吸入用复方异丙托溴铵溶液在大鼠呼吸道的组织分布

左亚茹[1,2]，侯海婷[1,2]，赵方红[1,2]，杨 娴[1,2,3]*

（1. 石家庄四药有限公司研发中心，河北石家庄 052100；2. 化学药品无菌制剂产业技术研究院，河北石家庄 051430；
3. 石家庄四药有限公司博士后科研工作站，河北石家庄 052100）

摘要：该研究建立了复方异丙托溴铵溶液（F）中异丙托溴铵（**1**）及硫酸沙丁胺醇（**2**）的 LC-MS/MS 分析方法，并测量了 **1** 和 **2** 在大鼠气管支气管、肺组织的分布。结果显示，大鼠吸入 F 后 **1** 与 **2** 在气管支气管中的浓度线性范围均为 2 ～ 800 ng/g；在肺中的浓度线性范围均为 1 ～ 400 ng/g。大鼠吸入给药后，**1** 和 **2** 在气管支气管和肺内呈现相似的动态变化过程，给药后即可达峰浓度，随后快速消除。与肺相比，**2** 在气管支气管中分布较多（P<0.05），**1** 在气管支气管的浓度与肺组织浓度无显著差异（P>0.05）。所建立的 LC-MS/MS 测量方法简便、灵敏、准确，可用于大鼠体内组织的药物分布研究，为研究 F 的体内药动学研究提供了新方法，为其临床合理用药提供了数据参考。

关键词：异丙托溴铵；硫酸沙丁胺醇；雾化吸入；气管支气管；肺

中图分类号：R965 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255（2023）07-1095-09

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.07.016

Tissue Distribution of Compound Ipratropium Bromide Solution for Inhalation in Respiratory Tract of Rats

ZUO Yaru[1,2], HOU Haiting[1,2], ZHAO Fanghong[1,2], YANG Xian[1,2,3]*

(*1. Pharmaceutical Research Institute of Shijiazhuang No.4 Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 052100;
2. Industrial Technology Research Institute of Chemical Sterile Preparations, Shijiazhuang 051430;
3. Postdoctoral Research Workstation of Shijiazhuang No.4 Pharmaceutical Co., Ltd, Shijiazhuang 052100*)

ABSTRACT: An LC-MS/MS analytical method was established to determine ipratropium bromide (**1**) and salbutamol sulfate (**2**) in compound ipratropium bromide solution (F), thus it was used to determine the distributions of **1** and **2** in tracheobronchial and pulmonary tissues of rats. The results showed that the linear concentration ranges of **1** and **2** in the trachea, bronchus and lung of rats inhaled of F were 2 – 800 and 1 – 400 ng/g, respectively. The dynamic changes of **1** and **2** in rat tracheobronchial and lung tissues showed similar processes, reaching the maximum concentration after administration and followed by rapid elimination. Compound **2** showed higher distribution in trachea and bronchus (P<0.05) than that in lung tissue, and the concentrations of **1** in tracheobronchial and lung tissues showed no significant difference (P>0.05). The developed LC-MS/MS method was simple, sensitive, accurate, and could be used to determine drug distributions in rat tissues. This study provided a new evaluation method for the pharmacokinetics of F *in vivo* and a reference for clinical rational drug use.

Key Words: ipratropium bromide; salbutamol sulfate; atomization inhalation; trachea and bronchus; lung

慢性阻塞性肺疾病（chronic obstructive pulmonary disease，COPD）是临床上常见的一种具有气流阻塞特征的慢性支气管炎或者肺疾病，具有较高的发病率和死亡率[1]。据统计，在中国年龄≥ 40 岁的人群中，COPD 发病率约为 13.7%[2]。开发

收稿日期：2022-09-15

基金项目：河北省创新能力提升计划项目（225A2704D）、河北省高层次人才资助项目（B2022003039）

作者简介：左亚茹（1993—），女，本科，从事新药非临床研究。

通信作者：杨 娴（1987—），女，副高级工程师，博士，从事新药非临床研究。

E-mail：xianyang323@163.com

治疗 COPD 的药物，对患者获得及时、有效的治疗有重要意义[3—5]。

COPD 患者的肺功能可通过使用抗胆碱能支气管扩张药和 β_2 受体激动药缓解症状得到改善[6]。吸入用复方异丙托溴铵溶液（F）由抗胆碱能支气管扩张药异丙托溴铵（**1**）和 β_2 受体激动药硫酸沙丁胺醇（**2**）组成，因二者在受体信号通路上的互补作用，联合使用不仅可产生附加性支气管扩张作用，而且可改善患者的依从性[6]。

本研究建立了液相色谱 - 串联质谱（LC-MS/MS）法同时检测大鼠吸入 F 后不同时间点的气管支气管和肺组织中 **1**、**2** 的浓度变化，为其体内药动学研究提供更多数据，且为临床合理用药提供参考依据。

