·实验研究·

LC-MS/MS 法检测人血浆中甲基纳曲酮浓度的分析方法及其应用

马婧怡[1,2]，张　丹[2]，刘　曼[2]，刘会臣[3]

（1 国家药品监督管理局药品审评中心，北京 100022；2 航天中心医院，北京 100049；
3 中国医学科学院阜外医院，北京 100037）

［摘要］ **目的：**建立快速、灵敏、可靠的 LC-MS/MS 法测定人血浆中甲基纳曲酮的浓度。**方法：**采用弱阳离子交换固相萃取柱进行样品预处理，以溴甲基纳曲酮-d3 为内标，通过 Ultra PFP Propyl 柱（100 mm×2.1 mm，5.0 μm）色谱柱进行分离，流动相为 20 mmol·L^{-1}乙酸铵水溶液（含 1% 甲酸）和乙腈，等度洗脱（15∶85，*v/v*），流速 0.4 mL·min^{-1}。通过电喷雾电离（ESI），以多反应监测（MRM）模式进行正离子监测，甲基纳曲酮和内标的离子对分别为 *m/z* 356.3→284.2，*m/z* 359.3→287.1。**结果：**人血浆中甲基纳曲酮在 0.1～120 ng·mL^{-1}范围内线性关系良好（$r>0.99$），定量下限为 0.1 ng·mL^{-1}；方法批内、批间精密度＜7.2%，准确度为 94.5%～100.7%；甲基纳曲酮内标归一化的平均基质效应为 99.1%，平均提取回收率为 81.4%。该方法成功应用于 12 例健康受试者皮下注射 0.075 mg·kg^{-1}溴甲基纳曲酮注射液的药动学研究。**结论：**本研究建立的 LC-MS/MS 分析方法灵敏度高、快速且方法重现性好，满足生物分析的法规要求。

［关键词］ 甲基纳曲酮；LC-MS/MS；固相萃取；药动学

［中图分类号］ R917　　［文献标志码］ A　　［文章编号］ 1003－3734(2021)05－0447－07

Determination of methylnaltrexone in human plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study in healthy Chinese volunteers

MA Jing-yi[1,2], ZHANG Dan[2], LIU Man[2], LIU Hui-chen[3]

(1 *Centre for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing* 100022, *China*; 2 *Aerospace Center Hospital, Beijing* 100049, *China*; 3 *Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing* 100037, *China*)

［**Abstract**］ **Objective**: To develop a rapid, robust and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) method for the determination of methylnaltrexone in human plasma. **Methods**: The plasma samples were pretreated by filtering using solid-phase extraction (SPE) with a weak cation-exchange cartridge. The filtrate samples were separated on an Ultra PFP Propyl column (100 mm×2.1 mm, 5.0 μm) using 20 mmol·L^{-1} ammonium acetate (containing 1% formic acid) in water-acetonitrile (15∶85, *v/v*) as mobile phase and methylnaltrexone-d3 as the internal standard (IS). The flow rate was set at 0.4 mL·min^{-1}. Methylnaltrexone and IS were ionized with an ESI source and MRM mode was applied and operated in positive ion mode. The detected ions were *m/z* 356.3→284.2 and *m/z* 359.3→287.1, respectively. **Results**: The linear range of the developed method was 0.1～120 ng·mL^{-1}, with the lower limit of quantification being 0.1 ng·mL^{-1}. The intra-day and inter-day precisions of the method were less than 7.2% across three validation runs, and the accuracy ranged 94.5%～100.7%. The extraction method using SPE reached a mean recovery of 81.4% for methylnaltrexone, and the mean normalized matrix effect was 99.1%. This method was successfully applied for the pharmacokinetic study of subcutaneous

［基金项目］ 马婧怡，女，工程师，主要从事临床药理学研究。E-mail：jenny2738@163.com。

［作者简介］ 刘会臣，男，主任药师，主要从事临床药理学研究。E-mail：huichenliu@163.com。

injection of methylnaltrexone bromide in 12 healthy volunteers. **Conclusion**: This LC-MS/MS method is proven sensitive, rapid and reproducible, and meets the regulatory requirements of biological analysis.

