

采用正负离子切换 LC-MS/MS 法同时测定人血浆中 对乙酰氨基酚和水杨酸

戴晓健, 陈笑艳, 钟大放

(中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

Simultaneous Determination of Paracetamol and Salicylic Acid in Human Plasma Using Sequential Positive and Negative Ionization Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Detection

DAI Xiao-jian, CHEN Xiao-yan, ZHONG Da-fang

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: A rapid and sensitive liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for simultaneous determination of paracetamol and salicylic acid was developed and validated. After a simple protein precipitation using acetonitrile, the analytes and the internal standards were chromatographed on Ultimate™ XB-C₁₈ column. Detection was performed on a tandem spectrometry in multiple reaction monitoring (MRM). An atmospheric pressure chemical ionization interface was chosen to reduce ion suppression from sample matrix components and provide high sensitivity. Paracetamol is readily ionized under positive APCI conditions, while salicylic acid required negative APCI conditions to obtain adequate sensitivity. The method was linear in the concentration range of 0.025-10.0 mg·L⁻¹ for each analyte using 50 μL plasma. The method produced acceptable precision and accuracy over the standard curve range. The method was successfully employed in a bioavailability and bioequivalence study of benorilate after oral administration of a multi component formulation to healthy volunteers.

Keywords: paracetamol; salicylic acid; LC/MS/MS; pharmacokinetics study

中图分类号: O657.63

文献标识码: A

文章编号: 1004-2997 (2007) 增刊-63-03

复方贝敏伪麻胶囊主要成分为贝诺酯、盐酸伪麻黄碱和马来酸氯苯那敏, 该药用于缓解普通感冒或流行性感冒引起的发热、头痛、鼻塞、咽痛等症状, 也可用于流行性感冒的预防和治疗。其中贝诺酯在体内迅速水解生成对乙酰氨基酚和水杨酸, 本工作拟建立同时测定人血浆中贝诺酯体内水解产物对乙酰氨基酚和水杨酸的方法, 为贝敏伪麻胶囊中贝诺酯的人体生物利用度和生物等效性评价提供血浆药物浓度数据。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

API 4000 型三重四极杆串联质谱仪: 美国 Applied Biosystems 公司产品, 配备大气压化学电离源 (APCI 源) 及 Analyst 1.4.1 软件; 岛津高效液相色谱系统: 日本岛津公司产品, 配备 LC-20AD 型输液泵及 SIL-HT_A 型自动进样器。

作者简介: 戴晓健 (1978~), 女 (汉), 河南辉县人, 硕士, 药代动力学研究。E-mail: daixj2006@yahoo.com.cn

通讯作者: 钟大放 (1957~), 男 (汉), 吉林长春人, 研究员, 药代动力学研究。E-mail: dfzhong@mail.shnc.ac.cn

1.2 主要材料与试剂

对乙酰氨基酚、水杨酸和萘普生对照品：购自中国药品生物制品检定所；盐酸氨溴索对照品：江苏豪森药业股份有限公司提供；甲醇和乙腈：色谱纯，德国 Sigma 公司产品；甲酸：色谱纯，美国 Tedia 公司产品。

1.3 试验条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱：Ultimate™ XB-C₁₈ 柱（150×4.6 mm×5 μm, Welch Materials, Ellicott, MD, USA）；流动相 *V*（乙腈）：*V*（水）：*V*（甲酸）=70:30:0.1；流速 0.6 mL·min⁻¹；进样量 20 μL。

1.3.2 质谱条件 离子源为大气压化学电离源（APCI 源），采用正、负离子切换分别检测对乙酰氨基酚和水杨酸。对乙酰氨基酚质谱条件：电晕放电电流为 3.0 μA；温度为 400 °C；离子源气体 1（N₂）压力为 344.5 kPa；离子源气体 2（N₂）压力为 344.5 kPa；气帘气体（N₂）压力为 68.9 kPa；碰撞气体（N₂）压力为 27.56 kPa；正离子方式检测；去簇电压（DP）均为 40 V；扫描方式为多反应监测（MRM），碰撞能量（CE）均为 25 eV；用于定量分析的离子反应分别为 *m/z* 152→*m/z* 110（对乙酰氨基酚）和 *m/z* 379→*m/z* 264（内标氨溴索），扫描时间为 0.2 s。

水杨酸质谱条件：电晕放电电流为-3.0 μA；温度为 400 °C；离子源气体 1（N₂）压力为 344.5 kPa；离子源气体 2（N₂）压力为 344.5 kPa；气帘气体（N₂）压力为 68.9 kPa；碰撞气体（N₂）压力为 27.56 kPa；负离子方式检测；去簇电压（DP）均为-40 V；扫描方式为多反应监测（MRM），碰撞能量（CE）分别为-25 eV（水杨酸）和-10 eV（内标萘普生）；用于定量分析的离子反应分别为 *m/z* 137→*m/z* 93（水杨酸）和 *m/z* 229→*m/z* 185（内标萘普生），扫描时间 0.2 s。待测物及其内标的二级全扫描质谱图示于图 1。

1.4 血浆样品预处理

向 50 μL 血浆中分别加入 50 μL 甲醇、25 μL 内标氨溴索溶液、25 μL 内标萘普生溶液，加入 100 μL 乙腈沉淀蛋白，涡流混匀；离心 5 min（11 000 r·min⁻¹），分取 50 μL 上清液于 10 mL 带塞试管中，40 °C 空气流下吹干，残渣溶于 200 μL 流动相中，吸取 20 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

