

基于 LC-MS/MS 技术的妥布霉素地塞米松滴眼液体外评价的分析方法研究

陈爽^{1,2}, 刘小勤^{1,2}, 郑小玲¹, 石云峰^{1,2}, 朱价¹, 罗英^{1,2}, 刘柱^{1*} (1. 浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310014; 2. 国家药品监督管理局仿制药评价关键技术重点实验室, 杭州 310014)

摘要:目的 建立液相色谱-串联质谱联用(LC-MS/MS)法同时测定人工泪液中妥布霉素和地塞米松的浓度,用于妥布霉素地塞米松滴眼液体外释放试验的研究中妥布霉素和地塞米松浓度的检测。方法 采用 Agilent Zorbax Eclipse plus-C₈ 色谱柱,以 2 mmol·L⁻¹ 乙酸铵水溶液为流动相 A,体积分数 90% 甲醇水溶液为流动相 B,梯度洗脱,流速 0.5 mL·min⁻¹,柱温 40 °C,进样体积 2 μL;采用质谱检测器,电喷雾离子源(ESI)离子化方式,多重反应监测(MRM)模式,正离子模式。结果 妥布霉素、地塞米松均在 200~5 000 ng·mL⁻¹ 内线性良好,定量下限均为 200 ng·mL⁻¹。妥布霉素、地塞米松在样品处理后放置进样器 48 h 条件下稳定性良好。结论 本研究建立的方法快速、高效、准确、灵敏,可用于妥布霉素地塞米松滴眼液在人工泪液中的药物浓度检测和体外释放试验的研究。

关键词:液相色谱-串联质谱联用;体外评价;人工泪液;妥布霉素;地塞米松

doi:10.11669/cpj.2025.06.011 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2025)06-0646-06

Analysis Method for *In Vitro* Evaluation of Tobramycin and Dexamethasone Eye Drops Based on LC-MS/MS

CHEN Shuang^{1,2}, LIU Xiaoqin^{1,2}, ZHENG Xiaoling¹, SHI Yunfeng^{1,2}, ZHU Jia¹, LUO Ying^{1,2}, LIU Zhu^{1*} (1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310014, China; 2. NMPA Key Laboratory for Core Technology of Generic Drug Evaluation, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for simultaneous determination of tobramycin and dexamethasone in artificial tears, and detect drug use concentration in human tears and *in vitro* release. **METHODS** Zorbax Eclipse plus-C₈ column was used with 2 mmol·L⁻¹ ammonium acetate aqueous solution as mobile phase A and 90% methanol aqueous solution as mobile phase B for gradient elution. The flow rate was 0.5 mL·min⁻¹, the column temperature was maintained at 40 °C, and the injection volume was 2 μL. A mass spectrometer was used with ESI ionization mode, MRM mode, and positive ion mode. **RESULTS** Tobramycin and dexamethasone showed good linearity in the concentration range of 200–5 000 ng·mL⁻¹, and the lower limit of quantification was 200 ng·mL⁻¹. **CONCLUSION** The established method is rapid, efficient, accurate and sensitive, and can be used for the detection of drug concentration in tears and *in vitro* release test of tobramycin and dexamethasone eye drops.

KEY WORDS: LC-MS/MS; *in vitro* evaluation; artificial tear; tobramycin; dexamethasone

妥布霉素地塞米松滴眼液是抗生素妥布霉素(tobramycin, TOB)与糖皮质激素地塞米松(dexamethasone, DXM)的复合制剂,具有抗炎作用,是眼科领域广泛应用的药物,其能够深入眼部组织,针对眼部感染和炎症进行治疗,是眼部手术后常用药^[1]。依据美国食品药品监督管理局(FDA)指导原则^[2-4],在进行此类眼用制剂的一致性评价研究时,受试者应为接受适应证白内障手术的患者,检

测指标为房水中的药物浓度。然而,体内试验往往受限于伦理、成本、样品量少及操作复杂性等因素。因此,开发一种可靠的体外替代评价方法显得尤为关键,这种方法需要不仅能够模拟体内环境,还应在减少动物和人体试验的同时,提供准确的药物性能评估。以人工泪液为介质的体外释放试验和体外眼角膜渗透试验是滴眼液体外替代评价的可行方法,而如何实现同时检测人工泪液

