

使用 LCMS-8060 进行新剂型咖啡因片药代动力学研究

LCMSMS-448

摘要： 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 进行了一种新剂型咖啡因片的临床前动力学研究。使用普萘洛尔作为内标进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法标准曲线相关系数大于 0.997，方法准确度、重复性及残留比均可满足临床前研究需求。该方法操作简捷、特异性好、灵敏度高、分析速度快，可以为临床前咖啡因片药代动力学的研究提供借鉴和参考。

关键词： LCMS-8060 咖啡因片 药代动力学

咖啡因属于中枢系统兴奋药，具有抗疲劳作用，在我国属于精神二类药品，在美国属于 OTC 药物。目前，美国已上市常见咖啡因片尚未进口国内，国内也无同类药品上市。本项目中的新剂型咖啡因片已获得 NMPA 相关立项许可，目前进入处方验证阶段。本研

究使用岛津液相色谱三重四极杆质谱仪 LCMS-8060，建立了比格犬血浆中咖啡因的含量测定方法，并利用该方法，表征不同处方制剂的咖啡因片在比格犬体内的药物释放、吸收处置等动力学特征，以筛选优化制剂处方。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.93 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱：Kromasil 100-5 C18, 50×2.1 mm, 5 μm

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水；B 相 - 甲醇

流速：0.3 mL/min

柱温：40°C

进样量：5 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	泵	B.Conc	5
2.50	泵	B.Conc	95
3.00	泵	B.Conc	95
3.10	泵	B.Conc	5
5.00	控制器	Stop	

质谱条件：

分析仪器	: LCMS-8060	DL 温度	: 250°C
离子源	: ESI (+)	加热模块温度	: 400°C
雾化气流速	: 3.0 L/min	干燥气流速	: 10.0 L/min
加热气流速	: 10.0 L/min	扫描模式	: 多反应监测 (MRM)
接口温度	: 300°C	MRM 参数	: 见表 2

表 2 MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 PreBias (V)	CE(V)	Q1 PreBias (V)
咖啡因	195.1	138.3*	11	-15	16
		110.2	12	-19	11

* 表示定量离子

1.3 标准溶液配制及样品处理

咖啡因标准储备液制备: 精确称取咖啡因 20.0 mg, 加 1 mL 水涡旋溶解, 得到浓度为 20 mg/mL 标准储备液。

内标溶液配制: 使用甲醇配制浓度为 50 ng/mL 的普萘洛尔备用。

溶液标曲配制: 取上述储备液以甲醇逐级稀释, 制备系列标准溶液, 浓度分别为 0.2 µg/mL、0.5 µg/mL、2 µg/mL、5 µg/mL、20 µg/mL、50 µg/mL。同法配制浓度分别为 1 µg/mL、10 µg/mL、40 µg/mL 的 QC 溶液。

样品前处理: 取空白比格犬血浆 5 µL, 分别加入 5 µL 不同浓度的溶液标曲和 QC 溶液制作基质标曲和 QC。待测样品取血浆 5 µL, 加入 5 µL 空白甲醇混匀。所有样品分别加入 100 µL 的 50 ng/mL 普萘洛尔内标溶液, 涡旋振荡后, 14000 rpm 离心 10 min, 取 10 µL 上清加 90 µL 甲醇, 混匀, 置于进样瓶中上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品扫描质谱图

