

文章编号: (2009)03-0135-08

人血浆中多潘立酮的含量测定及药物动力学考察

刘茜, 郑小楠, 王茜, 李贺, 李力, 宋洪涛

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: **目的** 建立测定人血浆中多潘立酮的液相色谱-串联质谱法(LC-MS-MS), 并将其应用于健康人体的药物动力学研究, 为临床用药提供依据。**方法** 20名健康男性受试者单剂量口服多潘立酮10 mg后, 以氨溴索为内标物, 进行LC-MS-MS法测定。色谱柱为XTerra[®]MS C₁₈柱, 流动相为甲醇-水-甲酸(体积比95:5:0.05), 流速为100 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; 质谱条件为电喷雾离子源, 正离子方式多反应扫描, 离子选择通道分别为 m/z 426.4 \rightarrow m/z 175.0(多潘立酮)和 m/z 379.0 \rightarrow m/z 264.0(氨溴索)。**结果** 多潘立酮测定方法的线性范围为0.5~50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 日内和日间精密度(RSD)均小于13.5%。多潘立酮片在中国健康受试者体内呈二室模型特征, 主要药物动力学参数 t_{max} 为(0.75 \pm 0.24)h, ρ_{max} 为(17.0 \pm 4.83) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $t_{1/2}$ 为(9.78 \pm 4.66)h, AUC_{0-4} 为(105 \pm 28.6) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ 为(121 \pm 45.9) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ 。**结论** 本法适用于多潘立酮的人体药物动力学研究。

关键词: 药剂学; 药物动力学; 液相色谱-串联质谱法; 多潘立酮; 血浆浓度

中图分类号: R 97 **文献标志码:** A

多潘立酮(domperidone)是一种合成的苯并咪唑类衍生物, 为具有抗呕吐作用的强效外周性多巴胺受体拮抗剂, 主要作用于血脑屏障外的化学受体触发区, 发挥胃动力效应。临床用于胃轻瘫及功能性消化不良, 反流性胃、食管疾病, 消化性溃疡及各种原因引起的恶心、呕吐等, 具有口服吸收迅速、半衰期长、耐受性好, 不良反应少等特点^[1]。由于口服药物剂量低, 且存在肝肠首过代谢效应, 多潘立酮的血药浓度测定要求灵敏度较高。本实验在参考文献[2-7]基础上建立了一个灵敏、准确、方便可行的液相色谱-串联质谱法(LC-MS-MS)用于测定人血浆样品中多潘立酮的质量浓度, 并对健康男性受试者单剂量口服多潘立酮的药物动力学特性进行考察, 力求为临床用药提供依据。

1 仪器与材料

Agilent 1100液相系统(包括G1311A四元输液泵、G1313A自动进样器、G1316A柱温箱和G1379A脱气机, 美国安捷伦公司), API2000三重四极杆串联质谱仪(电喷雾离子源, 美国Applied Biosystems公司), Analyst 1.4.1软件(美国Applied Biosystems公司), BS 124S Sartorius电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), TGL-16G离心沉淀机(上海安亭科学仪器厂), Vortex-Genie2漩涡混合器(美国思伯明仪器有限公司), DAS2.0统计计算软件(中国药理学会数学药理专业委员会)。

多潘立酮片(受试制剂, 规格10 mg, 批号060802, 山西鑫煜制药有限公司), 多潘立酮对照品(含量质量分数95.2%, 山西鑫煜制药有限公司), 氨溴索对照品(含量质量分数99.2%, 山西鑫煜制药有限公司), 甲醇、甲酸(色谱纯, 北京迪马公司), 乙醚(色谱纯, 天津康科德科技有限公司), 碳酸钠(分析纯, 沈阳化学试剂厂), 空白人血浆(沈阳军区总医院), 纯净水(市售)。

收稿日期: 2008-12-03

作者简介: 刘茜(1968-), 女(汉族), 辽宁沈阳人, 副教授, 硕士, 主要从事体内药物分析研究, Tel. 024-23986298, E-mail lqzm@yahoo.com.cn.

