

溴己新LC-MS/MS法测定及大鼠吸入给药后分布动力学研究

杨俊凤^{1, 2, 3}, 刘全国⁴, 赵琳¹, 李冬芝¹, 辛飞洋¹, 夏媛媛^{1, 2, 3*}, 胡金芳^{1, 2, 3*}

1. 天津天诚新药评价有限公司, 天津 300301

2. 天津药物研究院有限公司 药物成药性评价与系统转化全国重点实验室, 天津 300462

3. 中国医学科学院 药物代谢新技术创新单元, 北京 100050

4. 海南葫芦娃药业集团股份有限公司, 海南 海口 570100

摘要: 目的 建立大鼠血浆及肺部组织中溴己新浓度测定的LC-MS/MS方法, 并对大鼠给予盐酸溴己新雾化吸入溶液受试制剂与参比制剂后药物在血浆及肺部组织分布进行比较。方法 样品处理采用简便的蛋白沉淀法, 内标为苯海拉明, 采用ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈色谱柱, 有机相为甲醇, 水相为0.5%甲酸-5%甲醇水溶液, 采用梯度程序进行洗脱, 在电喷雾离子化源(ESI)的正离子模式下以多重反应监测(MRM)方式进行检测。对血浆和肺组织中溴己新的分析方法分别进行了完整验证和部分验证。健康SD大鼠随机分为两组, 分别雾化吸入给予盐酸溴己新雾化吸入溶液受试及参比制剂, 定时采集血浆、肺、气管支气管并测定溴己新的浓度。结果 血浆及肺组织中溴己新浓度测定的分析方法验证各项均符合指导原则规定。受试制剂与参比制剂在大鼠血浆、肺、气管支气管中的分布速度、分布程度基本一致, 在主要靶部位气管支气管中的相对生物利用度为97.4%。结论 建立的LC-MS/MS分析方法快速、灵敏、简便, 两种制剂在大鼠血浆及肺部组织分布具有一致性, 可为该新剂型的国产化提供数据支持。

关键词: LC-MS/MS; 溴己新; 吸入给药; 分布动力学

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)09-2082-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.09.016

Determination of bromhexine by LC-MS/MS and comparative study of distribution kinetics in rats after inhalation administration

YANG Junfeng^{1, 2, 3}, LIU Quanguo⁴, ZHAO Lin¹, LI Dongzhi¹, XIN Feiyang¹, XIA Yuanyuan^{1, 2, 3}, HU Jinfang^{1, 2, 3}

1. Tianjin Tiancheng New Drug Evaluation Co., Ltd., Tianjin 300301, China

2. National Key Laboratory of Druggability Evaluation and Systematic Translational Medicine, Tianjin Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Tianjin 300462, China

3. Research Unit for Drug Metabolism, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China

4. Hainan Huluwa Pharmaceutical Group Co., Ltd., Haikou 570100, China

Abstract: Objective To establish an LC-MS/MS method for the determination of bromhexine in rat plasma and lung, and the distribution in plasma and lung tissue was compared between the test and the reference formulations of bromhexine hydrochloride inhalation solution in rats. **Methods** Samples were pretreated by a simple protein precipitation method with diphenhydramine as the internal standard. Chromatographic separation was performed on a ZORBAX Eclipse XDB-C18 column using a gradient elution program with solvents consisting of methanol and 0.5% formic acid-5% methanol aqueous solution. The detection was operated in the positive ion mode using multiple reaction monitoring (MRM) with an electrospray ionization source (ESI). The analytical methods for plasma and lung tissue were fully and partially validated, respectively. Healthy Sprague-Dawley rats were divided into two groups randomly and administered by inhalation with test and reference formulations of bromhexine hydrochloride inhalation solution, respectively. The plasma, lung and tracheobronchus were collected at predetermined time points and the concentration of

收稿日期: 2024-02-06

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目资助(2019-I2M-5-020)

第一作者: 杨俊凤(1988—), 女, 理学硕士, 助理研究员, 药动学研究方向。E-mail: yangjf@tipr.com.cn

*共同通信作者: 夏媛媛, 女, 研究员。E-mail: xiayy@tipr.com.cn

胡金芳, 女, 研究员。E-mail: hujf@tipr.com.cn

bromhexine was measured. **Results** Bioanalytical method validation results all met the criteria of the guidelines. The distribution rate and extent of bromhexine in plasma, lung and tracheobronchus between the two formulations were consistent. The relative bioavailability in the main target organ tracheobronchus was about 97.4%. **Conclusion** The LC-MS/MS method established in this study is rapid, sensitive and simple. The distribution of bromhexine between the two formulations in rat plasma and lung tissue is consistent, which can provide data support for the localization of the new formulation.