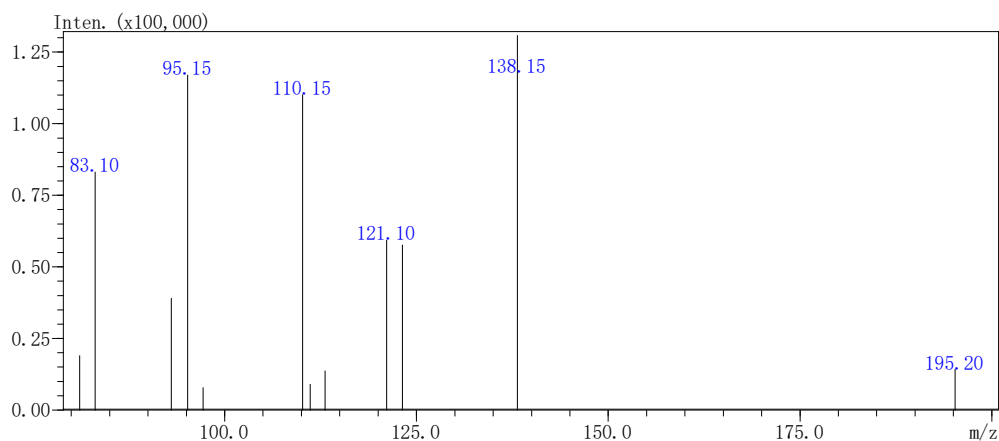


图 1 咖啡因的二级质谱扫描特征图谱

2.2 线性测定结果

按照上述 1.3 中方式进行基质标曲配制及前处理, 以血浆样品中咖啡因的检出峰面积与理论浓度进行线性拟合, 药物在比格犬血浆中的线性范围为 0.2-50 µg/mL, 经检测, 标准曲线相关系数为 0.997, 符合定量要求, 标准曲线及统计结果如下所示:

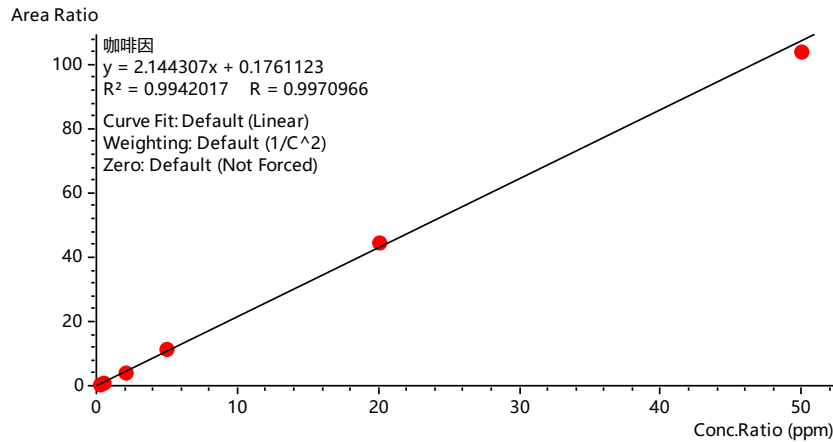


图 2 基质标曲图

表 3 标准曲线结果

编号	目标物	线性方程	线性范围 (µg/mL)	相关系数	准确度 (%)
1	咖啡因	$Y = (2.14431)X + (0.176112)$	0.2~50	0.997	88.4~107.5

2.3 重复性测定结果

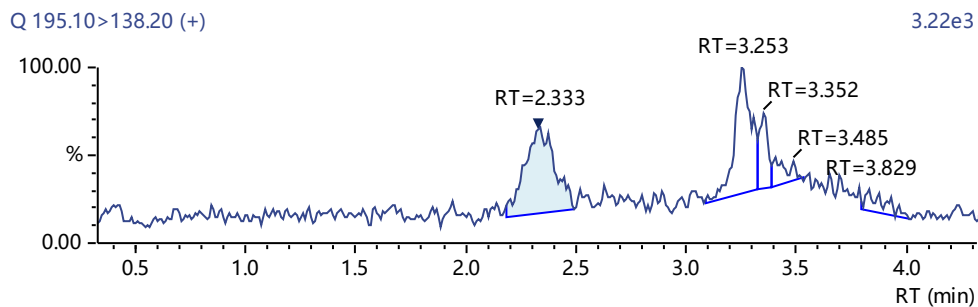
按 1.3 中的前处理方法对空白血浆添加低中高浓度标准品作为低中高浓度质控品，按 1.2 中的分析条件对质控品进行分析，每个样品平行制备 6 份，保留时间的 RSD% 在 0.09%-0.13% 之间，咖啡因与内标峰面积比的 RSD% 在 1.93%~2.54% 之间，满足测定需求。