1　仪器与试药

AB SCIEX UFLC-QTRAP5500 型液质联用仪（美国 Waters 公司）；BC/BD-202SFA 型台式高速冷冻离心机（长沙易达仪器有限公司）；NE-C28 型压缩式吸入器（日本欧姆龙公司）；A502220 型可视氮吹仪（杭州米欧仪器有限公司）。

F（石家庄四药有限公司研发中心，规格 2.5 mL 中含有 **1** 0.5 mg、**2** 3.0 mg，批号 6984035，以下简称 FA；德国 Boehringer Ingelheim 公司，规格 2.5 mL 中含 **1** 0.5 mg、沙丁胺醇 2.5 mg，批号 6984001，以下简称 FB）；**1** 对照品（含量 95.6%，批号 R022A0）和 **2** 对照品（含量 99.3%，批号 100328-200703）购于中国食品药品检定研究院；**1** 同位素（异丙托溴铵 -D7，纯度 99.4%，批号 15-AZC-169-1）和 **2** 同位素（沙丁胺醇 -D9，纯度 98.2%，批号 10-MMH-144-2）购于加拿大 Toronto Research Chemicals 公司；乙腈、甲醇、氨水均为色谱纯，无水乙醇、甲酸、乙酸铵、乙酸乙酯均为分析纯。

SPF 级雄性 SD 大鼠，6 ～ 7 周，体质量 180 ～ 220 g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，动物质量合格证编号 11400700245284。本实验符合实验动物伦理委员会的伦理学标准。

2　方法和结果

2.1　LC-MS/MS 的色谱和质谱条件

在文献[6—7]的基础上，根据预试验结果稍作调整，建立本法以检测生物样品中 **1**、**2** 的含量。

色谱条件：色谱柱 Waters BEH C_{18} 柱（2.1 mm×50 mm，1.7 μm）；流动相　A 为含有 0.2% 甲酸和 5 mmol/L 乙酸铵的水溶液，B 为含有 0.2% 甲酸和 5 mmol/L 乙酸铵的甲醇溶液，梯度洗脱（0—0.50 min：B 10%，0.50—2.00 min：B 10%—90%，2.00—3.50 min：B 90%，3.50—3.51 min：B 90%—10%；3.51—4.00 min：B 10%）；柱温 室温；流速 0.3 mL/min；进样量 10 μL。

质谱条件：离子源 电喷雾电离源（ESI），正离子模式，多反应监测模式（MRM）；喷射电压（IS）5 500 V；雾化温度（TEM）550 ℃；雾化气压力 0.379 2 MPa，辅助气压力 0.344 7 MPa；碰撞气压力 0.062 1 MPa；监测离子对 **2** *m*/*z* 240.2→*m*/*z* 148.3，**2** 同位素 *m*/*z* 249.4→*m*/*z* 149.0，**1** *m*/*z* 333.4→*m*/*z* 167.1，**1** 同位素 *m*/*z* 340.3→*m*/*z* 174.3。

2.2　对照品溶液及内标溶液配制

对照品溶液：分别精密称取 **1** 和 **2** 对照品适量，各置 10 mL 量瓶中，用 50% 甲醇溶解并定容，配成质量浓度为 1 mg/mL 的贮备液。用 50% 甲醇将贮备液稀释成 800、400、200、50、25、10、5、2 ng/mL 的 **1** 和 **2** 对照品溶液，常温条件下备用。

内标工作液：精密称取 **1** 同位素和 **2** 同位素适量，分别用 50% 甲醇溶解、定容，配成质量浓度为 1 mg/mL 的内标贮备液，分别经 50% 甲醇稀释得 50 ng/mL 的内标工作液。

质控样品溶液：分别用 50% 甲醇将上述内标贮备液进行系列稀释，得质量浓度为 600、60、6、2 ng/mL 的 **1** 同位素和 **2** 同位素质控溶液。

2.3　动物试验与组织样品处理

50 只雄性大鼠随机分为 2 组（每组 20 只）：FA 组吸入给予 FA 8 mL/kg（给药剂量以 **2** 和一水合 **1** 计，分别为 9.6、1.68 mg/kg）1 次，FB 组吸入给予等剂量 FB。分组后的剩余动物用于取空白血和组织。于给药结束后 0、0.5、1 和 4 h 时每组各处死 5 只大鼠，取气管支气管、肺组织，用 0.9% 氯化钠注射液清洗，滤纸吸干，于 －70 ℃保存备用。

组织样品：取 SD 大鼠气管支气管样品［*m*（气

管支气管）：*v*（生理盐水）=1 ∶ 10］或SD大鼠肺组织样品［*m*（气管支气管）：*v*（生理盐水）=1 ∶ 5］50 μL和缓冲溶液［*v*（5 mol/L乙酸铵水溶液）：*v*（氨水）=1 ∶ 1］20 μL置玻璃管中，分别加入稀释液（50%甲醇）和内标工作液各5 μL、无水乙醇100 μL，涡旋1 min，然后加入乙酸乙酯500 μL，涡旋5 min，取有机层500 μL于玻璃管中，加入无水乙醇100 μL和乙酸乙酯500 μL 进行2次萃取，取有机层500 μL与第一次萃取所得的有机层500 μL混合，40 ℃氮气吹干后加入复溶液［*v*（含0.5%甲酸的乙腈）：*v*（水）=1 ∶ 9］150 μL复溶，得气管支气管样品和肺组织样品。

