LC-MS/MS 法同时测定人血浆中罗氟司特及其活性代谢物 *N*- 氧化物

张 军[1]，孙冰婷[2]，戴国梁[1]，居文政[1]*

（1. 南京中医药大学附属医院，江苏南京 210029；2. 南京中医药大学附属南京中医院，江苏南京 210002）

摘要：建立了 LC-MS/MS 法同时测定人血浆中罗氟司特（**1**）和活性代谢物罗氟司特 *N*- 氧化物（**2**）。血浆样品经叔丁基甲醚提取处理，经 Phenomenex Gemini C_{18} 柱（2.0 mm×100 mm，3 μm）分离，流动相为乙腈：5 mmol/L 乙酸铵缓冲液（含 0.006%甲酸）（62 ∶ 38）；采用电喷雾离子源（ESI），多反应监测（MRM）模式。以稳定同位素标记内标 d_4-**1** 和 d_4-**2** 分别作为 **1** 和 **2** 的内标。结果显示，**1**、**2** 分别在 0.040 7 ～ 15.89、0.205 8 ～ 20.58 ng/ml 内线性关系良好，**1**、**2** 的日内、日间精密度和准确度均符合生物样品分析的相关要求。建立的 LC-MS/MS 法准确、灵敏、方便，可用于 **1** 和 **2** 的人体药代动力学研究。

关键词：罗氟司特；罗氟司特 *N*- 氧化物；LC-MS/MS；人血浆

中图分类号：R917 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255（2022）04-0553-06

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.04.018

Simultaneous Determination of Roflumilast and Its Active Metabolite Roflumilast *N*-Oxide in Human Plasma by LC-MS/MS

ZHANG Jun[1], SUN Bingting[2], DAI Guoliang[1], JU Wenzheng[1]*

(*1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029;*
2. Nanjing Hospital of Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210002)

ABSTRACT: An LC-MS/MS method was established for the simultaneous determination of roflumilast (**1**) and its active metabolite roflumilast *N*-oxide (**2**) in human plasma. Plasma samples were extracted with *tert*-butyl methyl ether and separated on a Phenomenex Gemini C_{18} column (2.0 mm×100 mm, 3 μm). The mobile phase was acetonitrile∶5 mmol/L ammonium acetate buffer containing 0.006% formic acid (62∶38). Electron spray ionization (ESI) and multiple reaction monitoring (MRM) mode were used. Stable isotope-labeled internal standards of d_4-**1** and d_4-**2** were used as internal standards for **1** and **2**, respectively. The results showed that it was linear for **1** and **2** in the ranges of 0.040 7 − 15.89 and 0.205 8 − 20.58 ng/ml, respectively. The intra-day and inter-day precision and accuracy of **1** and **2** all met the relevant requirements for biological sample analysis. The established LC-MS/MS method is accurate, sensitive and convenient, which can be used for human pharmacokinetic studies of **1** and **2**.

Key Words: roflumilast; roflumilast *N*-oxide; LC-MS/MS; human plasma

罗氟司特（roflumilast，**1**）是一种磷酸二酯酶 4（phosphodiesterase 4，PDE4）抑制剂，能够阻断炎症反应信号的传递，进而抑制慢性阻塞性肺疾病（chronic obstructive pulmoriary disease，COPD）和哮喘等呼吸道疾病对肺组织造成的损伤[1−2]。**1** 片由瑞士 Nycomed 公司和美国 Forest 实验室共同开发，于 2010 年和 2011 年分别被欧洲药品管理局和美国 FDA 批准用于治疗慢性支气管炎和急性加重史的重度 COPD[3]。人口服 **1** 后，在体内通过细胞色素 P450 3A4 酶（CYP3A4）和细胞色素氧化酶