基金项目:浙江省药品监管系统科技计划项目资助(2024016,2022001)

作者简介:陈爽,女,硕士,副主任药师 研究方向:药物分析与质量控制 * 通讯作者:刘柱,男,硕士,高级工程师 研究方向:质量分析技术 Tel:(0571)86468480

中微量 TOB 和 DXM 的浓度,是妥布霉素地塞米松滴眼液体外评价研究必须先要解决的问题。虽然各国药典均收录了妥布霉素地塞米松滴眼液,但均采用两种不同方法分别检测 TOB 和 DXM^[5-6]。另外,含量测定方法的检测灵敏度也无法满足本品体外释放、眼角膜渗透研究的检测需求。目前笔者也未见相关文献报道人工泪液中同时检测微量 TOB 和 DXM 的测定方法。本研究以人工泪液为介质,基于液相色谱-串联质谱技术(LC-MS/MS),建立了一种快速、高效、准确、灵敏的可同时检测人工泪液中 TOB 和 DXM 浓度的方法,并对方法的专属性、线性、定量限、准确度及精密度等方面开展了方法学研究,可应用于妥布霉素地塞米松滴眼液体外释放、眼角膜渗透研究。

1 仪器与材料

SHIMADZU LC-40D XR 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);QTRAP 6500 型三重四级杆质谱仪(ESI 源,Analyst 1.7.3 数据采集软件,美国 AB Sciex 公司);MCA3.6P-2CCN-M 型百万分之一电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];MTV-100 型涡旋混合仪(杭州奥盛仪器有限公司);Milli-Q 型纯水仪(美国 Millipore 公司)。

妥布霉素地塞米松滴眼液(批号:VDY51A;240801);TOB 对照品(含量:91.4%,批号:130527-200402)、DXM 对照品(含量:99.8%,批号:100129-201907)(中国食品药品检定研究院);碳酸氢钠、氯化钾、氯化钠、无水氯化钙、乙酸铵均为分析纯;甲醇为色谱纯。

2 实验方法

2.1 溶液的配制

2.1.1 空白基质 人工泪液作空白基质,分别称取碳酸氢钠 4.36 g,氯化钾 2.76 g,氯化钠 13.56 g,无水氯化钙 63.41 mg 至烧杯中,加 2 000 mL 水溶解,混匀,过滤。

2.1.2 对照品溶液 取 TOB 对照品、DXM 对照品各适量,精密称定,分别加入适量的体积分数 50% 甲醇,涡旋混合,配制成 0.250 mg·mL⁻¹ 的对照品储备液。分别移取 TOB、DXM 对照品储备液各 1 mL,加入体积分数 50% 甲醇 8 mL,混匀,配制成 0.025/0.025 mg·mL⁻¹ TOB/DXM 混合对照品储备液。精密量取储备液适量,用人工泪液稀释成质量浓度为 5 000、4 000、3 000、2 000、1 200、

800、400、200 ng·mL⁻¹ 的系列对照品溶液和 3 750、1 500、600、200 ng·mL⁻¹ 的质控溶液。

2.1.3 供试品溶液 供试样品为体外透皮试验收集的供试品溶液。采用的是改良型 Franz 立体扩散装置,释放面积为 1.77 cm²,接受室体积为 12 mL,将预处理的人工合成膜固定在供体室与接受室之间,分别取约 5 mL 妥布霉素地塞米松滴眼液在选定的人工合成膜上,保持封闭状态防止溶液蒸发和成分改变,在接受室中加入温度为(32±1)℃的 12 mL 体外释放介质,使人工膜恰好与体外释放介质液面接触,开启磁力搅拌器(转速:600 r·min⁻¹)不断搅拌,使药物自然释放,分别在 0.5、1、2、4、6 h 取样 12 mL,作为供试品溶液。

2.2 样品处理

吸取 500 μL 样品溶液(对照品溶液或供试品溶液);对于空白样品,加入 500 μL 空白基质(人工泪液)至 96 孔板中,加入 500 μL 体积分数 50% 甲醇溶液,混匀,取 2 μL 进样分析。

