

LC-MS/MS 法研究氨酚烷胺胶囊的人体药动学

徐晓峰¹, 陈 珺¹, 杭太俊¹, 宋 敏¹, 施宇翔², 杨 林²

(1. 中国药科大学药物分析室, 江苏 南京 210009; 2. 中国人民解放军第四军医大学临床药理研究所, 陕西 西安 710032)

Pharmacokinetics Study of Compound Paracetamol and Amantadine Capsules in Chinese Healthy Volunteers by LC-MS/MS

XU Xiao-feng¹, CHEN Jun¹, HANG Tai-jun¹, SONG Min¹,
SHI Yu-xiang², YANG Lin²

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2. Institute of Clinical Pharmacology, Fourth Military Medical University of PLA, Xi'an 710032, China)

Abstract: To establish an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of paracetamol, amantadine hydrochloride, caffeine, chlorphenamine maleate in human plasma and to evaluate their pharmacokinetics in 24 healthy male Chinese volunteers. A single oral dose of a compound paracetamol and amantadine test or reference capsule (each containing paracetamol 250 mg, amantadine hydrochloride 100 mg, caffeine 15 mg and chlorphenamine maleate 2 mg) was given to each volunteer according to an open-label randomized two-way cross-over study design. The concentrations of paracetamol, amantadine hydrochloride, caffeine and chlorphenamine maleate in plasma were simultaneously determined by a LC-ESI-MS/MS method with positive ion SRM detection using clenbuterol hydrochloride as internal standard. The pharmacokinetics was investigated. The method was proved to be accurate and sensitive.

Keywords: paracetamol; amantadine hydrochloride; chlorphenamine maleate; pharmacokinetics; LC-MS/MS

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2007) 增刊-74-03

氨酚烷胺胶囊为复方制剂, 每粒含对乙酰氨基酚 250 mg、盐酸金刚烷胺 100 mg、咖啡因 15 mg 和马来酸氯苯那敏 2 mg, 临床主要用于缓解普通感冒或流行性感引起之发热、头痛、咽痛、鼻塞、打喷嚏等症状。已有文献报道采用 HPLC 法测定人血浆中对乙酰氨基酚、咖啡因和马来酸氯苯那敏的浓度^[1-4], 采用 LC-MS/MS 法测定人血浆中盐酸金刚烷胺和马来酸氯苯那敏的浓度^[5]。尚未见 LC-MS/MS 法同时测定对乙酰氨基酚、盐酸金刚烷胺、咖啡因和马来酸氯苯那敏浓度的报道。本研究建立了液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 同时测定人血浆中对乙酰氨基酚、盐酸金刚烷胺、咖啡因和马来酸氯苯那敏浓度的方法, 并用于氨酚烷胺胶囊的人体药动学研究。

1 试验部分

1.1 色谱条件

Phenomenex Curosil-PFP 色谱柱; 流动相: 含 0.1% 甲酸的 0.2% 醋酸铵溶液 (pH 4.0)-甲醇-乙腈 (35:50:15); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 35 °C; 分流比 3:1; 进样 20 μL; 自动进样器温度 15 °C。

1.2 质谱条件

Finnigan Surveyor LC-TSQ Quantum Ultra AM LC-MS/MS 电喷雾离子源 (ESI); 正离子选择性反应监测 (SRM); 喷雾电压 5 000 V; 雾化气压 240 kPa; 离子吹扫气 3.4 kPa; 辅助气压力 28 kPa;

毛细管温度 350 °C; CID 碰撞气氦气压力 0.2 kPa。

对乙酰氨基酚、盐酸金刚烷胺、咖啡因、马来酸氯苯那敏和盐酸克仑特罗(内标)均采用 $[M+H]^+$ 离子进行选择反应监测,离子反应分别为: m/z 152@25 eV \rightarrow 110, m/z 152@20 eV \rightarrow 135, m/z 195@20 eV \rightarrow 138, m/z 275@16 eV \rightarrow 230 和 m/z 277@20 eV \rightarrow 203。

1.3 血浆样品处理方法

精密吸取血浆样品 0.5 mL,置于 10 mL 离心管中,精密加入内标溶液 100 μ L(浓度 500 μ g \cdot L $^{-1}$),涡旋混匀 30 s 后,加乙酸乙酯 5 mL,涡旋混匀 3 min, 3 500 r \cdot min $^{-1}$ 离心 5 min,分取上清液 4 mL,40 °C 水浴中以氮气吹干,残留物用 200 μ L 流动相涡旋溶解,16 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 5 min,取上清液 20 μ L 进行 LC-MS/MS 分析,按内标标准曲线法计算血浆样品中对乙酰氨基酚、盐酸金刚烷胺、咖啡因和马来酸氯苯那敏的浓度。

