

盐酸美金刚在健康人体中的药代动力学研究

刘洋¹, 魏敏杰², 刘明妍², 吴慧哲², 冯婉玉^{1*}

(1. 中国医科大学附属第一医院临床药理教研室, 沈阳 110001; 2 中国医科大学药学院药理教研室, 沈阳 110001)

摘要 目的: 建立 LC-MS 法测定人血浆中盐酸美金刚浓度, 研究盐酸美金刚在健康人体的药代动力学。方法: 30 名健康受试者分别服用受试制剂盐酸美金刚片 5, 10, 20 mg 用 LC/MS 法测定血药浓度, 计算药代动力学参数。结果: 口服盐酸美金刚片 5, 10, 20 mg 后主要药代动力学参数: $C_{\max}$ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 分别为 6.20 ± 0.75 , 11.60 ± 1.95 , 25.34 ± 8.34 , $t_{1/2}$ (h) 分别为 66.86 ± 11.75 , 63.57 ± 12.58 , 62.06 ± 9.26 , $T_{\max}$ (h) 分别为 5.70 ± 1.64 , 6.00 ± 1.33 , 6.89 ± 1.41 , MRT (h) 分别为 99.37 ± 16.96 , 91.73 ± 18.16 , 89.56 ± 13.77 , AUC_{0-t} ($\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$) 分别为 486.19 ± 80.00 , 889.32 ± 239.49 , 1772.91 ± 784.07 , $\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$) 分别为 540.05 ± 89.68 , 932.07 ± 230.82 , 1853.29 ± 776.85 。结论: 建立的 LC-MS 方法适合于盐酸美金刚的临床研究。

关键词: 盐酸美金刚; 液相-质谱联用; 药代动力学

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)04-0547-04

Pharmacokinetics research of memantine hydrochloride in healthy volunteers

LIU Yang¹, WEI Min-jie², LIU Ming-yan², WU Hui-zhe², FENG Wan-yu^{1*}

(1. Clinical Pharmacology Laboratory, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

2. Pharmacology Laboratory, Pharmacy College of China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract Objective To set up LC-MS method to measure concentration of memantine hydrochloride in human plasma and study pharmacokinetics of memantine hydrochloride in healthy volunteers. **Methods** After 30 healthy volunteers administered respectively 5 mg, 10 mg, 20 mg of memantine hydrochloride tablets, measure concentration of memantine hydrochloride in human plasma by LC-MS method, and evaluate pharmacokinetic parameters. **Results** The main pharmacokinetic parameters of 5 mg, 10 mg, 20 mg of memantine hydrochloride were as follow: $C_{\max}$ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) were 6.20 ± 0.75 , 11.60 ± 1.95 , 25.34 ± 8.34 ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$); $t_{1/2}$ (h) were 66.86 ± 11.75 , 63.57 ± 12.58 , 62.06 ± 9.26 ; $T_{\max}$ (h) were 5.70 ± 1.64 , 6.00 ± 1.33 , 6.89 ± 1.41 ; MRT (h) were 99.37 ± 16.96 , 91.73 ± 18.16 , 89.56 ± 13.77 ; AUC_{0-t} ($\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$) were 486.19 ± 80.00 , 889.32 ± 239.49 , 1772.91 ± 784.07 ; $\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$) were 540.05 ± 89.68 , 932.07 ± 230.82 , 1853.29 ± 776.85 , respectively. **Conclusion** LC-MS method suit to clinical research of memantine hydrochloride.

Key words memantine hydrochloride; LC-MS; pharmacokinetics

盐酸美金刚 (memantine hydrochloride) 化学名是 1-氨基-3,5-二甲基-金刚烷盐酸盐^[1]。其为 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体拮抗剂^[2,3], 与 NMDA 受体有低、中度亲和性^[4], 可以有效调控兴奋性递质, 减缓神经退化过程, 用于治疗中重度阿尔茨海默病^[5]。目前尚未见国内有关 LC-MS 对盐酸美金刚药代动力学研究的报道。为此, 本文建立了一种简单、灵敏、快捷、准确的 LC-MS 方

