

[5] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求 (暂行)[J]. 中国药品标准, 2000, 1(4): 3-7.  
 [6] 宋丽艳, 叶斌, 于荣敏, 等. 人工蛹虫草核苷类成分的超声提取

工艺优化研究[J]. 中药材, 2007, 30(9): 1156-1157.

[收稿日期] 2008-08-02

## 高效液相色谱串联质谱法测定人血浆中美金刚浓度

曲婷婷<sup>1</sup>, 刘晓燕<sup>1</sup>, 王本杰<sup>2</sup>, 袁桂艳<sup>2</sup>, 张蕊<sup>2</sup>, 魏春敏<sup>2</sup>, 郭瑞臣<sup>2</sup> (1. 山东大学药学院, 山东 济南 250012; 2. 山东大学齐鲁医院临床药理研究所, 山东 济南 250012)

**[摘要]** 目的: 建立测定人血浆中美金刚浓度的高效液相色谱串联质谱法, 以用于美金刚人体药动力学研究。方法: Ultimate XB-C<sub>18</sub> 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱, 甲醇-0.5% 甲酸(70:30) 为流动相, 流速为 0.5 mL·min<sup>-1</sup>; 电喷雾电离正离子模式, 选择性监测质荷比(M/Z) 为 180<sup>+</sup>163(美金刚) 和 152<sup>+</sup>135(金刚烷胺, 内标); 血浆样本经醋酸乙酯提取后进行分析。结果: 血浆中美金刚质量浓度在 0.2~100 μg·L<sup>-1</sup> 范围内线性关系良好, 最低定量限达 0.2 μg·L<sup>-1</sup>; 日内、日间精密度 RSD 小于 7, 血浆样本经冷冻和冻融后均稳定。结论: 此方法灵敏、专一、快速、简便, 适用于盐酸美金刚胶囊人体药动力学研究。

**[关键词]** 高效液相色谱串联质谱法; HPLC-MS/MS; 美金刚; 金刚烷胺; 药动学

[中图分类号] R969 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2009)07-0549-03

## Development of memantine in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry

QU Ting-ting<sup>1</sup>, LIU Xiao-yan<sup>1</sup>, WANG Ben-jie<sup>2</sup>, YUAN Gui-yan<sup>2</sup>, ZHANG Rui<sup>2</sup>, WEI Chun-min<sup>2</sup>, GUO Rui-chen<sup>2</sup> (1. Pharmacy College of Shandong University, Shandong Jinan 250012, China; 2. Institute of Clinical Pharmacology, Qilu Hospital of Shandong University, Shandong Jinan 250012, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To validate a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for the determination of memantine in human plasma. **METHODS** The analyte was separated on a Ultimate XB-C<sub>18</sub> column(150 mm 4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase of methanol and water containing 0.5% formic acid (70:30) at a flow rate of 0.5 mL·min<sup>-1</sup>. The multiple reaction monitoring (MRM) mode was used for analyte quantification, and the precursor-to-product ion transition of m/z 180<sup>+</sup>163 (memantine) and 152<sup>+</sup>135 (amantadine, IS) were selected, respectively. The plasma sample was liquid-liquid extracted by ethyl acetate. **RESULTS** The weighted (1/x<sup>2</sup>) calibration curve was linear in the 0.2-100.0 μg·L<sup>-1</sup> range for memantine, and the low limit of quantification was 0.2 μg·L<sup>-1</sup>. The inter- and intra-day precisions (RSD) were <7. Plasma samples were stable under frozen and freeze-thaw conditions. **CONCLUSION** The developed LC/MS/MS method was selective, sensitive and simple, and was successfully applied to the pharmacokinetic study of memantine after oral administration to Chinese healthy volunteers.

**KEY WORDS:** liquid chromatography tandem mass spectrometry; HPLC-MS/MS; memantine; amantadine; pharmacokinetics

美金刚(memantine) 化学名 1-氨基-3,5-二甲基哌啶, 是一种中等亲和力、非竞争性的 NMDA 受体拮抗剂<sup>[1,2]</sup>, 临床上广泛用于治疗阿尔茨海默症<sup>[3]</sup>。已有报道用高效液相-紫外或荧光检测法测定动物或人血浆中美金刚浓度<sup>[4,6]</sup>, 但最低定量限较高, 不能满足人体药动力学研究, 而且荧光检测法需要将待测物衍生化, 操作繁琐; GC-MS 法<sup>[7]</sup> 测定人血浆中美金刚同样也需要衍生化, 不适宜大量生物样本的快速分析。而用 HPLC-MS/MS 法测定人血浆或其他基质中美金刚的浓度<sup>[8,9]</sup>, 不仅专一性强, 而