[**Key words**] methylnaltrexone; LC-MS/MS; solid-phase extraction (SPE); pharmacokinetics

甲基纳曲酮(methylnaltrexone,MNTX)是一种新型的外周 μ 受体拮抗剂,可避免阿片类药物的胃肠道不良反应,而不影响其镇痛效果[1-2]。溴甲基纳曲酮由美国 Wyeth 公司和 Progenics 公司联合研究开发,商品名为 Relistor,于 2008 年 4 月经美国 FDA 批准上市,用于治疗阿片类药物引起的便秘(opioid induced constipation,OIC)。

目前,测定生物基质中甲基纳曲酮含量的方法有高效液相色谱法(HPLC)、高效液相色谱质谱联用法(LC-MS/MS)。Kim 等[3]采用 HPLC 法检测大鼠血清及脑组织中甲基纳曲酮的含量,该方法血清中的灵敏度为 500 ng·mL^{-1}。Foss 等[4]对甲基纳曲酮在健康受试者剂量爬坡给药的药动学研究中,将检测方法的灵敏度提升至 100 ng·mL^{-1},但仍有 3 个低剂量组没有检测到足够的血药浓度。采用固相萃取柱进行预处理样品极大地提高了检测方法的灵敏度,并使得检测干扰更少。Yu 等[5]采用 LC-MS/MS 进一步将定量下限提高至 1 ng·mL^{-1},但未提供完整的方法学验证。Oswald 等[6]运用 LC-MS/MS 测定甲基纳曲酮在人血浆样品中的含量,并完成 3 例给药剂量为 12 mg 的受试者样本的测定。该方法定量下限为 0.5 ng·mL^{-1},所用血浆体积为 200 μL。但该方法在重现时呈现色谱峰拖尾、分叉和严重的离子抑制,进一步影响了灵敏度。

溴甲基纳曲酮的常用剂量范围为 0.075 ~ 12 mg·kg^{-1}。在进行人体药动学研究时,为减少临床研究的安全性风险,通常首先选择低剂量开展试验。因此,建立符合分析方法验证要求的快速、灵敏、可靠的人血浆样品分析方法至关重要。本实验运用固相萃取(solid-phase extraction,SPE)联合 LC-MS/MS 测定人血浆中的甲基纳曲酮的含量,定量下限为 0.1 ng·mL^{-1},灵敏度高。生物样品前处理采用了 SPE,检测干扰少,使得分析方法重现性好。所用血浆样品的体积小(50 μL),大大节省了血浆用量。样品分析时间短,可以实现短时间内大量样品的处理分析,可以更好地应用于甲基纳曲酮在人体的药动学研究,为检测血浆基质中甲基纳曲酮提供可靠的方法学参考。

材料与方法

1 药品与试剂

溴甲基纳曲酮对照品(纯度 98.27%,批号 06892)购于 MedChem Express;溴甲基纳曲酮-d3 对照品(内标,化学纯度 98%,同位素纯度 99.9%,批号 20-AZC-168-1)购于 Toronto Research Chemicals Inc.;乙腈、甲醇(色谱级)购于美国 Thermo Fisher Scientific Inc.;甲酸(色谱级)购于美国 Dikma Technologies Inc.;乙酸铵(色谱级)购于美国 Sigma-ALDRICH CO;氨水(分析纯,25% ~28%)购于北京化工厂;超纯水由去离子水经 Milli-Q ADVANTAGE A10 纯水仪纯化制得。

2 仪器

日本 Shimadzu Corporation 生产,Nexera XR 超快速液相色谱系统,包括 LC-20AD$_{XR}$溶剂输送泵、DGU-20A$_{3R}$在线脱气机、SIL-20AC$_{XR}$自动进样器、CTO-20AC 柱温箱、CBM-20A 系统控制器;美国 AB Sciex Pte. Ltd. 生产,QTRAP 5500 三重四级杆线性离子阱复合质谱仪,配有 Turbo V^{TM}电喷雾离子化源、Analyst 1.6.2 软件;CPA225D 电子天平[最小分度为 0.000 01 g,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];FA1004N 电子天平(最小分度为 0.000 1 g,上海精密科学仪器有限公司);KDC-2046 低速冷冻离心机(最大相对离心力 3 387 ×g,科大创新股份有限公司中佳分公司);MTN-2800D 氮吹浓缩装置(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

3 色谱条件

色谱柱为美国 Restek Corporation 的 Ultra PFP Propyl Columns 柱(100 mm ×2.1 mm,5.0 μm),配有在线过滤器(日本 Shimadzu Corporation 过滤片 0.5 μm)。流动相水相 A 为 20 mmol·L^{-1}乙酸铵水溶液(含 1% 甲酸),有机相 B 为乙腈,等度洗脱(B 相比例 85%),流速:0.400 0 mL·min^{-1}。柱温:35 ℃,进样量:6.00 μL,总采集时间:4.00 min。