2.3 检测条件

2.3.1 色谱条件 采用 Agilent Zorbax Eclipse plus-C₈(3 mm×100 mm,1.8 μm),流动相 A 为 2 mmol·L⁻¹ 乙酸铵水溶液,用甲酸调节 pH 至 3.2,流动相 B 为体积分数 90% 甲醇水溶液,梯度洗脱,洗脱梯度程序如下:0~0.30 min,2.0% B;0.30~2.00 min,2.0% B→95.0% B;2.00~4.00 min,95.0% B;4.00~4.01 min,95.0% B→2.0% B;4.01~5.50 min,2.0% B。柱温 40℃,流速 0.5 mL·min⁻¹,进样量 2 μL。

2.3.2 质谱条件 采用多重反应监测(MRM)的扫描方式下正离子监测,离子源为电喷雾离子源(ESI),离子化电压(IS)为 5 500 V,离子源温度(TEM)为 400℃,喷雾气(GS1,N₂)为 50 kPa,辅助气(GS1,N₂)为 50 kPa,接口持续加热,全程通入氮气,气帘气(CRU,N₂)为 35 kPa,碰撞气(CAD)压力为 Medium,每个离子对的滞留时间(dwel time)为 150 ms。每个待测化合物的监测离子对、解簇电压(DP)及碰撞能量(CE)见表 1。TOB 和 DXM 的二级质谱图见图 1。

3 方法学验证

本试验方法学验证遵循《中国药典》2020 年版四部通则《9012 生物样品定量分析方法验证指导原则》和《M10 生物分析方法验证及样品分析》等相关指导原则的要求^[7-8]。

表 1 妥布霉素 (TOB) 和地塞米松 (DXM) 的多重反应监测 (MRM) 最优参数

Tab. 1 MRM parameters for TOB and DMX

Analyte	M_r	m/z (Q1)	m/z (Q3)	DP/V	CE/eV
TOB	467.5	468.4[M + H] ⁺	163.2	70	26
DXM	392.5	393.2[M + H] ⁺	237.1	40	18

注: DP - 解簇电压; CE - 碰撞能量。

Note: DP - declustering potential; CE - collision energy.