法, 研究盐酸美金刚在健康人体的药代动力学。

1 仪器与试剂

LC-MS 系统: LC-10AT_{vp} 泵、2010EV 型单重四极杆质谱仪、LC-MS Solution 3.0 (均为日本岛津公司); CAY-1 型液体快速混合器 (北京长安仪器厂); WM-2H 型无油压缩机 (天津医疗仪器厂); TDL-40B 和 TGL-16C 型离心机 (上海安亭科学仪器厂); TG-328A 分析天平 (上海天平仪器厂)。

* 通讯作者 Tel: (024) 83282155 E-mail: Fengwanyu2000@yahoo.com.cn

受试制剂盐酸美金刚片(规格: $5\text{ mg}\cdot\text{片}^{-1}$, 上海信谊九福药业有限公司, 批号: 050201); 盐酸美金刚对照品(纯度 99.6%, 上海信谊九福药业有限公司); 盐酸金刚烷胺对照品(批号: 100426-200301, 中国药品生物制品检定所)。甲醇和甲酸均为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 实验用水为重蒸馏水。

2 受试对象

男女健康受试者各 15 名, 年龄分别为 (21.9 ± 1.06) 和 (21 ± 1.97) 岁, 体重 (64.9 ± 7.68) 和 (59.6 ± 4.57) kg 身高 (173.3 ± 5.56) 和 (164.9 ± 4.91) cm; 血尿常规、肝肾功能及心电图等指标均正常。受试者实验前 2 周及实验期间禁烟、酒及含药物、乙醇的饮料等。本研究经本院医学伦理委员会批准。签署知情同意书。

3 给药方案与血样采集

本研究采用单剂量、开放、随机、平行试验设计。30 名受试者随机分为 3 组, 每组男女各半。禁食 10 h 后, 分别服用受试制剂盐酸美金刚片 5、10、20 mg 用 250 mL 温开水送服。服药后 4 h 和 9 h 后可进食统一的标准餐。

在服药前 (0 h) 和服药后 1.0、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、12.0、24.0、72.0、144.0、240.0、360.0 h 取前臂静脉血 3~5 mL, 置于肝素处理的离心管中, 混匀, $5000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 分离血浆, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测。

4 实验方法

4.1 色谱和质谱条件

4.1.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil C_{18} ($150\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$), 保护柱: C_{18} ($10\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$); 流动相: 甲醇-0.2% 甲酸水溶液 (56:44, v/v); 流速: $0.8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温: 室温; 进样量 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。

4.1.2 质谱条件 检测方式: 正离子方式检测; 离子源: 大气压化学电离源; 接口温度: $400\text{ }^{\circ}\text{C}$; CDL 温度: $250\text{ }^{\circ}\text{C}$; 加热块温度: $200\text{ }^{\circ}\text{C}$; 雾化气流速: $2.5\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; 干燥气流速: $2.0\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测电压: 1.6 kV ; 扫描方式: 选择离子检测 (SM); 美金刚的 m/z : 180.10 金刚烷胺的 m/z 152.10。

4.2 溶液制备

4.2.1 对照品溶液 精密称取对照品盐酸美金刚 12.1 mg 以甲醇-水 (50:50) 配成 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液, 再用甲醇-水稀释储备液得到相应浓度的工作液, 冰箱 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) 内保存备用。

4.2.2 内标溶液 精密称取内标盐酸金刚烷胺 12.4 mg 以甲醇配成 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液, 再用甲

醇-水稀释储备液得到 $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的工作液, 冰箱 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) 内保存备用。

4.3 样品处理 取血浆 $1000\text{ }\mu\text{L}$, 依次加入甲醇-水 (50:50, v/v) $100\text{ }\mu\text{L}$, 内标溶液 $50\text{ }\mu\text{L}$, $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 $200\text{ }\mu\text{L}$, 涡旋混合 1 min, 加入乙醚 4 mL , 涡旋混合 3 min, 离心 ($4000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 5 min 取上清液置另一试管中, 空气流下吹干, 残渣加流动相 $100\text{ }\mu\text{L}$ 溶解, 超声 1 min, 涡旋 1 min, $12000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 取上清液 $20\text{ }\mu\text{L}$ 进样。