且分析速度快, 适于人体药动力学的研究。本实验建立了快速、专一、灵敏地测定人血浆中美金刚浓度的方法, 并应用于盐酸美金刚胶囊人体药动力学研究。

### 1 材料

Agilent 6410 Triple Quad LC/MS/MS, 包括 1200series HPLC, Hip-ALS SL 进样器和 DAD SL 检测器(美国安捷伦科学技术公司); 盐酸美金刚对照品(批号 070801)、美金刚胶囊(10 mg/ 胶囊, 批号 071001) 均由上海复旦复华药业有限公司提供; 内标金刚烷胺对照品(内标, IS, 东北制药总厂, 批号

[作者简介] 曲婷婷, 女, 硕士研究生, 电话: 0531-82969636, E-mail: qutt0612@163.com [通讯作者] 郭瑞臣, 男, 教授, 博士生导师, 电话: 0531-82169636, E-mail: grc7636@126.com

2004182B); 甲醇和醋酸乙酯均为色谱纯; 水为纯化水, 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱质谱条件

**2.1.1 色谱条件** 色谱柱: Ultimate XB- $C_{18}$  柱 (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m), 柱温: 25  $^{\circ}$ C; 流动相: 甲醇-0.5% 甲酸(70:30); 流速: 0.5 mL  $\cdot$  min $^{-1}$ , 进样量: 10  $\mu$ L。

**2.1.2 质谱条件** ESI 离子源, 正离子模式, 雾化压力 35 psi, 干燥气( $N_2$ ) 流速: 8 L  $\cdot$  min $^{-1}$ , 干燥气温度: 350  $^{\circ}$ C, 毛细管电压: 4 000 V, 多级反应监测(MRM)方式监测  $m/z$  180 $\rightarrow$ 163(美金刚),  $m/z$  152 $\rightarrow$ 135(IS), 碰撞能为 18 V(美金刚)和 20 V(IS), 碎片电压均为 120 V。

**2.2 对照品和内标溶液的配制** 分别精密称取盐酸美金刚对照品 0.012 1 g 和盐酸金刚烷胺对照品 0.012 6 g, 并分别用水溶解定容至 10 mL, 得 1 g  $\cdot$  L $^{-1}$  的两种储备液; 分别精密量取两种储备液适量, 用流动相稀释得 1 000, 100, 10  $\mu$ g  $\cdot$  L $^{-1}$  系列标准工作液和 100  $\mu$ g  $\cdot$  L $^{-1}$  内标液, 所有溶液均置 4  $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

**2.3 血浆样品的处理** 精密吸取 0.5 mL 血浆置离心管中, 加入 40  $\mu$ L 内标液, 涡旋 30 s 混匀, 加入 1 mol  $\cdot$  L $^{-1}$  氢氧化钠溶液 25  $\mu$ L, 涡旋 30 s 混匀, 加入 3.5 mL 醋酸乙酯, 涡旋 2 min 混匀, 5 000 r  $\cdot$  min $^{-1}$  离心 5 min, 取上清 3 mL, 40  $^{\circ}$ C 水浴氮气吹干。残渣用 100  $\mu$ L 流动相复溶, 10  $\mu$ L 进样。

**2.4 色谱质谱行为** 将美金刚和内标标准溶液直接进质谱分析得的全扫描质谱图和二级质谱图见图 1。血浆中美金刚和内标峰形良好, 无杂质干扰, 保留时间分别为 3.4 min 和 2.9 min, 方法专属性好, 见图 2。

**2.5 标准曲线的制备** 分别取美金刚标准工作液适量, 用空白血浆配成质量浓度为 0.2, 0.5, 2.0, 5.0, 10.0, 40.0, 80.0, 100.0  $\mu$ g  $\cdot$  L $^{-1}$  的血浆样本, 按“2.3”项下血浆样本处理方法提取处理, 并进行 LG-MS/MS 分析, 以美金刚浓度和内标浓度比为横坐标, 面积比为纵坐标, 用加权( $W = 1/x^2$ ) 最小二乘法进行线性, 回归方程:  $Y = 0.016 6 + 0.859 X$ ,  $r = 0.995 9$ 。结果表明: 美金刚血浆在 0.2~100.0  $\mu$ g  $\cdot$  L $^{-1}$  范围内线性关系良好。本法的最低定量限达 0.2  $\mu$ g  $\cdot$  L $^{-1}$ 。