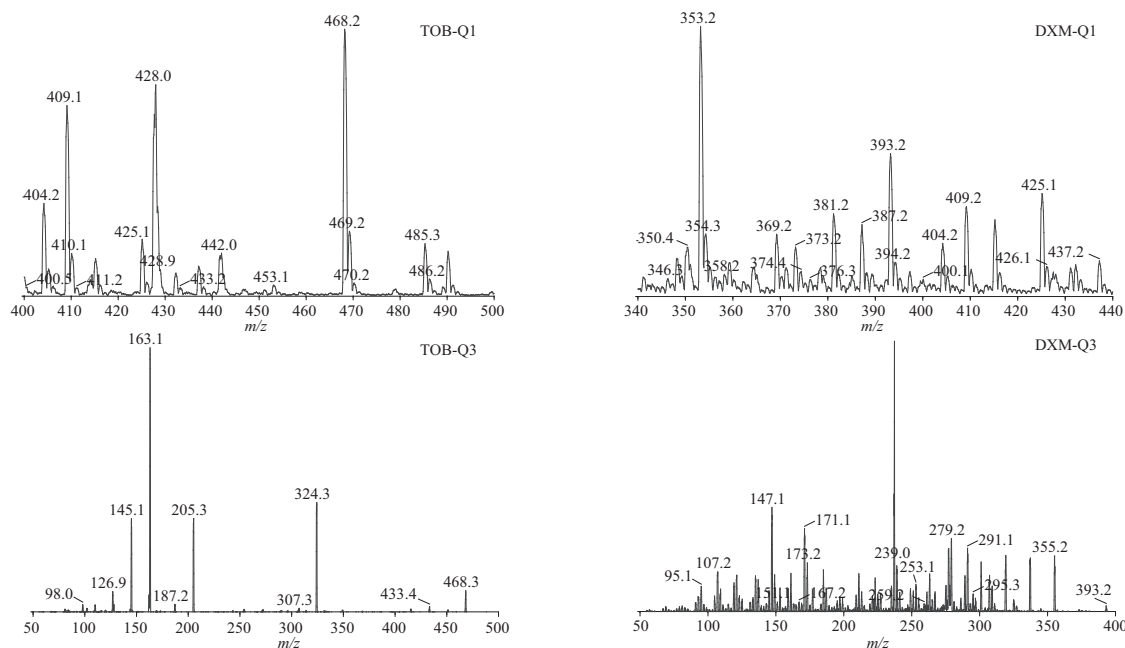


图 1 TOB 和 DXM 的典型质谱图

Fig. 1 Typical mass spectrograph of TOB and DXM

3.1 方法的专属性

取空白基质、含 $5\,000\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ TOB 空白基质、含 $5\,000\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ DXM 空白基质, 以及含 $5\,000\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ TOB/DXM 对照品溶液按“2.2”项下方法检测。由图 2 可知, TOB 的保留时间为 0.73 min , DXM 的保留时间为 3.16 min 。结果表明, 空白基质对 TOB、DXM 及 TOB 和 DXM 相互间均无干扰, 本法专属性良好。

3.2 标准曲线和定量下限

取“2.1.2”项下系列对照品溶液, 按供试样品处理。采用 Analyst 1.7.3 软件进行数据采集和处理, 分别以 TOB 和 DXM 的质量浓度 (ρ) 为横坐标, 以色谱响应值 (A) 为纵坐标, 用加权最小二乘法进行回归运算, 所得的直线回归方程即为标准曲线。TOB 典型的线性回归方程为 $A = 1\,710\rho - 70\,200$, $r = 0.998\,6$; DXM 典型的线性回归方程为 $A = 4\,510\rho + 111\,000$, $r = 0.999\,8$, 待测物均在 $200\sim 5\,000\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性良好, 定量下限均为 $200\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 信噪比均大于 10, 本研究同时考察了最高浓度对照品溶液后空白基

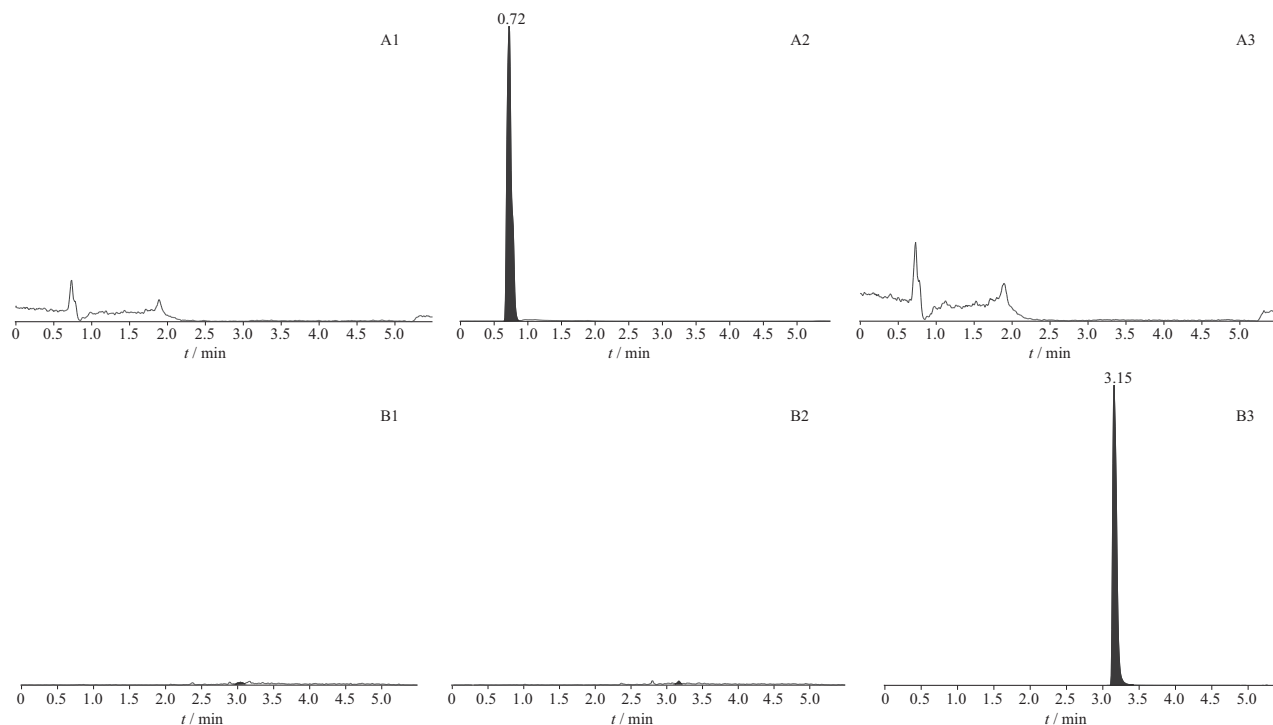
质中两待测物的残留, 其残留峰面积均低于定量下限中分析物峰面积的 20.0% 。