4 质谱条件

采用 ESI 电喷雾离子化源,多反应(MRM)正离子检测模式进行定量检测,甲基纳曲酮和内标的检测离子对分别为 *m/z* 356.3→284.2、*m/z* 359.3→

287.1;解簇电压(DP):84 V;碰撞能量(CE):33 eV;源内气体:40 psi;卷帘气:20 psi;碰撞气:10 psi;喷雾电压:1 500 V;源温度:550 ℃。

5 对照品溶液的配制

取溴甲基纳曲酮对照品于 10 mL 量瓶中,用 50% 乙腈水溶液溶解并定容,得甲基纳曲酮浓度为 18.0 μg·mL^{-1}的标准曲线储备液。用 50% 乙腈水稀释得到系列标准工作溶液,甲基纳曲酮浓度分别为 0.005 00,0.015 0,0.045 0,0.150,0.450,1.50,4.00,6.00 μg·mL^{-1}。另配置相同浓度的质控储备液,并用 50% 乙腈水稀释得到质控工作液,甲基纳曲酮浓度为 0.012 5,0.017 5,2.50,4.50,18.0 μg·mL^{-1}。用 50% 乙腈水溶液溶解并配制甲基纳曲酮-d3 浓度为 1.00 mg·mL^{-1}的母液,并将母液用 50% 乙腈水溶液稀释得到浓度为 200 ng·mL^{-1}的内标工作溶液。

6 校正标样的配制

将系列标准工作溶液按照 1∶50 的稀释比例,用混合空白血浆配制标准曲线样品,甲基纳曲酮浓度分别为 0.100,0.300,0.900,3.00,9.00,30.0,80.0,120 ng·mL^{-1}。将质控储备液和工作液按照 1∶50 的稀释比例,用混合空白血浆配制 LLOQ,LQC,LMQC,MQC,HQC,DQC,甲基纳曲酮浓度分别为 0.100,0.250,3.50,50.0,90.0,360 ng·mL^{-1}。质控样品如需冻存,分装后分别于 -40 ℃、-80 ℃冰箱中保存。

7 生物样品处理方法

SPE 柱(Cnwbond WCX SPE Cartridge,50 mg)中加入 2 mL 甲醇和 1 mL 超纯水活化。向 50 μL 人血浆样品中加入内标工作液(200 ng·mL^{-1})10 μL、50% 乙腈水溶液 10 μL 和 930 μL 超纯水,涡旋 30 s。将样液全部转移至 SPE 柱中,流速 0.4 mL·min^{-1}。分别用 1 mL 甲醇和 1 mL 超纯水洗涤后,用 2 mL 洗脱液甲醇-氨水(9∶1,*v*/*v*)洗脱。洗脱液用氮吹浓缩装置(40 ℃,N_2 流)吹干后,加入 170 μL 50% 乙腈水溶液,涡流 30 s,进行 LC-MS/MS 定量分析。

8 方法学验证

8.1 选择性 取 6 个不同来源的人空白血浆,除不加内标溶液(改加同等体积的 50% 乙腈水溶液)外,其余按“**7 生物样品处理方法**”项下操作,进行 LC-MS/MS 分析考察该方法的特异性。通过向人空白血浆中加入内标工作液、不加入内标工作液处理 ULOQ 浓度样品,进行分析物与内标相互干扰的考察。

8.2 系统残留 在方法学验证的每个分析批中,于测定最高浓度标准曲线样品(ULOQ 浓度样品)后测定 BK 样品,考察残留情况。

8.3 标准曲线与线性范围 处理标准曲线样品,以血浆中待测物的理论浓度为横坐标,待测物与内标峰面积的比值为纵坐标,用加权($W = 1/x^2$)最小二乘法进行回归运算,标准曲线的回归方程为 $Y = aX + b$。

8.4 定量下限(LLOQ) 以血浆标准曲线的最低浓度点作为定量下限,考察 3 个分析批,每批 6 样品,以各分析批的标准曲线计算 LLOQ QC 样品的浓度,并计算批内和批间的精密度以及准确度。

8.5 准确度与精密度 按“**7 生物样品处理方法**”项下处理浓度为 0.250,3.50,50.0,90.0 ng·mL^{-1}的质控样品,考察 3 个分析批,每批 6 个样品。以各分析批的标准曲线计算 QC 样品的测得浓度,考察方法的准确度和精密度。

