LC-MS/MS 测定人血浆中对乙酰氨基酚及其人体药动学和生物等效性研究

张君[1,2a]，胡少君[2a]，陆安欣[2b]，汤宁信[2b]，尾崎丽莎[2b]，周怡君[2b]，霍兆邦[2b]，林泰宁[2a]，庞博[3]，梁修雄[3]，王毅[1*]，左中[2a*](1.浙江大学药学院，杭州 310058；2.香港中文大学，a.医学院药剂学院，b.一期临床研究中心，中国香港 999077；3.幸福医药有限公司，中国香港 999077)

摘要：目的 建立一种快速、灵敏的高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)方法以测定人血浆中对乙酰氨基酚浓度，并应用于 2 种对乙酰氨基酚制剂的人体药动学和生物等效性研究。**方法** 以替硝唑为内标，200 μL 血浆样品经 1 mL 乙酸乙酯液液萃取，再经 Waters XBridge® C_{18} 柱等度洗脱分离后导入串联质谱，以正离子多反应监测模式进行定量分析，对乙酰氨基酚和内标的选择性反应离子对分别是 *m/z* 152.0→110.0 和 248.0→121.0。方法经验证后应用于 19 名健康受试者单剂量空腹口服 2 种对乙酰氨基酚制剂 500 mg 后药动学和生物等效性的研究。**结果** 血浆中对乙酰氨基酚在 0.1~8.0 μg·mL^{-1} 范围内线性良好(r^2>0.99)，最低检测限为 0.1 μg·mL^{-1}，提取回收率为 91.0%~98.7%，日内和日间准确度分别为 98.8%~111.3% (精密度≤9.0%)和 94.9%~102.6% (精密度≤10.7%)。生物等效性试验中，受试制剂与参比制剂的主要药代动力学参数 C_{max}、$AUC_{0-12\,h}$ 和 $AUC_{0-\infty}$ 几何均值比的 90%置信区间分别为 83.50%~105.79%，94.25%~101.54%和 93.24%~101.02%，均落在生物等效可接受标准的 80.00%~125.00%。**结论** 所建立测定人血浆中对乙酰氨基酚浓度的 LC-MS/MS 具有快速灵敏、回收率高、选择性好的特点，适用于对乙酰氨基酚片人体药动学和生物等效性研究。受试制剂与参比制剂在人体内吸收速度和程度相似，2 种制剂生物等效。

关键词：对乙酰氨基酚；LC-MS/MS；人血浆；药动学；生物等效性

中图分类号：R917　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1007-7693(2020)21-2625-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.21.011

引用本文：张君，胡少君，陆安欣，等. LC-MS/MS 测定人血浆中对乙酰氨基酚及其人体药动学和生物等效性研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(21): 2625-2632.

Determination of Paracetamol in Human Plasma Using LC-MS/MS: Application to A Pharmacokinetic and Bioequivalence Study in Healthy Human Subjects

ZHANG Jun[1,2a], WO Siu-Kwan[2a], LUK Andrea-OY[2b], TOMLINSON Brian[2b], OZAKI Risa[2b], CHOW Elaine YK[2b], FOK Benny SP[2b], LAM Teddy TN[2a], PANG Bo[3], LEUNG Sau-Hung[3], WANG Yi[1*], ZUO Zhong[2a*](*1.College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2.The Chinese University of Hong Kong, a.School of Pharmacy, Faculty of Medicine, b.Phase 1 Clinical Trial Centre, Hong Kong 999077, China; 3.Fortune Pharmacal Co., Ltd., Hong Kong 999077, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a rapid and sensitive high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric(LC-MS/MS) assay for the quantitative determination of paracetamol in human plasma, and apply it to a pharmacokinetic and bioequivalence study of two paracetamol formulations in human. **METHODS** Tinidazole was used as internal standard(IS), paracetamol were extracted from 200 μL human plasma with 1 mL ethyl acetate. Chromatographic separation was achieved on an Waters XBridge® C_{18} column under isocratic elution condition. Then with the mass spectrometer operated in positive electrospray ionization mode using multiple reaction monitoring, paracetamol and IS were quantitative analyzed by detecting MS/MS ion transition at *m/z* 152.0→110.0 and 248.0→121.0, respectively. The validated method was employed in the pharmacokinetic and bioequivalent study of two paracetamol formulations, which conducted in 19 healthy adult human subjects following single-dose oral administrations of 500 mg paracetamol under fasting condition. **RESULTS** The method showed linearity over the concentration range of 0.1–8.0 μg·mL^{-1}(r^2>0.99) for paracetamol in human plasma. The lower limit of quantitation achieved was 0.1 μg·mL^{-1} and the extraction recovery ranged from 91.0% to 98.7%. Intra-and inter-day accuracy were in the ranges of 98.8%–111.3% (precision ≤ 9.0%) and 94.9%–102.6% (precision ≤ 10.7%) respectively. Additionally, in the bioequivalence study, the calculated 90% confidential intervals of geometric mean (test/reference) ratios for pharmacokinetic parameters(C_{max}, $AUC_{0-12\,h}$ and $AUC_{0-\infty}$) of the two paracetamol formulations were 83.50%–105.79%,