3.3 准确度和精密度

按“2.1.2”项下制备混合定量下限质控 (LLOQ) QC ($200\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、低浓度质控 (LQC) ($600\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中浓度质控 (MQC) ($1\,500\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 HQC ($3\,750\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 共 4 个浓度质控样品, 每个浓度各 6 份, 连续测定 3 d。将回算浓度与标准添加浓度进行比较, 得到批内和批间的变异系数 (coefficient of variation, CV), 以及相对误差 (relative error, RE), 计算准确度, 见表 2。结果显示, TOB 批内和批间的准确度偏差分别为 $-2.7\% \sim 4.6\%$ 和 $0.1\% \sim 2.7\%$, DXM 批内和批间的准确度偏差分别为 $-6.8\% \sim 4.6\%$ 和 $-1.3\% \sim 3.5\%$, TOB 和 DXM 的批内和批间精密度 CV 均在 15.0% 范围内, 本法准确度与精密度良好。

3.4 溶液稳定性

按“2.1.2”项下制备混合 LQC ($600\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、HQC ($3\,750\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 两个质量浓度的质控样品,



1 - 空白基质; 2 - 空白基质 + 妥布霉素; 3 - 空白基质 + 地塞米松。
 1 - Blank matrix; 2 - Blank matrix spiked with TOB; 3 - Blank matrix spiked with DXM.

图2 TOB(A)和DXM(B)典型的MRM色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of TOB(A) and DXM(B)

表2 人工泪液中TOB和DXM测定方法的准确度与精密度。 $\bar{x} \pm s$

Tab. 2 Precision and accuracy for the determination of TOB and DXM in artificial tears. $\bar{x} \pm s$

Analyte	ρ_{spiked} /ng · mL ⁻¹	Intra-day (n = 6)			Intra-day (n = 18)		
		ρ_{mean} /ng · mL ⁻¹	CV/%	RE/%	ρ_{mean} /ng · mL ⁻¹	CV/%	RE/%
TOB	200	204.8 ± 4.2	2.1	2.4	204.4 ± 7.3	3.6	2.0
		208.7 ± 8.4	4.0	4.3			
		198.5 ± 5.3	2.7	-0.8			
	600	609.4 ± 8.1	1.3	1.6	600.4 ± 11.1	1.8	0.1
		596.4 ± 5.1	0.9	-0.6			
		595.3 ± 13.4	2.3	-0.8			
	1 500	1 536.2 ± 32.1	2.1	2.4	1 541.2 ± 41.7	2.7	2.7
		1 569.1 ± 39.3	2.5	4.6			
		1 517.7 ± 39.4	2.6	1.1			
3 750	3 921.4 ± 73.8	1.9	4.6	3 779.3 ± 138.4	3.6	0.8	
	3 769.3 ± 96.9	2.5	0.5				
	3 648.3 ± 70.4	1.9	-2.7				
DXM	200	186.5 ± 5.5	2.9	-6.8	197.3 ± 10.1	5.1	-1.3
		205.1 ± 7.1	3.4	2.6			
		200.4 ± 6.6	3.3	0.2			
	600	591.4 ± 15.6	2.6	-1.4	596.2 ± 17.6	2.9	-0.6
		590.0 ± 21.9	3.7	-1.7			
		607.4 ± 10.0	1.7	1.2			
	1 500	1 569.7 ± 28.3	1.8	4.6	1 553.7 ± 40.4	2.6	3.5
		1 568.2 ± 15.3	1.0	4.5			
		1 523.6 ± 53.4	3.5	1.5			
3 750	3 793.8 ± 65.2	1.7	1.1	3 780.4 ± 75.3	2.0	0.8	
	3 839.3 ± 44.1	1.1	2.4				
	3 710.6 ± 52.7	1.4	-1.1				