2 方法与结果

2.1 分析条件的选择及系统适用性试验

色谱条件为色谱柱:XTerra[®]MS C₁₈柱(50 mm×2.1 mm, 5 μm); C₁₈保护柱(4 mm×3.0 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水-甲酸(体积比95:5:0.05); 流速: 100 μL·min⁻¹; 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μL。

质谱条件为三重四极杆串联质谱, 电喷雾电离源(Turbo IonSpray), 离子源喷射电压为5 500 V, 温度为400 °C, 离子源气体1(N₂)压力为55 psi, 离子源气体2(N₂)压力为60 psi, 气帘气体(N₂)压力为20 psi, 碰撞气体(N₂)压力为5 psi, 正离子方式检测, 去簇电压(DP)分别为60 eV(多潘立酮)和30 eV(氨溴索), 扫描方式为多反应监测(MRM), 碰撞能量(CE)均为35 eV, 用于定量分析的离子反应分别为 m/z 426.4 → m/z 175.0(多潘立酮)和 m/z 379.0 → m/z 264.0(氨溴索), 扫描时间为300 ms。

多潘立酮和内标物氨溴索[M+H]⁺的产物离子全扫描质谱图见图1。

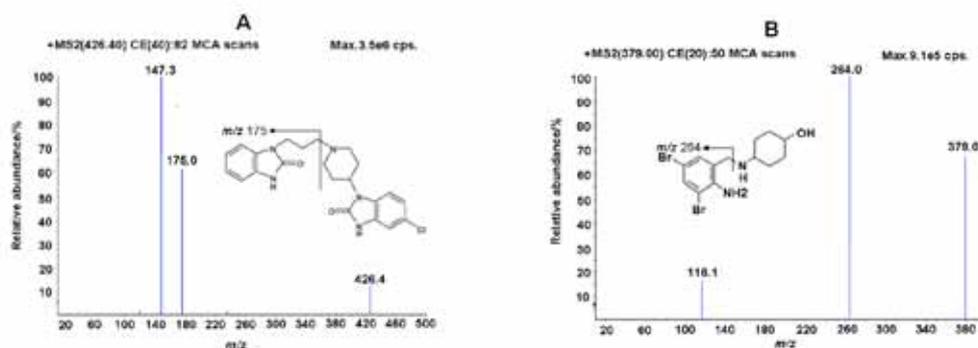


Fig.1 Full scan MS-MS spectra of [M+H]⁺ ions of domperidone(A) and internal standard ambroxol(B)

2.2 溶液的制备

精密称取多潘立酮对照品适量, 用甲醇溶解并稀释, 配成质量浓度为1 000 μg·L⁻¹的标准储备液。内标物氨溴索用甲醇溶解并稀释, 配成质量浓度为50 μg·L⁻¹的内标工作液, 4 °C冰箱保存备用。