8.6 基质效应和回收率 将 6 个不同来源的 LQC 和 HQC 样品,按“**7 生物样品处理方法**”项下处理,得到分析物和内标的峰面积 *A*;将 6 个不同来源的空白样品按“**7 生物样品处理方法**”项下操作,经处理得到样品基质再加入低、高 2 个质控浓度的分析物工作液和内标工作溶液,得到分析物和内标的峰面积 *B*;另用上述低、高 2 个质控浓度的分析物工作液和内标工作液经处理至相应浓度后测定,得到分析物和内标的峰面积 *C*。计算公式:甲基纳曲酮回收率 = $A_{(甲基纳曲酮)}/B_{(甲基纳曲酮)} \times 100\%$,甲基纳曲酮基质效应因子 = $B_{(甲基纳曲酮)}/C_{(甲基纳曲酮)} \times 100\%$;同法计算内标回收率和基质效应因子。甲基纳曲酮经内标归一化基质效应因子 = 甲基纳曲酮基质效应因子/内标基质效应因子。

8.7 稀释可靠性 处理超高浓度的质控(360 ng·mL^{-1})样品,考察 3 个分析批,每批 6 个样品,以各分析批的标准曲线计算稀释后的浓度,在除以其稀释因子(1/5),计算稀释前的浓度,并计算精密度和准确度。

8.8 稳定性 分别将甲基纳曲酮储备液、工作液室温放置 27 h,内标工作液室温放置 29 h,甲基纳曲酮储备液 -40 ℃条件下储存 63 d 和 219 d,工作液 -40 ℃储存 58 d 和 214 d 考察溶液的稳定性。配制 LQC,DQC 血浆样品,各浓度水平 6 样品,分别考察室温放置 7 h,反复 3 次 -80 ℃冰冻(每次冰冻 12 h 以上)、室温熔融,处理后的样液自动进样器放置 53 h

后测定,于 -80 ℃、-40 ℃储存 56 d 和 212 d 的稳定性。配制全血 LQC 和 MQC 样品,分别于放置前和放置 1 h 后离心,取血浆按"**7 生物样品处理方法**"项下操作,考察甲基纳曲酮在全血中的稳定性,各浓度水平均为 6 样品。

8.9 分析批最大样品量 该分析批内包含系统适用性、标准曲线、残留效应、质控样品共计 211 个。

9 临床药动学研究

建议的分析方法应用于 12 名健康受试者皮下注射 0.075 mg·kg^{-1}溴甲基纳曲酮注射剂的血浆样品的检测。该临床方案已获得航空航天中心医院伦理委员会批准。受试者在给药前及给药后 0.1,0.2,0.3,0.5,0.75,1,1.5,2,3,4,6,8,12,16,24,36,48 h 采集血样至肝素钠抗凝管中,在 4 ℃ 3 500 r·min^{-1}离心 5 min,分离血浆并保存在 -80 ℃直至样品检测。采用非房室模型计算甲基纳曲酮的药动学参数。

结 果

1 质谱分析

在全扫描 Q1 质谱图中,甲基纳曲酮主要产生 *m/z* 356.3 的[M + H]$^+$峰。选择性对[M + H]$^+$峰进行产物离子扫描,尽管 *m/z* 55.2 的离子丰度最高,但由于背景噪音高,检测灵敏度低,因此未作为定量离子。所以,甲基纳曲酮选择 *m/z* 356.3→*m/z* 284.2、甲基纳曲酮-d3 选择其他 *m/z* 359.3→*m/z* 287.1 作为定量离子对。待测物和内标的离子扫描质谱图见图 1。