注: CV - 变异系数; RE - 相对误差。

Note: CV - coefficient of variation; RE - relative error.

每个质量浓度各 6 份,考察处理过的样品在自动进样器温度(15 °C)下放置稳定性。结果所示,表明

TOB 和 DXM 在自动进样器温度(15 °C)下 48 h 稳定(表 3)。

表 3 空白基质中 TOB 和 DXM 的稳定性考察(15 °C, 48 h)。n = 6, $\bar{x} \pm s$

Tab. 3 Stability of TOB and DXM in blank matrix stored for 48 h at 15 °C. n = 6, $\bar{x} \pm s$

Analyte	$\rho_{\text{spiked}}/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\rho_{\text{mean}}/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	CV/%	RE/%
TOB	600.0	613.8	0.7	2.3
	3 750.2	3 726.2	2.4	-0.6
DXM	600.0	644.5	1.7	7.4
	3 750.5	3 763.3	1.2	0.3

3.5 样品检测

取参比制剂和自研制剂,按“2.1.3”项下制备供试品溶液,经样品处理,采用经验证的 LC-MS/MS 方法检测,通过测定的释放浓度计算参比制剂和自研制剂的累计释放量、单位面积释放量,以单

位面积释放量(y)与释放时间平方根(x)做线性回归,参比制剂释放速率方程为 $y = 176.35x - 93.532$ ($r^2 = 0.9933$);自研制剂释放速率方程为 $y = 112.43x - 13.595$ ($r^2 = 0.9973$),结果见表 4、图 3。

表 4 妥布霉素地塞米松滴眼液中 DXM 体外释放试验数据。n = 6

Tab. 4 DXM IVRT data of tobramycin and dexamethasone eye drops. n = 6

Items t/h	TS				RLD			
	AMT/%		$Q_n/\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$		AMT/%		$Q_n/\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$	
	AVG	CV/%	AVG	CV/%	AVG	CV/%	AVG	CV/%
0.5	11.7	3.6	66.2	3.5	7.9	3.5	44.76	2.4
1	17	3.6	95.9	3.7	14	3.7	79.24	1.7
2	25.5	5.7	143.9	5.7	25.6	5.7	144.71	1.7
3	32.8	6.4	185.2	6.4	35.8	6.4	202.13	2
4	38.3	5.8	216.3	5.8	45.4	5.8	256.5	2
5	42.2	4.4	238.5	4.4	54.3	4.4	306.64	2.4
6	45.4	3.3	256.2	3.2	61.3	3.2	346.15	3

注: AMT - 累计释放量; Q_n - 单位面积累计释放量; TS - 自研制剂; RLD - 参比制剂; AVG - 平均值。

Note: AMT - accumulated mass transfer; Q_n - cumulative permeation amount per unit area; TS - test sample; RLD - reference listed drug; AVG - average.

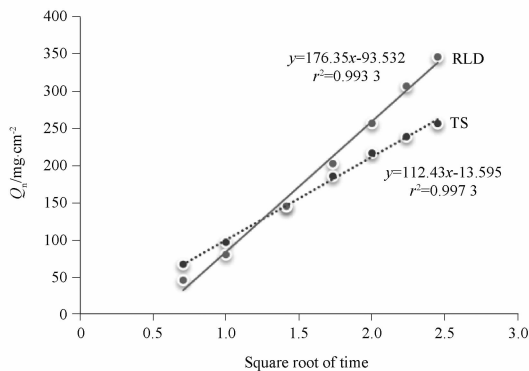


图 3 妥布霉素地塞米松滴眼液中 DXM 体外释放速率图

Fig. 3 DMX Release profiles of TOB/DXM Eye Drops

结果表明,取样点单位面积释放量与时间的平方根呈线性关系, r^2 均大于 0.99,6 个样品释放速率的 RSD 值均小于 10%,体外释放方法可行。自研制

剂的体外释放速率与参比制剂的体外释放速率比值的 90% 置信区间为 66.5%,超出 80.00% ~ 125.00% 的范围(参考 FDA^[2]妥布霉素地塞米松滴眼液指导原则中体内等效性试验的评价标准),参比制剂与自研制剂存在显著差异。

