy volunteer. Peaks I, II and III refer to ephedrine, IS and chlorpheniramine, respectively

15.0和 160 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,氯苯那敏血浆浓度为 0.050, 1.50和 16.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的质量控制(QC)样品,每一浓度进行 6 样本分析,连续测定 3 d,根据当日的标准曲线,计算 QC 样品的测得浓度,结果进行方差分析,求得本法的准确度与精密度,数据见表 1。由表中数据可知,测定血浆中麻黄碱和氯苯那敏方法的日内、日间精密度(RSD) < 9.3%,准确度(RE)在 $\pm 3.4\%$ 之内。

Table 1 Precision and accuracy for the analysis of ephedrine and chlorpheniramine in human plasma (in three consecutive days, six replicates for each day)

Drug	Added C / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Found C / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Intra-day RSD /%	Inter-day RSD /%	Relative error /%	Sample number
Ephedrine	0.500	0.481	9.3	0.6	-3.2	18
	15.0	15.3	6.7	3.9	2.1	
	160	163	5.9	6.8	1.7	
Chlorpheniramine	0.050	0.050	8.9	4.7	0.8	18
	1.50	1.45	6.0	3.8	-3.4	
	16.0	15.8	6.3	3.2	-1.0	

5 回收率

取含麻黄碱 1.0, 15.0, 160.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和氯苯那敏 0.1, 1.50和 16.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血浆样品,以前述方法处理后,每一浓度进行六样本分析。同时另取相应对照溶液 50 μL 和内标溶液 100 μL ,以空白血浆经乙腈沉淀蛋白处理后的上清液稀释至相应浓度,涡流混合后进样分析,以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算回收率。麻黄碱 3 种浓度下样品的回收率分别为 96.2%, 97.4%和 96.9%,氯苯那敏 3 种浓度下样品的回收率分别为 98.4%, 97.0%和 98.2%,内标溶液经同样处理,回收率为 99.7%。

6 样品稳定性

取空白血浆 100 μL ,配制低、高两个浓度(麻黄碱血浆浓度为 1.0和 160 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,氯苯那敏血浆浓度为 0.1和 16.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的稳定性样品,考察麻黄碱和氯苯那敏血浆样品经历 3 次冷冻-解冻循环、-20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 d、室温放置 2 h 以及经沉淀蛋白处理后的血浆样品室温放置 24 h 的稳定性,测得值与新鲜配置的 QC 样本值进行比较,浓度变化在 85% ~ 115%,结果表明麻黄碱和氯苯那敏在上述条件下均稳定,与文献^[8]报道一致。

7 分析方法在药代动力学研究中的应用

20 名健康男性受试者,经伦理委员会批准,签署知情同意书,于实验前一日晚 8:00 开始禁食,试验当日清晨 7:00 空腹口服复方妥英麻黄茶碱片

(含盐酸麻黄碱 5 mg,马来酸氯苯那敏 1 mg,苯妥英 50 mg,茶碱 12.5 mg,可可碱 12.5 mg,咖啡因 7.5 mg),服药后 2 h 和 5 h 进食统一的标准餐。采血期间禁烟酒和含咖啡因类饮料。于服药前和服药后 0.33, 0.67, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12, 24, 36, 48 和 72 h 于前臂静脉取血 4 mL,移入经肝素处理的试管,离心,分离血浆,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存至测定。血浆样品采集在辽宁省人民医院进行。麻黄碱及氯苯那敏平均血药浓度-时间曲线见图 3,主要药代动力学参数见表 2。

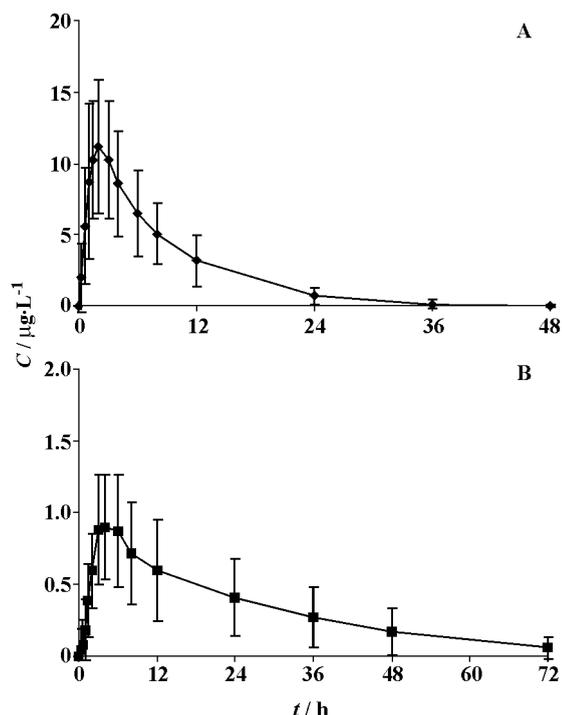


Figure 3 Mean plasma concentration-time curve of ephedrine (A) and chlorpheniramine (B) after a single oral administration of 5 mg ephedrine hydrochloride and 1 mg chlorpheniramine maleate in 20 volunteers ($n = 20$, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Main pharmacokinetics parameters of ephedrine and chlorpheniramine in 20 volunteers after an oral dose of 5 mg ephedrine and 1 mg chlorpheniramine ($\bar{x} \pm s$)