2.4 样品配制

标准曲线样品：取空白气管支气管匀浆液50 μL，分别加入不同质量浓度的**2**和**1**对照品溶液5 μL，按“**2.3**”项下方法处理样品，配制成**2**和**1**浓度均为800、400、200、50、25、10、5、2和0 ng/g的气管支气管线性样品。取SD大鼠空白肺组织匀浆液50 μL，同上操作，制备**2**和**1**浓度均为400、200、100、25、12.5、5、2.5、1和0 ng/g的肺组织线性样品。

质控（QC）及定量限（LLOQ）样品：取空白气管支气管匀浆液50 μL，分别加入不同质量浓度质控样品溶液5 μL，按“**2.3**”项下方法处理样品，制备**2**和**1**浓度均为600、60、6 ng/g的**2**和**1**的QC气管支气管样品，以及2 ng/g的**2**和**1**的LLOQ气管支气管样品。取空白肺组织匀浆液50 μL，分别加入不同质量浓度质控样品溶液5 μL，同上处理，制备**2**和**1**浓度均为300、30、3 ng/g的**2**和**1**的QC肺组织样品，以及1 ng/g的**2**和**1**的LLOQ肺组织样品。

基质效应考察用样品：分别配制**2**和**1**浓度均为0.2、2、20 ng/g的**2**和**1**溶液样品（Sol1）；取空白气管支气管组织匀浆，除用稀释液代替内标溶液外，按“**2.3**”项下方法处理组织样品，氮气吹干后用Sol1（150 μL）复溶，得气管支气管匀浆基质样品（SAE1）。另分别配制**2**和**1**浓度均为0.1、1、10 ng/g的**2**和**1**溶液样品（Sol2）；取空白肺组织匀浆，除用稀释液代替内标溶液外，按“**2.3**”项下方法处理组织样品，氮气吹干后用Sol2（150 μL）复溶，得肺组织匀浆基质样品（SAE2）。

2.5 方法学验证

2.5.1 方法专属性

分别取空白气管支气管组织和FB组气管支气管匀浆液，按“**2.3**”项下方法处理，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测量。另取**2**和**1**的气管支气管组织线性样品（均为400 ng/g），按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测量。

分别取空白肺组织和FB组肺组织样品，按“**2.3**”项下方法处理，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测量。另取**2**和**1**的肺组织线性样品（均为200 ng/g）按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测量。上述结果如图1～4所示。

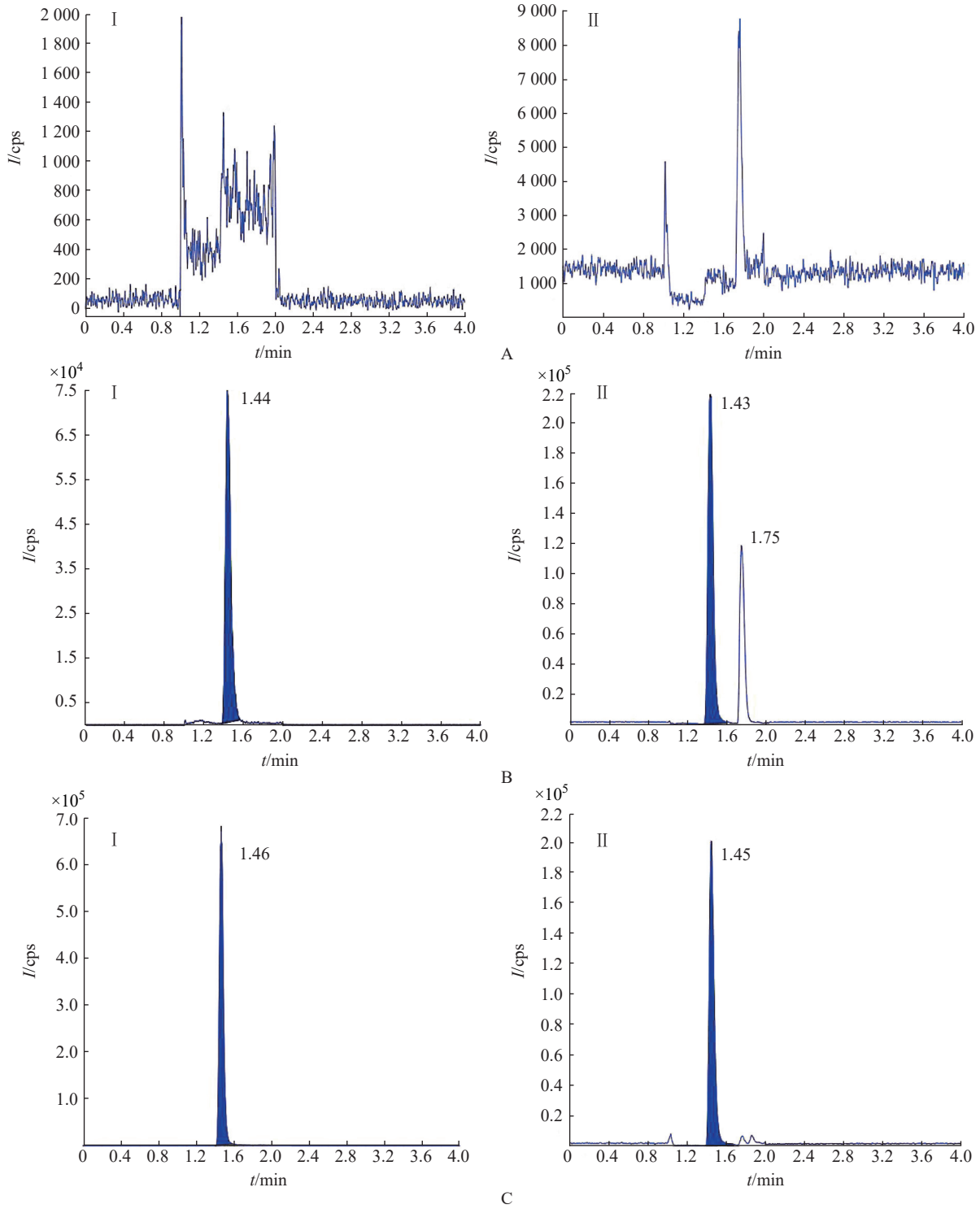
在所建立的LC-MS/MS条件下，**2**和**1**及**2**同位素和**1**同位素在气管支气管组织及肺组织中的特异性良好，无明显干扰峰，**2**和内标（**2**同位素）的保留时间均约为1.5 min，**1**和内标（**1**同位素）的保留时间均约为1.8 min。