收稿日期：2021-07-28

基金项目：江苏省中医药领军人才（SLJ0208）、江苏省自然科学基金面上项目（BK20211394）

作者简介：张 军（1966—），女，主任中药师，从事临床药代动力学研究。

通信作者：居文政（1965—），男，教授，博士生导师，从事临床药代动力学研究。

E-mail：juwz333@hotmail.com

CYP1A2 代谢为 *N*- 氧化物，即罗氟司特 *N*- 氧化物（roflumilast *N*-oxide，**2**）[4—5]。在人体内约 90%的 PDE4 抑制作用由 **2** 产生，另外 10%为 **1** 产生 [6—7]。国家药品监督管理局已批准进行国产 **1** 片的研制，因此有必要建立简便、快速、可靠的 **1** 和 **2** 人体血药浓度测定方法，以便深入开展 **1** 在我国患者体内的药代动力学研究，为 **1** 制剂的开发和临床合理应用提供指导。

目前国内尚无文献报道人血浆中 **1** 和 **2** 含量的测定方法，国外文献对 **1** 和 **2** 的含量测定方法多为 HPLC-UV 法 [8]，但由于灵敏度低、分析时间长等缺点，不能满足临床药代动力学研究的要求。此外，在已报道的 LC-MS/MS 法中，研究人员多采取梯度分析，导致分析体系的平衡时间长、易残留，不利于高通量样品分析 [9—10]。基于此，本研究拟对已报道的测定方法进行系统优化，并对方法进行全面的方法学验证，以期建立一种简便、快速、可靠的 **1** 和 **2** 人体血药浓度测定方法以适用于我国患者的药代动力学研究。

1　仪器与试药

API 4000 型质谱仪（美国 AB 公司）；1200 型液相色谱系统（美国 Agilent 公司，配有 CTC-PAL 自动进样器）；CPA225D 型电子天平（德国 Sartorius 公司）。

1 对照品（江苏柯菲平医药股份有限公司，含量 99.90%，批号 141001）；**2** 对照品［科贝源（北京）生物医药科技有限公司，含量 99.28%，批号 20110728］；d_4-**1** 对照品（含量 98.00%，同位素含量 99.60%，批号 3-vcp-96-1）和 d_4-**2** 对照品（含量 98.60%，同位素含量 99.20%，批号 1327-093A2）均购于加拿大 TLC 公司；乙酸铵、叔丁基甲醚、甲酸、甲醇、乙腈均为色谱纯，水为超纯水。

人空白血浆（江苏省血液中心，批号 064375、069882、070630、062724、066764、054349）和受试者血浆［36 名健康受试者，男女各半，均分为低（0.25 mg）、中（0.375 mg）、高（0.5 mg）3 个剂量组进行药动学试验：在服药前和给药后的 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8、12、24、36、48、72、96 h 时经肘静脉采血 4 ml 置肝素化试管中，离心（900×*g*）10 min，分取上层血浆样品，并置 －70 ℃冰箱中保存待测］，本试验经南京中医药大学附属医院伦理委员会审批同意（伦理审查批件号 2014NL-092-02）。

2　方法与结果

2.1　色谱及质谱条件

色谱条件：色谱柱 Phenomenex Gemini C_{18} 柱（2.0 mm×100 mm，3 μm）；流动相 乙腈：5 mmol/L 乙酸铵缓冲液（含 0.006%甲酸）=62 ∶ 38；流速 200 μl/min；柱温 35 ℃；分析时间 4.5 min；进样量 10 μl。

质谱条件：离子源 电喷雾离子源（ESI），正离子模式检测，多反应监测（MRM）模式；电喷雾电压 5 500 V；离子源温度 500 ℃；辅助气 1（GS1）344.74 kPa；辅助气 2（GS2）413.69 kPa；气帘气（CUR）137.90 kPa；碰撞气（CAD）68.95 kPa；扫描时间 200 ms。**1**、**2**、d_4-**1**、d_4-**2** 的去簇电压（DP）分别为 80、90、80 和 70 V，碰撞能量（CE）值分别为 36、40、28 和 80 V；监测离子对 **1** *m*/*z* 403.1 → 187.2；**2** *m*/*z* 419.1 → 187.2；d_4-**1** *m*/*z* 407.1 → 245.2；d_4-**2** *m*/*z* 423.1 → 245.2。

