

LC-MS/MS 法测定人血浆中加巴喷丁的浓度及其药动学研究

熊志立, 俞 嘉, 何积芬, 秦 峰, 李发美*

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 建立液相色谱串联质谱 (LC-MS/MS) 法测定人血浆中加巴喷丁的浓度并将其应用于人体药动学研究。取血浆样品经甲醇沉淀蛋白后, 以甲醇-0.2% 甲酸水溶液 (80 : 20) 为流动相, 用 Inertsil ODS-3 C₁₈ 柱 (50 mm × 2.1 mm ID, 3 μm) 分离, 采用电喷雾离子源, 以多反应监测 (MRM) 方式进行正离子检测, 定量分析的离子反应分别为 m/z 172 → m/z 154 (加巴喷丁) 和 m/z 130 → m/z 71 (内标二甲双胍)。加巴喷丁线性范围为 40.8~8.16 × 10³ ng·mL⁻¹, 定量限为 40.8 ng·mL⁻¹, 每个样品测试时间仅 2.2 min, 日内、日间精密度 (RSD) 均小于 12%, 准确度 (RE) 在 ±6.4% 范围内。应用此法研究了 20 名健康志愿者单剂量口服加巴喷丁胶囊 600 mg 后的药动学特点。该方法快速、专属、灵敏、适用性强, 可应用于加巴喷丁的人体药动学研究。

关键词: 加巴喷丁; 液相色谱串联质谱法; 药动学研究

中图分类号: R969

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 10-1246-05

LC-MS/MS method for quantification and pharmacokinetic study of gabapentin in human plasma

XIONG Zhi-li, YU Jia, HE Ji-fen, QIN Feng, LI Fa-mei*

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: A sensitive, rapid and specific liquid chromatographic-tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) method for quantification of gabapentin in human plasma has been developed. After a single plasma protein precipitation with methanol, gabapentin and metformin (internal standard) were chromatographed on a Inertsil ODS-3 column (50 mm × 2.1 mm ID, 3 μm) with mobile phase consisting of methanol-0.2% formic acid aqueous solution (80 : 20, v/v) at a flow-rate of 0.2 mL·min⁻¹. Electrospray ionization (ESI) source was applied and operated in the positive ion mode. Multiple reaction monitoring (MRM) mode with the transitions of m/z 172 → m/z 154 and m/z 130 → m/z 71 were used to quantify gabapentin and metformin, respectively. The run time was 2.2 min. The linear calibration curve was obtained in the concentration range of 40.8~8.16×10³ ng·mL⁻¹. The lower limit of quantification was 40.8 ng·mL⁻¹. The intra- and inter-day precision (RSD) was less than 12%, and the accuracy (RE) was within ±6.4% calculated from quality control (QC) samples. The method was used to determine the concentration of gabapentin in human plasma after a single oral administration of 600 mg gabapentin capsule to 20 healthy male Chinese volunteers. The method was proved to be selective, sensitive, rapid and suitable for pharmacokinetic study of gabapentin in human plasma.

Key words: gabapentin; LC-MS/MS; pharmacokinetic study

收稿日期: 2011-04-12.

基金项目: 重大新药创新综合平台临床前药物代谢动力学技术与平台项目 (2009ZX09301-012).

*通讯作者 Tel /Fax: 86-24-23986289, E-mail: lifamei@syphu.edu.cn

加巴喷丁 (gabapentin, GBP) 化学名为 1-(氨基)-环己烷乙酸, 是一种化学结构类似于神经递质 γ -氨基丁酸 (GABA)、具有多晶型结构^[1]的新型抗癫痫药。有研究^[2, 3]表明, GBP 能够穿过血脑屏障, 可以增加 GABA 在癫痫患者脑中的水平, 可抑制癫痫发作。癫痫患者服用加巴喷丁后, 药理作用来自于其原形药物的活性, 其在循环中大部分不与血浆蛋白结合并主要以原形药物形式通过肾脏排泄从全身循环系统中消除。