2.5.2 标准曲线与定量限

分别取“**2.4**”项下气管支气管组织线性样品和肺组织线性样品，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测量，以待测物浓度（*c*）为横坐标、待测物与内标物的峰面积比值（*y*）为纵坐标，用加权最小二乘法进行线性回归，得标准曲线方程，以线性下限为LLOQ。结果显示，**2**在气管支气管组织和肺组织中的标准曲线方程分别为*y*=0.011 6*c*+0.007 5（*r*=0.999 1）和*y*=0.027 4c+0.002 1（*r*=0.998 8），线性范围分别为2～800和1～400 ng/g，LLOQ分别为2和1 ng/g；**1**在气管支气管组织和肺组织中的标准曲线方程分别为*y*=0.017 9c+0.005 7（*r*=0.997 9）和*y*=0.039 5c+0.002 9（*r*=0.998 0），线性范围分别为2～800和1～400 ng/g，LLOQ值也分别为2和1 ng/g。

2.5.3 精密度与准确度

分别取“**2.4**”项下气管支气管和肺组织的低、中、高浓度的QC样品和LLOQ样品，每个

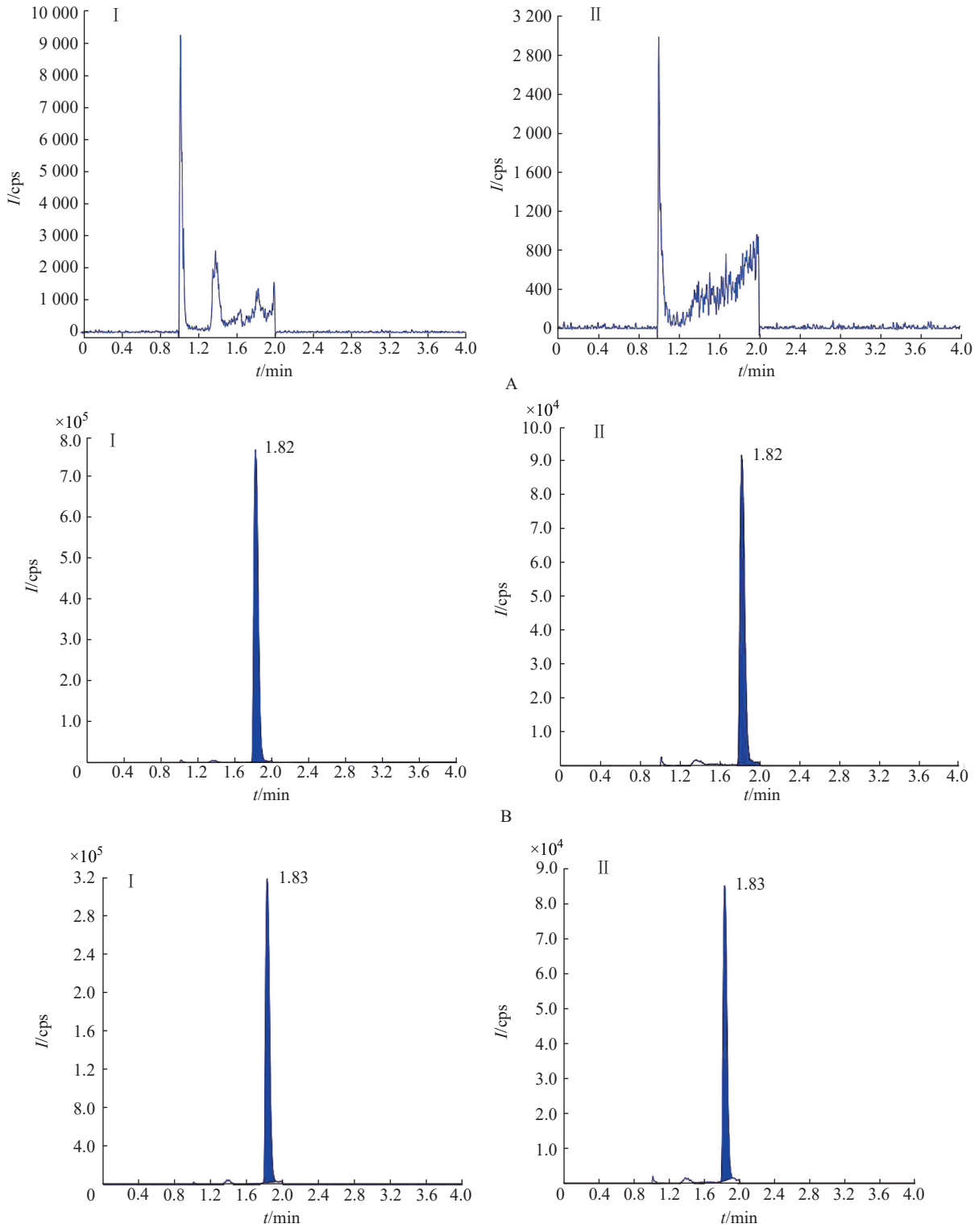


A—SD 大鼠空白气管支气管组织；B—400 ng/g **2** 气管支气管组织线性样品（图 B Ⅱ中，1.75 min 处色谱峰为基质中的干扰物质）；C—SD 大鼠雾化吸入 9.6 mg/kg 的 FB 30 min 后气管支气管样品。

Ⅰ—**2**；Ⅱ—同位素 **2**。

图 1　气管支气管组织样品中 2 的典型色谱图

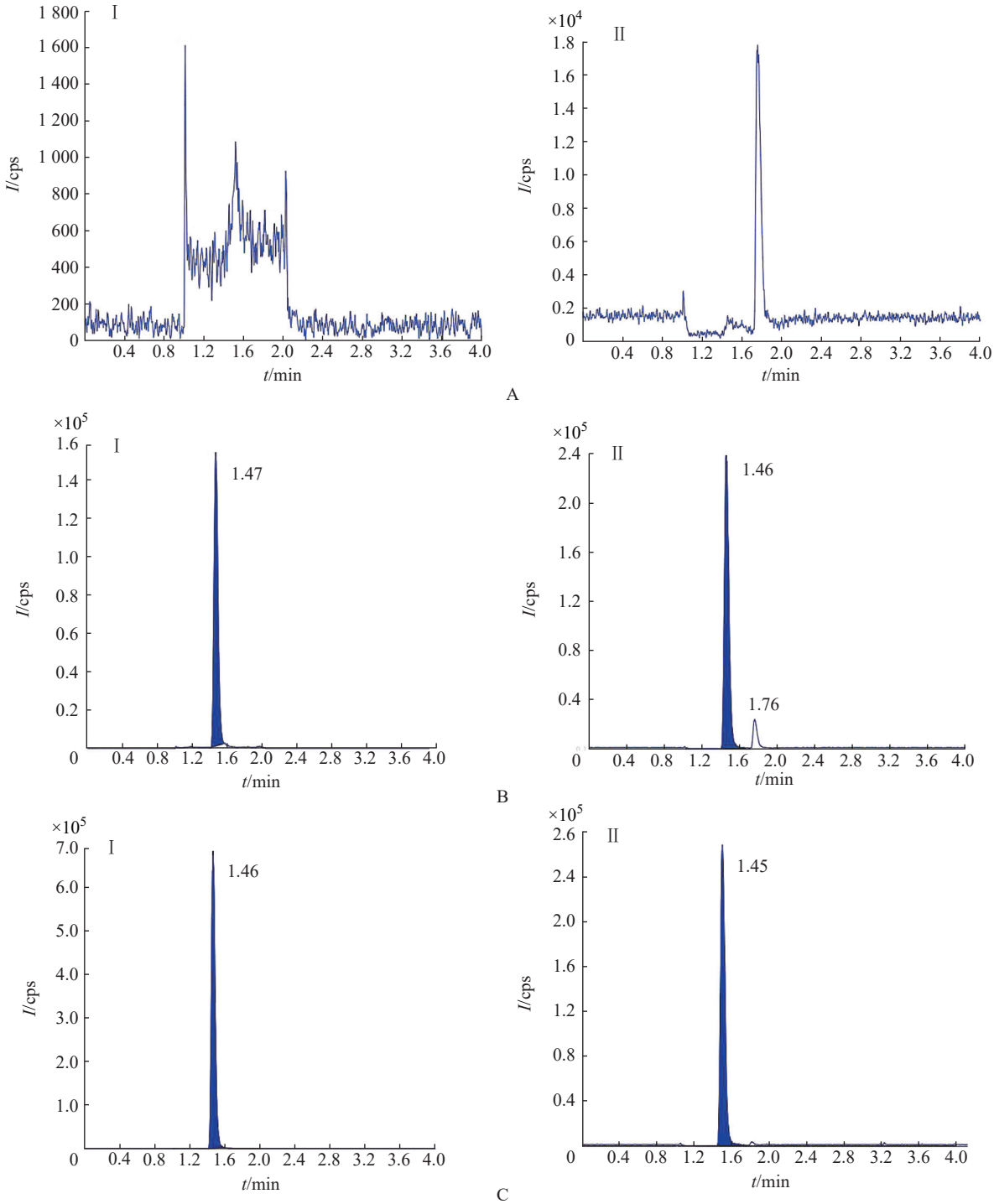
Fig.1　Typical Chromatograms of **2** in Tracheobronchial Samples