2.2　溶液配制

1、**2** 对照品贮备液：精密称取 **1**、**2** 对照品各 10.17、10.29 mg，分别置 10 ml 量瓶中，用甲醇溶解并定容，即得质量浓度分别为 1.017、1.029 mg/ml 的 **1**、**2** 对照品贮备液。

混合系列标准曲线工作液：以甲醇为溶剂分别将 **1**、**2** 对照品贮备液逐级稀释得到不同质量浓度的 **1**、**2** 系列标准工作液。将不同浓度的 **1** 和 **2** 系列标准工作液按相应浓度梯度等体积混匀，即得含 **1** 质量浓度分别为 2.034、5.085、12.71、25.43、50.85、254.3、794.5 ng/ml 和 **2** 质量浓度分别为 10.29、25.73、51.45、128.6、257.3、514.5、1 029 ng/ml 的混合系列标准曲线工作液，于 4 ℃冰箱中保存备用。

混合系列标准质控工作液：精密称取 **1**、**2** 对照品各 9.66、11.00 mg，分别置 10 ml 量瓶中，用甲醇溶解并定容，即得质量浓度分别为 0.966、1.100 mg/ml 的 **1** 和 **2** 标准贮备液。以甲醇为溶剂分别将 **1**、**2** 标准贮备液逐级稀释得到含 **1** 和 **2** 不同质量浓度的系列标准工作液。将不同质量浓度的 **1** 和 **2** 系列标准工作液按相应浓度梯度等体积混匀，即得含 **1** 质量浓度分别为 4.832、60.40、604.0 ng/ml

和 **2** 质量浓度为 27.50、137.5、859.4 ng/ml 的混合系列标准质控工作液，于 4 ℃冰箱中保存备用。

d_4-**1** 和 *d_4*-**2** 内标贮备液：取 *d_4*-**1** 和 *d_4*-**2** 对照品各 1 mg，分别置 10 ml 量瓶中，用甲醇溶解并定容，即得质量浓度均为 1 mg/ml 的 *d_4*-**1** 和 *d_4*-**2** 内标贮备液。

混合内标工作液：以甲醇为溶剂，分别将上述 *d_4*-**1** 和 *d_4*-**2** 内标贮备液稀释，得到含 *d_4*-**1** 500 ng/ml 和含 *d_4*-**2** 1 250 ng/ml 的内标工作液，将两溶液等体积混匀，再用甲醇稀释 5 倍，即得含 *d_4*-**1** 50 ng/ml、*d_4*-**2** 125 ng/ml 的混合内标工作液，于 4 ℃冰箱中保存备用。

校正标样：分别取上述混合系列标准曲线工作液或混合系列标准质控工作液各 10 μl，加入人空白血浆 500 μl，即得 **1** 和 **2** 质量浓度分别为 0.040 68、0.101 7、0.254 2、0.508 5、1.017、5.085、15.89 ng/ml 和 0.205 8、0.514 5、1.029、2.572、5.145、10.29、20.58 ng/ml 的标准系列血浆样品，以及 **1**、**2** 质量浓度分别为 0.096 64、1.208、12.08 ng/ml 和 0.550 0、2.750、17.19 ng/ml 的质量控制（QC）样品，以及 **1**、**2** 质量浓度分别为 0.040 68、0.205 8 ng/ml 的定量下限（LLOQ）样品。

2.3 血浆样品的预处理

精密吸取血浆样品 500 μl 于 10.0 ml 玻璃试管中，加入甲醇 10 μl，再加入“**2.2**”项下混合内标工作液 10 μl，旋涡 10 s，加入叔丁基甲醚 4 ml 进行提取处理，旋涡振荡 3 min，离心（900×*g*）10 min，吸取上层有机相 4 ml，于 35 ℃下空气吹干，加入 50％乙腈溶液 100 μl 复溶，旋涡 3 min，离心（13 800×*g*）5 min，吸取 10 μl 进样分析。