文献报道测定血浆样品中加巴喷丁的方法主要为 LC-FD 法^[4-6]、LC-UV 法^[7-10]和 LC-MS/MS 法^[11-15]。采用荧光或紫外检测器时, 样品处理及衍生化过程较为复杂, 并且每一样品的分析时间较长 (均大于 7 min)。国内相关的研究报道较少^[4, 15], 其中 Liu 等^[15]采用液相色谱串联质谱法测定人血清中加巴喷丁的含量, 但未做相关药动力学研究。本文旨在建立专属、灵敏、快速的液相色谱串联质谱法测定人血浆中加巴喷丁的浓度, 样品经过一步沉淀蛋白处理, 操作简便快速, 分析时间短, 其定量下限为 $40.8 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 并将其用于加巴喷丁胶囊的人体药动力学研究。

材料与方法

仪器 美国 Waters 公司超高效液相色谱仪; 美国 Waters 公司三重四极杆串联质谱仪, 配备电喷雾离子源 (ESI 源) 以及 Masslynx 4.1 数据采集软件。

药品与试剂 加巴喷丁 (含量 99.7%, 100 mg, 批号 20080102) 由江苏恩华药业股份有限公司提供; 内标盐酸二甲双胍对照品 (含量 96.8%, 50 mg, 批号 100666-299501) 购自中国药品生物制品鉴定所; 加巴喷丁胶囊 (含加巴喷丁 100 mg, 批号 20090119) 由江苏恩华药业股份有限公司提供; 甲醇为 TEDIA 公司的色谱纯试剂; 空白血浆由中国人民解放军第 210 医院提供。

色谱条件 色谱柱为 Inertsil® ODS-3 柱 (50 mm × 2.1 mm ID, 3 μm , Dikma 公司); 流动相为甲醇-0.2% 甲酸水溶液 (80 : 20, v/v); 流速为 $0.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温为 25°C ; 进样量为 $5 \mu\text{L}$ 。

质谱条件 离子源: ESI 源; 检测方式: 正离子检测; 扫描方式: 多反应监测 (MRM) 方式, 定量分析时的离子反应分别为 m/z 172 $\rightarrow$ m/z 154 (加巴喷丁) 和 m/z 130 $\rightarrow$ m/z 71 (内标二甲双胍), 扫描时间为 0.10 s; 毛细管电压: 2.0 kV; 锥孔电压: 25 V; 去溶剂气: N_2 ; 去溶剂气温度: 450°C ; 源温度: 110°C ; 去溶

剂气流速: $500 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$; 锥孔气流速: $50 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$; 碰撞气 (Ar) 压力: 0.25 Pa; 碰撞诱导解离 (CID) 电压为 14 eV (加巴喷丁) 和 25 eV (内标二甲双胍)。

对照品溶液配制 加巴喷丁和内标用甲醇配成分别为 $408 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $121 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的贮备液, 于 4°C 保存。将 $408 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 贮备液用 50% 甲醇配成加巴喷丁质量浓度为 0.204、0.408、1.02、2.04、4.08、10.2、20.4 和 $40.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。用 50% 甲醇配成质量浓度为 $2.42 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标溶液。

血浆样品处理 取待测血浆 100 μL , 置 2.0 mL 塑料离心管中, 依次加入甲醇-水 (1 : 1) 混合溶液 20 μL , $2.42 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 二甲双胍溶液 20 μL , 涡旋 30 s, 再加入甲醇 300 μL , 涡旋 60 s, 离心 10 min ($12\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$), 上清液用 0.22 μm 滤膜过滤, 取续滤液 5 μL 进样, 进行 LC-MS/MS 分析。