2.3 受试者选择及样品采集

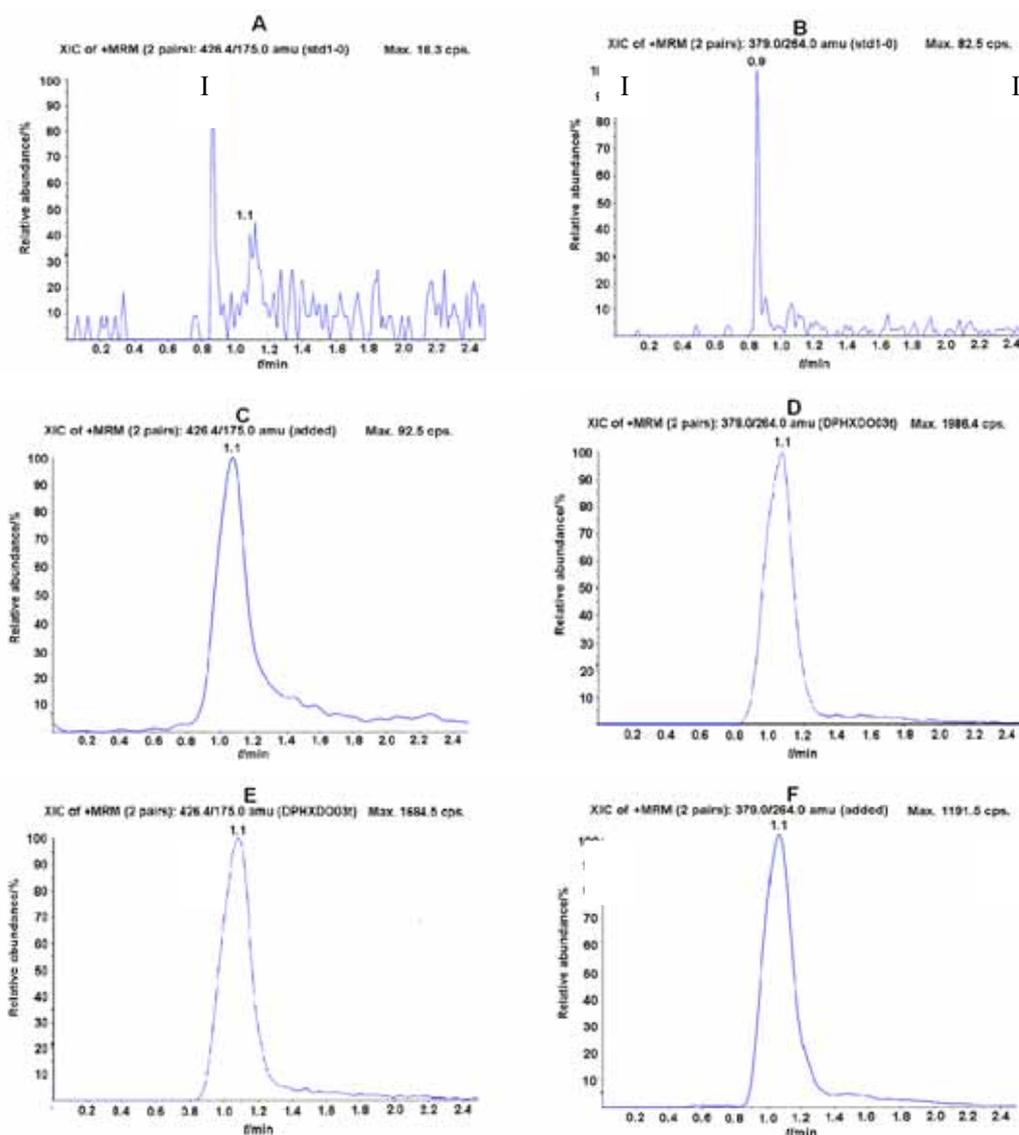
选择健康男性志愿受试者20名, 年龄(22.3±1.63)岁, 身高(172.4±5.05)cm, 体质量(62.4±5.51)kg, 试验前2周末服用任何药物及烟酒。于试验前签署知情同意书, 并在医院接受全面体检, 包括血常规、肝、肾功能及心电图, 结果均属正常。受试者于试验前禁食10 h, 试验当日晨7:00室温条件下空腹口服多潘立酮1片(规格10 mg), 于给药前(0 h)和给药后0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8、12、24、30 h由肘正中静脉取血5 mL, 并立即移入经肝素处理的离心试管中, 3 500 r·min⁻¹离心15 min, 分离血浆, 于-20 °C冰箱中保存待测。

2.4 血浆样品处理

取血浆400 μL, 分别加入甲醇40 μL、50 μg·L⁻¹氨溴索40 μL、0.1 mol·L⁻¹Na₂CO₃溶液50 μL, 涡流混合1 min; 加入乙醚5 mL, 涡流混合5 min, 10 000 r·min⁻¹离心1 min; 分取上层有机相于另一试管中, 40 °C氮气流下吹干, 残留物加流动相150 μL溶解, 待进样分析。

2.5 方法的专属性考察

分别取6名受试者的空白血浆400 μL ，加入甲醇80 μL ，自“2.4”条中加入“0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液50 μL ”起操作并测定，得空白血浆色谱图；将一定质量浓度的标准溶液和内标溶液加入空白血浆中，同法操作，得空白血浆加入多潘立酮和内标氨溴索的色谱图；取受试者服药后血浆样品，按“2.4”条操作，得受试者单剂量口服受试制剂后血浆样品色谱图（图2）。多潘立酮和内标物氨溴索的保留时间均为1.20 min。空白血浆中内源性物质不干扰多潘立酮和氨溴索的测定。



A—Domperidone chromatogram of blank plasma ;B—Ambroxol chromatogram of blank plasma ;C—Domperidone chromatogram of blank plasma added with domperidone (5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and internal standard ambroxol (50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ; D—Ambroxol chromatogram of blank plasma added with domperidone (5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and internal standard ambroxol (50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ; E—Domperidone chromatogram of plasma sample(0.75 h after oral administration) ; F—Ambroxol chromatogram of plasma sample (0.75 h after oral administration)