2 结果和讨论

要实现二者的同时测定分析，必须对二者进行色谱分离，且保留时间的间隔满足正负离子切换所需要的时间。分别为对乙酰氨基酚和水杨酸选择各自的内标，分别用于正负离子检测，所选内标必须和待测物保留时间接近。

在测试过程中发现，当采用 Zorbax XDB-C₁₈ 色谱柱进行分离时，受试者血浆中在对乙酰氨基酚色谱峰位置出现干扰峰，此干扰峰为对乙酰氨基酚葡萄糖醛酸或硫酸酯结合物在 APCI 源下发生裂解而产生的，通过尝试不同的色谱柱，在不增加单个样品分析时间的情况下，采用 Ultimate™ XB-C₁₈ 对二者实现色谱分离后对乙酰氨基酚进行定量。

本工作建立了一种快速灵敏的液相色谱-串联质谱法，采用正负离子切换分别测定人血浆中的对乙酰氨基酚和水杨酸。该法测定对乙酰氨基酚和水杨酸的线性范围均为 0.025~10.0 mg·L⁻¹，最低定量浓度均为 0.025 mg·L⁻¹。以质控样品（QC）计算，对乙酰氨基酚的日内精密度（RSD）为 4.7%~5.9%，日间精密度为 7.3%~11.1%，准确度（RE）为-5.7%~1.0%；水杨酸的日内精密度（RSD）为 5.3%~6.2%，日间精密度为 4.2%~13.8%，准确度（RE）为 0.05%~5.7%。该方法成功用于贝诺酯的人体药物动力学研究。受试者口服含 300 mg 贝诺酯的复方制剂后平均血浆药物浓度时间曲线示于图 2。

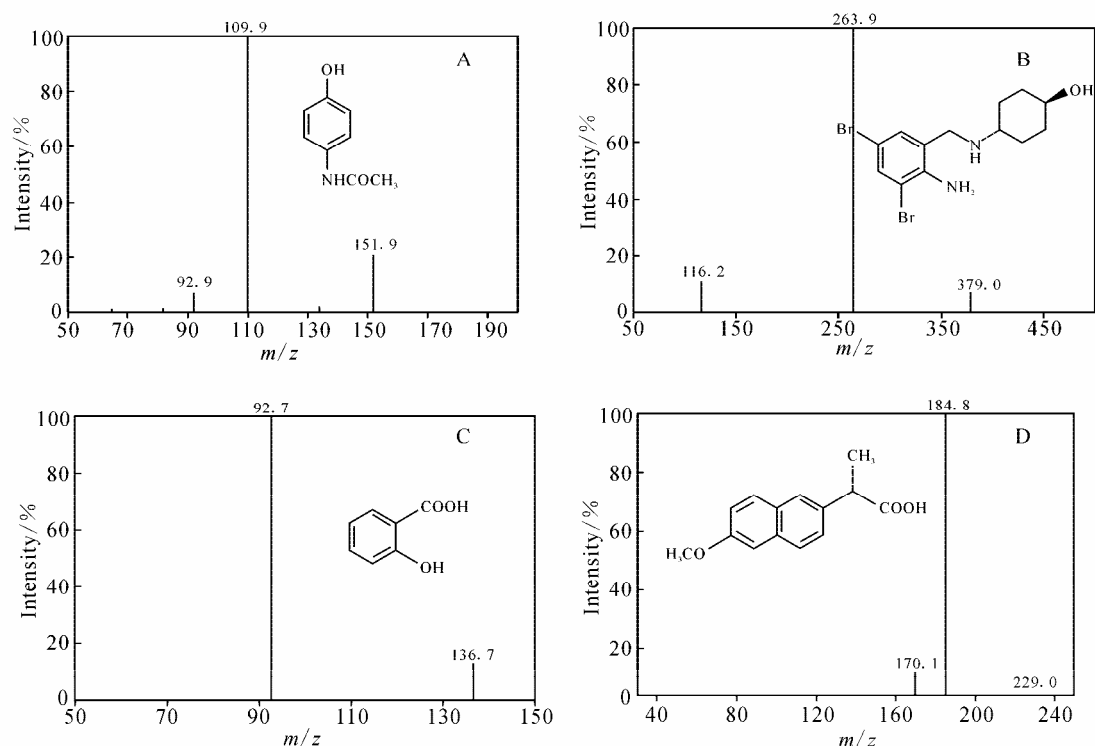


图 1 对乙酰氨基酚和水杨酸及其各自内标的二级全扫描质谱图

A: 对乙酰氨基酚; B: 氨溴索; C: 水杨酸; D: 萘普生

Fig.1 Product ion spectra of (A) paracetamol, (B) ambroxol, (C) salicylic acid and (D) naproxen

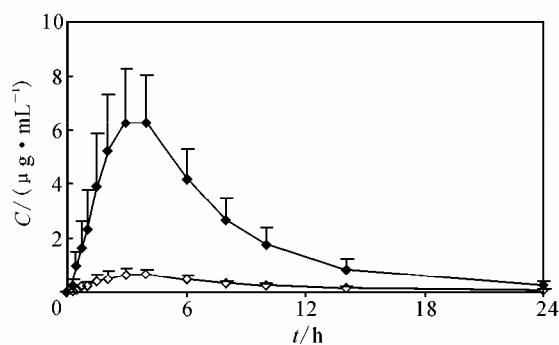


图 2 受试者口服含 300 mg 贝诺酯的复方制剂后对乙酰氨基酚和水杨酸平均血浆药物浓度时间曲线

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curve of paracetamol and salicylic acid after a single oral administration of a multi component formulation containing 300 mg benorilate ($n = 22$)