**2.6 回收率和精密度试验** 按“标准曲线的制备”方法分别配制 0.5, 5.0, 80.0  $\mu$ g  $\cdot$  L $^{-1}$  的美金刚血浆

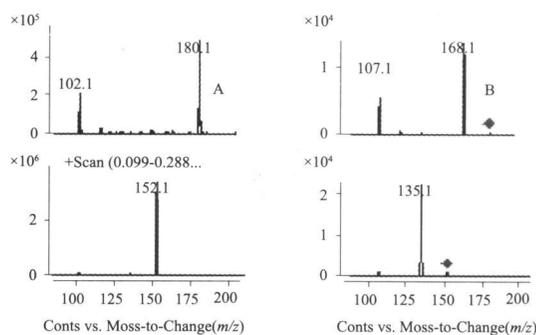


图 1 美金刚和内标的质谱图

A. 美金刚和内标一级质谱图; B. 美金刚和内标二级质谱图

Fig 1 Mass spectra

A. full scan spectrum; B. product ion spectrum

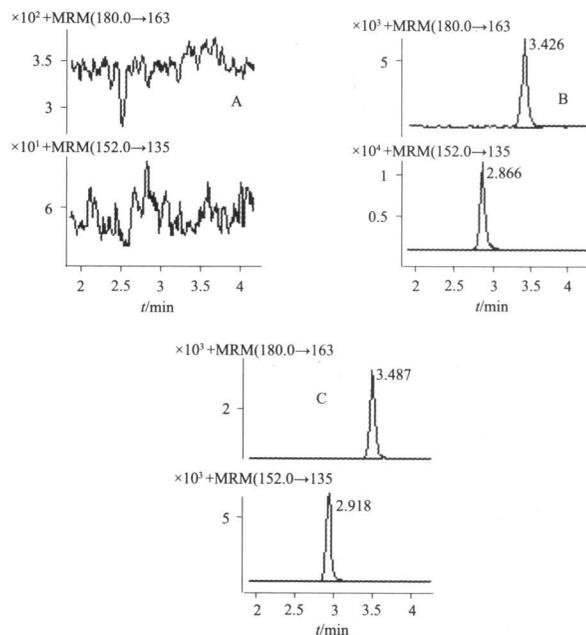


图 2 美金刚色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆加美金刚和内标; C. 志愿者血浆;

Fig 1 MRM chromatograms

A. blank plasma; B. plasma spiked with memantine and IS; C. plasma from a volunteer

样品, 每个浓度 5 份, 按“2.3”项处理后进样分析, 同时测定相应浓度的标准溶液; 以测得血浆样本面积和标准溶液面积之比计算提取回收率, 平均提取回收率为 48.87%; 以测得血浆样本浓度与相应标准溶液的浓度比值计算相对回收率, 平均相对回收率为 100.61%; 将低、中、高浓度血浆样本 1 d 内测定 5 份, 连续测定 3 d, 分别考察方法的日内和日间精密度, 结果 RSD 均小于 7%, 精密度良好。

**2.7 样品稳定性试验** 按“标准曲线的制备”方法分别配制 0.5, 5.0, 80.0  $\mu$ g  $\cdot$  L $^{-1}$  的血浆样本, 每个浓度取 5 份, 分别在下列条件下放置以考察样本短期、长期和冻融稳定性: 室温 24 h, 冷冻 1, 7, 21 d, 冻融 1 次、2 次和 3 次。结果 RSD 均小于 6%, 方法稳定性良好。

2.8 质控样本 按“2.5”项下方法分别配制 0.5, 5.0, 80.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的质控样本; 在志愿者样品测定过程中, 随行测定质控样品, 使其均匀分布在志愿者样品测试顺序中。结果 RSD 均在  $\pm 10\%$  之内, 说明测定结果可靠。

### 2.9 药动学试验

2.9.1 试验设计 男性健康志愿者 10 名, 年龄 (22.7  $\pm$  2.4) 岁, 体质量 (61.2  $\pm$  7.6) kg, 身高 (170.0  $\pm$  6.6) cm, 血、尿常规及肝、肾功能检查正常; 试验方案经山东大学齐鲁医院伦理委员会批准。志愿者于试验前签署知情同意书, 并于前一日晚入住 I 期病房, 禁食过夜, 于次日早晨 7:00, 空腹口服 15 mg 盐酸美金刚胶囊, 200 mL 温开水送服, 服药后 2 h 后方能饮水, 4 h 后进统一标准餐。于给药前和给药后 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 48, 96, 144, 240 h 肘静脉取血 4 mL, 立即移入加有肝素的塑料试管中, 5 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 取血浆于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。