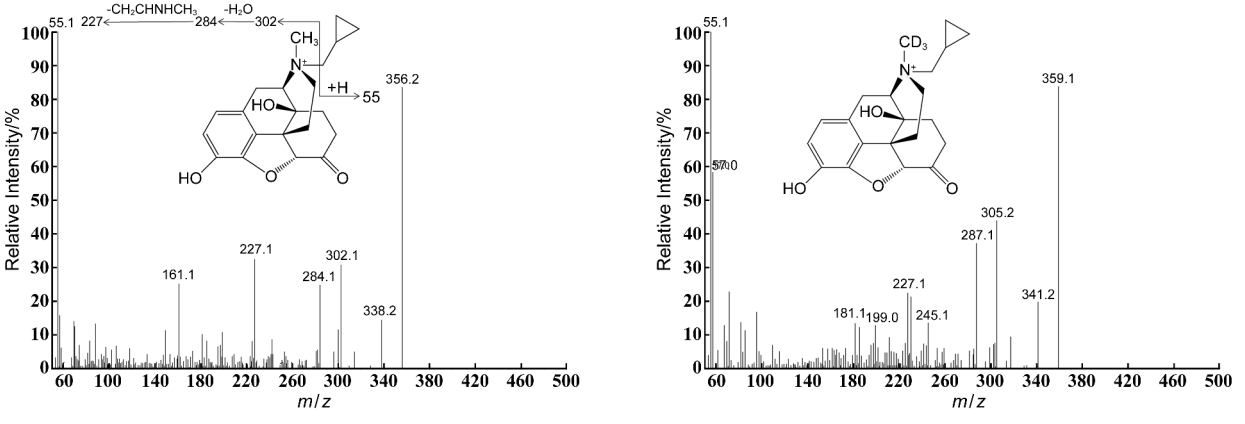
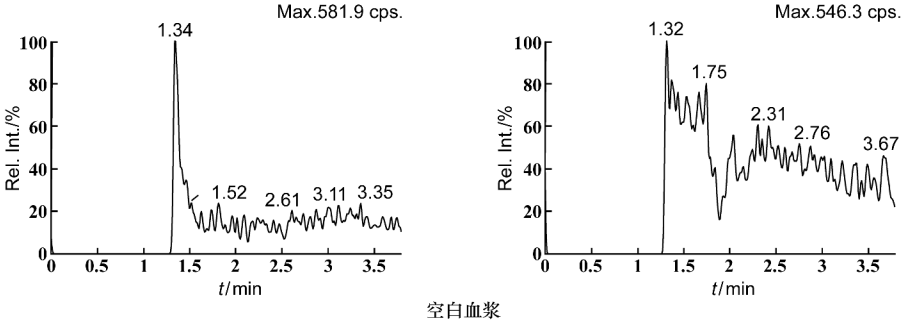


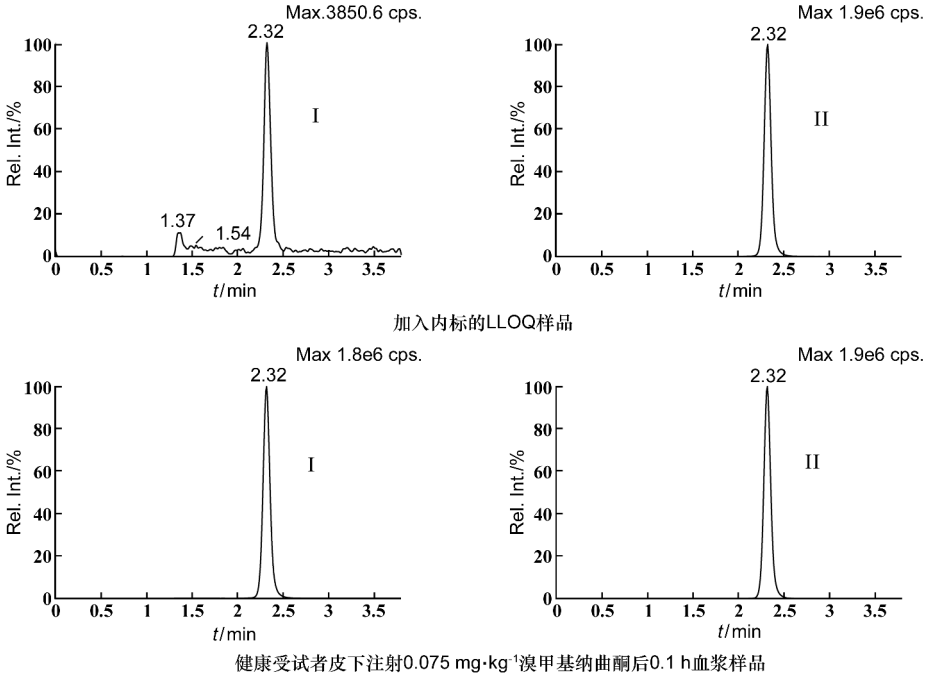
图 1 甲基纳曲酮与内标的离子扫描质谱图

2 方法学验证

2.1 选择性 空白血浆样品的色谱图见图 2A;LLOQ 样品的代表性色谱图见图 2B;受试者皮下注射溴甲基纳曲酮注射液 0.1 h 后样品的代表性色谱图见图 2C。甲基纳曲酮和内标的色谱保留时间均为 2.32 min。结果表明,干扰组分的响应低于 LLOQ 待测物响应的 20% 及内标响应的 5%,表明人血浆中的内源性物质不干扰待测物和内标的定量分析。内标和分析物相互无干扰。