1.4 线性范围

精密制备对乙酰氨基酚、盐酸金刚烷胺、咖啡因和马来酸氯苯那敏浓度(C)分别为 8.0~8 000 μ g \cdot L $^{-1}$ 、0.80~800 μ g \cdot L $^{-1}$ 、40.0~2 000 μ g \cdot L $^{-1}$ 和 0.040~40.0 μ g \cdot L $^{-1}$ 的系列血浆样品,并照“血浆样品处理方法”项下方法处理测定,分别以四成分与内标(盐酸克仑特罗)的峰面积比(R)进行定量。

2 结果和讨论

空白血浆、受试者血浆样品测定结果示于图 1。结果表明内源性杂质不干扰对乙酰氨基酚(I)、盐酸金刚烷胺(II)、咖啡因(III)、马来酸氯苯那敏(VI)和内标(V)的测定。回收率均良好(80%~100%),血浆样本测定无明显基质效应。对四成分低、中、高三种不同浓度血浆样本进行测定精密度(RSD)和准确度(Diff)考察,一个分析批内测定多次,计算批内变异,不同分析批测定多次,计算批间变异,RSD 和 Diff 均 $<$ 15%。四成分血浆样品经过反复冻融 3 次,血浆室温放置 24 h,自动进样器中放置 24 h,长期冷冻保存 30 天均稳定($n=5$, RSD $<$ 10%)。运用上述方法进行了 24 名男性健康志愿受试者(年龄 (34 ± 3) 岁、身高 (170 ± 3) cm、体重 (63 ± 3) kg)单剂量口服 1 粒复方氨酚烷胺胶囊后的药动学研究,结果见表 1(略)。

3 结论

氯苯那敏由于服药剂量比较低,峰时血浆浓度仅为几纳克每毫升,需要灵敏的分析方法测定其血药浓度,文献中多采用 HPLC-UV 法,单个分析样品时间较长,定量下限仅为 0.75 μ g \cdot L $^{-1}$,达不到测定要求。另有文献报道采用 LC-APCI-MS/MS 法同时测定氯苯那敏和金刚烷胺的人体血药浓度,但试验结果表明,金刚烷胺和氯苯那敏均含有较强的碱性基团,极性较大,相对于 APCI 来说,以 ESI 方式进行离子化更适合。

串联质谱是一种通用型检测器,但特征性子离子的确定、程序段(segment)的设定等使其相较于其他检测方式而言,灵敏度更高、专属性更强、分析时间缩短、效率更高。本实验中:(1)在 CID 源内,对四成分各准分子离子(母离子)施加不同的碰撞能量,使各准分子离子进一步裂解成为特征性的子离子,以获得比一级质谱更优的选择性。对乙酰氨基酚和盐酸金刚烷胺的分子量相同,且色谱保留行为相近,若采用单级质谱会相互干扰而影响测定,采用串联质谱,则可以通过改变 CID 碰撞能量找到各自不同的特征性子离子峰而分别定量测定。(2)复方制剂中马来酸氯苯那敏含量较低,峰浓度仅达几纳克每毫升,本实验采用设置两程序段(segment)的方法,将对乙酰氨基酚、盐酸金刚烷胺、咖啡因和内标盐酸克仑特罗设置在一个程序段中,而设置另一个程序段单独测定马来酸氯苯那敏,这样可以更好的提高其灵敏度,达到测定要求。

本实验考察了不同的提取溶剂和碱化试剂,氯仿的提取效率较低,乙醚和甲基叔丁基醚提取效率高于氯仿但提取物杂质较多,采用氢氧化钠为碱化试剂时提取效率较低且重现性差,采用氨-氯化铵缓冲液(pH=10)为碱化试剂时盐酸金刚烷胺和马来酸氯苯那敏提取效率显著提高但对乙酰氨基