2.4 方法学验证

2.4.1 方法选择性

取 6 份人空白血浆，除不加混合内标工作液（改加同等体积的甲醇）外，其余步骤按“**2.3**”项下方法进行预处理；并取“**2.2**”项下 LLOQ 样品，以及志愿者口服 **1** 片（0.25 mg）1 h 后的血浆样品，按“**2.3**”项下方法进行预处理后，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样分析。通过比较上述 3 个血浆样品考察方法特异性。

结果见图 1，**1**、**2** 的保留时间分别为 3.6、2.1 min，说明干扰组分的响应低于当批次 LLOQ 待测物响应的 20％及内标响应的 5％，人血浆中的内源性物质不干扰待测物和内标的定量分析。

2.4.2 进样残留

为考察进样残留情况，按标准系列血浆样品最高浓度至空白人血浆样品的顺序进样分析，考察残留情况。结果显示，空白人血浆中干扰组分的响应低于当批次 LLOQ 待测物响应的 20％及内标响应的 5％，不影响人血浆中 **1** 和 **2** 的定量分析。

2.4.3 线性试验

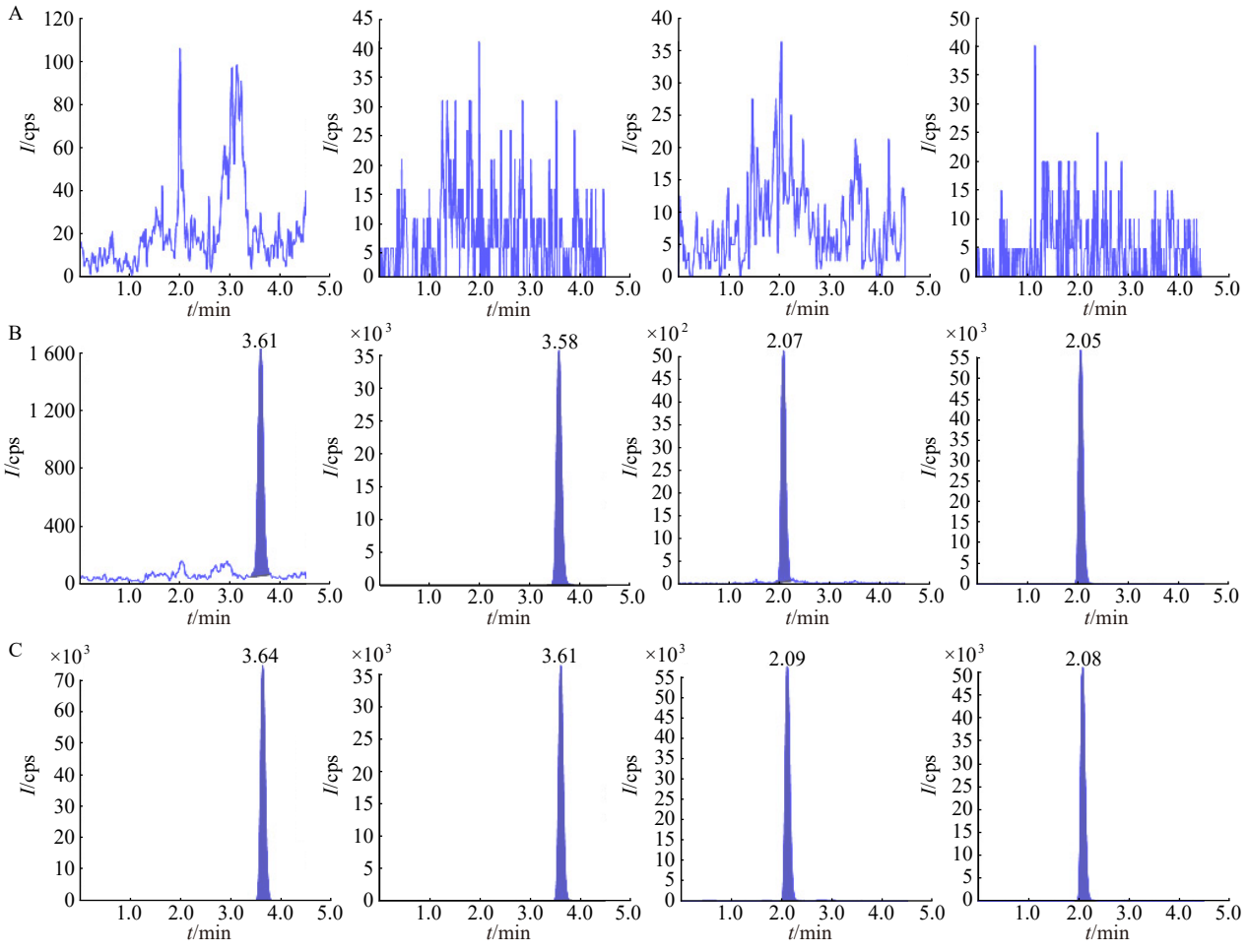
取“**2.2**”项下标准系列血浆样品，按“**2.3**”项下血浆样品预处理方法操作，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，并记录色谱图、分析物峰面积和内标峰面积。以 **1** 或 **2** 的血药浓度 *c* 为横坐标，以 **1** 或 **2** 峰面积和相应内标峰面积的比值 *R* 为纵坐标进行权重回归（权重系数为 $1/c^2$），得标准曲线回归方程。

