

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)14-0054-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.14.013



吸入用盐酸氨溴索溶液在大鼠肺组织内的药物代谢动力学研究*

平 丽, 洪雅雯, 吴 玥

(浙江大学药学院·浙江大学药物安全评价研究中心, 浙江 杭州 310058)

摘要:目的 考察吸入用盐酸氨溴索溶液在大鼠肺组织内的药物代谢动力学(简称药动学)特征。方法 采用超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法测定SD大鼠肺组织中盐酸氨溴索含量,色谱柱为Waters Acquity UPLC BEH C₁₈柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm),流动相为0.1%甲酸水溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为0.3 mL/min,柱温为35℃,进样量为5 μL;采用电喷雾离子源,正离子多反应监测模式。通过给予大鼠吸入用盐酸氨溴索溶液(相当于盐酸氨溴索22.5 mg),分别于给药前及给药后0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h采集大鼠肺组织,并以DAS 3.0软件计算药动学参数。结果 大鼠肺组织内盐酸氨溴索质量浓度在10~1 000 ng/mL范围内与待测成分与内标峰面积的比值线性关系良好($r=0.9986, n=7$);精密性、稳定性、回收试验及基质效应结果均符合方法学要求。半衰期($t_{1/2}$)为4.33 h,峰浓度(C_{max})为3 997.40 ng/g,药-时曲线下面积(AUC_{0-1})为4 311.88 (ng·h)/g,平均滞留时间(MRT_{0-1})为2.74 h,清除率为5.05 (L·h)/kg。结论 该方法操作简便,结果准确可靠,可用于大鼠肺组织内吸入用盐酸氨溴索溶液的药动学研究。

关键词:吸入用盐酸氨溴索溶液;大鼠;肺组织;药物代谢动力学;超高效液相色谱串联质谱法;含量测定

Pharmacokinetic Study of Ambroxol Hydrochloride Solution for Inhalation in Lung Tissue of Rats

PING Li, HONG Yawen, WU Yue

(College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University · Center for Drug Safety Evaluation and Research of Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang, China 310058)

Abstract: Objective To investigate the pharmacokinetic characteristics of Ambroxol Hydrochloride Solution for Inhalation in the lung tissue of rats. **Methods** Ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was used to determine the content of ambroxol hydrochloride in the lung tissue of SD rats. The chromatographic column was the Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was 0.1% formic acid aqueous solution-acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 35℃, and the injection volume was 5 μL. The electron spray ionization was adopted with the positive-ion multiple reaction monitoring mode. The lung tissues of rats were collected before giving Ambroxol Hydrochloride Solution for Inhalation and after 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h of giving this drug (equivalent to 22.5 mg ambroxol hydrochloride), and pharmacokinetic parameters were calculated by the DAS 3.0 software. **Results** The linear range of ambroxol hydrochloride in lung tissue of rats was 10-1 000 ng/mL ($r=0.9986, n=7$). The results of precision, stability, recovery tests and matrix effect all met the methodological requirements. The half-life ($t_{1/2}$) was 4.33 h, the peak concentration (C_{max}) was 3 997.40 ng/g, the area under the plasma concentration-time curve (AUC_{0-1}) was 4 311.88 (ng·h)/g, the mean residence time (MRT_{0-1}) was 2.74 h, and the clearance rate was 5.05 (L·h)/kg. **Conclusion** This method is easy, accurate and reliable, which can be used for the pharmacokinetic study of Ambroxol Hydrochloride Solution for Inhalation in lung tissue of rats.

Key words: Ambroxol Hydrochloride Solution for Inhalation; rat; lung tissue; pharmacokinetics; UPLC-MS/MS; content determination

盐酸氨溴索为溴己新在体内的活性代谢物,可促进呼吸道内部黏稠分泌物的排出及减少黏液的滞留,从而有效促进排痰,临床主要用于治疗支气管哮喘和慢性支气管炎^[1-3]。盐酸氨溴索静脉注射因给药不便且会引起疼痛,从而导致患者依从性差。吸入给药可使药物以较高浓度到达气道或肺,起效迅速,使用方便,且能避免肝脏的首过效应,减少全身给药可能导致的不良反应^[4-5]。研究发现,雾化吸入盐酸氨溴索溶液可达到与口服给药相同的疗效,且起效较口服药物快,所需