酚提取效率降低。故最后确定乙酸乙酯为提取溶剂不加碱化试剂时,四种药物的提取效率高,且重现性好,提取物中杂质较少。

本工作采用 LC-ESI-MS/MS 法同时测定受试者服用氨酚烷胺胶囊后不同时刻血浆中的对乙酰氨基酚、盐酸金刚烷胺、咖啡因和马来酸氯苯那敏浓度。样品处理简单易行、灵敏度高、选择性好,血浆中内源性杂质不干扰测定,6.5 min 便可将四者同时检出,大大提高了测试速度,缩短了分析周期,节约了血浆样品和实验成本,并成功用于氨酚烷胺胶囊中对乙酰氨基酚、盐酸金刚烷胺、咖啡因和马来酸氯苯那敏的生物等效性的同时评价。

氨酚烷胺胶囊临床用法与用量为:口服,一次 1 粒,一日 2 次(早晚各 1 次),最大剂量一日不宜超过 2 粒,连续服用不超过 10 天。这是因为马来酸氯苯那敏半衰期长,尽管剂量低,血浆药物浓度不高,但是连续多剂量服用会使药物在人体中蓄积,引起嗜睡、困倦、虚弱感、心悸等不良反应,提醒临床用药须要特别注意,避免长期或大剂量使用。

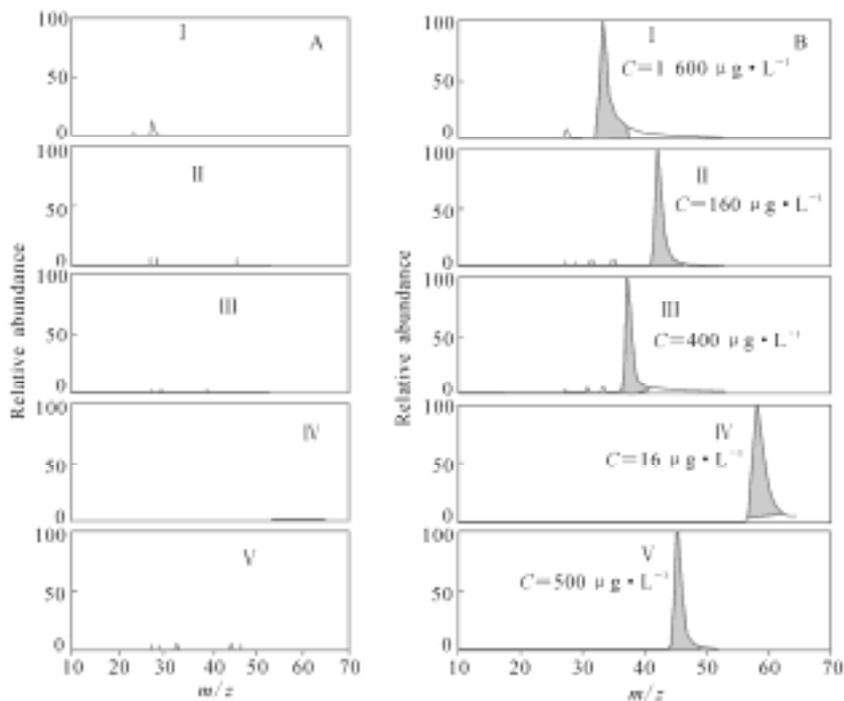


图 1 氨酚烷胺胶囊血浆样品 LC-MS/MS 测定图谱

A: 空白血浆; B: 空白血浆添加对乙酰氨基酚、盐酸金刚烷胺、咖啡因、马来酸氯苯那敏、盐酸克仑特罗

Fig.1 LC-MS/MS chromatograms for the determination of compound paracetamol and amantadine capsule in human plasma

参考文献:

- [1] 薛洪源, 杨汉煜, 胡玉钦, 等. 对乙酰氨基酚软胶囊与片剂的人体相对生物利用度研究[J]. 中国医药工业杂志, 2006, 37 (9): 621-623.
- [2] 薛洪源, 刘建芳, 刘会臣, 等. 高效液相色谱法同时测定人血浆中对乙酰氨基酚和咖啡因含量[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25 (8): 708-710.
- [3] 乔海灵, 田鑫, 郭玉忠, 等. 马来酸氯苯那敏片健康人体药动学和相对生物利用度[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10 (12): 1416-1419.
- [4] 谢敏, 贾琳静, 郜娜, 等. 高效液相色谱法测定人体内氯苯那敏血药浓度及药动学[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26 (10): 1205-1207.
- [5] 戴晓健, 陈笑艳, 张勇, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定人血浆中金刚烷胺和氯苯那敏[J]. 药物分析杂志, 2006, 26 (6): 713-717.