结果显示，**1**、**2** 分别在 0.040 7 ～ 15.89、0.205 8 ～ 20.58 ng/ml 内线性关系良好，线性方程分别为 R=0.937 9c+0.021 6（r=0.996 6）；R=0.383 6c+0.021 3（r=0.998 5）。

2.4.4 精密度和准确度

取“**2.2**”项下 **1**、**2** 的低、中、高浓度 QC 样品及 LLOQ 样品，按“**2.3**”项下方法进行样品预处理，每个浓度平行制备 5 份，连续制备并测定 3 个分析批，每批随行 1 条标准曲线。将分析物峰面积和内标峰面积的比值代入随行标准曲线求得实测浓度及其准确度。

结果显示，每个浓度水平的 QC 样品和 LLOQ 样品中 **1** 的日内精密度 RSD（n=5）均小于 7.18％，日间精密度 RSD（n=15）均小于 8.85％，相对误差为 －0.99％～ 6.22％；每个浓度水平的 QC 样品和 LLOQ 样品中 **2** 的日内精密度 RSD（n=5）均小于 3.73％，日间精密度 RSD（n=15）均小于 5.06％，相对误差为 －0.29％～ 6.75％。说明 **1** 和 **2** 的低、中、高浓度 QC 样品和 LLOQ 样品的日内和日间精密度



A：人空白血浆，B：LLOQ 样品，C：志愿者口服 **1** 片（0.25 mg）1 h 后血浆样品（每行从左至右依次为 **1**、d_4-**1**、**2**、d_4-**2**）

图 1　人血浆中 1 和 2 的典型色谱图

Fig.1　Typical Chromatograms of **1** and **2** in Human Plasma

和准确度均符合生物样品测定的相关要求。

2.4.5　提取回收率

取“**2.2**”项下低、中、高浓度的混合系列标准质控工作液，按“**2.3**”项下方法进行样品预处理，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，每个浓度平行 3 份，获得相应峰面积 *A*；取 9 份人空白血浆各 500 μl，除不加混合内标工作液（改加同等体积的甲醇）外，其余按“**2.3**”项下预处理方法操作，分别加入“**2.2**”项下低、中、高浓度的混合系列标准质控工作液 10 μl，再分别加入“**2.2**”项下混合内标工作液 10 μl 和 50%乙腈溶液 80 μl，混匀 30 s，旋涡振荡 3 min，离心（13 800×*g*）5 min 后，吸取 10 μl 进样分析，获得相应峰面积 *B*。上述 *A* 和 *B* 的比值（*A*/*B*）即为提取回收率。