空白血浆



Ⅰ：甲基纳曲酮；Ⅱ：内标

图 2 空白血浆、样品和 LLOQ 样品及皮下注射溴甲基纳曲酮后样品色谱图

2.2 系统残留 残留效应为了考察进样高浓度样品后对低浓度样品的检测是否有影响。测定 ULOQ 样品后的空白样品中没有分析物和内标的色谱峰，系统无残留。

2.3 线性范围与定量下限 甲基纳曲酮在 0.1 ~ 120 ng·mL^{-1}范围内线性关系良好。典型回归方程为 $y = 0.018\,1x + 0.000\,14$（$r = 0.999\,7$）。标准曲线回算浓度与标示浓度相差不超过 ±15%（LLOQ 为 ±20%）。血浆中甲基纳曲酮检测的定量下限为 0.1 ng·mL^{-1}，批内准确度为 97.5% ~107.7%，批内精密度不大于 5.1%，批间准确度为 101.6%，批间精密度为 13.0%。在 LLOQ 浓度下，甲基纳曲酮色谱峰的信噪比（S/N）约为 20，即使在 0.075 mg·kg^{-1}的低剂量水平给药时，也能满足甲基纳曲酮药动学的研究。

2.4 准确度与精密度 该方法的批内和批间准确度及精密度结果见表 1。甲基纳曲酮各浓度水平 QC 样品的批内精密度 <2.4%，准确度为 94.5% ~ 100.7%，批间精密度 <7.2%，准确度为 94.6% ~ 100.3%。该分析方法的准确度和精密度均符合有关生物样品分析方法验证的要求。

表 1 批内和批间精密度与准确度

理论浓度 /ng·mL^{-1}	n	批内			批间		
		$\bar{x} \pm s$/ng·mL^{-1}	准确度偏差/%	精密度/%	$\bar{x} \pm s$/ng·mL^{-1}	准确度偏差/%	精密度/%
0.250	6	0.248 ±0.008	-0.7	2.4	0.251 ±0.008	0.3	7.2
3.50	6	3.52 ±0.02	0.7	0.7	3.50 ±0.03	0.1	1.2
50.0	6	50.0 ±0.4	-0.1	0.6	49.9 ±0.3	-0.2	0.8
90.0	6	85.1 ±0.1	-5.5	0.4	85.1 ±0.3	-5.4	0.2

2.5 基质效应和回收率 在低（0.250 ng·mL^{-1}）和高（90 ng·mL^{-1}）QC 浓度水平，甲基纳曲酮的基质效应因子分别为（77.8 ±2.8）%和（79.8 ±1.7）%；内标归一化的基质效应为（97.2 ±1.1）%和（101.1 ±0.5）%，CV% 分别为 1.1%和 0.5%；内标的基质效应因子为（79.5 ±2.1）%。在浓度为 0.250 和 90 ng·mL^{-1}时，甲基纳曲酮的提取回收率分别为（80.4 ±2.8）%和（82.5 ±4.5）%；内标的提取回收率为（81.2 ±1.7）%。结果表明，说明基质效应和提取回收率不会对样品的分析产生影响。

2.6 稀释可靠性 将 DQC 样品用空白血浆稀释 5 倍进行分析,以考察稀释效应。稀释前样品的平均准确度为 95.6%,精密度为 0.9%。结果表明,将浓度超出定量上线的样品稀释 5 倍后测定,结果准确可靠。

2.7 稳定性 分别将甲基纳曲酮储备液、工作液室温放置 27 h,内标工作液室温放置 29 h,甲基纳曲酮储备液 -40 ℃储存 63 d 和 219 d,工作液 -40 ℃储存 58 d 和 214 d,溶液均稳定。血浆样品稳定性结果见表 2。结果表明,人血浆样品室温放置 7 h,反复 3 次 -80 ℃冰冻(每次冰冻 12 h 以上)、室温熔融,于 -80 ℃、-40 ℃储存 56 d 和 212 d 稳定。处理后的样液自动进样器放置 53 h 稳定。全血样品室温放置 1 h 内甲基纳曲酮稳定。