Key words: LC-MS/MS; bromhexine; inhalation administration; comparative distribution kinetics study

吸入给药近年来受到广大学者的广泛关注,与其他给药途径相比,吸入给药途径具有突出的优势。对于呼吸道或肺部起效药物,直接实现以较高的药物浓度作用于靶部位,起效迅速,给药剂量小,可减小全身给药导致的对非靶组织的毒性;同时肺部吸收面积大、肺泡壁薄、血流丰富,适合于药物递送,且肺部代谢酶活性低于肝脏及肠道,对于系统性治疗的药物,可以通过肺部吸收来改善生物利用度^[1-3];另外对于仅能通过注射途径给药的蛋白质、多肽,吸入给药为提高患者依从性提供了可能。这种优势已在人及动物身上得到了验证,如Yu等^[4]分别通过iv和吸入给药2种途径给予大鼠等剂量的抗肺部真菌感染药物卡泊芬净,结果显示,卡泊芬净在靶部位肺部的暴露量吸入比iv给药高约20倍,非靶组织肝脏和肾脏中的暴露量吸入比iv给药低约45%,且吸入给药后药物在肺部的半衰期明显延长;Zhang等^[5]证明在大鼠中采用低于iv给药几十倍的剂量进行雾化吸入抗上呼吸道感染药物热毒宁,气管和肺部的药物浓度可达到同等水平,且可实现比iv给药显著降低的血药浓度。

盐酸溴己新是一种呼吸道系统疾病临床常用药物,主要作用于气管、支气管的黏液产生细胞,促其分泌黏滞性低的分泌物,使呼吸道分泌的流变性恢复正常,痰液由黏变稀,易于咳出^[6]。目前盐酸溴己新国内临床剂型仅有片剂、注射剂、注射用粉针剂等剂型,其雾化吸入溶液已在海外注册上市,该剂型显示出了疗效好、安全性高的突出优势,目前国内多家企业对其进行了仿制。目前针对盐酸溴己新雾化吸入溶液仅有质量控制方面的资料^[7],尚无吸入剂型非临床药动学比较方面的报道。本研究对受试制剂和市售参比制剂在大鼠血浆、肺、气管、支气管中药物分布进行了比对,从系统暴露和药效靶部位暴露两个层面揭示受试制剂和参比制剂的一致性,为受试制剂进入临床研究提供数据支持,推动该新剂型在我国的上市。

盐酸溴己新雾化吸入给药与其他给药途径比,给药剂量更低,且药物主要集中于呼吸道等靶部

位,血浆中药物浓度很低,要实现血浆药物浓度的准确测定,需要一个高灵敏度的检测方法。较早的如气相色谱法(GC)、气相色谱-质谱联用(GC-MS)、高效液相色谱法(HPLC)等分析方法存在灵敏度欠佳且样品处理过程繁琐等缺点,目前被广泛使用的液相色谱-串联质谱联用(LC-MS/MS)方法仍面临样品用量大、灵敏度低的不足,如Zhang等^[8]要用250 μL 人血浆,定量下限仅达0.5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$;Liu等^[9]定量下限可达0.15 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,人血浆用量也要200 μL ;2020年Waraksa等^[10]发表的文章,定量下限虽可达25 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$,但马血清用量仍达200 μL 。本研究在现有分析方法的基础上进行了改进,旨在建立一种血浆用量少、灵敏度高且操作简便的分析方法,以完成雾化吸入给药后大鼠血浆、肺部组织中溴己新准确、简便、高效的测定,从而实现大鼠吸入给药后受试制剂和参比制剂间分布动力学的比对。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

1.1.1 主要仪器 HRH-MNE3026小动物口鼻吸入系统(北京慧荣和科技有限公司);LC-30A型液相(日本岛津公司);5500型三重四极杆串联质谱仪(AB Sciex公司),质谱仪配有电喷雾离子化源及Analyst 1.6.3数据处理软件;XS105型天平(Mettler Toledo公司);BSH-C2型生物样品低温快速制备仪(杭州遂真生物技术有限公司);17R低温高速台式离心机(Thermo Scientific公司);VX-II型多管涡旋振荡仪(北京踏锦科学技术有限公司);Turbo VAP浓缩仪(美国Caliper公司)等。

1.1.2 药品与主要试剂 盐酸溴己新雾化吸入溶液受试制剂,批号20210401,质量分数0.2%(本品含盐酸溴己新为标示量的100.2%),由海南葫芦娃药业集团股份有限公司生产;盐酸溴己新雾化吸入溶液参比制剂,批号179004,质量分数0.2%,由サノフイ株式会社生产;盐酸溴己新对照品,批号100427-201903,质量分数99.9%,由中国食品药品检定研究院生产;盐酸苯海拉明对照品,批号100066-200807,质量分数99.9%,由中国食品药品检定研究