作者简介：张君，女，硕士，工程师　Tel: (0852)39433798　E-mail: jennyzhang@cuhk.edu.hk　*通信作者：王毅，男，博士，教授　Tel: (0571)88208426　E-mail: zjuwangyi@zju.edu.cn　左中，女，博士，教授　Tel: (0852)39436832　E-mail: joanzuo@cuhk.edu.hk

94.25%–101.54% and 93.24%–101.02%, respectively, which all fell within the bioequivalence acceptance range of 80.00%–125.00%. **CONCLUSION** A rapid and sensitive LC-MS/MS method for the determination of paracetamol in human plasma is developed, it has the characteristics of rapid sensitivity, high recovery and good selectivity and is successfully applied to the pharmacokinetic and bioequivalent study in healthy human subjects. The results show that the test formulation is similar to the reference formulations in terms of rate and extent of absorption, the two formulations are bioequivalent.
KEYWORDS: paracetamol; LC-MS/MS; human plasma; pharmacokinetics; bioequivalence

对乙酰氨基酚(paracetamol，APAP)，又名扑热息痛，1878 年由 Harmon Northrop Morse 合成，1893 年由 Von Mering 首次应用于临床[1]，1951 年在美国获批上市并于 1955 年成为非处方药。该品为乙酰苯胺类解热镇痛药，解热作用缓慢而持久，耐受性良好，与阿司匹林相比，具有胃肠道刺激性小、过敏反应少等优点，因而临床应用极广泛[2-3]。它是许多抗感冒和流感药物的主要成分，我国上市的约 80%抗感冒药中含有该品[4]。

APAP 口服后迅速自胃肠道吸收，10~60 min 出现血药峰浓度，约 90%于肝脏内分别与葡萄糖醛酸、硫化物结合产生无毒性代谢物对乙酰氨基酚葡萄糖醛酸(paracetamol glucoside，PG，约 6%)和 APAP 硫酸盐后经肾排泄，<5%药物以原形自尿中排泄，其余则经细胞色素 P450 酶系 CYP_2E_1、CYP_1A_2 和 CYP_3A_4 代谢产生 3-羟基-APAP 和毒性中间产物 *N*-乙酰对苯醌亚胺，该中间产物迅速通过结合肝内还原型谷胱甘肽解毒后从尿中排出[5-6]。但若药物过量(>150 mg·kg^{-1})，其葡萄糖醛酸化和硫化代谢途径饱和时，药物经细胞色素 P450 酶途径代谢增多。当肝内谷胱甘肽贮量减少 70%~80%时，*N*-乙酰对苯醌亚胺与肝细胞大分子上半胱氨酸不可逆性结合，导致氧化损伤和肝细胞坏死[5,7]。因此尽管治疗剂量的 APAP 安全性良好[8]，但作为常用药物尤其是非处方药物，因其过量使用或误服而引起的不良反应和严重肝肾毒性日益引起关注[9]。国外已将 APAP 血药浓度监测作为急诊中毒患者的常规检测项[10]，故探讨快速灵敏而准确的 APAP 血药浓度监测方法对于指导治疗极为重要。

关于 APAP 血药浓度检测虽已有诸多报道，如比色法、毛细管电泳法、化学发光法、荧光光谱法、薄层色谱扫描法、GC 和 HPLC 等[11-17]，但这些方法操作过程复杂繁琐，专属性不强或者灵敏度不高。近年来 LC-MS/MS 技术因较高的灵敏度和选择性而广泛应用于生物样品中微量药物的定量分析[18]，但质谱条件下，APAP 主要代谢物 PG 因产生的碎片离子 *m/z* 与 APAP 检测离子对相同产生交叉效应从而会对 APAP 的定量检测产生干扰。此前报道的方法或未考察这一干扰[19-21]，或未经临床实际样品验证[22]。本研究的特点在于通过优化色谱条件实现 APAP 和 PG 的分离，去除了这一干扰。同时在血浆样品的处理中，相较于以往报道[19-24]，采用了效果更佳的乙酸乙酯液液萃取方法。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

APAP 对照品(东京化成工业株式会社，纯度 100%)；替硝唑[内标(internal standard，IS)，东京化成工业株式会社，纯度 99.9%]；PG 钠盐(加拿大多伦多研究化学，纯度 98%)，结构式见图 1。受试制剂：幸福止痛素片(幸福医药有限公司，批号：5F03；规格：每片含 APAP 500 mg)。参比制剂：必理痛片[葛兰素史克(爱尔兰)公司生产，批号：1740949；规格：每片含 APAP 500 mg]。甲酸(ACS 级)、乙腈(HPLC 级)均购自德国 Merck 公司；甲醇(HPLC 级，泰国 RCI Labscan 公司)；乙酸乙酯(GR 级，韩国 Duskan 公司)；DI 水由本实验室用 Millipore Direct-Q3 纯水系统自制。

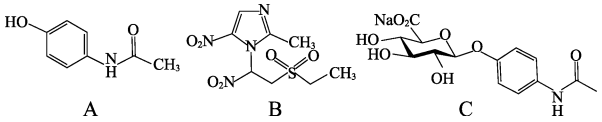

图 1 化学结构式

A–对乙酸氨基酚；B–替硝唑；C–对乙酰氨基酚葡萄糖醛酸钠盐。

Fig. 1 Chemical structures

A–paracetamol; B–tinidazole; C–paracetamol glucuronide sodium salt.