结果显示，**1** 的低、中、高浓度平均提取回收率（*n*=3）分别为 106.06 %、101.31 % 和 95.86 %，RSD 分别为 11.30 %、1.04 % 和 3.34 %；**2** 的低、中、高浓度平均提取回收率（*n*=3）分别为 96.16%、101.43%和 96.39%，RSD 分别为 2.45%、1.83%和 2.36%，说明 **1** 和 **2** 的提取回收率精密且可重现。

2.4.6　基质效应

分别取“**2.2**”项下低、中、高浓度的混合系列标准质控工作液各 10 μl，再向其中分别加入“**2.2**”项下混合内标工作液 10 μl 和 50%乙腈 80 μl，涡旋混匀，每个浓度平行 3 份，吸取 10 μl 进样分析，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，获得相应峰

面积 *C*。

取 6 份不同批号的人空白血浆，按上述“**2.4.5**”项下峰面积 *B* 的获得方法进行处理，上述 *B* 和 *C* 的比值（*B*/*C*）即为基质因子 ME（%）。

结果显示，**1** 在低、中、高浓度下经内标校正的基质效应分别为 98.04%、94.34%和 95.76%，RSD（*n*=3）均小于 7.97%；**2** 在低、中、高浓度下经内标校正的基质效应分别为 101.36%、93.61%和 96.70%，RSD（*n*=3）均小于 6.58%，说明待测物和内标在本试验选择的色谱质谱条件下可忽略基质效应的影响。

2.4.7 稳定性试验

取 **1** 和 **2** 的低、中、高浓度 QC 样品，每个浓度平行配制 3 份，按“**2.3**”项下预处理方法操作，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，分别考察室温放置 4 h、－20 ℃冰箱中保存并反复冻融 3 次、－70 ℃冰箱保存 34 d、样品处理后在自动进样器（15 ℃）中放置 24 h 的样品稳定性。

结果显示，**1** 和 **2** 的含药血浆在上述各项条件下稳定性良好，准确度分别在 87.72 %～106.8 %（RSD ≤ 5.49 %）及 89.53 %～106.70 %（RSD ≤ 3.07%）。

2.4.8 稀释效应

取“**2.2**”项下 **1**、**2** 对照品贮备液适量，用甲醇分别稀释至 3.178、4.116 μg/ml。将上述稀释溶液等体积混匀，得含 **1** 和 **2** 分别为 1.589、2.058 6 μg/ml 的混合标准溶液。吸取空白人血浆 500 μl，加入上述混合标准溶液 10 μl，得含 **1** 及 **2** 分别为 31.78、41.16 ng/ml 的含药血浆样品，平行配制 5 份。精密吸取上述样品 100 μl，加入人空白血浆 400 μl，涡旋振荡 30 s，充分混匀后，按“**2.3**”项下方法进行预处理并进样分析，每个浓度平行 5 份。

结果显示，血浆稀释 5 倍后，测得 **1** 的准确度为 96.90%～105.2%，RSD（*n*=5）为 3.13%；**2** 的准确度为 99.17%～104.4%，RSD（*n*=5）为 2.45%，表明人血浆样品经人空白血浆稀释 5 倍后测定，不影响结果的准确度。

2.5 药代动力学研究

36 名健康受试者单次口服 **1** 片 0.25、0.375 或 0.5 mg 后，**1** 与 **2** 的血药浓度均值 - 时间曲线见图 2，相关药代动力学参数结果见表 1。