院生产;甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯。

1.1.3 动物 SD大鼠,SPF级,雌雄各半,体质量在181.5~241.0 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号为SCXK(京)2016-0011,合格证编号为110011211113611551与110011211113611443,动物使用方案经天津天诚新药评价有限公司动物管理和使用委员会(IACUC)审查并批准。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱为ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(50 mm×4.6 mm, 5 μm),柱温为45 °C,流动相:水相为0.5%甲酸-5%甲醇水溶液(A),有机相为甲醇(B);采用梯度洗脱方式,梯度程序为:0~3.0 min, 50%→75%B; 3.0~3.1 min, 75%→90%B; 3.1~4.0 min, 90%B; 4.0~4.1 min, 90%→50%B; 4.1~5.5 min, 50%B;体积流量为0.5 mL·min⁻¹;血浆样品的进样量为5 μL,组织样品的进样量为1 μL。

1.2.2 质谱条件 采用电喷雾离子化源(ESI),正离子检测模式,扫描方式为多重反应监测(MRM);喷雾电压为4 000 V,气帘气压力为137.9 kPa,源温为500 °C,雾化气压力为275.8 kPa,辅助加热气压力为275.8 kPa;待测物溴己新和内标苯海拉明的定量离子对分别为 m/z 376.9→113.9、 m/z 256.1→167.1。

1.2.3 溶液配制 精密称取盐酸溴己新对照品适量,以甲醇溶解得到溴己新储备液,质量浓度为1 mg·mL⁻¹,用甲醇将溴己新储备液稀释至质量浓度为0.6、1.2、6.0、20.0、120.0、480.0、600.0 ng·mL⁻¹的系列标准工作液及质量浓度为0.6、1.8、30.0、450.0 ng·mL⁻¹的质量控制(QC)溶液,用于血浆标准曲线和QC样品的制备。用甲醇将溴己新储备液稀释至质量浓度为0.3、0.6、3.0、10.0、60.0、240.0、300.0 ng·mL⁻¹的系列标准工作液及质量浓度为0.3、0.9、15.0、225.0 ng·mL⁻¹的QC溶液,用于组织标准曲线和QC样品的制备。

精密称取盐酸苯海拉明对照品适量,以甲醇溶解得到苯海拉明储备液,质量浓度为1 mg·mL⁻¹,用甲醇将苯海拉明储备液稀释成质量浓度为5、50 ng·mL⁻¹的内标工作液。

1.2.4 标准曲线与QC样品的配制 取380 μL空白大鼠血浆,加入20 μL对应的标准系列工作液或QC溶液,配成质量浓度分别0.03、0.06、0.30、1.00、6.00、24.00、30.00 ng·mL⁻¹的血浆标准曲线样品及质量浓度为0.03 [定量下限(LLOQ)]、0.09(LQC)、1.50(MQC)、22.50(HQC)ng·mL⁻¹的血浆QC样品。

以1 g:5 mL的比例用50%甲醇-水制备空白组织匀浆,取50 μL空白组织匀浆,加入50 μL对应的标准系列工作液或QC溶液,配成1.5、3.0、15.0、50.0、300.0、1 200.0、1 500.0 ng·g⁻¹的组织标准曲线样品及1.5(LLOQ)、4.5(LQC)、75.0(MQC)、1 125.0(HQC)ng·g⁻¹的组织QC样品。

1.2.5 样品处理方法 血浆样品的处理:取50 μL大鼠含药血浆,加入50 μL内标苯海拉明工作液(5 ng·mL⁻¹),加入200 μL甲醇,涡旋1 min,4 °C、12 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液100 μL于内插管中,4 °C、12 000 r·min⁻¹离心5 min,进样5 μL进行LC-MS/MS定量分析。

组织样品的处理:50 μL大鼠组织匀浆样品,加入50 μL甲醇溶液,加入50 μL内标苯海拉明工作液(50 ng·mL⁻¹),加入250 μL甲醇,涡旋1 min,4 °C、12 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液100 μL于内插管中,4 °C、12 000 r·min⁻¹离心5 min,进样1 μL进行LC-MS/MS定量分析。

1.2.6 方法学验证 依据《中国药典》2020年版生物样品定量分析方法验证指导原则的相关规定,对大鼠血浆中溴己新测定的LC-MS/MS分析方法进行完整验证,包括选择性、质谱通道间的交叉干扰、残留、线性、批内批间准确度与精密度、基质效应、稳定性。在完整验证的基础上,在肺和气管支气管中,选取肺为代表性组织对大鼠组织匀浆中溴己新测定的LC-MS/MS分析方法进行部分验证,包括选择性、质谱通道间的交叉干扰、残留、线性、批内准确度、精密度及基质效应。

1.2.7 动物给药及样品采集 60只SD大鼠,随机分为两组,每组30只,雌雄各半,一组雾化吸入受试制剂,另一组雾化吸入参比制剂。给药前禁食不少于12 h,自由饮水。应用小动物口鼻吸入系统进行吸入给药操作:由气溶胶发生器产生盐酸溴己新气溶胶,气溶胶发生达到稳态后,将大鼠置于吸入专用固定器中进行染毒,每只大鼠吸入给药时长为30 min。