剂量更小,副作用相对更少,临床应用广泛^[6-9]。本研究中建立了大鼠肺组织内吸入用盐酸氨溴索溶液药物代谢动力学(简称药动学)的考察方法,为吸入用盐酸氨溴索溶液的临床使用提供参考。现报道如下。

1 仪器、试药与动物

1.1 仪器

Waters Xevo TQS型超高效液质联用仪(美国Waters公司);PARI BOYN型压缩雾化吸入机(德国Pari公司);XS205型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公

*基金项目:浙江大学实验技术研究项目[SYBJS202206]。

第一作者:平丽,女,硕士,助理研究员,研究方向为药物分析和药物代谢动力学,(电子信箱)Pingli552@zju.edu.cn。

司,精度为0.01 mg);Eppendorf 5817R型离心机(德国Eppendorf公司);MTV-10型多管漩涡混合仪(上海之信仪器有限公司)。

1.2 试剂

盐酸氨溴索对照品(批号为100599-201905,含量99.9%),氯雷他定对照品(批号为100615-202005,含量100.0%),均购自中国食品药品检定研究院;吸入用盐酸氨溴索溶液(德国Boehringer Ingelheim Espana S. A,批号为428731,规格为每支2 mL:15 mg);甲醇、乙腈均为色谱纯,水为超纯水。

1.3 动物

SD大鼠66只,SPF级,体质量180~220 g,雌雄各半,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0006]。

2 方法与结果

2.1 试验条件

色谱条件:色谱柱为Waters Acquity UPLC BEH C₁₈柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相为0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~1.00 min时90%A → 5%A, 1.00~3.50 min时5%A, 3.50~3.51 min时5%A → 90%A, 3.51~5.00 min时90%A);流速为0.3 mL/min;柱温为35 °C;进样量为5 μL;总运行时间为5 min。

质谱条件:电喷雾离子源,正离子多反应监测模式;电离电压3 kV;离子源温度150 °C;锥孔电压30 V,锥孔气流速50 L/h,雾化气流速650 L/h,碰撞气流速0.15 mL/min。扫描方式为多反应监测(MRM)模式。盐酸氨溴索,母离子 m/z 379.03;子离子1、子离子2 m/z 分别为263.98, 103.96,裂解电压均为22 V,碰撞能量分别为18, 56 eV。氯雷他定(内标),母离子 m/z 383.18,子离子1、子离子2 m/z 分别为267.03, 259.09,裂解电压均为40 V,碰撞能量均为34 eV。

2.2 溶液制备与样品预处理

取盐酸氨溴索对照品适量,精密称定,用甲醇制成质量浓度为1 mg/mL的对照品溶液,加甲醇稀释,得质量浓度为0.2, 0.4, 1, 2, 4, 10, 20 μg/mL的系列标准工作液。精密量取盐酸氨溴索对照品溶液适量,加甲醇稀释,得质量浓度为0.6, 8, 16 μg/mL的质控标准液。取氯雷他定对照品适量,用甲醇制成质量浓度为1 mg/mL溶液,加乙腈稀释,得质量浓度为5 ng/mL的内标溶液。

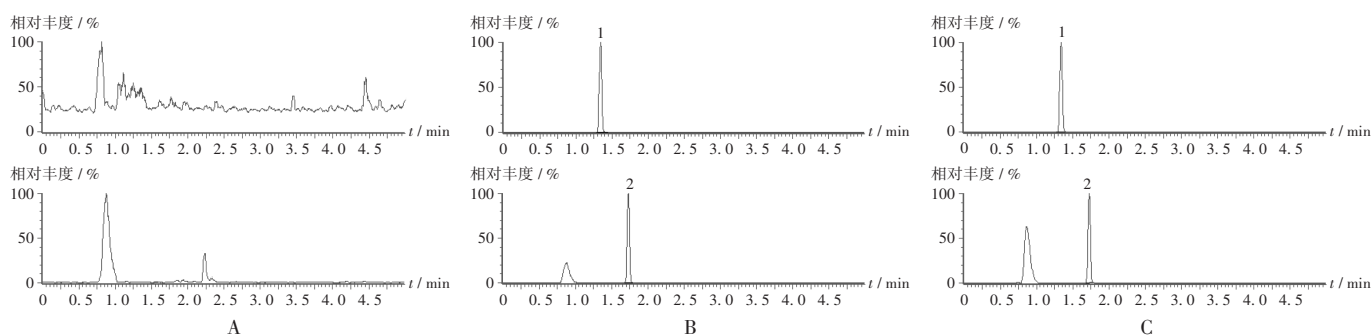
样品预处理:取大鼠空白肺组织,用吸水纸吸干水分,剪碎,称定质量,加入3倍质量生理盐水,制成匀浆。以4倍量乙腈沉淀蛋白处理,涡旋10 min, 12 000 r/min离心10 min,取上清液,备用。