BETHKE 等的研究表明，19 名德国健康志愿者单次口服 0.5 mg **1** 片后，**1** 和 **2** 的药时曲线下面积（$AUC_{0\to\infty}$）、峰浓度（c_{max}）、达峰时间（t_{max}）及末端消除半衰期（$t_{1/2}$）的均值分别为 35.0 h·ng·ml^{-1}、5.27 ng/ml、1.25 h、14.47 h 和 351.3 h·ng·ml^{-1}、9.39 ng/ml、11.0 h、23.16 h[7]。本研究中，我国健康志愿者体内 **1** 的药动学参数与文献报道基本一致，**2** 的 $AUC_{0\to\infty}$ 与文献相比偏大而 t_{max} 偏小，**2** 的其他药动学参数与文献报道的基本一致。**2** 在中国健康志愿者体内存在明显的双峰现象，可能由肝肠循环所致，该现象与文献报道一致。

3 讨论

本研究在方法学建立的过程中，对色谱柱、流动相组成、样品前处理和内标选择方面进行了系统、全面的优化。结果表明：①采用 Phenomenex Gemini C_{18} 色谱柱作为分析柱时，其分离效果和峰形均较好，优于 Phenomenex Luna C_8 等色谱柱；②参考相关文献，考察不同比例的乙腈和不同浓度乙酸铵缓冲液（含不同浓度的甲酸）作为流动相，结果表明，乙腈：5 mmol/L 乙酸铵缓冲液（含 0.006%甲酸）为 62 ∶ 38（*v*/*v*）时，**1** 和 **2** 峰形良好，保留时间在 2～4 min，因采用等度洗脱，减少了系统平衡时间，缩短了分析时间，适合大通量样本的分析[9—10]；③比较叔丁基甲醚、乙酸乙酯∶庚烷（50 ∶ 50）和乙醚作为不同提取溶剂处理血浆的提取效果，结果表明，采用叔丁基甲醚提取，**1** 和 **2** 的提取回收率显著提高，同时降低了基质效应；④作为定量用内标，先后考察了阿托伐他汀和替硝唑，在本研究的分析条件下替硝唑的出峰时间约为 1.5 min，阿托伐他汀的出峰时间约为 3 min，色谱峰峰形良好，故预试验采用阿托伐他汀作为内标，但在方法学验证时发现阿托伐他汀和分析物 **1** 和 **2** 的基质效应相差较大，多次反复进样，**1** 和 **2** 的响应值稳定，而阿托伐他汀的响应值有增大趋势，最终本试验采用了同位素 d_4-**1** 和 d_4-**2** 作为内标，确保了检测的稳定性。

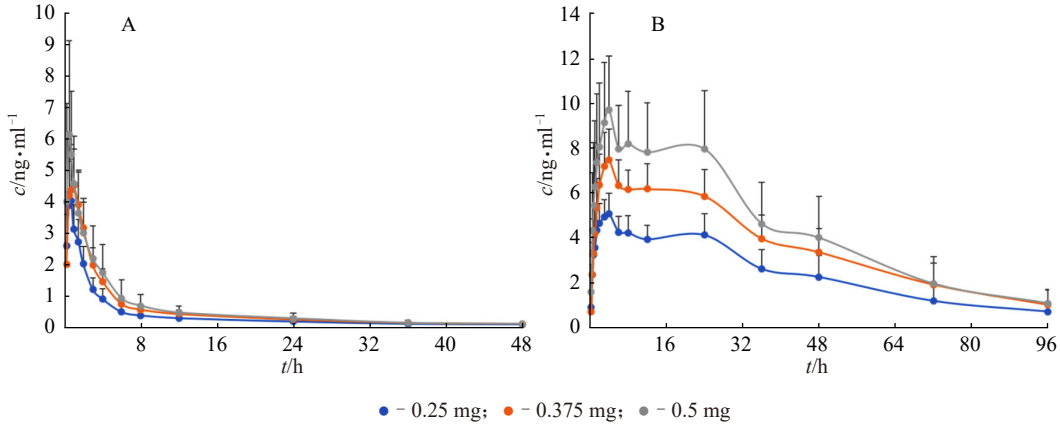


图 2　单次口服试验制剂 **0.25**、**0.375** 或 **0.5 mg** 后血浆中 **1**（A）和 **2**（B）的平均药 - 时曲线（n=12）