1.2 仪器

Agilent 1290 高效液相色谱系统(美国 Agilent 公司)；Applied Biosystems QTrap LC-MS/MS 系统及 1.4.2 版分析软件(美国应用生物系统公司)；Sorvail ST8R 离心机、Forma 925 型超低温冰箱、multifuge X1R 离心机(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.3 受试者选择

本研究在香港中文大学一期临床研究中心进

行，试验前研究方案经香港中文大学-新界东医院联网临床研究伦理联席委员会批准，研究严格遵守世界医学会制定《赫尔辛基宣言》的有关伦理准则，所有受试者均充分了解试验方案和过程，并签署知情同意书。19 名入选健康成人受试者[9 名女性和 10 名男性；年龄范围：18~30 岁；身体质量指数(body mass index，BMI)范围：18.6~24.9 kg·m^{-2}]；经检查身体健康，无心、肝、肾、消化道、神经系统、精神异常及代谢异常等疾病史；体格检查如血压、心率、心电图、尿液分析、血液生化分析等正常。女性受试者在筛选期及每次服药前经妊娠测试为阴性。受试者均无烟、酒嗜好。服药前 2 周及试验期间未服用其他药物(避孕药除外)。

1.4 研究方案

试验采用随机、单剂量、两制剂、双处理、双周期、双序列的自身交叉对照设计，在空腹状态下进行。受试者随机分为 2 组(第 1 组 10 例，第 2 组 9 例)，交叉空腹口服用受试制剂或参比制剂 1 片(500 mg)，清洗期为 7 d。试验开始前 1 d 晚上 10 点之后禁食≥10 h。试验当日分别在服药前和服药后 0.083，0.167，0.333，0.5，0.75，1，1.5，2，3，4，6，8，10 和 12 h 用肝素化抗凝管收集于受试者肘静脉采集的血浆样品 5 mL，立即混匀并于 4 ℃离心 10 min (2 500 ×*g*)后取上层血浆，分成双份放置于–70 ℃以下保存待测。

1.5 血浆样品分析测定

1.5.1 色谱条件 色谱柱：Waters XBridge® C_{18} 柱(150 mm×4.6 mm，3.5 μm)；柱温：室温；流动相：乙腈-0.1%甲酸水溶液(70∶30)；等度洗脱：0.4 mL·min^{-1}；自动进样室温度：12 ℃；进样量：10 μL。

1.5.2 质谱条件 采用电喷雾离子源；源电压：5 500 V；离子化温度：400 ℃；气帘气、雾化气和辅助气流速分别为 30，30 和 70 L·min^{-1}；碰撞气：Medium；检测方式为正离子多反应模式(MRM)；检测的离子对为 *m/z* 152.0→110.0(APAP)和 *m/z* 248.0→121.0(IS)，另 *m/z* 328.0→152.0(PG)在方法开发阶段亦有检测。

1.5.3 溶液配制 APAP 储备液、校正标样和质控样品配制：精密称取 APAP 适量，加 50%甲醇溶液溶解并稀释成 1 mg·mL^{-1} 的储备液，放置于–20 ℃保存。临用取适量加 80%乙腈溶液分别稀释成 1，2，5，10，25，50，60，80 μg·mL^{-1} 的工作液，再加空白血浆 200 μL 制成 APAP 系列校正标样(0.1，0.2，0.5，1，2.5，5，6 和 8 μg·mL^{-1})。低、中、高浓度(0.2，2.5 和 8 μg·mL^{-1})质控样品另行同法新鲜配制而成。

IS 溶液配制：精密称取 IS 适量，加 80%乙腈溶液溶解并稀释成 1 mg·mL^{-1} 的储备液，再加 80%乙腈溶液稀释成 15 μg·mL^{-1} 的工作液。储备液及工作液均放置于–20 ℃保存。

1.5.4 血浆样品处理 精密吸取血浆样品 200 μL，加 IS 工作液 20 μL，混匀后加乙酸乙酯 1.0 mL，混匀，13 000 r·min^{-1} 离心 5 min，取上清液真空浓缩至干，残留物加 30%乙腈溶液 200 μL 涡旋溶解后，13 000 r·min^{-1} 离心 5 min，取上清液进样分析。空白样品(空白血浆，不含 APAP 和 IS)和零浓度样品(含 IS)经同法处理而成。

1.6 数据处理

采用 Phoenix WinNonlin software (Version 8.1，Certara)药动学统计分析软件以非房室模型法进行参数计算。达峰浓度(C_{max})、血药浓度-时间曲线下面积(area under curve，AUC)经对数转换后进行方差分析，计算 C_{max}、AUC_{0-t} 和 $AUC_{0-\infty}$ 几何均值比(受试制剂/参比制剂)的 90%置信区间，达峰时间(T_{max})采用非参数检验即 Wilcoxon 符号秩检验，以考察受试制剂与参比制剂的生物等效性。

2 结果

2.1 血浆样品分析方法学验证

2.1.1 选择性 考察了 4 名健康志愿者的空白血浆样品，空白血浆加 IS 样品，定量下限(lower limit of quantitation，LLOQ)样品(空白血浆加 IS 和 APAP)，空白血浆加 IS、APAP 和 PG 钠盐样品，按“1.4”项下方法处理分析，结果 PG、APAP 和 IS 的保留时间分别为 3.7，4.5，6.1 min，见图 2，表明血浆内源性基质或样品中其他组分均不干扰 APAP 及 IS 的检出，方法选择性良好。