药动力学应用 加巴喷丁临床药动力学研究试验在中国人民解放军第 210 医院进行, 试验方案在受试者签署知情同意后, 经独立伦理委员会批准。20 名男性健康志愿受试者单剂量口服加巴喷丁胶囊 600 mg, 于服药前和服药后 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0、10.0、12.0 和 24.0 h 由肘静脉取血 5 mL, 置肝素处理的离心试管中, 离心 15 min ($3\,500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$), 分离血浆, 存于 -20°C 中冷冻待测。临床实际血浆样品测定按“血浆样品处理”方法项下操作, 每天建立 1 条标准曲线, 同时制备低、中、高 (多样本) 浓度的质控 (QC) 样品, 根据当日标准曲线求算未知临床样品浓度和 QC 样品浓度, 决定当日数据取舍。至少 67% QC 样品的相对偏差在 $\pm 15\%$ 以内, 且 33% 的不是同一浓度的 QC 样品相对偏差可以超过 $\pm 15\%$, 当日数据方可接受。

结果

1 质谱分析

在上述的质谱条件下, 加巴喷丁和内标二甲双胍主要生成 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 准分子离子峰, 分别为 m/z 172 和 m/z 130。选择性对 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 进行 MS^2 产物离子全扫描质谱分析 (图 1), 加巴喷丁和内标二甲双胍的主要碎片离子分别为 m/z 154 和 m/z 71, 将其作为多反应监测 (MRM) 扫描时的产物离子。

2 方法学考察

2.1 专属性试验 分别取 6 名受试者空白血浆考察方法的专属性, 结果表明, 空白血浆中的内源性物质不干扰加巴喷丁及内标物的测定。空白血浆、加药血

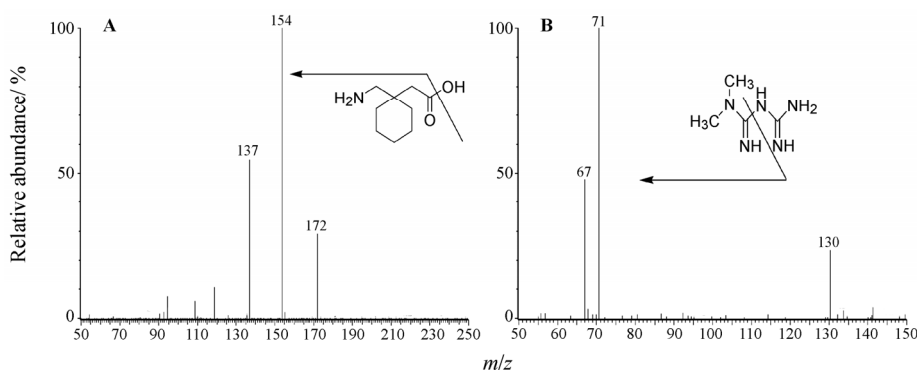


Figure 1 Product ion spectra of $[M+H]^+$ of gabapentin (A) and metformin (B, IS)

浆及健康受试者给药后血浆样品色谱见图 2。加巴喷丁保留时间为 1.5 min, 内标的保留时间为 1.4 min。

2.2 标准曲线和定量限 取空白血浆 100 μL , 置 2.0 mL 塑料离心管中, 加入加巴喷丁系列溶液 20 μL , 配制相当于加巴喷丁质量浓度为 40.8、81.6、204、408、816、 2.04×10^3 、 4.08×10^3 和 8.16×10^3 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的血浆样品, 除不加甲醇-水 (1:1) 混合溶液外, 按“血浆样品处理”项下依法操作, 每一浓度进行双样本分析, 进样 5 μL , 记录色谱图; 以血浆中加巴喷丁的浓度为横坐标, 以加巴喷丁与内标的峰面积比值为纵坐标, 用加权最小二乘法 ($W=1/x^2$) 进行回归计算, 求得加巴喷丁标准曲线, 典型回归方程为: $Y = 1.06 \times 10^{-2} X + 2.55 \times 10^{-1}$ ($r = 0.9945$), 线性范围为 $40.8 \sim 8.16 \times 10^3$ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 定量限浓度为 40.8 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 精密度与准确度 取空白血浆 100 μL , 按“标准曲线和定量限”项下方法制备加巴喷丁定量限 ($40.8 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和低、中、高浓度 (质量浓度分别为 61.6、616 和 6.16×10^3 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 QC 样品, 每个浓度进行 6 样本分析, 连续测定 3 天, 并与标准曲线同时进行。以当日的标准曲线计算 QC 样品的浓度, 将 QC 样品的结果进行方差分析, 求算本法的准确度与精密度, 结果见表 1。