Fig. 2 Multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms of domperidone and internal standard ambroxol in plasma samples

2.6 生物基质效应考察

分别取6名受试者的空白血浆400 μL ，加入甲醇40 μL ，自“2.4”条中加入“0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液50 μL ”起操作，向获得的上清液中分别加入相应质量浓度的多潘立酮标准溶液40 μL ，于40 $^\circ\text{C}$ 氮气流下吹干，残留物加150 μL 流动相溶解，使多潘立酮最终血浆质量浓度为1.0、5.0、40.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。离心并分别取上清液20 μL 进样，记录多潘立酮峰面积(A)；另取相应质量浓度的标准溶液40 μL ，40 $^\circ\text{C}$ 下氮气流下吹干，残留物用150 μL 流动相溶解，配制质量浓度为1.0、5.0、40.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的样品进样分析，得多潘立酮峰面积(B)。基质效应 = $A/B \times 100\%$ 。内标物的基质效应用相同方法考察。上述计算得到的比值均在85%~115%之间，表明本方法基质效应对样品和内标物的影响可以忽略。

2.7 线性关系考察及定量下限确定

取空白血浆400 μL ，分别加入多潘立酮标准系列溶液40 μL ，配制相当于多潘立酮血浆质量浓度为0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的样品，自“2.4”条中加入“50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨溴索40 μL ”起操作，每一质量浓度进行双样本分析，记录色谱图；以待测物质量浓度(ρ)为横坐标，以待测物与内标物峰面积比值(A)为纵坐标，用加权($W=1/x^2$)最小二乘法进行回归运算^[8]，求得标准曲线的典型回归方程为 $A=5.42 \times 10^{-2}\rho + 2.11 \times 10^{-2}$ ， $r=0.995\ 0$ ，线性范围为0.5~50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，定量下限为0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.8 精密度与准确度试验

取空白血浆400 μL ，按“2.7”条方法配制多潘立酮血浆质量浓度分别为1.0、5.0、40.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的质控(QC)样品，每一质量浓度进行6样本分析，连续测定3 d，根据当日标准曲线方程，求算QC样品质量浓度，计算本法的准确度与精密度，结果见表1。日内、日间精密度(RSD)均小于13.5%，准确度(E_R)在 $\pm 6.3\%$ 以内。

Table 1 Accuracy and precision for the analysis of domperidone in human plasma ($n=6$)

$\rho_{\text{added}}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho_{\text{found}}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	Intra-day RSD/%	Inter-day RSD/%	$E_R/\%$
1.0	1.0	4.1	11.9	0.2
5.0	5.3	5.5	8.4	6.3
40.0	40.1	2.7	13.5	0.2

2.9 提取回收率试验

取空白血浆400 μL ，加入甲醇40 μL ，除不加内标溶液外，按“2.7”条方法制备多潘立酮血浆质量浓度分别为1.0、5.0、40.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的质控(QC)样品，每一质量浓度进行6样本分析；同时用水代替血浆400 μL ，加入甲醇40 μL ，除不加标准溶液和内标溶液外，按“2.7”条操作，向获得的上清液中分别加入相应质量浓度的多潘立酮标准溶液40 μL ，于40 $^\circ\text{C}$ 氮气流下吹干，残留物加流动相150 μL 溶解，进样分析，获得相应峰面积(3次测定的平均值)。以每一质量浓度两种处理方法的峰面积比值计算回收率。内标物氨溴索的回收率经相同方法处理。1.0、5.0、40.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 多潘立酮血浆样品提取回收率分别为62.3%、61.6%、66.7%，内标物的提取回收率为82.8%。

2.10 稳定性考察

考察了多潘立酮血浆样品在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置20 d、血浆样品经历2次冷冻-解冻循环的稳定性以及多潘立酮血浆样品经液-液萃取处理室温放置24 h的稳定性。取空白血浆 $400\text{ }\mu\text{L}$ ，按“2.7”条方法配制多潘立酮血浆质量浓度分别为 1.0 、 5.0 、 $40.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血浆样品，每一质量浓度进行3样本分析，采用LC-MS-MS法测定。结果表明，多潘立酮血浆样品在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置20 d稳定，经历2次冷冻-解冻循环后稳定，经液-液萃取处理后室温放置24 h内稳定。