4 结论与讨论

本研究建立了一种同时测定人工泪液中妥布霉素和地塞米松浓度的 LC-MS/MS 方法。在方法开发优化过程中比较了 C_{18} 、 C_{18} -AQ、氨基柱、 C_8 等多种色谱柱,发现仅在 C_8 色谱柱中妥布霉素和地塞米松均有保留,出峰时间处无干扰。在筛选流动相组成和比例时,尝试了多种流动相组成和比例,包括水(0.1% 甲酸)-乙腈、水(0.1% 甲酸, 20 mmol · L⁻¹ 乙酸铵)-乙腈(0.1% 甲酸),以及水(0.4% 甲酸)-

80% 乙腈,发现妥布霉素不呈线性关系,地塞米松线性关系差。当更换流动相为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵,用甲酸调节 pH 至 3.2,流动相为 90% 甲醇水溶液时,妥布霉素线性关系良好,得到较为合适的保留时间,避免妥布霉素、地塞米松与杂质共同洗脱,减少了基质对妥布霉素和地塞米松响应的干扰^[9-13]。

本研究建立的定量检测人工泪液中妥布霉素和地塞米松的方法,经过全面的方法学验证,证明该方法具有良好的精密度、准确度、选择性、耐用性和稳定性,可满足妥布霉素地塞米松滴眼液在体外释放试验中定量检测的要求,为体外评价和临床药物检测提供可靠分析手段。

REFERENCES

- [1] XIANG Q, HU D, GAO X. Tobramycin/dexamethasone eye drops as a better choice for lacrimal duct probing in persistent congenital nasolacrimal duct obstruction: A consort study [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(6):e14188.
- [2] FDA. Draft guidance on moxifloxacin hydrochloride [S/OL]. <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm614096.pdf>. 2018.
- [3] FDA. Draft guidance on olopatadine hydrochloride 0.2% [S/OL]. <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm089224.pdf>. 2017.
- [4] FDA. Draft guidance on nepafenac 0.10% [S/OL]. <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm428230.pdf>. 2016.
- [5] *Ch. P*(2020) Vol II (中国药典 2020 年版. 二部) [S]. 2020: 632.
- [6] USP2024-NF42 [S]. United States Pharmacopeia: Tobramycin and Dexamethasone Ophthalmic Suspension. 2024.
- [7] *Ch. P*(2020) Vol IV (中国药典 2020 年版. 四部) [S]. 2020: 466-472.
- [8] FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation; FDA-2013-D-1020 [S/OL]. Center for Drug Evaluation and Research, 2018.
- [9] WANG Y Y, HUANG H, GAO Y H, *et al.* Simultaneous determination of three organic acids of anshen buxin liuwei pills in rat plasma using LC-MS/MS and pharmacokinetic study [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2024, 59(17): 1620-1628.
- [10] GAO Z F, ZHAO Y Y, ZHOU J. Bioequivalence tests of aspirin enteric-coated tables [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2016, 36(2): 217-225.
- [11] YANG G H, JIN Y, LI D Z, *et al.* Simultaneous determination of aspirin and salicylic acid in human plasma by LC-MS/MS [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2023, 40(9): 1165-1172.
- [12] MA L Y, WANG L M, ZHANG G C, *et al.* Using parallel artificial membrane permeability assay to test the *in vitro* FLUX of quetiapine fumarate tablets from different manufactures [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2023, 58(14): 1327-1333.
- [13] GUO H H, XIE Q L, HONG Z, *et al.* Preparation and *in vitro* drug release of diclofenac sodium microcapsules [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2023, 58(19): 1752-1758.

(收稿日期:2024-10-09)