表 2 甲基纳曲酮在人血浆中的稳定性结果 $n=6$

理论浓度 /ng·mL^{-1}	室温放置 7 h		自动进样器放置 53 h		-80 ℃ 3 次冻融		-80 ℃放置 56 d	
	测定浓度 /ng·mL^{-1}	准确度偏差/%	测定浓度 /ng·mL^{-1}	准确度偏差/%	测定浓度 /ng·mL^{-1}	准确度偏差/%	测定浓度 /ng·mL^{-1}	准确度偏差/%
0.250	0.246 ± 0.006	-1.8	0.255 ± 0.004	1.9	0.257 ± 0.006	2.7	0.257 ± 0.008	2.9
360	342 ± 1	-5.0	341 ± 2	-5.2	340 ± 2	-5.6	343 ± 3	-4.9

3 人体药动学研究

该分析方法成功应用于测定皮下注射 0.075 mg·kg^{-1}溴甲基纳曲酮注射液的血浆样品。采用 WinNonlin 6.4 软件,非房室模型计算药动学参数。12 例健康成年受试者单次皮下注射 0.075 mg·kg^{-1}溴甲基纳曲酮注射液后,甲基纳曲酮的平均血药浓度-时间曲线见图 3,相应的药动学参数见表 3。

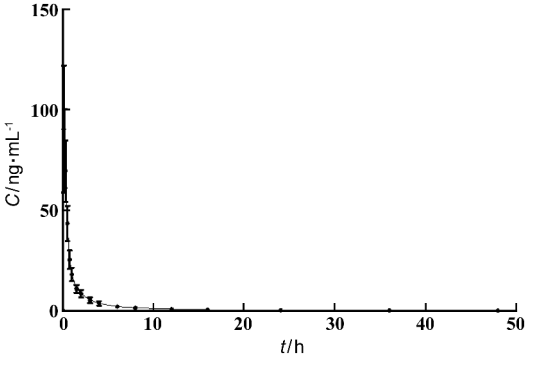


图 3 12 例健康受试者皮下注射 0.075 mg·kg^{-1}溴甲基纳曲酮后平均血浆药物浓度-时间曲线

表 3 12 例健康受试者皮下注射 0.075 mg·kg^{-1}溴甲基纳曲酮后甲基纳曲酮的药动学参数

参数	$\bar{x} \pm s$
AUC_{0-t}/μg·h·L^{-1}	90.0 ± 9.1
$AUC_{0-\infty}$/μg·h·L^{-1}	90.5 ± 9.2
$t_{1/2}$/h	7.90 ± 1.82
T_{max}/h	0.15 ± 0.08
C_{max}/μg·L^{-1}	93.5 ± 28.6
Vz/F/L·kg^{-1}	9.50 ± 2.22
CL/F/L·h·kg^{-1}	0.84 ± 0.08

讨 论

甲基纳曲酮结构中含有季氨,此类化合物通常具有较大的极性和较低的脂溶性。在建立 LC-MS/MS 分析方法时,对色谱条件以及样品处理方法进行了优化。

甲基纳曲酮在 C_{18},C_{12}和 C_8 色谱柱上的保留能力很差,当为了增大保留而增加水相的比例时,色谱峰会出现严重的峰拖尾和分叉现象,进而影响了检测方法的准确性和精密度。最终,在 Ultra PFP Propyl 柱(100 mm × 2.1 mm,5.0 μm,美国 Restek Corporation)色谱柱上,甲基纳曲酮呈现较好的平滑、对称的色谱峰。此外,与在其他色谱柱上的表现不同,当增加有机相的比例时,甲基纳曲酮在该色谱柱上的保留时间会增大,并且质谱响应会提高,这样使得待测物与内源性干扰能充分分离,保证了方法的稳健性和灵敏度。

此外,研究中还对流动相的组成进行了探索,以优化甲基纳曲酮的色谱行为。因为甲基纳曲酮是一种季铵化合物,可以在流动相中与乙酸根离子形成中性电荷的离子对[7],因此,乙酸铵溶液比甲酸溶液能更显著地将甲基纳曲酮保留在色谱柱上。为了获得合适的保留时间,水相流动相选择 20 mmol·L^{-1}乙酸铵水溶液(含 1% 甲酸)。

对于样品制备,研究中评估了蛋白沉淀法,液-液萃取法和 SPE 处理血浆样品。采用蛋白沉淀法进行样品前处理过程中,探索了高氯酸、三氯乙酸、甲醇和乙腈等不同的沉淀剂,所得的回收率低、基质效应大、色谱峰形差。液-液萃取法中,乙醚、乙酸乙