2.11 血药质量浓度-时间曲线绘制

受试者口服多潘立酮片 10 mg 后，平均血药质量浓度-时间曲线见图3。

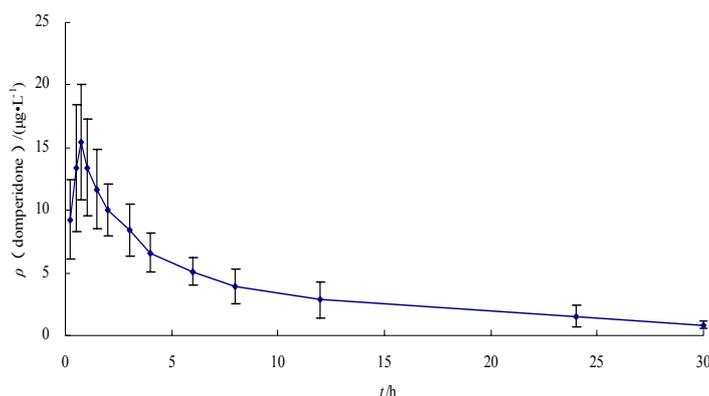


Fig. 3 Mean plasma concentration-time curve after a single oral administration of 10 mg of domperidone to 20 healthy volunteers

2.12 药物动力学考察

20名受试者单剂量口服多潘立酮片 10 mg 后，其血药质量浓度-时间数据经DAS 2.0软件统计分析。结果表明，不同室模型间有显著差异，当权重系数取 $1/C^2$ 、二室模型拟合时，房室判别指标AIC值最小，为最佳拟合模型，即多潘立酮片在中国健康受试者体内呈二室模型特征。主要药物动力学参数见表2。

3 讨论

a. 液相和质谱条件的优化。实验在流动相中加入易挥发且酸性较强的甲酸后，方法的灵敏度显著提高。其原因可能为多潘立酮为弱碱性含氮化合物，加酸后使其氮原子上易加氢形成正离子形式的准分子离子，从而提高电离效率。实验对流动相中甲醇-水-甲酸体积比为 $95:5:0.01$ 和 $95:5:0.05$ 时的分离效果进行了考察。当甲醇-水-甲酸体积比为 $95:5:0.05$ 时，药物峰及内标峰可以与血浆中内源性物质峰达到最佳分离效果。

Table 2 Mean pharmacokinetic parameters of domperidone after a single oral administration($n=20$, $\bar{x} \pm s$)

Parameter	Value(domperidone)
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$)	105±28.6
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$)	121±45.9
ρ_{\max} ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	17.0±4.83
t_{\max}/h	0.75±0.24
$t_{1/2}/\text{h}$	9.78±4.66
t_{MR}/h	8.01±1.64
$Cl:F/(\text{L}\cdot\text{h}^{-1})$	236±640
$V_d:F/\text{L}$	785±636
$t_{1/2\alpha}/\text{h}$	6.78±15.0
$t_{1/2\beta}/\text{h}$	26.3±25.7
$t_{1/2Ka}/\text{h}$	1.23±1.46
K_a/h^{-1}	3.96±5.20

b. 血浆样品的预处理。首先采用沉淀蛋白法，发现干扰物质的影响很大。后考虑多潘立酮在碱性条件下能以分子形式被有机溶剂萃取出来，因此尝试将其碱化后进行液-液萃取。分别考察了碱化后乙酸乙酯、二氯甲烷、乙醚的萃取效果，最终选用乙醚进行提取，提取溶剂不仅沸点低，有利于减少样品前处理时间，而且密度小，易于移取上清液，被测物能很好的被萃取出来，并且有效的消除了基质效应。

c. 药物动力学参数分析。药物动力学参数的数据表明，多潘立酮口服给药后吸收迅速，表观分布容积较大，总血浆清除率较高，具有高度的组织亲和力。试验得到的生物利用度及药物动力学参数标准差数值均较大，反映了受试者间的个体差异较大。推测其可能的原因是人体内多潘立酮在细胞色素 P450 酶系 3A4 作用下发生转化^[9-10]，而此种酶活性存在较大的个体差异。实验结果提示临床用药应引起注意。