4.4 专属性 在试验条件下, 美金刚和金刚烷胺 (内标物) 峰形良好, 分离完全, 其保留时间分别为 5.0 min 和 2.6 min。色谱图见图 1, 质谱图见图 2。

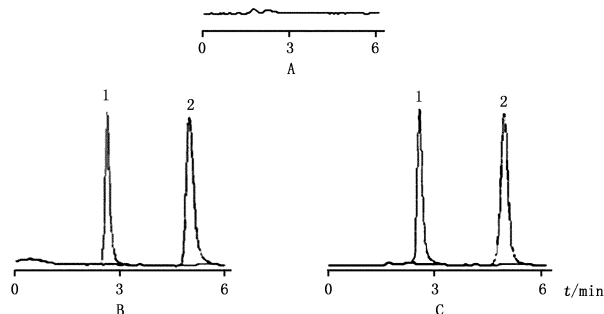


图 1 方法专属性试验 LC-MS 总离子流图

Fig 1 LC-MS chromatograms of method specificity test

A 空白血浆 (blank plasma) B 空白血浆 + 美金刚 + 金刚烷胺 (Blank plasma + mefenamine + adamantanamine) C. 受试者口服盐酸美金刚 6 h 后的血浆样品 (A serum extraction from a subject 6.0 h after an oral of mefenamine)

1. 美金刚 (mefenamine) 2. 金刚烷胺 (adamantanamine)

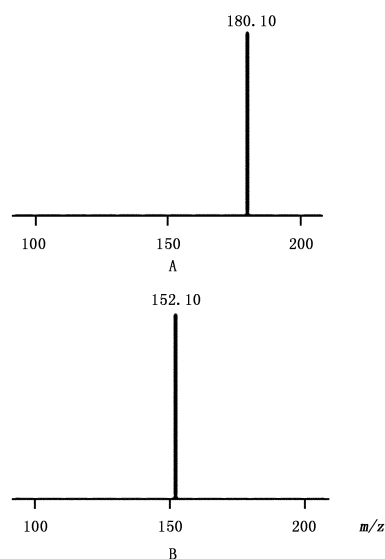


图 2 方法专属性试验 LC-MS 质谱图

Fig 2 LC-MS mass-spectrograms of method specificity test

A 美金刚 (mefenamine) B. 金刚烷胺 (adamantanamine)

4.5 标准曲线制备 取空白血浆 1000 μL , 加美金刚对照品溶液 100 μL , 制成相当于美金刚浓度为 0.2 0.4 1 5 20 100 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品血浆, 按“样品处理”项下方法处理进样, 以美金刚血药浓度为横坐标, 美金刚与内标物金刚烷胺的峰面积比值为纵坐标作图, 用加权最小 ($w = 1/k^2$) 二乘法^[6]进行回归运算, 求得回归方程为:

$$Y = 6.52 \times 10^3 C + 3.9 \times 10^4 \quad r = \sqrt{0.9982}$$

最低定量限为 0.2 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

4.6 提取回收率 取空白血浆 1000 μL , 配制浓度分别为 0.4 20 180 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 QC 样品, 按“样品处理”项下方法处理进样, 将测得结果与相应浓度对照品溶液测得结果相比较, 见表 1。

表 1 血浆样品中美金刚和内标物(金刚烷胺)的提取回收率

Tab 1 Extraction recovery of m enantine and internal standard substance(adamantanamine) in plasma sample

化合物 (compound)	C /ng* mL ⁻¹	提取回收率(extraction recovery) $\pm$ SD %	RSD %
美金刚(m enantine)	0.4	78.9 $\pm$ 5.70	7.2
	20	81.5 $\pm$ 6.94	8.5
	180	82.0 $\pm$ 5.60	6.8
金刚烷胺(adamantanamine)	100	83.7 $\pm$ 7.25	8.7

4.7 方法精密度与准确度 取空白血浆 1000 μL , 配制浓度分别为 0.4 20 180 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 QC 样品, 按“样品处理”项下方法处理进样, 连续测定 3d 计算日内和日间精密度及准确度, 结果见表 2。