Fig.2　Mean Plasma Concentration-time Profiles of **1** (A) and **2** (B) after a Single Oral Dose of 0.25, 0.375 or 0.5 mg (n=12)

表 1　主要药动学参数（$\bar{x}\pm s$，n=12）

Tab.1　Main Pharmacokinetic Parameters ($\bar{x}\pm s$, n=12)

参数	0.25 mg		0.375 mg		0.5 mg	
	1	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**
t_{max}/h	0.83±0.54	5.58±5.98	0.79±0.32	6.92±6.27	0.96±1.06	6.75±8.09
c_{max}/ng·ml^{-1}	4.46±1.36	5.29±0.92	5.25±1.10	7.67±1.24	6.86±2.37	10.29±2.42
$t_{1/2}$/h	16.08±4.44	24.61±4.91	18.59±8.84	27.09±10.23	12.74±3.95	21.76±5.70
表观分布容积(V_d)/L	14.42±5.02	1.07±0.32	14.56±4.32	1.01±0.30	19.02±6.87	1.23±0.42
清除率(CL)/L·h^{-1}	310.83±83.87	36.42±9.49	354.32±86.96	36.27±6.46	326.25±93.07	37.11±13.69
$AUC_{0\to t}$/h·ng·ml^{-1}	17.88±7.39	229.98±67.02	25.22±6.97	346.08±77.03	27.84±9.83	421.31±142.55
$AUC_{0\to\infty}$/h·ng·ml^{-1}	20.14±9.62	257.26±89.21	28.30±9.91	404.25±128.12	29.76±11.18	456.45±162.52

参考文献：

[1] ANTÓ J M, VERMEIRE P, VESTBO J, *et al*. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Eur Respir J*, 2001, **17**(5): 982-994.

[2] WOODRUFF P G, FAHY J V. Asthma: prevalence, pathogenesis, and prospects for novel therapies [J]. *JAMA Surg*, 2001, **286**(4): 395-398.

[3] WANG R Q, BIAN T. Research advance of the anti-inflammatory effect of selective phosphodiestera 4 inhibitor roflumilast in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chin J Asthma*, 2012, **6**(6): 441-446.

[4] GIEMBYCZ M A, FIELD S K. Roflumilast: first phosphodiesterase 4 inhibitor approved for treatment of COPD [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2010, **4**: 147-158.

[5] BUNDSCHUH D S, ELTZE M, BARSIG J, *et al*. *In vivo* efficacy in airway disease models of roflumilast, a novel orally active PDE4 inhibitor [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, **297**(1): 280-290.

[6] HATZELMANN A, SCHUDT C. Anti-inflammatory and immunomodulatory potential of the novel PDE4 inhibitor roflumilast *in vitro* [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, **297**(1): 267-279.

[7] BETHKE T D, BÖHMER G M, HERMANN R, *et al*. Dose-proportional intraindividual single- and repeated-dose pharmacokinetics of roflumilast, an oral, once-daily phosphodiesterase 4 inhibitor [J]. *J Clin Pharmacol*, 2007, **47**(1): 26-36.

[8] PINHEIRO M S, VIANA G M, VIEIRA B A, *et al*. Identification, characterization and in silico ADMET prediction of Roflumilast degradation products [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, **138**: 126-133.

[9] CUI X G, HUANG J, ZHENG X, *et al*. Simultaneous determination of roflumilast and its metabolite in human plasma by LC-MS/MS: application for a pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B*, 2016, **1029**: 60-67.

[10] KNEBEL N G, HERZOG R, REUTTER F, *et al*. Sensitive quantification of roflumilast and roflumilast *N*-oxide in human plasma by LC-MS/MS employing parallel chromatography and electrospray ionisation [J]. *J Chromatogr B*, 2012, **893**: 82-91.