4 结论

采用 LC-MS-MS 法测定了血浆中多潘立酮的血药质量浓度，分析时间短，每一样品仅需 2.5 min 即能完成测定，适于大量样品的快速分析测定。血浆样品预处理采用液-液萃取法，方法选择性好，干扰少，且操作简便，适用于多潘立酮的药物动力学研究。主要药物动力学参数的数据表明，多潘立酮口服给药后吸收迅速，表观分布容积较大，总血浆清除率较高，具有高度的组织亲和力，但受试者间的个体差异较大，提示临床用药应引起注意。

参考文献:

- [1] 郭建强, 谷成明. 多潘立酮的作用机制及临床应用新进展[J]. 中华消化杂志, 2001, 21(1): 39-42.
- [2] 梁艳, 钱平利, 李彦. 多潘立酮口腔崩解片在健康人体的生物等效性[J]. 中国临床药理学杂志, 2006, 22(4):

- 289-291.
- [3] WU Min-shu, GAO Ling, CAI Xiao-hui, et al. Determination of domperidone in human plasma by LC-MS and its pharmacokinetics in healthy chinese volunteers [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(3): 285-288.
- [4] 于洋, 张小丽, 王建, 等. 液相色谱-质谱联用法测定人血浆中多潘立酮[J]. *药物分析杂志*, 2007, 27(5): 677-680.
- [5] 邱相君, 王建刚, 石东恒, 等. 多潘立酮口崩片的人体生物等效性[J]. *中国医院药学杂志*, 2007, 27(3): 299-302.
- [6] 柴栋, 方翼, 裴斐, 等. 单剂口服多潘立酮片在健康人体的生物等效性[J]. *中国临床药理学杂志*, 2005, 21(3): 190-193.
- [7] 晁阳, 李炜, 陈磊. 微粉化马来酸多潘立酮在犬体内的绝对生物利用度研究[J]. *药学进展*, 2006, 30 (5): 228-231.
- [8] 钟大放. 以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题[J]. *药物分析杂志*, 1996, 16 (5): 343-346.
- [9] WARD B A, MOROCHO A, KANDIL A, et al. Characterization of human cytochrome P450 enzymes catalyzing domperidone *N*-dealkylation and hydroxylation *in vitro* [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2004, 58(3): 277-287.
- [10] TSUJIKAWA K, KAN Y, NOGAWA K, et al. Potentiation of domperidone induced catalepsy by a P-glycoprotein inhibitor cyclosporine A [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2003, 24 (3): 105-114.

Determination of domperidone concentration in human plasma by LC-MS-MS and its pharmacokinetics

LIU Qian, ZHENG Xiao-nan, WANG Qian, LI He, LI Li, SONG Hong-tao
(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To establish a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) method for the determination of domperidone in human plasma and to study its pharmacokinetics in healthy volunteers. **Methods** After a single dose oral administration of domperidone 10 mg to 20 healthy Chinese male volunteers, the plasma concentrations of domperidone were determined by LC-MS-MS by taking ambroxol as internal standard. Chromatography was performed on a XTerra[®] MS C₁₈ column with a mobile phase consisting of methanol-water-formic acid (V:V:V=95:5:0.05), delivered at 100 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. A triple quadrupole tandem mass spectrometer equipped with Turbo Ionspray Source was used as detector and was operated in the positive ion mode. Multiple reaction monitoring using the precursor to produce ion combinations of m/z 426.4 \rightarrow m/z 175.0 and m/z 379.0 \rightarrow m/z 264.0 was performed to quantify domperidone and the internal standard ambroxol, respectively. **Results** The calibration curve of domperidone was linear in the range of 0.5-50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The intra-day and inter-day precision (RSD) were below 13.5%. The pharmacokinetic characteristics of domperidone were fitted with a two-compartment model. The main pharmacokinetic parameters were as follows: t_{max} (0.75 \pm 0.24) h; ρ_{max} (17.0 \pm 4.83) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $t_{1/2}$ (9.78 \pm 4.66)

h ; AUC_{0-t} (105±28.6) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$; $AUC_{0-\infty}$ (121±45.9) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$. **Conclusion** LC-MS-MS method established in this study is simple and sensitive with better accuracy, which is adapted to the study of pharmacokinetics of domperidone.

Key words: pharmaceutics ; pharmacokinetics; LC-MS-MS ; domperidone ; plasma concentration

(责任编辑 高明)