表 2 LC-MS法测定美金刚血浆药物浓度的精密度及准确度试验结果

Tab 2 Precision and accuracy of m enantine hydrochloride in human plasma by LC-MS

C /ng* mL ⁻¹	日内(intra- day)		日间(inter- day)		准确度 (accuracy) %
	C /	RSD	C /	RSD	
	ng* mL ⁻¹	%	ng* mL ⁻¹	%	
0.4	0.38 $\pm$ 0.03	8.0	0.40 $\pm$ 0.03	11.3	100 $\pm$ 0.03
20	19.83 $\pm$ 1.00	6.8	20.32 $\pm$ 1.64	14.4	101.6 $\pm$ 1.64
180	173.68 $\pm$ 13.18	5.8	172.70 $\pm$ 9.38	1.3	95.9 $\pm$ 9.38

4.8 稳定性考察 按“4.5”项下方法配制浓度分别为 0.4 20 180 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 QC 样品, 分别于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存 7 14 45 d 及常温放置 6 12 24 h 后测定, 考察其稳定性。结果表明, 美金刚血浆在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存 45 d 及常温下放置 24 h 均稳定。

4.9 数据处理 数据用 DAS 2.0 程序处理, 求算药代动力学参数。 T_{max} 和 C_{max} 采用实测值, 采用梯形法分别计算 AUC_{0-t} 值和 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 值, 以半对数作图法, 由消除相的浓度点分别计算 k_e 和 $t_{1/2}$, 采用方差分析和线性回归法, 考察各剂量组健康受试者的主要

药代动力学参数(如 AUC 值、 $t_{1/2}$ 、 T_{max} 、 C_{max})与剂量的关系, 以及性别是否影响主要药代动力学参数。

5 结果

5.1 血药浓度 - 时间曲线及药代动力学参数 30 名健康受试者分别单次口服受试制剂盐酸美金刚片 5 10 20 mg 后的平均血浆药物浓度 - 时间曲线, 见图 3 主要药代动力学参数, 见表 3。

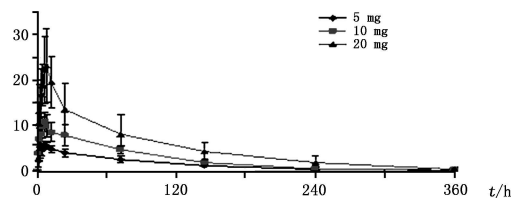


图 3 30 名健康受试者分别单次口服受试制剂盐酸美金刚片 5 10 20 mg 后的平均血浆药物浓度 - 时间曲线

Fig 3 Mean plasma concentration- time curves of 30 healthy volunteers adm inistrating respectively 5, 10, 20 mg of m enantine hydrochloride tablets

表 3 30 名健康受试者分别单次口服受试制剂盐酸美金刚片 5 10 20 mg 后的主要药代动力学参数

Tab 3 Main pharmacokinetic parameter of 30 healthy volunteers adm inistrating respectively 5 10 20 mg of m enantine hydrochloric tablets

参数 (parameter)	低剂量组 (low- group)	中剂量组 (middle- group)	高剂量组 (high- group)
$T_{\text{max}} / \text{h}$	5.70 $\pm$ 1.64	6.00 $\pm$ 1.33	6.89 $\pm$ 1.41
$C_{\text{max}} / \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	6.20 $\pm$ 0.75	11.6 $\pm$ 1.95	25.34 $\pm$ 8.34
$\text{AUC}_{0-t} / \text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	486.19 $\pm$ 80.00	889.32 $\pm$ 239.49	1772.91 $\pm$ 784.07
$\text{AUC}_{0-\infty} / \text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	540.05 $\pm$ 89.68	932.07 $\pm$ 230.82	1853.29 $\pm$ 776.85
$t_{1/2} / \text{h}$	66.86 $\pm$ 11.75	63.57 $\pm$ 12.58	62.06 $\pm$ 9.26
MRT / h	99.37 $\pm$ 16.96	91.73 $\pm$ 18.16	89.56 $\pm$ 13.77