2.1.2 标准曲线和 LLOQ 取 APAP 系列校正标样，按“1.4”项下方法处理分析，以 APAP 峰面积与 IS 峰面积的比值(y)对校正标样浓度(x)用加权最小二乘法(权重系数 1/x)进行线性回归，得标准曲线。回归方程为 y=0.267 0x+0.008 1(r=0.999 0)，线性范围为 0.1~8.0 μg·mL^{-1}。LLOQ 确定为标准曲线最低点 0.1 μg·mL^{-1} (S/N= 11)。

2.1.3 残留效应　通过在高浓度质控样品后注射空白样品进行评估。结果空白样品中未检出 APAP 和 IS，残留效应可忽略不计。

2.1.4 准确度与精密度　通过连续 3 d 对 LLOQ 样品及低、中、高浓度质控样品的测定进行考察。结果见表 1。

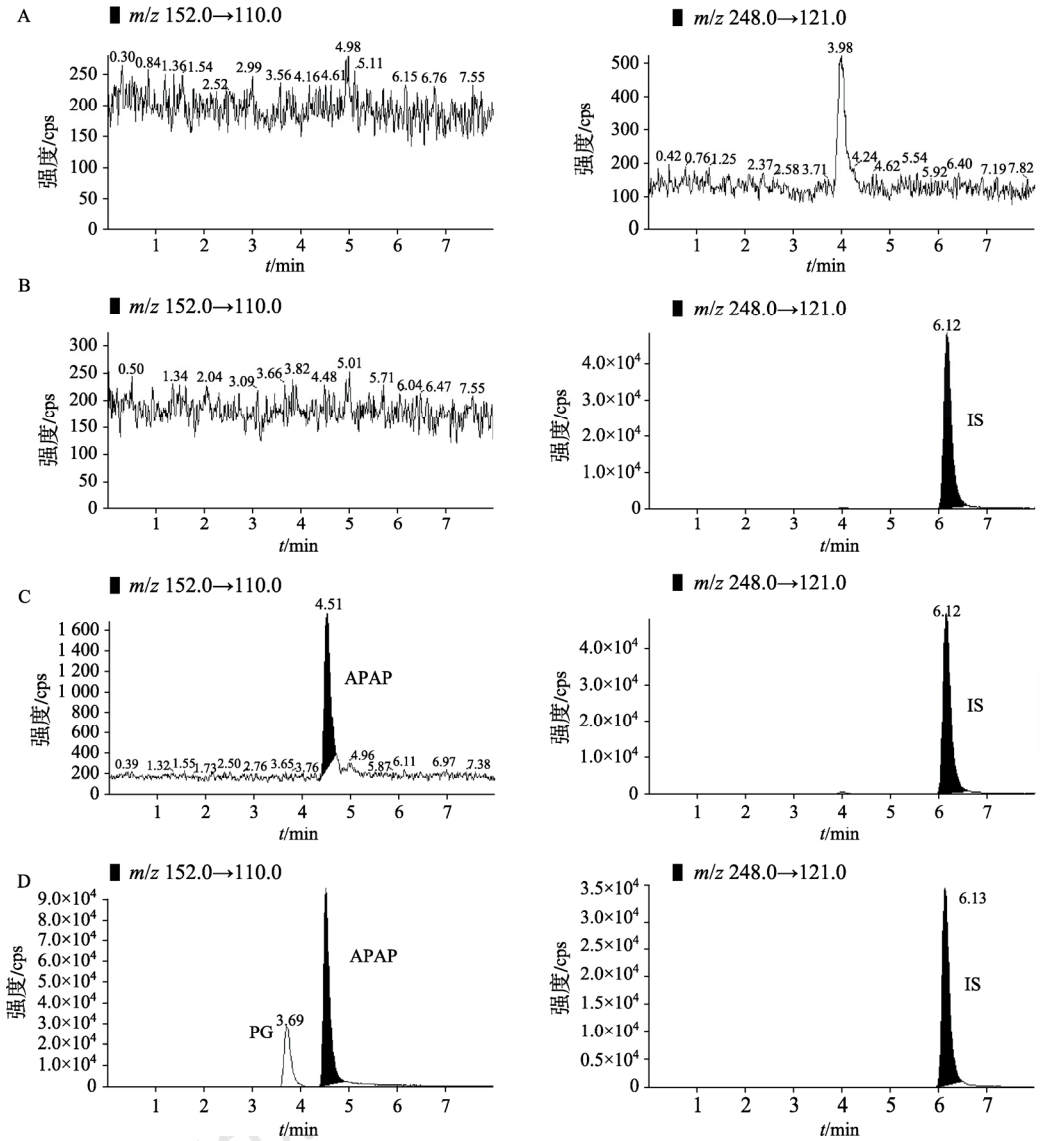

图 2　空白和加样样品 MRM 色谱图

A–空白血浆；B–空白血浆+IS(1.5 μg·mL^{-1})；C–LLOQ 样品：空白血浆+IS(1.5 μg·mL^{-1})+APAP(0.1 μg·mL^{-1})；D–空白血浆+IS(1.5 μg·mL^{-1})+APAP(0.1 μg·mL^{-1})+PG 钠盐(5 μg·mL^{-1})。

Fig. 2　MRM chromatograms for blank and sample samples

A–blank plasma; B–blank plasma spiked with IS at 1.5 μg·mL^{-1}; C–LLOQ samples: blank plasma spiked with IS at 1.5 μg·mL^{-1} and APAP at 0.1 μg·mL^{-1}; D–blank plasma spiked with IS at 1.5 μg·mL^{-1}, APAP at 0.1 μg·mL^{-1} and paracetamol glucuronide sodium salt at 5 μg·mL^{-1}.