表 4 重复性考察结果 (n=6)

名称	LQC (1 µg/mL) RSD(%)		MQC (10 µg/mL) RSD(%)		HQC (40 µg/mL) RSD(%)	
	保留时间	面积比	保留时间	面积比	保留时间	面积比
咖啡因	0.12	2.54	0.13	1.93	0.09	2.15

2.4 残留考察

根据药品非临床药代动力学研究指导规则要求，在 50 µg/mL 的样品分析完成后对空白样品进行分析考察残留对样品测定的影响。按照上述方法，样品经色谱分离后，比格犬血浆中咖啡因的保留时间约为 2.35 min，内标普萘洛尔的保留时间约为 2.67 min。残留考察空白血浆及实际样品色谱图见下图 3 与图 4，残留考察结果如表 5 所示。残留面积和定量下限 0.2 µg/mL 的面积比为 8.6%，小于药品非临床药代动力学研究指导规则不得过 20% 的要求。



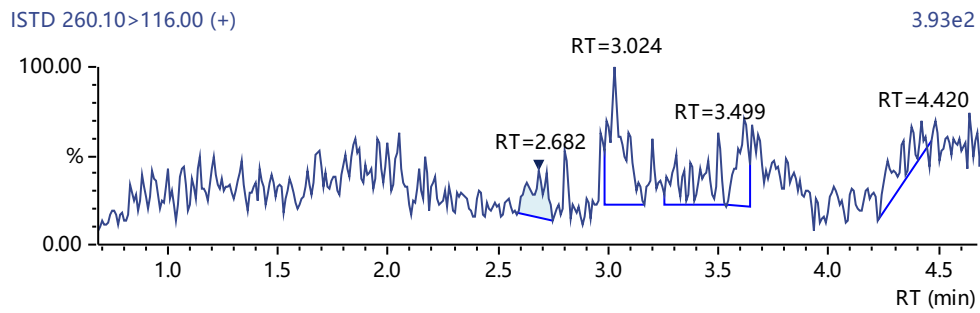


图3 比格犬残留考察空白血浆色谱图

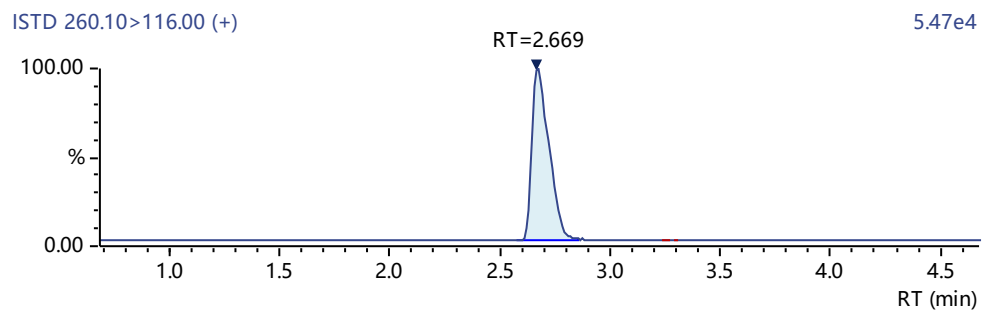
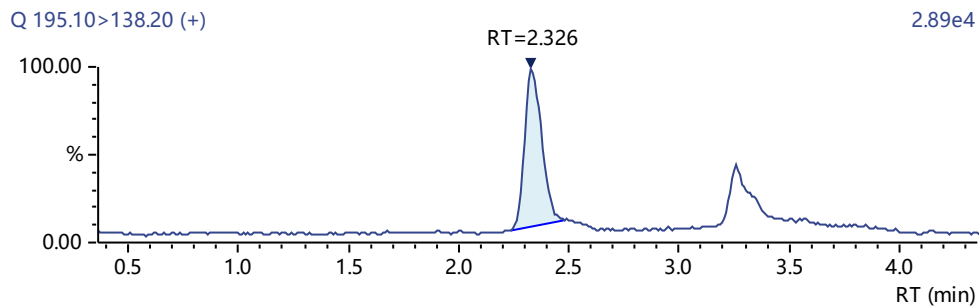