5.2 方差分析结果 采用方差分析和线性回归法, 对低、中、高剂量组健康受试者主要药代动力学参数分别进行检验分析, 结果见表 4、表 5。

表 4 低、中、高剂量组健康受试者分别单次口服受试制剂盐酸美金刚片后主要药代动力学参数比较的方差分析结果

Tab 4 ANOVA result of main pharmacokinetic parameter after health volunteers of low, middle and high doses adm inistrate respectively m enantine hydrochloride tablets

参数 (parameter)	F	P
$t_{1/2}$	0.947	0.401
MRT	0.941	0.403
T_{max}	1.631	0.215
C_{max}	37.588	0.000
AUC_{0-t}	18.206	0.000
$\text{AUC}_{0-\infty}$	19.485	0.000

表 5 低、中、高剂量组男性与女性健康受试者分别单次口服受试制剂盐酸美金刚片后主要药动学参数比较的方差分析结果

Tab 5 ANOVA result of main pharmacokinetic parameter after male and female health volunteers of low middle and high doses adm inistrate respectively m emantine hydroch bride tablets

参数 (parameter)	低剂量组 (low - group)		中剂量组 (m iddle- group)		高剂量组 (high- group)	
	F	P	F	P	F	P
$t_{1/2}$	0.235	0.641	0.012	0.917	0.161	0.700
C_{max}	1.385	0.273	0.039	0.848	0.073	0.795
T_{max}	0.310	0.593	0.889	0.373	0.037	0.853
AUC_{0-t}	0.004	0.952	0.032	0.862	0.098	0.763
$AUC_{0-\infty}$	0.023	0.884	0.017	0.900	0.157	0.704

6 讨论

关于血浆中美金刚药物浓度的测定方法国内外报道不多。本实验采用 LC MS法测定血浆中美金刚的药物浓度,与 HPLC法相比较本法灵敏度高,专属性强,重现性好;选择甲醇 - 0.2% 甲酸水溶液 (56:44 v/v)为流动相,配制简单,经济可行,且分离效果良好。

30名健康受试者 (男女各半)分别口服低、中、高 3个剂量美金刚后,其消除半衰期 ($t_{1/2}$),达峰时间 (T_{max})和体内平均滞留时间 (MRT)三者相近, AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ 和 C_{max} 均与剂量呈良好的线性关系 ($r > 0.99$);上述结果提示在 5~ 20 mg剂量范围内,美金刚在健康受试者体内呈线性药代动力学特征,且性别差异不影响美金刚在体内的药代动力学过程。

参考文献

1 GUO Fang- fang(郭芳芳), ZHU Zhu(朱珠). New drug of treating Alzheimer disease- m emantine(治疗阿尔茨海默病新药 - 美金

刚). *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2006 41(23): 1837
2 LUO Jing- jing(罗京京), HE Ling(何玲), LIU Guo- qing(刘国卿). New drug of treating Alzheimer disease- m emantine hydrochloric (治疗阿尔茨海默病新药盐酸美金刚). *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2006 15(9): 742
3 Koerber Martin J Patrick M Hughes Wilson CIG, et al Development of a liquid chromatography- mass spectrometric method for measuring the binding of memantine to different mechanisms *J Chromatogr B*, 2003 787: 313
4 DENG Yu- lei(邓钰蕾), CHEN Sheng- di(陈生弟). Memantine - new drug of treating Alzheimer disease(美金刚 - 阿尔茨海默病治疗新药). *World Clin Drugs* (世界临床药物), 2005 26(9): 541
5 SHENG Zhu- mei(盛竹梅), YU Zai- lin(于在林). Aphrenia drug of treating middle and heavy Alzheimer disease- m emantine hydrochloric(治疗中至重度阿尔茨海默病型痴呆药 - 盐酸美金刚). *World Clin Drugs* (世界临床药物), 2004 25(7): 442
6 ZHONG Da- fang(钟大放). Several problems of setting up biological assay standard curve by weighting least square method (以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1996 16(5): 343

(本文于 2008年 4月 8日收到)