Table 1 Accuracy and precision of the method ($n = 18$)

Concentration/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$		RSD/%		Relative error/%
Added	Found	Within-day	Between-day	
40.8	38.4	12	6.9	-5.9
61.6	62.2	8.9	11	0.9
616	586	5.7	12	-4.9
6.16×10^3	5.77×10^3	5.2	11	-6.4

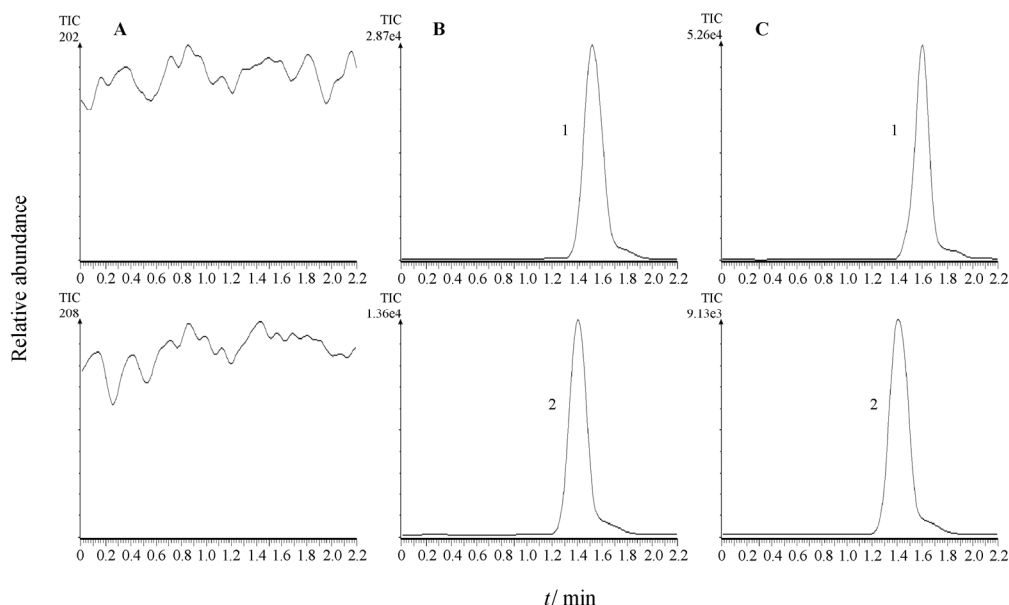


Figure 2 Typical MRM chromatograms of gabapentin and metformin (IS) in human plasma. (A) Blank plasma; (B) Blank plasma spiked with $204 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ gabapentin and internal standard; (C) plasma at 0.5 hours after an oral dose of 600 mg gabapentin capsules. Peak 1: Gabapentin; Peak 2: IS

2.4 提取回收率与基质效应 考察了加巴喷丁低、中、高 3 个浓度下的提取回收率 ($n=6$), 以加巴喷丁和内标血浆样品按“血浆样品处理”项下依法操作后所得峰面积, 与空白血浆沉淀蛋白后上清液加入相应浓度的加巴喷丁和内标溶液获得的峰面积之比, 计算提取回收率。经测定加巴喷丁在 61.6, 616 和 $6.16 \times 10^3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 三个质量浓度下的血浆样品平均提取回收率分别为 $84.7\% \pm 5.4\%$, $92.3\% \pm 5.3\%$ 和 $85.7\% \pm 3.7\%$, 内标的平均提取回收率为 $81.9\% \pm 6.5\%$ 。