表 1　方法准确度、精密度、提取回收率与基质效应($\bar{x} \pm s$, n=5)

Tab. 1　Accuracy, precision, recovery and matrix effect of the method($\bar{x} \pm s$, n=5)

标示浓度/μg·mL^{-1}	日内			日间			提取回收率/%	基质效应/%
	实测浓度/μg·mL^{-1}	准确度/%	精密度/%	测得浓度/μg·mL^{-1}	准确度/%	精密度/%		
0.1	0.105±0.010	105.4	9.0	0.097±0.009	97.4	8.9	–	–
0.2	0.198±0.008	98.8	4.1	0.190±0.009	94.9	4.8	91.0±10.0	100.6±5.8
2.5	2.783±0.076	111.3	2.7	2.564±0.274	102.6	10.7	98.7±5.4	100.6±4.0
8.0	8.015±0.209	100.2	2.6	7.646±0.437	95.6	5.7	93.7±2.8	102.5±5.4

2.1.5 稀释可靠性　配制高浓度 APAP 溶液(10 和 20 μg·mL^{-1})以验证稀释可靠性。将 10 和 20 μg·mL^{-1} APAP 溶液分别用空白血浆稀释 2 和 4 倍各 5 份后处理分析。结果准确度均值为 94.5%~114.7%(精密度≤7.9%)。

2.1.6 提取回收率和基质效应　配制低、中、高浓度质控样品 20 μL 各 5 份，分别加 IS 工作液 20 μL 和 30%乙腈溶液 160 μL，混匀。进样分析，得相应峰面积 A。另取空白血浆 200 μL，加入乙酸乙酯 1.0 mL，混匀，13 000 r·min^{-1} 离心 5 min 后取上清液真空浓缩至干，残留物加 30%乙腈溶液 160 μL、IS 溶液 20 μL，再分别加低、中、高浓度质控样品 20 μL，涡旋溶解后，经 13 000 r·min^{-1} 离心 5 min，取上清液进样分析，得相应峰面积 B。另配制低、中、高浓度质控样品各 5 份，经处理分析，得相应峰面积 *C*。计算公式为：提取回收率=*C*/*B*×100%，基质效应=*B*/*A*×100%。结果见表 1。

2.1.7 血浆样品稳定性试验　配制低、中、高浓度各 5 份质控样品考察血浆样品在不同条件下的稳定性。结果样品经室温放置 4 h、−70 ℃以下存放 2 个月，3 次冻融循环，以及处理后在自动进样室(12 ℃)放置 31 h 稳定性均良好，满足分析要求。

2.1.8 溶液贮存稳定性　APAP 储备液(1 mg·mL^{-1})、IS 储备液(1 mg·mL^{-1})和工作液(15 μg·mL^{-1})配制后放置于−20 ℃贮存的研究结果显示：与各自新鲜配制溶液相比，APAP 储备液贮存 4 个月偏差为 3.5%，IS 储备液和工作液贮存 11 周偏差分别为 −5.0%和−0.7%，均在±15%可接受范围内，稳定性均良好。

经上述验证，本方法符合中国药典 2015 年版和美国食品药品监督管理局关于生物样品分析方法验证指导原则的要求[25-26]。

2.2 药动学

取 19 名健康受试者服药前后各时间点采集的血浆样品进行处理分析，典型色谱图见图 3。对所得血药浓度数据进行曲线拟合，主要药动学参数和消除半衰期($t_{1/2}$)计算结果见表 2。血药浓度-时间曲线见图 4。