根据前期探索及验证,受试制剂、参比制剂可分别产生18.5、17.5 mg·m⁻³的气溶胶,计算得理论递送剂量为0.427、0.404 mg·kg⁻¹(计算公式见讨论部分),给药期间对气溶胶的均一性和含量进行监测。

给药组分别于给药前、给药后20 min及1.0、4.0、9.0 h麻醉大鼠,每时间点设置6只动物,雌雄各半,腹主动脉采血于EDTA-K₂抗凝管中,4 °C、4 000 r·min⁻¹离心5 min分离血浆,血液采集

完成后立即处死动物,剖取肺、气管支气管组织样品,以1 g:5 mL的比例用50%甲醇-水制备组织匀浆,血浆及组织匀浆均于-70 °C冰箱冻存至LC-MS/MS定量分析。

1.2.8 数据处理与统计分析 应用Analyst 1.6.3数据处理软件得到每只动物的药物浓度数据,用梯形法计算血浆及组织中溴己新的暴露量药时曲线下面积(AUC_{0-t}),用GraphPad Prism 5.01软件绘制药时曲线及柱状图,使用公式 $F=(\text{受试制剂 AUC}/\text{受试制剂递送剂量})/(\text{参比制剂 AUC}/\text{参比制剂递送剂量})$ 计算受试制剂相比于参比制剂的相对生物利用度。

2 结果

2.1 方法学考察结果

2.1.1 选择性 6个不同来源的大鼠空白血浆或空白肺组织匀浆液,进行LC-MS/MS分析,获得空白血浆或组织色谱图,见图1-A及1-D;LLOQ样品分析的代表性色谱图见图1-B及1-E;大鼠雾化吸入给药后样品的代表性色谱图见图1-C和1-F。结果表明,干扰组分的响应低于当批次LLOQ待测物响应均值的20%及内标响应均值的5%,表明大鼠血浆及组织中的内源性物质不干扰待测物和内标的定量分析。

2.1.2 待测物与内标的相互干扰 制备只含有内标、不含有待测物的血浆或肺组织匀浆样品(Control-0),以及只含有待测物溴己新(校正曲线最高浓度)、不含有内标的定量上限血浆或肺组织样品(ULOQ-no IS),进行LC-MS/MS分析,结果显示,Control-0样品中待测物的峰面积低于当批次LLOQ样品中待测物响应均值的20%,ULOQ-no IS样品中内标的峰面积低于当批次LLOQ样品中内标响应均值的5%,表明血浆、组织中待测物与内标不存在相互干扰情况。

2.1.3 残留 曲线最高浓度进样之后,分析空白大鼠血浆或肺组织匀浆样品。结果显示,空白样品中干扰组分的响应小于当条曲线标准样品待测物响应值的20%,且小于内标响应值的5%。说明残留不影响待测物及内标的定量。

2.1.4 线性 配制并处理7个质量浓度水平的血浆或肺组织匀浆校正标样进行LC-MS/MS分析,每个浓度校正标样双样本,以待测物浓度(x)为横坐标,待测物与内标的峰面积比值(y)为纵坐标,用加权最小二乘法(权重为 $1/x^2$)进行回归运算,求得的直线回归方程即为校正曲线。结果表明,血浆中溴己新

在0.03~30.00 ng·mL⁻¹线性良好,代表性回归方程为 $y=0.0645x+0.000124$, $R^2=0.9976$;组织中溴己新在1.5~1500.0 ng·g⁻¹范围内线性良好,代表性回归方程为 $y=1.51 \times 10^{-3}x+7.97 \times 10^{-5}$, $R^2=0.9970$ 。

2.1.5 精密度和准确度 配制并处理LLOQ、LQC、MQC、HQC水平的血浆QC样品,每浓度重复6样本,连续考察3个分析批,应用当批校正曲线计算各样品浓度,计算批内批间准确度和精密度。结果表明在LLOQ浓度下,溴己新的批内准确度为99.1%~103.0%,批间准确度为102.0%;批内精密度为4.31%~7.34%,批间精密度为5.19%;在LQC、MQC、HQC 3个浓度下批内准确度为97.7%~105.0%,批间准确度为99.2%~103.0%;批内精密度为1.49%~4.65%,批间精密度为3.13%~6.23%。