2.3 方法学考察

专属性试验^[10]:取空白肺组织匀浆(按2.2项下方法预处理),空白肺组织匀浆(同上预处理)+对照品溶液,以及给药后1 h的肺组织匀浆(同上预处理),按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果盐酸氨溴索和内标分离良好,内源性杂质不影响盐酸氨溴索含量的测定。详见图1。

线性关系考察:精密量取空白肺组织匀浆95 μL,加盐酸氨溴索对照品溶液5 μL,制成质量浓度分别为10, 20, 50, 100, 200, 500, 1 000 ng/mL的标准曲线溶液。按2.2项下方法预处理,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积,以待测成分质量浓度(X , ng/mL)为横坐标、待测成分与内标峰面积的比值(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.025\ 023\ 4 X - 0.002\ 475\ 3$ ($r = 0.998\ 6, n = 7$)。结果显示,盐酸氨溴索质量浓度在10~1 000 ng/mL范围内与待测成分与内标峰面积的比值线性关系良好。

精密度和准确度试验:精密量取空白肺组织匀浆95 μL,加入质控标准液适量混匀,制成盐酸氨溴索质量浓度分别为30, 400, 800 ng/mL的质控样品,每个质



1. 盐酸氨溴索 2. 氯雷他定
A. 空白肺组织匀浆 B. 空白肺组织匀浆 + 对照品溶液(盐酸氨溴索0.4 μg/mL) C. 肺组织匀浆(给药后1 h)

图1 超高效液相色谱串联质谱图

1. Ambroxol hydrochloride 2. Loratadine

A. Blank lung tissue homogenate B. Blank lung tissue homogenate + reference solution (0.4 μg/mL ambroxol hydrochloride)
C. Lung tissue homogenate (after 1 h of administration)

Fig. 1 UPLC-MS/MS diagrams

量浓度平行5份。按2.2项下方法预处理,按2.1项下试验条件进样测定,结果显示,同一质量浓度样品精密度试验结果的RSD为0.84%~7.66%,准确度试验结果的RSD为-4.50%~5.52%($n=5$);不同质量浓度样品精密度试验结果的RSD为4.95%~5.86%,准确度试验结果的RSD为-1.69%~2.69%($n=5$)。

稳定性试验:配制盐酸氨溴索质量浓度分别为30、800 ng/mL的肺组织匀浆,分别于置冰盒4 h、室温保存8 h、-20℃保存6 d,冻融3次后,按2.2项下方法预处理,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果偏差分别为-4.19%~0.62%, -6.58%~3.66%, -5.84%~3.46%, -11.78%~-11.28%,表明样本在上述条件下稳定性良好。

回收试验:取“精密度和准确度试验”项下3种质量浓度的质控样品,每个质量浓度平行3份,按2.2项下方法预处理,按2.1项下试验条件进样测定。同时取空白肺组织匀浆95 μ L,按2.2项下方法预处理,再加上上述质量浓度的盐酸氨溴索对照品溶液5 μ L,每个质量浓度平行3份。结果盐酸氨溴索的提取回收率为90.83%~93.65%,RSD为2.51%~4.50%($n=3$)。

基质效应:精密量取空白肺组织匀浆95 μ L,共6份,按2.2项下方法预处理,再加入质量浓度为0.6,16 μ g/mL的盐酸氨溴索溶液5 μ L,混匀,每个平行6份;同时取水95 μ L,加入质量浓度为0.6,16 μ g/mL的盐酸氨溴索对照品溶液,混匀,每个平行6份,按2.2项下方法预处理,按2.1项下试验条件进样测定。得基质效应为95.81%~105.48%,表明该效应未显著影响试验。