Parameter	Ephedrine	Chlorpheniramine
$C_{\text{max}} / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	13 \pm 5	1.0 \pm 0.4
$T_{\text{max}} / \text{h}$	1.9 \pm 0.8	4.1 \pm 1.2
$T_{1/2} / \text{h}$	5.7 \pm 2.0	20 \pm 9
K_e / h^{-1}	0.14 \pm 0.07	0.04 \pm 0.03
$\text{AUC}_{0-t} / \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	101 \pm 51	20 \pm 13
$\text{AUC}_{0-\infty} / \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	108 \pm 50	28 \pm 18

实际血浆样品测定按“血浆样品处理”项下操

作,每天建立一条标准曲线,同时分析低、中、高(双样本)的QC样品,根据当日标准曲线求算未知样品及QC样品浓度。主要药代动力学参数达峰浓度(C_{max})和达峰时间(T_{max})为实测值,对药时曲线进行对数线性回归求得消除速率常数(K_c),消除半衰期为 $T_{1/2} = \ln 2 / K_c$,采用梯形法计算0-t药时曲线下面积 AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_t / K_c$ 。

讨论

在复方制剂的药代动力学或生物等效性评价试验中,建立同时测定血浆样品中多组分的分析方法,不仅能缩短临床试验周期,而且可以充分利用有限且不可重复获得的生物样品。液相色谱-串联质谱法(LC/MS/MS)因其高灵敏度、高选择性,多组分同时测定不需完全分离,在复方制剂药代动力学研究中具有其他传统方法不可比拟的优势。

本室^[7]曾报道采用TSQ型液相色谱-串联质谱同时测定血浆中伪麻黄碱和氯苯那敏,血浆样品经液液萃取后,采用APCI源测定。在此试验中采用TSQ Quantum Ultra型液相色谱-串联质谱仪,以对照溶液直接进样,峰强度较原TSQ型串联质谱仪响应强度提高50倍以上,因此试验中降低血浆样品用量至100 μL ,经与文献^[7]相同的样品处理方法,发现麻黄碱线性良好而氯苯那敏在低浓度区域(小于0.20 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)响应强度不随浓度降低而降低,更换多种提取溶剂及pH调节剂均不理想,而后尝试改变色谱条件,均未见改善;改用电喷雾离子源(ESI)后,氯苯那敏线性虽然有所改善,但仍无法满足测定要求,因此尝试以沉淀蛋白法处理血浆样品,发现分别以乙腈和甲醇作为蛋白沉淀剂时,可排除内源性物质干扰,而以乙腈沉淀蛋白后两种被测物的质谱响应较甲醇高5倍左右,以上清液直接进样即可使氯苯那敏定量下限达到0.050 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

若以文献^[7]报道的离子对反应 $m/z 166 \rightarrow 148$ 对麻黄碱进行定量分析,由于血浆样品经沉淀蛋白处理,存在较高的背景噪音,因此,本试验对麻黄碱 $[M+H]^+$ 进行产物离子扫描时,增大CID能量,以获得碎片离子 $m/z 115$,降低SRM扫描时的背景噪音。

本文建立的液相色谱-质谱-质谱联用法操作简便,血浆样品经沉淀蛋白处理后即可进样分析,避免了浓缩和重新溶解等过程;采用SRM扫描方式进行定量,大大增加了方法选择性,复方制剂中其他组分(苯妥英、咖啡因、茶碱和可可碱)由于母离子及产

物离子均与待测物不同,因此不干扰待测物及内标的测定;灵敏度高,血浆用量仅为100 μL ,定量下限即可达到0.50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (麻黄碱)和0.050 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (氯苯那敏);分析速度快,每个样品测定仅需3.3 min,适于大批量生物样品的分析测试;对于氯苯那敏口服剂量仅为1 mg时的药代动力学,可测试到服药后72 h样品,适合不同处方及剂型的复方制剂中麻黄碱和氯苯那敏的同时测定及临床药代动力学研究。

References

- [1] Midha KK, Rauw G, McKay G, et al. Subnanogram quantitation of chlorpheniramine in plasma by a new radioimmunoassay and comparison with a liquid chromatographic method [J]. J Pharm Sci, 1984, 73: 1144 - 1147.
- [2] Miyamoto Y. Highly sensitive determination of chlorpheniramine as fluorescence derivative by high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr, 1987, 420: 63 - 72.
- [3] Aymard G, Labarthe B, Warot D, et al. Sensitive determination of ephedrine and norephedrine in human plasma samples using derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and liquid chromatography [J]. J Chromatogr B, 2000, 744: 25 - 31.
- [4] Bui TH, Fernandez C, Vu K, et al. Stereospecific versus nonstereospecific assessments for the bioequivalence of two formulations of racemic chlorpheniramine [J]. Chirality, 2000, 12: 599 - 605.
- [5] Amal K, Ai K, Mihoko NN, et al. High-performance liquid chromatography with UV detection for the simultaneous determination of sympathomimetic amines using 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazole-2-yl) benzoyl chloride as a label [J]. Biomed Chromatogr, 2001, 15: 379 - 388.
- [6] Spyridaki MH, Tsitsimpikou CJ, Siskos PA, et al. Determination of ephedrine in urine by gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2001, 758: 311 - 314.
- [7] Chen XY, Zhang Y, Zhong DF. Simultaneous determination of chlorpheniramine and pseudoephedrine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr, 2004, 18: 248 - 253.
- [8] Ge QH, Zhou Z, Zhi XJ, et al. HPLC method for the simultaneous determination of pseudoephedrine and chlorpheniramine in human plasma [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2004, 39: 281 - 284.
- [9] Zhong DF. Some aspects in establishing standard curves in bioanalysis with the weighted least squares method [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 1996, 16: 343 - 346.