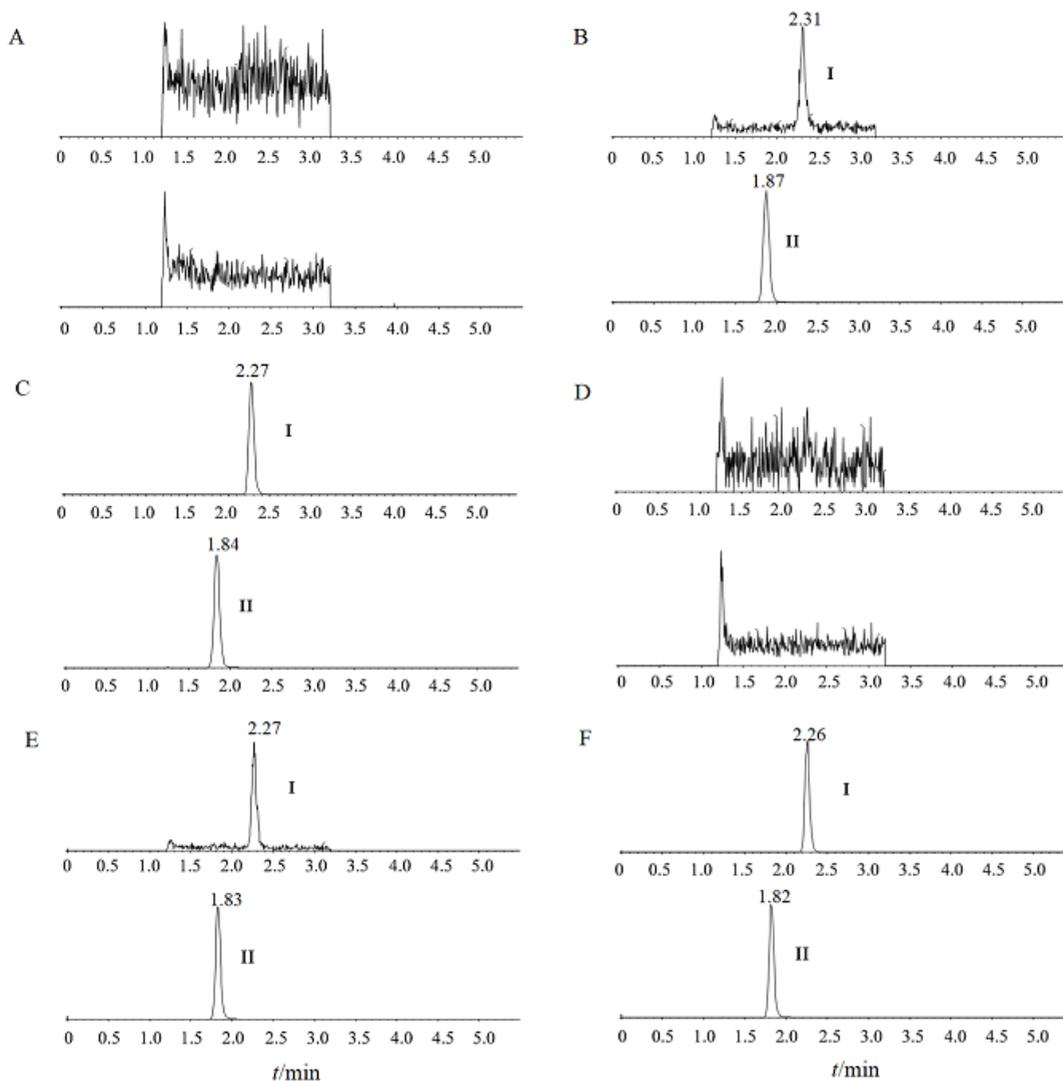
配制并处理LLOQ、LQC、MQC、HQC水平的肺组织QC样品,每浓度重复6样本,仅考察1个分析批,应用当批校正曲线计算各样品浓度,计算批内准确度和精密度。结果表明,在LLOQ浓度下,溴己新的批内准确度为101.0%,批内精密度为5.09%,在LQC、MQC、HQC 3个浓度下,批内准确度为97.3%~103.0%,批内精密度为1.95%~4.03%。

2.1.6 基质效应 考察LQC和HQC两个浓度水平的经内标归一化的基质效应。结果表明,溴己新在低(0.09 ng·mL⁻¹)、高(22.50 ng·mL⁻¹)质量浓度血浆中经内标归一化的基质效应分别为1.07和1.02,基质效应的精密度分别为3.06%和1.49%,溴己新在低(4.5 ng·g⁻¹)、高(1125.0 ng·g⁻¹)质量浓度肺组织匀浆液中经内标归一化的基质效应分别为0.997和0.982,基质效应的精密度分别为3.27%和2.09%,说明血浆或组织中的基质效应可忽略不计。

2.1.7 稳定性 考察血浆及血浆处理后样品在LQC(0.09 ng·mL⁻¹)、HQC(22.50 ng·mL⁻¹)浓度水平不同放置条件下的稳定性。结果表明含药血浆室温放置3 h、冻融循环3次、-70 °C冻存42 d稳定;处理后样品进样器6 °C放置52 h、处理后上清液室温放置4 h均稳定。血浆稳定性数据见表1。同时全血稳定性结果表明EDTA-K₂抗凝的全血中溴己新室温放置2 h稳定。