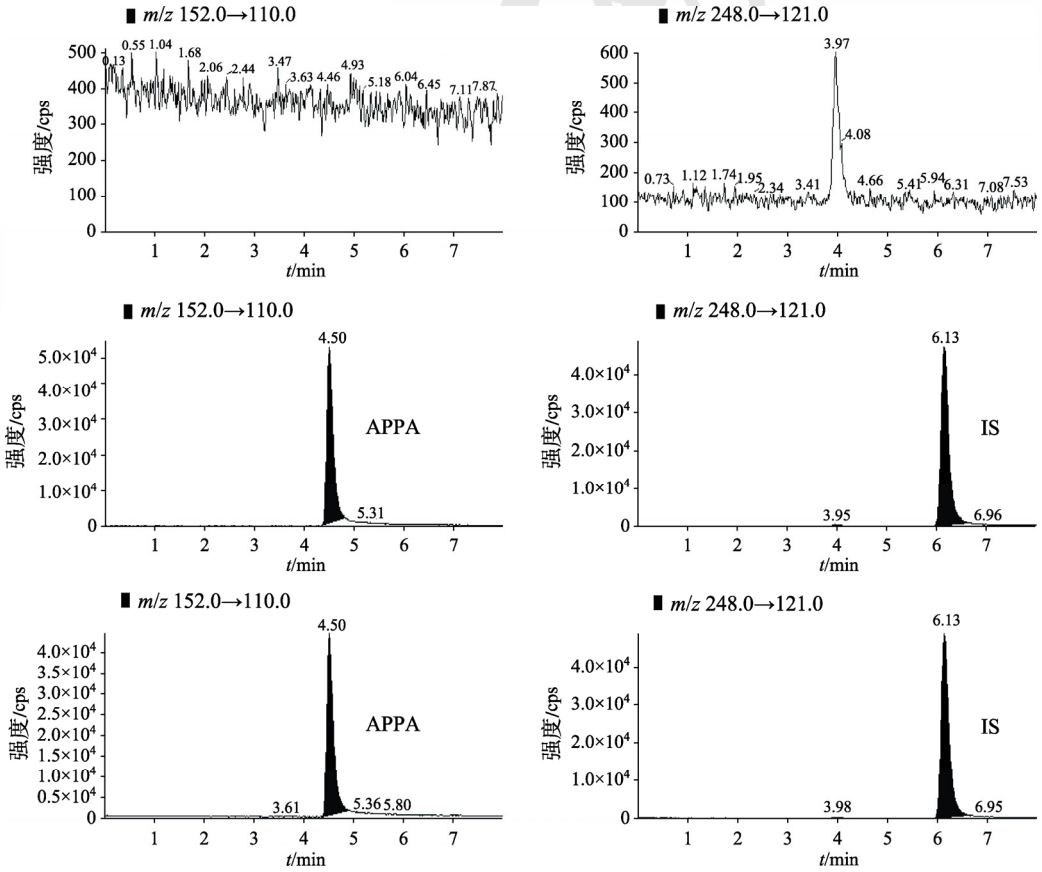

图 3 健康受试者服药前后血浆样品典型 MRM 色谱图
A−0 h；B−0.333 h；C−4 h。

Fig. 3 Representative MRM chromatograms of plasma samples from healthy subjects before and after administration
A−0 h; B−0.333 h; C−4 h.

表 2 健康受试者口服对乙酰氨基酚 500 mg 药动学研究结果($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Pharmacokinetic study results in healthy subjects following oral administrations of paracetamol 500 mg($\bar{x} \pm s$)

参数	受试制剂(n=19)	参比制剂(n=18)
T_{max}/h	0.99±0.75	0.89±0.51
C_{max}/μg·mL^{-1}	7.53±1.91	8.09±2.00
$t_{½}$/h	2.56±0.29	2.86±0.79
AUC_{0-12h} /μg·h·mL^{-1}	28.97±7.35	29.46±8.24
$AUC_{0-\infty}$/μg·h·mL^{-1}	30.41±7.59	31.29±9.10

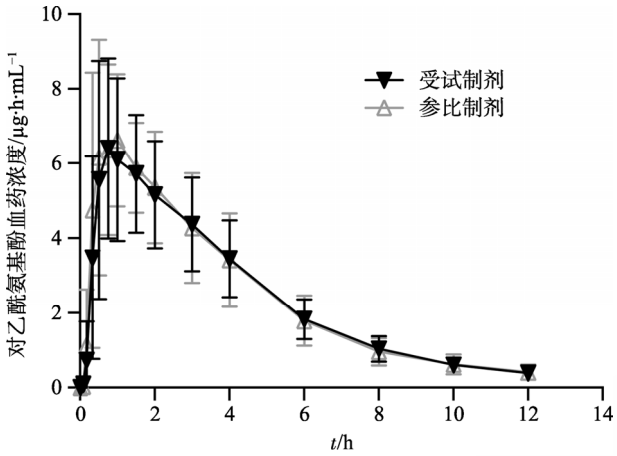

图 4 健康受试者口服对乙酰氨基酚 500 mg 平均血药浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s$；受试制剂：n=19；参比制剂：n=18)

Fig. 4 Mean plasma paracetamol concentration-time curve in healthy subjects following oral administrations of paracetamol 500 mg($\bar{x} \pm s$; test formulation: n=19; reference formulation: n=18)

2.3 生物等效性评价

19 名健康受试者分别随机交叉空腹口服受试或参比制剂 1 片(其中 1 名受试者最终仅参加了口服受试制剂的试验)，结果 T_{max} 经非参检验在受试制剂与参比制剂间无统计学差异，C_{max}、AUC_{0-t} 和 $AUC_{0-\infty}$经方差分析在给药序列间、周期间和制剂间亦无统计学差异。受试制剂与参比制剂的 C_{max}、$AUC_{0-12\,h}$ 和 $AUC_{0-\infty}$几何均值比的 90%置信区间分别为 83.50%~105.79%，94.25%~101.54%和 93.24%~101.02%，均在 80.00%~ 125.00%，符合国家药品监督管理局《以药动学参数为终点评价指标的化学药物仿制药人体生物等效性研究技术指导原则》(2016 年)[27]以及世界卫生组织《多来源(仿制)药品：建立可互换性注册要求的指导原则》(2017 年)[28]关于生物等效的判断标准，受试制剂与参比制剂生物等效。