2.4 药动学特征

大鼠于试验当日早晨雾化吸入给药(含适量内标)1 h,每次吸入药量为3.0 mL(相当于盐酸氨溴索22.5 mg),给药时间约15 min。分别于给药前及给药后0.083,0.25,0.5,1,2,4,6,8,12,24 h时采集肺组织。不同时间点大鼠肺组织匀浆内盐酸氨溴索的药-时曲线见图2。以DAS 3.0软件计算药动学参数,结果达峰时间(t_{max}),半衰期($t_{1/2}$),峰浓度(C_{max}),药-时曲线下面积(AUC_{0-1} 、 $AUC_{0-\infty}$),平均滞留时间(MRT_{0-1}),清除率(CL)分别为0.083 h、4.33 h、3 997.40 ng/g、4 311.88 [(ng·h)/g]、4 356.97 [(ng·h)/g]、2.74 h、5.05 [(L·h)/kg]。

3 讨论

盐酸氨溴索的含量测定方法主要有气相色谱法^[11]、近红外法^[12]、高效液相色谱法^[13-16]等,但分析时间均较长,样品处理过程复杂。预试验中比较了不同规格的色谱柱,最后采用Waters Acquity UPLC BEH C₁₈柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μ m)。同时比较了水-乙腈、水-甲醇作为流动相进行洗脱,发现基线略有漂

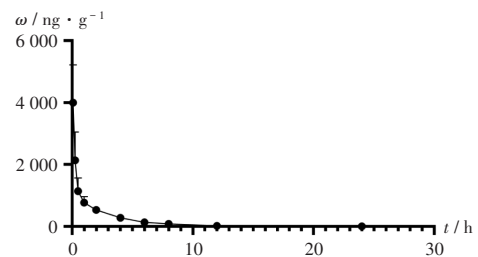


图2 大鼠肺组织匀浆中盐酸氨溴索药-时曲线

Fig. 2 Plasma concentration - time curve of ambroxol hydrochloride in the lung tissue homogenate of rats

移,盐酸氨溴索峰峰形对称性不佳。通过在水相中添加少量甲酸可促进目标物离子化,最终发现0.1%甲酸水溶液-乙腈洗脱效果良好。

样品处理方法分别考察了甲醇沉淀法和乙腈沉淀法。结果表明,采用乙腈沉淀法对样品干扰较少,回收率良好,能较大程度地除去血浆中的蛋白质,能有效延长色谱柱的使用寿命。选择适合的内标是生物样本检测的要素之一,有文献报道,血浆中盐酸氨溴索测定选用普拉克索^[17]等为内标,其色谱行为与盐酸氨溴索相近。而本研究中选用氯雷他定为内标,发现其具有良好的分离度,且互不干扰。

综上所述,本研究中建立了高效、灵敏、简单的测定大鼠肺组织中盐酸氨溴索药物浓度的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法,该方法适用于吸入制剂体内生物样本的含量检测。并研究了将吸入用盐酸氨溴索溶液雾化给予大鼠后盐酸氨溴索在其肺组织内的药动学特性。结果表明,盐酸氨溴索通过吸入雾化迅速分布到肺组织,半衰期较长,表明该溶液雾化给药能有效用于急/慢性支气管炎、支气管哮喘等呼吸系统疾病的治疗,为临床合理使用该药奠定了检测基础。

参考文献

- [1] 余茜,李树军,黄汉忠,等. 盐酸氨溴索的合成[J]. 中国现代应用药学,2012,29(3):230-232.
- [2] 贺美莲,郭常川,冷佳薇,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定人血浆中盐酸氨溴索及其制剂的生物等效性评价[J]. 色谱,2018,36(11):1099-1104.
- [3] 魏宁漪,周颖,陈翠翠,等. 盐酸氨溴索吸入溶液的空气动力学粒径分布测定[J]. 中国新药杂志,2018,27(17):1994-1998.
- [4] 林璐,吴伟英,刘晓琦,等. 氨溴索注射剂吸入与静注有效性安全性的系统评价[J]. 临床药学,2018,28(10):678-684.
- [5] 郭思瑞,王晶,王月,等. 吸入用盐酸氨溴索溶液与5种临床常用平喘药物的配伍稳定性考察[J]. 中国药学杂志,2023,58(13):1218-1223.
- [6] 雷光萍,陈汝婷. 盐酸氨溴索不同给药途径对慢性阻塞性肺疾病急性加重期疗效的影响[J]. 临床合理用药杂志,2016,9(24):40-41.
- [7] ZHANG SJ, JIANG JX, REN QQ, et al. Ambroxol inhalation