2.2 肺组织分布研究结果

两制剂给药后的药物浓度平均值见表2,用梯形法计算受试制剂、参比制剂大鼠雾化吸入给药后血浆及肺组织中溴己新的AUC,两制剂不同组织中药物含量在不同时刻的分布比较、两制剂在不同组织中AUC比较见表3。



A-空白血浆; B-空白血浆中加入溴己新(30 pg·mL⁻¹)和内标(5 ng·mL⁻¹); C-给药后血浆样品; D-空白肺组织; E-空白肺组织中加入溴己新(1.5 ng·g⁻¹)和内标(50 ng·mL⁻¹); F-给药后肺组织样品。

A-blank plasma; B-blank plasma spiked with bromhexine (30 pg·mL⁻¹) and IS (5 ng·mL⁻¹); C-plasma sample after inhalation administration; D-blank lung; E-blank lung spiked with bromhexine (1.5 ng·g⁻¹) and IS (50 ng·mL⁻¹); F-lung sample after inhalation administration; I-bromhexine; II-diphenhydramine.

图1 溴己新及内标的典型色谱图

Fig. 1 Representative chromatograms of bromhexine and IS in rat plasma and lung

2.2.1 分布速度比较 如表2所示,两制剂在血浆、肺、气管支气管中的分布速度基本一致,血浆、肺、气管支气管中溴己新均在第一个采样点给药后20 min即已达到最高浓度即峰浓度(C_{max}),随后逐渐消除,至药后9 h,受试制剂及参比制剂血浆中溴己新分别降至 C_{max} 的5.55%及6.12%,肺中溴己新分别降至 C_{max} 的4.49%及5.13%,气管支气管中溴己新分别降至 C_{max} 的20.1%及15.7%。

2.2.2 分布程度比较 如表3所示,两制剂在血浆、肺、气管支气管中的分布程度基本一致,药物均主要分布于气管支气管,其次分布于肺中,血浆中分

布最少,且两制剂AUC具有相似的组织/血浆比,受试制剂及参比制剂肺中溴己新AUC_{0-9h}分别为血浆中的15.7和15.6倍,气管支气管中溴己新AUC_{0-9h}分别为血浆中的67.6和52.8倍。

2.2.3 相对生物利用度 虽然两制剂在血浆、肺、气管支气管中具有一致的分布速度和分布程度,但从绝对暴露量上看(表3),血浆、肺、气管支气管中溴己新的AUC_{0-9h}受试制剂均低于参比制剂。推测此差异主要来源于两制剂间给药浓度的差异:给药期间对实时气溶胶浓度进行了测定,发现参比制剂的气溶胶浓度高于受试制剂,实测受试与参比制剂

表1 溴己新在大鼠血浆中的稳定性

Table 1 Stability test of bromhexine in rat plasma

稳定性内容	放置条件	理论值/ (ng·mL ⁻¹)	测定值/ (ng·mL ⁻¹)	准确度/%	精密性/%
血浆稳定性	室温 3 h	0.09	0.0815	90.5	2.21
		22.50	19.4	86.4	2.93
	-70 °C 至室温冻融循环 3 次	0.09	0.0783	87.0	0.85
		22.50	21.2	94.1	2.77
	-70 °C 冻存 42 d	0.09	0.0837	93.0	3.17
		22.50	19.7	87.4	5.89
血浆处理后稳定性	室温 4 h	0.09	0.0901	100	2.05
		22.50	21.8	96.7	4.65
	进样器温度(6 °C)52 h	0.09	0.0982	109	5.00
		22.50	24.2	108	2.98

表2 两给药组大鼠血浆、肺及气管支气管中溴己新浓度

Table 2 Bromhexine concentration in plasma, lung and tracheobronchus in two administration groups

时间	血浆/(ng·mL ⁻¹)		肺/(ng·g ⁻¹)		气管支气管/(ng·g ⁻¹)	
	受试制剂	参比制剂	受试制剂	参比制剂	受试制剂	参比制剂
20 min	4.790±0.799	6.180±2.170	86.70±17.70	94.8±42.8	168.0±23.5	221.0±90.4
1 h	1.970±0.522	3.840±0.794	32.40±8.82	64.9±17.1	105.0±22.2	134.0±48.6
4 h	0.728±0.141	0.928±0.210	9.54±2.64	13.1±3.2	71.9±20.0	84.5±31.8
9 h	0.266±0.076	0.378±0.132	3.89±1.22	4.86±2.6	33.7±12.6	34.8±12.2

表3 两给药组血浆和各组织中溴己新AUC比较(n=6)

Table 3 AUC of bromhexine in plasma and tissues in the two administration groups (n=6)