酯和正己烷在加入以及未加入酸和碱的条件下,都很难从血浆基质中提取出甲基纳曲酮。尽管在血浆样品中加入乙腈后,二氯甲烷可将待测物的回收率提高至 60%,但存在较高的基质效应(约 140% ~ 150%),影响了样品检测的准确性。SPE 是另一种常用于样品处理的方法,可减少使用的血浆体积,获得较少生物基质干扰的上样溶液。WCX SPE 具有很强的疏水作用和较弱的阳离子交换能力,对强碱性药物(例如季胺化合物)显示出良好的选择性。在洗涤过程中,需先用 1 mL 甲醇洗涤,再用 1 mL 水洗涤。否则,很难用洗脱液将甲基纳曲酮从 SPE 柱上洗脱下来。该方法的提取回收率约为 81%,基质效应接近 80%。

文献报道,西方人群皮下注射 0.1 mg·kg^{-1}甲基纳曲酮后,C_{max}约为 47 ~ 110 ng·mL^{-1},并在 15 ~ 30 min 达到峰浓度[8-9]。甲基纳曲酮的暴露量(C_{max}和 AUC)与剂量呈线性关系,本研究给药剂量为 0.075 mg·kg^{-1},故设定的线性范围为 0.1 ~ 120 ng·mL^{-1},满足了实际测样的灵敏度需求,保证能够实施完整的人体生物样本浓度研究。本研究的 C_{max}为(93.5 ± 28.6) ng·mL^{-1},T_{max}约为 12 min,$AUC_{(0-t)}$为(90.0 ± 9.1) ng·h·mL^{-1},消除半衰期($t_{1/2}$)约为 8 h。此外发现,男性受试者的 T_{max},C_{max}和 AUC 的变异均大于女性受试者(分别为 44.7% 和 0.0%,41.5% 和 19.3%,9.5% 和 6.2%),溴甲基纳曲酮是否具有种族差异,有待进一步研究。

本文建立的分析方法严格遵守 2015 年版药典中《生物样品定量分析方法验证指导原则》,进行了系统的方法学验证,可满足药物临床药动学研究的要求。分析方法快速可靠,能准确测定人血浆中甲基纳曲酮的浓度,可用于该药物研发的人血浆样品的检测。

[参 考 文 献]

[1] YUAN CS. Methylnaltrexone mechanisms of action and effects on opioid bowel dysfunction and other opioid adverse effects[J]. *Ann Pharmacother*, 2007, 41(6): 984 - 993.

[2] RUSSELL J, BASS P, GOLDBERG LI, *et al*. Antagonism of gut, but not central effects of morphine with quaternary narcotic antagonists[J]. *Eur J Pharmacol*, 1982,78(3): 255 - 261.

[3] KIM C, CHENG R, CORRIGALL WA, *et al*. Assay for methylnaltrexone in rat-brain regions and serum by high-performance liquid-chromatography with coulometric electrochemical detection [J]. *Chromatographia*, 1989,28(7): 359 - 363.

[4] FOSS JF, O'CONNOR MF, YUAN CS, *et al*. Safety and tolerance of methylnaltrexone in healthy humans: a randomized, placebo-controlled, intravenous, ascending-dose, pharmacokinetic study [J]. *J Clin Pharmacol*, 1997,37(1): 25 - 30.

[5] YU LF, LU WG, XIANG P, *et al*. Enhancing oral bioavailability of methylnaltrexone using an emulsionformulation[J]. *Lett Drug Des Discov*, 2011, 8(1): 87 - 92.

[6] OSWALD S, SCHUMACHER G, SIEGMUND W. Quantitative determination of methylnaltrexone in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 56(5): 1079 - 1084.

[7] NUNEZ O, MOYANO E, GALCERAN MT. Determination of quaternary ammonium biocides by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1058(1 - 2): 89 - 95.

[8] YUAN CS, WEI G, FOSS JF, *et al*. Effects of subcutaneous methylnaltrexone on morphine-induced peripherally mediated side effects: a double-blind randomized placebo-controlled trial[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 300(1): 118 - 123.

[9] U.S. Food and Drug Administration. Relistor (methylnaltrexone bromide) prescibing information[EB/OL]. (2008 - 04 - 24). https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2008/021964s000_ClinPharmR.pdf.

编辑:王宇梅/接受日期:2020 - 08 - 10