A—SD 大鼠空白气管支气管组织；B—400 ng/g **1** 气管支气管组织线性样品；
C—SD 大鼠雾化吸入 1.68 mg/kg 的 FB 30 min 后气管支气管样品。
Ⅰ—**1**；Ⅱ—同位素 **1**。

图 2　气管支气管组织样品中 1 的典型色谱图

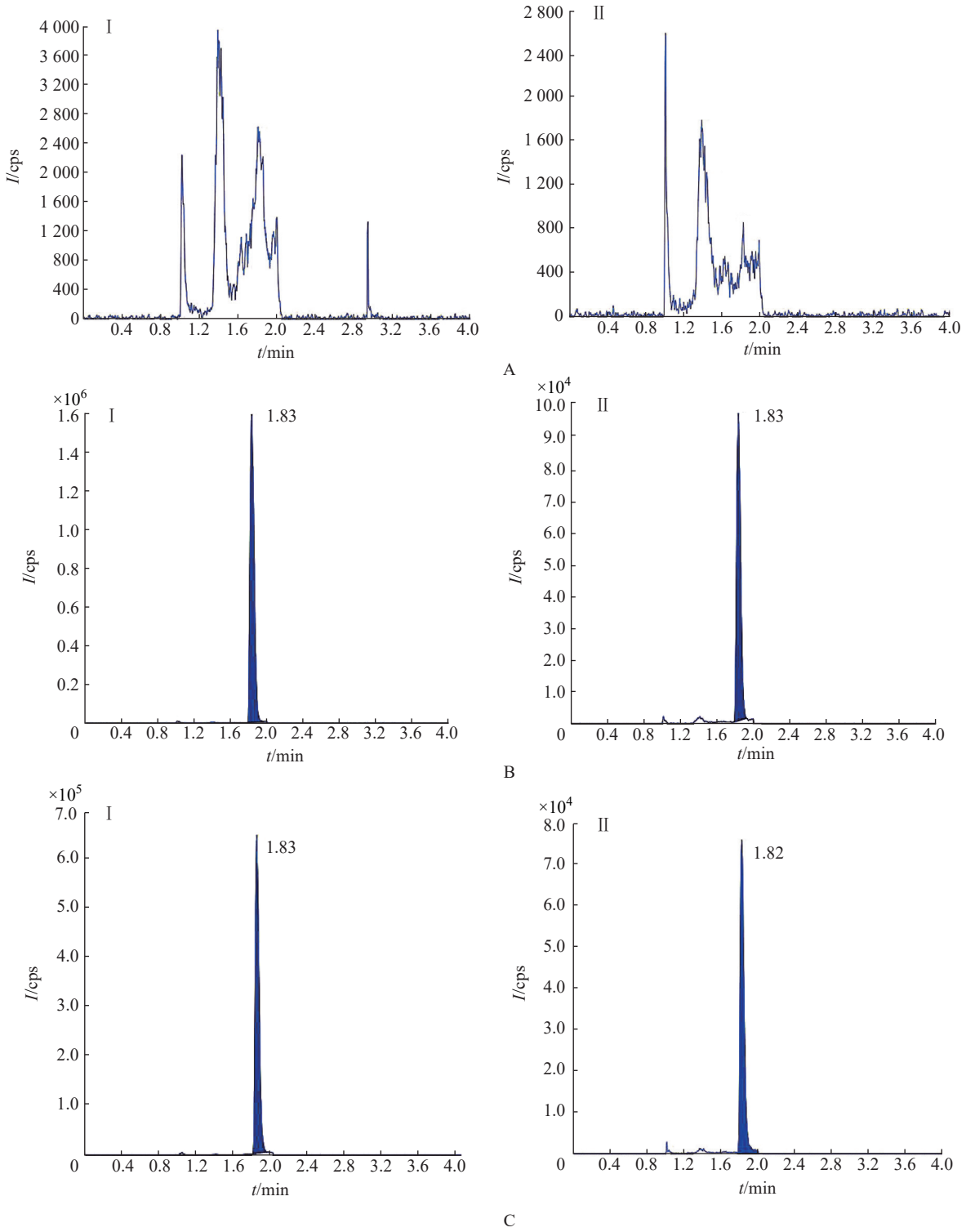
Fig.2　Typical Chromatograms of **1** in Tracheobronchial Samples