样本	受试制剂 (递送剂量 0.381 mg·kg ⁻¹)		参比制剂 (递送剂量 0.448 mg·kg ⁻¹)		F/%
	AUC _{0-9h}	组织/血浆比	AUC _{0-9h}	组织/血浆比	
	血浆	9.6 h·ng·mL ⁻¹	1.0	14.8 h·ng·mL ⁻¹	
肺	151.0 h·ng·g ⁻¹	15.7	231.0 h·ng·g ⁻¹	15.6	76.9
气管支气管	647.0 h·ng·g ⁻¹	67.6	781.0 h·ng·g ⁻¹	52.8	97.4

的气溶胶浓度分别为16.5、19.4 mg·m⁻³,虽然与理论浓度(18.5、17.5 mg·m⁻³)相比,均符合相对误差在±20%以内的规定,但两制剂实测浓度之间的差异达到了16.2%。为了消除这种差异,采用了实测递送剂量进行相对生物利用度的计算,结果显示两制剂在主要靶器官气管支气管中暴露量基本相当,相对生物利用度为97.4%。

3 讨论

吸入给药后血浆中药物浓度很低,需要一种灵敏度高、简便、快速的LC-MS/MS分析方法对药物浓度进行检测。本研究在方法建立过程中对质谱条件及色谱条件等进行了一系列摸索和优化,质谱扫描选择了响应较强的正离子模式,由于分子结构

中存在两个溴原子,扫描时发现共存在m/z 375、m/z 377、m/z 379 3个母离子峰,丰度比大约为1:2:1,选择了丰度最高的母离子m/z 377进行进一步优化。经过对不同品牌、不同长度、不同粒径的色谱柱进行筛选,发现ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(50 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱能获得更好的峰型、更低的基线和更高的响应,发现流动相中添加剂的种类对色谱行为及质谱响应有较大影响,水相中加甲酸铵或乙酸铵等无机盐会使基线明显升高而导致信噪比降低,水相中加甲酸可使基线明显降低且能改善峰型,有机相使用甲醇比使用乙腈能获得更合适的保留时间,且能避免内源物质的干扰,适宜的梯度洗脱程序可获得更尖锐的峰型和更高的信噪比,样品

沉淀试剂甲醇比乙腈能获得更好的峰型,内标选择了极性相近的苯海拉明,经过综合考量,形成了本研究分析方法且经过了验证,血浆中待测物的定量下限可达到 $30\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$,而血浆用量仅需 $50\text{ }\mu\text{L}$,样品处理方法为简便的蛋白沉淀法,单针运行时间仅 5.5 min ,与现有的方法^[8-10]相比,血浆用量大大减少的情况下仍可获得较高的灵敏度,显示出了一定优势。

在非临床研究中,吸入给药技术是一个难点。临床研究中,患者可通过主动呼吸实现给药,这对动物来说难以实现,经调研发现,目前啮齿类动物吸入给药主要有气管内给药(包括气管插管、气管内滴注)和借助设备实现被动吸入两种方法。气管内给药有给药剂量精确、用量少的优点,但给药时上呼吸道没有药物暴露^[11],且通常需要将动物麻醉后进行给药操作,更适用于评估肺吸收及生物利用度等药物筛选阶段^[12]。借助设备实现被动吸入,是在动物正常生理状态下进行的,更能模拟临床使用场景,且可实现多只动物同时给药且保证同一组动物给药剂量的一致性,更适于非临床申报用的系统性研究中,本研究在小动物口鼻暴露系统中完成的吸入给药就是采用这种方法。

吸入给药的给药剂量是另一个值得讨论的问题,国际上通用的计算公式如下: $\text{Dose}(\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}) = C(\text{气溶胶浓度}\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}) \times \text{RMV}(\text{大鼠每分钟通气量}\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}) \times D(\text{吸入时间}\text{ min}) \times \text{DF}(\text{沉积系数}) / \text{BW}(\text{动物体质量}\text{ kg})$,其中 $\text{RMV}(\text{L}\cdot\text{min}^{-1}) = 0.608 \times \text{BW}(\text{kg})^{0.852}$ ^[13-14]。通常有两种表征吸入剂量的方式,一种是递送剂量,此时不考虑药物的沉积($\text{DF} = 1$),另一种为沉积剂量,通常认为大鼠约递送剂量的10%可沉积到肺部($\text{DF} = 0.1$),但实际沉积系数受动物的呼吸状态、气溶胶颗粒直径、动物气道解剖结构等多种因素的影响,两种剂量表征方法均是估算值。对于本研究而言,气管支气管是主要的靶部位,用肺部沉积剂量表征显然不太合适,且研究目的是比较制剂间的差异,因此选择了递送剂量进行表征。

对于这样的给药系统,气溶胶每次的发生浓度会有一定程度的波动,要准确表征给药剂量,气溶胶浓度的监测至关重要。本研究对给药期间的气溶胶浓度进行了监测,在两制剂间相对生物利用度计算时根据实际气溶胶浓度对结果进行了校正,减小了因给药剂量不同造成的误差。