2.4 不良事件

研究中健康受试者单剂量口服受试制剂和/或参比制剂 1 片耐受性均良好，报告的 7 例轻度不良事件均与研究药物无关。

3 讨论

本研究建立了测定人血浆中 APAP 浓度的回收率高、选择性更好的 LC-MS/MS。以往报道 LC-MS/MS[18-23]中使用的血浆样品处理方法有直接蛋白沉淀法、蛋白沉淀后真空干燥复溶和蛋白沉淀-固相萃取法，色谱系统中为达到理想的分离效果采用较长的运行时间或者梯度洗脱的方法。蛋白沉淀法简便易操作，但常常因样品浓度稀释导致灵敏度降低，而梯度洗脱则较费时。本研究中采用了 5 倍于血浆体积的乙酸乙酯液液萃取后等度洗脱的方法，在保证良好提取和分离效率以及高灵敏度的同时使得样品实际分析时间大大减少。

因 APAP 极性大，故质谱条件中选用了电喷雾离子源，但由于 APAP 主要代谢物 PG 在离子源中除产生 m/z 328.0→152.0 离子跃迁外，亦产生附加跃迁 m/z 152.0→110.0，若不完全分离这 2 个化合物，会导致通过监测离子对 m/z 152.0→110.0 进行定量分析的 APAP 响应增大，对检测结果造成干扰。和其他方法相比[19-24]，本研究在方法开发初期对色谱条件如流动相比例及流速进行优化，使 PG 在 3.7 min 出峰，而目标分析物 APAP 出峰时间延至 4.5 min，两者达到了理想的色谱分离。去除了 PG 对 APAP 定量所造成的干扰。此外，在萃取溶剂的筛选中，本研究先后考察了甲醇、乙腈、10%丙二醇乙腈溶液和乙酸乙酯的萃取效果，结果仅乙酸乙酯萃取能获得理想的检测灵敏度，且除杂效果好，基质效应小，这在随后的 19 名健康受试者 0~12 h 血浆样品检测中进一步得到了证实，所有样品的检测均未受到干扰，方法选择性好。

APAP 为有机弱酸(pK_a 为 9.5)[29]，研究中通过在流动相体系(乙腈-水)中加入 0.1%的甲酸实现了峰形的优化。关于 IS 则先后选用了与 APAP 结构相近的乙酰苯胺以及曲唑酮，但结果均不理想。经比较最终选择替硝唑作为 IS，该品与 APAP 出峰时间相近，峰面积匹配性高，提取回收率相似，离子化效率一致，能很好地校准样品前处理、进样和仪器误差，有效提高方法的精密度和准确度。此外，低、中、高 3 个浓度的基质效应均接近 100%，表明几乎不存在基质效应的影响，方法准确度高。

生物等效性试验中健康志愿受试者口服受试制剂和参比制剂 500 mg 后吸收迅速，血药浓度分

别于 0.99 和 0.89 h (平均值)达到峰浓度(7.53±1.91)和(8.09±2.00)μg·mL^{-1}，平均血浆半衰期分别为 2.56 和 2.86 h，与文献报道接近[7,30]。值得注意的是，研究中还发现相同剂量下，个体间血药浓度差异显著(P<0.05)，因此临床监测确有必要。受试制剂与参比制剂主要药代动力学参数 T_{max}、C_{max}、AUC_{0-t} 和 $AUC_{0-\infty}$在受试制剂与参比制剂间均无统计学差异。此外，C_{max}、AUC_{0-t} 和 $AUC_{0-\infty}$几何均值比的 90%置信区间均落在 80.00%~125.00%，表明 2 种制剂在人体内吸收速度(C_{max}，T_{max})和程度(AUC)相似，两者生物等效。

本研究建立了一种快速灵敏、回收率高、选择性好的人血浆中 APAP 浓度测定的 LC-MS/MS 并成功应用于 APAP 片口服血药浓度检测、人体药动学和生物等效性研究。APAP 因解热镇痛效果显著目前仍为市场上抗感冒药物的主流化学成分，本研究所建立的方法可以推广到诸多该品其他剂型药物以及含有该品的复方药物的提取、药动学和生物等效性研究中。此外，研究中受试制剂与参比制剂药代动力学曲线高度契合以及生物等效的结果既为临床应用提供了更多选择，又为同类仿制药物的生物等效性研究以及质量和疗效的一致性评价提供了借鉴，具有重要的现实临床价值和社会经济意义。

REFERENCES

[1] HAAS H. History of antipyretic analgesic therapy [J]. Am J Med, 1983, 75(5): 1-3.

[2] RIGGS B S, KULIG K, RUMACK B H. Current status of aspirin and acetaminophen intoxication [J]. Pediatr Ann, 1987, 16(11): 886-898.

[3] GRAHAM G G, DAVIES M J, DAY R O, et al. The modern pharmacology of paracetamol: Therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings [J]. Inflammopharmacology, 2013, 21(3): 201-232.

[4] LI N, GAO Y T. Determination of contents of pediatric paracetamol and amantadine hydrochloride granules by using HPLC-RID method [J]. Pharm Today(今日药学), 2017, 27(9): 609-611, 619.

[5] PRESCOTT L F. Paracetamol overdosage pharmacological considerations and clinical management [J]. Drugs, 1983, 25(3): 290-314.

[6] GAZZARD B G, HENDERSON J M, WILLIAMS R. Early changes in coagulation following a paracetamol overdose and a controlled trial of fresh frozen plasma therapy [J]. Gut, 1975, 16(8): 617-620.