取空白血浆经沉淀蛋白后, 上清液加入低、中、高浓度的加巴喷丁溶液和内标溶液获得的峰面积, 与相同进样浓度的溶液直接进样获得的峰面积之比评价基质效应。经测定加巴喷丁在 61.6, 616 和 $6.16 \times 10^3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 三个质量浓度下的血浆样品基质效应分别为 $96.9\% \pm 5.1\%$, $100.8\% \pm 7.2\%$ 和 $90.7\% \pm 6.6\%$; 内标的基质效应为 $90.4\% \pm 5.1\%$ 。表明本方法可有效地避免人血浆中的基质效应。

2.5 稳定性考察 考察加巴喷丁低、中、高 3 个质量浓度血浆样品在不同保存条件下的稳定性 ($n=3$)。结果表明血浆样品室温下放置 4 h (RE 为 $-14\% \sim 12\%$)、预处理后 4°C 条件下放置 12 h (RE 为 $-13\% \sim 8.5\%$) 稳定性良好; QC 样品经 3 个冷冻-解冻循环可保持稳定 (RE 为 $-14\% \sim 1.9\%$); 样品在 -20°C 条件下可保持 3 个月稳定 (RE 为 $-12\% \sim 13\%$)。

3 药动力学研究

应用本文的分析方法, 测定 20 名男性健康志愿受试者单剂量口服 600 mg 加巴喷丁胶囊后各时间点血浆样品中的加巴喷丁浓度, 并将其用于人体药动力学研究。试验期间每天建立 1 条标准曲线, 同时制备低、中、高 (多样本) 浓度的质控 (QC) 样品, 根据当日标准曲线求算未知临床样品浓度和 QC 样品浓度 (RE 为 $-14\% \sim 15\%$), 获得平均血药浓度-时间曲线, 见图 3, 主要药动力学参数通过 Topfit 2.0 软件求得, 见表 2。

Table 2 The main pharmacokinetic parameters of gabapentin after a single oral administration of 600 mg gabapentin ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

Parameter	Gabapentin
$t_{1/2} / \text{h}$	5.04 ± 1.21
$t_{\max} / \text{h}$	3.25 ± 0.97
k_e / h^{-1}	0.147 ± 0.048
$C_{\max} / \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$3.61 \times 10^3 \pm 1.05 \times 10^3$
$\text{AUC}_{0-\infty} / \text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	$3.09 \times 10^4 \pm 1.17 \times 10^4$
$\text{AUC}_{0-t} / \text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	$2.93 \times 10^4 \pm 1.09 \times 10^4$

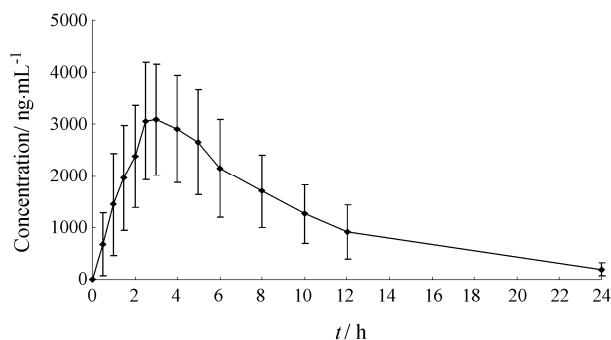


Figure 3 Plasma concentration-time curve of gabapentin in subjects after single oral dose of 600 mg gabapentin ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

讨论

为了获得较好的峰形和较短的分析时间以及较高的质谱响应以提高样品通量, 本实验对色谱条件进行了考察。甲醇作为有机相时, 待测物响应比使用乙腈时高; 分别选用甲酸和醋酸铵作为水相添加剂以提高待测物的离子化效率, 本实验考察了不同浓度的甲酸和醋酸铵, 选择 0.2% 甲酸时, 待测物的峰形较好且响应较高。继续对流动相中有机相和水相的比例进行考察, 最后确定甲醇-0.2% 甲酸水溶液 (80:20) 作为流动相, 一个样品的分析时间为 2.2 min, 较文献^[11, 13-15]方法更短。