在受试制剂与参比制剂的大鼠分布动力学比

较中,从药物在血浆、肺、气管支气管的分布速度、分布程度和相对生物利用度3个方面进行了比较,结果表明,两制剂的分布速度基本一致,药后9 h与药后20 min相比,两制剂在血浆、肺、气管支气管中的清除比例基本一致;两制剂的分布程度基本一致,分布程度排序均为气管支气管、肺、血浆,且两制剂在气管支气管和肺中具有基本一致的组织/血浆比;经剂量校正后,受试制剂相比于参比制剂在血浆、肺、气管支气管中的相对生物利用度基本一致,分别为76.0%、76.9%、97.4%,尤其在主要靶器官气管支气管中的分布具有高度一致性。血浆、肺、气管支气管药物分布的一致性进一步反映出受试制剂和参比制剂系统暴露和靶部位暴露的一致性,系统暴露提示了两种制剂具有相对一致的安全性,靶部位暴露提示了两制剂具有相对一致的有效性,研究结果为受试制剂进入临床研究提供了充分的数据支持,可推动该新剂型的国产化应用,同时本研究也可为其他吸入制剂的非临床药理学比较研究提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Newman S P. Drug delivery to the lungs: Challenges and opportunities [J]. Ther Deliv, 2017, 8(8): 647-661.
- [2] 周学海,张成飞,杨敏,等.肺部吸入制剂评价方法研究进展[J].药物评价研究,2019,42(9):1891-1895.
Zhou X H, Zhang C F, Yang M, et al. Research progress of evaluation methods for pulmonary inhalation preparations [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(9): 1891-1895.
- [3] Aryal S, Park S, Park H, et al. Clinical trials for oral, inhaled and intravenous drug delivery system for lung cancer and emerging nanomedicine-based approaches [J]. Int J Nanomedicine, 2023, 18: 7865-7888.
- [4] Yu I G, O'Brien S E, Ryckman D M. Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of intravenous and inhaled caspofungin [J]. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv, 2021, 34(3): 197-203.
- [5] Zhang G P, Li Y F, Chen T F, et al. Comparative study of the efficacy and pharmacokinetics of reduning injection and atomization inhalation [J]. Biomedicine Pharmacother, 2019, 118: 109226.
- [6] 葛庆华,周臻,支晓瑾,等.愈酚溴新口服溶液剂的药理学动力学和生物等效性研究[J].中国医药工业杂志,2008,39(10):750-752,757.
Ge Q H, Zhou Z, Zhi X J, et al. Pharmacokinetics and bioequivalence of Yufenxiuxin oral solutions [J]. Chin J Pharm, 2008, 39(10): 750-752, 757.

- [7] 朱狄峰, 石萌, 洪雅雯, 等. 盐酸溴己新雾化气溶胶浓度测定及空气动力学粒径分布分析 [J]. 中国药学杂志, 2022, 8(21): 1834-1841.
Zhu D F, Shi M, Hong Y W, et al. Quantification and aerodynamics particle size distribution of bromhexine hydrochloride aerosol by LC-MS/MS [J]. Chin Pharm J, 2022, 8(21): 1834-1841.
- [8] Zhang W, Feng F, Wang Y. Bioequivalence study of bromhexine by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry after oral administration of bromhexine hydrochloride tablets [J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 48(4): 1206-1210.
- [9] Liu J, Chen X Y, Hu Y H, et al. Quantification of the major metabolites of bromhexine in human plasma using RRLLC-MS/MS and its application to pharmacokinetics [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 51(5): 1134-1141.
- [10] Waraksa E, Owczarek K, Kubica P, et al. Determination of bromhexine and its metabolites in equine serum samples by liquid chromatography - Tandem mass spectrometry: Applicability to the elimination study after single oral dose [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2020, 1151: 122197.
- [11] 张海飞, 余珊珊, 曹瑾, 等. 吸入药物非临床毒性评价特点与要求 [J]. 中国药物警戒, 2021, 18(6): 570-574, 578.
Zhang H F, Yu S S, Cao J, et al. Features and requirements of non-clinical toxic evaluation of inhalable drugs [J]. Chin J Pharmacovigil, 2021, 18(6): 570-574, 578.
- [12] Patil J S, Sarasija S. Pulmonary drug delivery strategies: A concise, systematic review [J]. Lung India, 2012, 29(1): 44-49.
- [13] Tepper J S, Kuehl P J, Cracknell S, et al. Symposium summary: "breathe In, breathe out, its easy: What you need to know about developing inhaled drugs" [J]. Int J Toxicol, 2016, 35(4): 376-392.
- [14] Alexander D J, Collins C J, Coombs D W, et al. Association of Inhalation Toxicologists (AIT) working party recommendation for standard delivered dose calculation and expression in non-clinical aerosol inhalation toxicology studies with pharmaceuticals [J]. Inhal Toxicol, 2008, 20(13): 1179-1189.

[责任编辑 袁永兵]