A—SD 大鼠空白肺组织；B—200 ng/g **2** 肺组织线性样品；C—SD 大鼠雾化吸入 9.6 mg/kg 的 FB 30 min 后肺组织样品。I—**2**；II— 同位素 **2**。

图 3　肺组织样品中 2 的典型色谱图

Fig.3　Typical Chromatograms of **2** in Lung Samples



A—SD 大鼠空白肺组织；B—200 ng/g **1** 肺组织线性样品；C—SD 大鼠雾化吸入 1.68 mg/kg 的 FB 30 min 后肺组织样品。I—**1**；II— 同位素 **1**。

图 4 肺组织样品中 1 的典型色谱图

Fig.4 Typical Chromatograms of **1** in Lung Samples

浓度平行制备 6 份，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测量，以“**2.5.2**”项下标准曲线方程计算实测浓度，采用 SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析。结果显示，**2** 在大鼠气管支气管和肺组织中日内 RSD 为 1.27%～8.66%，准确度为 92.65%～104.37%；日间 RSD 为 3.15%～12.96%，准确度为 96.82%～102.80%，满足生物样品定量分析要求；**1** 在大鼠气管支气管和肺组织中日内 RSD 为 1.44%～8.93%，准确度为 91.96%～105.22%；日间 RSD 为 2.51%～13.39%，准确度为 97.94%～104.06%，满足生物样品定量分析要求。

2.5.4 基质效应

分别取“**2.4**”项下的气管支气管和肺组织的溶液样品（Sol1、Sol2）和各自的匀浆基质样品（SAE1、SAE2），每个质量浓度平行配制 6 份，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测量。

结果显示，气管支气管和肺组织中 **2** 的基质效应分别为 97.51%～100.53%（RSD 为 1.49%～2.68%）和 104.35%～104.71%（RSD 为 3.60%～4.56%）；气管支气管和肺组织中 **1** 的基质效应分别为 98.88%～103.00%（RSD 为 2.08%～4.59%）和 99.37%～101.53%（RSD 为 3.53%～4.74%），均可接受。

2.5.5 稳定性

分别取“**2.4**”项下气管支气管和肺组织的低、中、高浓度 QC 样品，每种样品平行配制 3 份，在液相色谱仪的自动进样器中放置 24 h 后，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测量。结果显示，气管支气管组织及肺组织分析物在液相色谱仪的自动进样器中放置 24 h 内稳定性较好（表 1）。

2.5.6 提取回收率

取“**2.4**”项下气管支气管和肺组织 QC 样本、SAE 样品，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测量，按式①计算提取回收率（ER）。

$$ER=A_{BL}/A_{SAE}\times100\% \quad ①$$

式中：A_{BL} 为 QC 样品的色谱峰面积；A_{SAE} 为 SAE 样品色谱峰面积。

2 在气管支气管与肺组织中的 ER 为 84.92%～90.75%，RSD 为 1.93%～9.47%；**1** 在气管支气管与肺组织中的 ER 为 81.28%～86.56%，RSD 为 2.80%～8.85%，均可接受。

表 1　气管支气管和肺组织中 2 和 1 的稳定性数据（n=3）

Tab.1　Stability Data for **2** and **1** in Tracheobronchial and Lung Tissues (n=3)

组织	浓度/（ng·g^{-1}）	**2**准确度/%		**1**准确度/%	
		0 h	24 h	0 h	24 h
气管支气管	2	95.86±4.93	96.31±3.96	95.14±4.42	98.44±5.59
	6	108.37±9.85	110.96±9.23	103.59±6.15	106.16±2.48
	60	104.41±3.67	103.42±3.78	104.43±3.79	105.34±3.38
	600	97.46±3.86	96.27±3.69	98.85±4.29	99.62±4.75
肺	1	92.04±5.20	95.30±4.21	96.28±6.29	98.91±6.28
	3	99.55±4.79	96.44±6.23	104.58±4.98	105.23±4.59
	30	99.46±3.46	99.90±3.64	107.61±1.72	106.26±1.50
	300	101.01±2.59	99.37±1.23	109.18±3.00	109.67±3.60