2.9.2 试验结果 采用前述 HPLC-MS/MS 法测定志愿者血浆样本, 美金刚血药浓度-时间曲线见图 3。10 名志愿者美金刚血药浓度-时间数据经 DAS 2.0 拟合符合二室模型。主要药动学参数:  $t_{\text{max}}$  为 (4.9  $\pm$  1.1) h,  $C_{\text{max}}$  为 (16.5  $\pm$  2.8)  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , A 为 (25.5  $\pm$  38.2),  $\alpha$  为 (0.11  $\pm$  0.10), B 为 (14.7  $\pm$  16.1),  $\beta$  为 (0.013  $\pm$  0.003),  $t_{1/2\alpha}$  为 (20.6  $\pm$  18.3) h,  $t_{1/2\beta}$  为 (55.2  $\pm$  12.8) h,  $\text{AUC}_{0-240}$  为 (1 101.6  $\pm$  264.1)  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$ ,  $CL$  为 (13.8  $\pm$  3.2)  $\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}$ ,  $V$  为 (999.2  $\pm$  243.5)  $\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

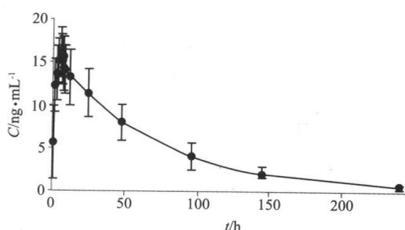


图 3 10 名志愿者口服 15mg 盐酸美金刚胶囊后平均血药浓度-时间曲线

Fig 3 Mean plasma concentration-time profile of memantine after administration of 15mg memantine hydrochloride capsules

### 3 讨论

经比较美金刚在正离子检测模式下响应较好; 不同厂家的色谱柱得到的色谱峰不同, 试用了 Diamonsil 和 Zorbax 的  $\text{C}_{18}$  色谱柱, 但峰都较宽且拖

尾, 最后选择 Ultimate XB- $\text{C}_{18}$  柱, 峰形好; 流动相中添加甲酸可增加质谱响应强度, 提高方法的灵敏度。

实验中尝试了不同的血浆样本提取方法, 结果直接沉淀蛋白法回收率太低, 而用氯仿、二氯甲烷、乙醚或其混和溶剂进行液液萃取时均存在杂质干扰, 用醋酸乙酯处理血浆样品无杂质干扰和基质效应, 且与文献报道方法相比, 既避免了提取过程中乙醚易挥发不易定量的缺点, 同时使用单一萃取液也比较方便。所建立的色谱-质谱条件专属性强, 灵敏度高。同时分析速度快, 适于测定大量人血浆样本。

由于美金刚半衰期长, 取血时间达 240 h, 因此必须考察血浆样本的长期稳定性, 本法考察了血浆样本  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  冷冻 21 d 和冻融 3 次的稳定性, 结果显示血浆样本在冷冻和冻融条件下均稳定; 本法最低定量限可达  $0.2\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 能满足人体药动学研究。

#### 参考文献:

- [1] Sonkusare SK, Kaul CL, Ramarao P. Dementia of alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders memantine, a new hope[J]. Pharmacol Res, 2005, 51: 4-17.
- [2] Johnson JW, Kotermanski SE. Mechanism of action of memantine[J]. Curr Opin Pharmacol, 2006, 6: 61-67.
- [3] 郭芳芳, 朱珠. 治疗阿尔茨海默病新药-美金刚[J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(23): 1837-1838.
- [4] Suckow RF, Zhang MF, Collins ED, et al. Sensitive and selective liquid chromatographic assay of memantine in plasma with fluorescence detection after pre-column derivatization[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1999, 729: 217-224.
- [5] Duh TH, Wu HL, Pan CW, et al. Fluorimetric liquid chromatographic analysis of amantadine in urine and pharmaceutical formulation[J]. J Chromatogr A, 2005, 1088: 175-181.
- [6] Shuangjin C, Fang F, Han L, et al. New method for high-performance liquid chromatographic determination of amantadine and its analogues in rat plasma[J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 44: 1100-1105.
- [7] Leis HJ, Fauler G, Win dischhofer W. Quantitative analysis of memantine in human plasma by gas chromatography/negative ion chemical ionization/mass spectrometry[J]. J Mass Spectrom, 2003, 7: 477-480.
- [8] Almeida AA, Campos DR, Bernasconi G, et al. Determination of memantine in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry: application to a bioequivalence study[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007, 848: 314-316.
- [9] Koeberle MJ, Hughes PM, Wilson CG, et al. Development of a liquid chromatography-mass spectrometric method for measuring the binding of memantine to different melanins[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003, 787: 313-322.

[收稿日期] 2008-10-20