由于加巴喷丁的极性较大, 没有合适的萃取溶剂能将其从血浆中萃取出来, 同时, 固相萃取方法成本较高^[9], LC-FD 法^[4-6]或 LC-UV 法^[7-10]分析加巴喷丁, 样品需经过衍生化处理, 过程较为复杂费时, 而采用 LC-MS/MS 法^[11-15], 样品处理多为简单的沉淀蛋白法。所以作者采用简单、快速、易操作的沉淀蛋白法处理血浆样品, 分别考察了甲醇和乙腈为沉淀试剂。甲醇作为沉淀试剂时加巴喷丁的响应较高, 并且和流动相匹配, 因此沉淀试剂被选定为甲醇。同时考察了血浆与甲醇体积比分别为 1:2、1:3 和 1:4 时沉淀的效果, 比例为 1:3 时效果最佳。

本文建立了 LC-MS/MS 法测定人血浆中加巴喷丁, 样品处理仅需一步沉淀蛋白, 操作简便快速, 定量下限为 $40.8 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每个样品分析时间仅需 2.2 min, 提高了样品通量。本方法分析速度快、专属性好、适用性强, 有良好的精密度及准确度, 适用于加巴喷丁的临床药动力学研究。

References

- [1] Yang L, Ru ML, Lang MD. The crystalline polymorph control and selection of gabapentin with polymer heteronuclei [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2010, 45: 109-113.

- [2] Chadwick D. Gabapentin [J]. *Lancet*, 1994, 343: 89–91.
- [3] Gidal BE, Radulovic LL, Kruger S, et al. Inter- and intra- subject variability in gabapentin absorption and absolute bioavailability [J]. *Epilepsy Res*, 2000, 40: 123–127.
- [4] Wang Z, Liu D, Gong PL, et al. Determination of gabapentin in human plasma by HPLC with fluorescent detection [J]. *China Pharm (中国药师)*, 2005, 8: 676–678.
- [5] Gauthier D, Gupta R. Determination of gabapentin in plasma by liquid chromatography with fluorescence detection after solid-phase extraction with a C18 column [J]. *Chin Chem*, 2002, 48: 2259–2261.
- [6] Chung TC, Tai CT, Wu HL. Simple and sensitive liquid chromatographic method with fluorimetric detection for the analysis of gabapentin in human plasma [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1119: 294–298.
- [7] Forrest G, Sills GJ, Leach JP, et al. Determination of gabapentin in plasma by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1996, 681: 421–425.
- [8] Zhu Z, Neirinck L. High-performance liquid chromatography method for the determination of gabapentin in human plasma [J]. *J Chromatogr B*, 2002, 779: 307–312.
- [9] Sagirli O, Cetin SM, Onal A. Determination of gabapentin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with UV-vis detection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 42: 618–624.
- [10] Jalalizadeh H, Souri E, Tehrani MB, et al. Validated HPLC method for the determination of gabapentin in human plasma using derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene and its application to a pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 854: 43–47.
- [11] Ifa DR, Falci M, Moraes ME, et al. Gabapentin quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. Application to bioequivalence study [J]. *J Mass Spectrom*, 2001, 36: 188–194.
- [12] Ramakrishna NVS, Vishwottam KN, Koteswara M, et al. Rapid quantification of gabapentin in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 40: 360–368.
- [13] Ji HY, Jeong DW, Kim YH, et al. Determination of gabapentin in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20: 2127–2132.
- [14] Park JH, Jhee OK, Park SH, et al. Validated LC-MS/MS method for quantification of gabapentin in human plasma: application to pharmacokinetic and bioequivalence studies in Korean volunteers [J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21: 829–835.
- [15] Liu GY, Jia JY, Liu HM, et al. Determination of gabapentin in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis [J]. *Pharm Care Res (药学服务与研究)*, 2011, 11: 42–44.