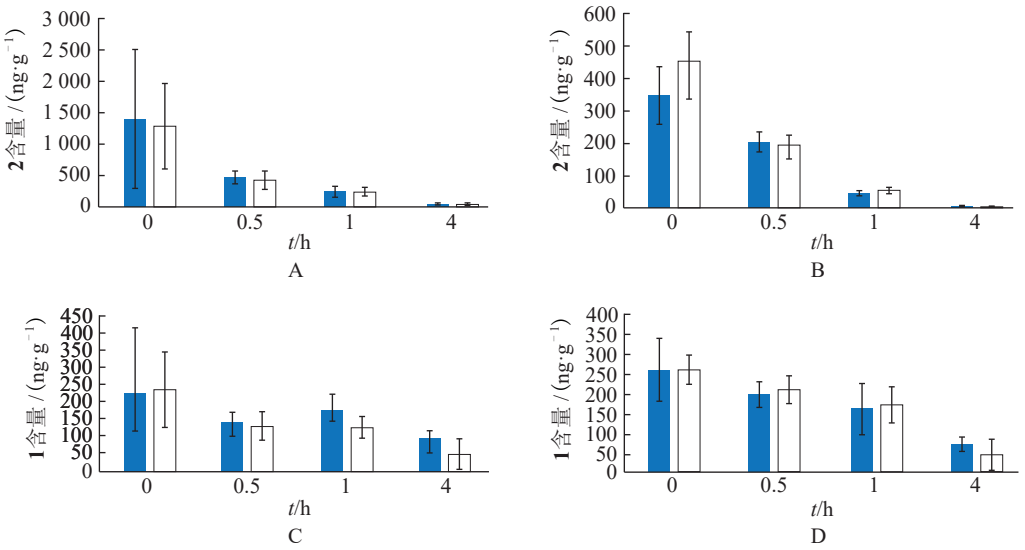
2.6 药物在气管支气管和肺组织中的分布

取“**2.3**”项下 FA 组气管支气管样品和肺组织样品，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，计算药物浓度。结果如图 5 所示，**2** 在气管支气管中的浓度高于肺组织（P<0.05）；**1** 在气管支气管与肺组织中的浓度无显著性差异（P>0.05）；与已上市药物（FB）相比，FA 给药后各时间点的大鼠气管支气管和肺组织样品中 **1**、**2** 的浓度无显著差异（P>0.05）。

3　结论

本研究建立了生物样本中 **2** 与 **1** 的 LC-MS/MS 分析方法，质谱检测采用电喷雾电离源，在流动相中加入 0.2%甲酸以促进样品电离。方法学验证结果表明，**1** 和 **2** 浓度为 2～800 ng/g 时，该方法可用于大鼠气管支气管中 **1** 和 **2** 的测量，**1** 和 **2** 浓度为 1～400 ng/g 时，该方法可用于大鼠肺组织中 **1** 和 **2** 的测量，方法的准确度、专属性、稳定性均满足方法学验证的相关要求。

将建立的 LC-MS/MS 分析方法用于研究吸入给予 FA 或 FB 的大鼠中 **1** 和 **2** 在气管支气管及肺组织分布，结果显示，FA 组小鼠和 FB 组小鼠 **1** 和 **2** 的组织分布无显著性差异（P>0.05），**2** 倾向于聚集在气管支气管中，**1** 在上述 2 种组织中的分布无明显差异，可为临床合理用药提供参考依据。



A—FA 组、FB 组气管支气管中 **2** 的含量；B—FA 组、FB 组肺组织中 **2** 的含量；C—FA 组、FB 组气管支气管中 **1** 的含量；D—FA 组、FB 组肺组织中 **1** 的含量。

■—FA组；□—FB组。

图 5　吸入给药后大鼠气管支气管和肺组织中 1 和 2 的含量（*n*=5）

Fig.5　Contents of **1** and **2** in Tracheobronchial and Lung Tissues of Rats after Aerosol Inhalation (*n*=5)

参考文献：

[1] MARKELIĆ I, HLAPČIĆ I, ČERI A, *et al*. Activation of NLRP3 inflammasome in stable chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Sci Rep*, 2022, **12**(1): 7544.

[2] 中青在线. 我国慢阻肺患者约1亿，知晓率仅10% [EB/OL]. https: //news. medlive. cn/pul/info-progress/show-141322_145. html.

[3] SZALONTAI K, GÉMES N, FURÁK J, *et al*. Chronic Obstructive pulmonary disease: epidemiology, biomarkers, and paving the way to lung cancer [J]. *J Clin Med*, 2021, **10**(13): 2889.

[4] LIBU C, OTELEA M R, ARGHIR I A, *et al*. Challenges in diagnosing occupational chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Medicina* (Kaunas), 2021, **57**(9): 911.

[5] QUAN Z Y, YAN G H, WANG Z G, *et al*. Current status and preventive strategies of chronic obstructive pulmonary disease in China: a literature review [J]. *J Thorac Dis*, 2021, **13**(6): 3865-3877.

[6] WU J W, DING C G, GE Q H, *et al*. Simultaneous determination of ipratropium and salbutamol in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2011, **879**(30): 3475-3483.

[7] ZHANG D J, TENG Y N, CHEN K G, *et al*. Determination of salbutamol in human plasma and urine using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and its pharmacokinetic study [J]. *Biomed Chromatogr*, 2012, **26**(10): 1176-1182.