图4 比格犬血浆样品色谱图

表5 残留考察结果

样品名称	咖啡因面积	内标面积
空白	15299	559
定量下限	176902	293417
残留比 %	8.6	0.2

2.5 比格犬口服药物后体内药物动力学结果

比格犬口服咖啡因片参比制剂与两种受试制剂后，采集到的血浆样品按 1.3 进行前处理，并使用 LCMS-8060 对样本进行分析。经 WinNolin Ver. 6.3 软件对所测数据进行处理得到药代动力学主要参数见表 6，药-时曲线见图 5。综合图、表中数据分析可得，在相同剂量下，受试制剂与参比制剂在比格犬体内的药代动力学过程基本一致。

表 6 比格犬咖啡因灌胃给药后的主要药代动力学参数 (n=6)

Parameters	药代动力学参数 (Mean±SD)		
	参比制剂	受试制剂 -1	受试制剂 -2
t1/2 (h)	5.87±0.53	5.02±0.55	4.49±1.10
Tmax (h)	1.50±1.15	1.17±0.45	0.79±0.37
Cmax (µg/mL)	39.53±4.81	27.71±5.82	41.88±10.05
Cmax_D (µg*kg/mL/mg)	1.61±0.19	1.48±0.11	1.74±0.14
AUC _(0-t) (h*µg/mL)	329.91±64.58	190.94±29.93	312.98±63.76
AUC _{(0-t)_D} (h*µg*kg/mL/mg)	13.35±2.05	10.82±3.25	13.48±3.92
AUC _(0-∞) (h*µg/mL)	333.97±67.43	191.44±29.80	319.01±64.75
AUC _{(0-∞)_D_obs} (h*µg*kg/mL/mg)	13.50±2.10	10.85±3.26	13.73±3.89
MRT _(0-∞) (h)	8.03±1.69	7.62±1.74	6.62±1.56
MRT _(0-t) (h)	8.51±2.42	7.76±1.69	7.10±1.63

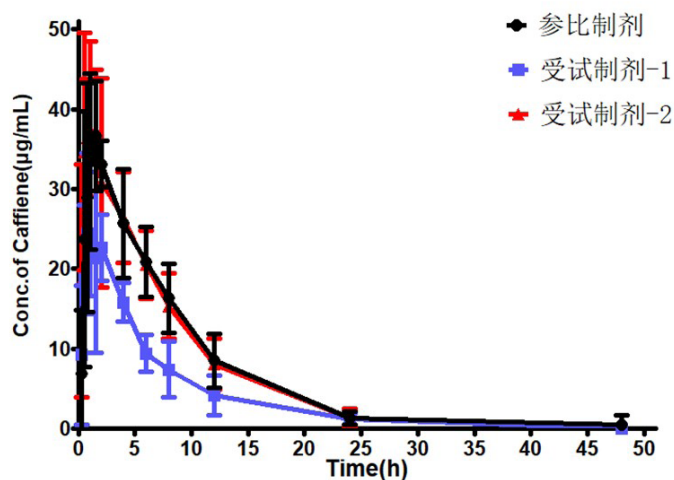


图 5 比格犬灌胃给药后咖啡因参比制剂和受试制剂的药 - 时曲线

■ 结论

使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 进行了一种新剂型咖啡因片的临床前动力学研究。使用普萘洛尔作为内标进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法标准曲线相关系数大于 0.997, 方法准确度、重复性及残留比均可满足临床前研究需求。使用该方法对新剂型咖啡因片进行了临床前动力学研究, 结果表明受试制剂与参比制剂在比格犬体内的药代动力学过程基本一致。

岛津应用云