[7] PRESCOTT L F, ROSCOE P, WRIGHT N, et al. Plasma-paracetamol half-life and hepatic necrosis in patients with paracetamol overdosage [J]. Lancet, 1971, 297(7698): 519-522.

[8] LEWIS S C, LANGMAN M J S, LAPORTE J R, et al. Dose-response relationships between individual nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs(NANSAIDs) and serious upper gastrointestinal bleeding: A meta-analysis based on individual patient data [J]. Br J Clin Pharmacol, 2002, 54(3): 320-326.

[9] RAMACHANDRAN A, JAESCHKE H. Acetaminophen hepatotoxicity [J]. Semin Liver Dis, 2019, 39(2): 221-234.

[10] THOMPSON J, WATSON I, THANACOODY H, et al. Guidelines for laboratory analyses for poisoned patients in the United Kingdom [J]. Ann Clin Biochem: Int J Biochem Lab Med, 2014, 51(3): 312-325.

[11] SHIHANA F, DISSANAYAKE D, DARGAN P, et al. A modified low-cost colorimetric method for paracetamol (acetaminophen) measurement in plasma [J]. Clin Toxicol, 2010, 48(1): 42-46.

[12] KUNKEL A, GÜNTER S, WÄTZIG H. Quantitation of acetaminophen and salicylic acid in plasma using capillary electrophoresis without sample pretreatment improvement of precision [J]. J Chromatogr A, 1997, 768(1): 125-133.

[13] LARA F J, GARCÍA-CAMPAÑA A M, VELASCO A I. Advances and analytical applications in chemiluminescence coupled to capillary electrophoresis [J]. Electrophoresis, 2010, 31(12): 1998-2027.

[14] VILCHEZ J, BLANC R, AVIDAD R, et al. Spectrofluorimetric determination of paracetamol in pharmaceuticals and biological fluids [J]. J Pharm Biomed Anal, 1995, 13(9): 1119-1125.

[15] CHAUBE P H, GANDHI S V, DESHPANDE P B, et al. High performance thin layer chromatographic analysis of paracetamol and etoricoxib in spiked human plasma [J]. Res J Pharm Technol, 2011, 4(8): 1303-1306.

[16] STEWART M J, WILLIS R G. Simplified gas chromatographic assay for paracetamol [J]. Ann Clin Biochem: Int J Biochem Lab Med, 1975, 12(1/2/3/4/5/6): 4-8.

[17] DENG M, NIU K, HU Y Q, et al. HPLC determination of acetaminophen in human plasma [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2009, 26(1): 60-63.

[18] YANG J J, WANG C X, ZHOU Z Y, et al. Determination of oxcarbazepine and its active metabolite 10-hydroxycarbamazepine in human serum by LC-MS/MS and its clinical application [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(22): 2823-2827.

[19] TAYLOR R R, HOFFMAN K L, SCHNIEDEWIND B, et al. Comparison of the quantification of acetaminophen in plasma, cerebrospinal fluid and dried blood spots using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2013(83): 1-9.

[20] COOK S F, KING A D, VAN DEN ANKER J N, et al. Simultaneous quantification of acetaminophen and five acetaminophen metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry: Method validation and application to a neonatal pharmacokinetic study [J]. J Chromatogr B, 2015(1007): 30-42.

[21] KAM R K T, CHAN M H M, WONG H T, et al. Quantitation of paracetamol by liquid chromatography-mass spectrometry in human plasma in support of clinical trial [J]. Futur Sci OA, 2018, 4(8): FS0331. Doi.org/10.4155/fsoa-2018-0039.

[22] LI R, YANG L T, PENG Y R, et al. Determination of safinamide in human plasma by LC-MS/MS and its pharmacokinetic study in Chinese healthy volunteers [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2019, 28(19): 2375-2379.

[23] TONOLI D, VARESIO E, HOPFGARTNER G. Quantification of acetaminophen and two of its metabolites in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography-low and high resolution tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2012(904): 42-50.

[24] HORI Y, FUJISAWA M, SHIMADA K, et al. Method for screening and quantitative determination of serum levels of salicylic acid, acetaminophen, theophylline, phenobarbital, bromvalerylurea, pentobarbital, and amobarbital using liquid chromatography/electrospray mass spectrometry [J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(1): 7-13.

[25] 中国药典. 四部[S]. 2015.

[26] Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry [S]. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), May 2018.

[27] 中国国家药品监督管理局. 以药动学参数为终点评价指标的化学药物仿制药人体生物等效性研究技术指导原则[S]. 2016-03.

[28] World Health Organization. Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability [S]. WHO Technical Report Series, No. 992, Annex 7 with a New Appendix 2. WHO Technical Report Series, No. 1003, 2017, Annex 6.

[29] MATTIA C, COLUZZI F. A look inside the association codeine-paracetamol: Clinical pharmacology supports analgesic efficacy [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(3): 507-516.

[30] FORREST J A, CLEMENTS J A, PRESCOTT L F. Clinical pharmacokinetics of paracetamol [J]. Clin Pharmacokinet, 1982, 7(2): 93-107.

收稿日期：2019-07-26
(本文责编：李艳芳)

中国现代应用药学
http://www.chinjmap.com