

LC-MS/MS法测定人血浆中伊伐布雷定及其活性代谢产物的浓度

肖卫红*,何伟,徐宏峰,胡松,张耕(武汉市第一医院,武汉 430022)

中图分类号 R969.1;R972 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)22-2050-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.22.13

摘要 目的:建立测定人血浆中伊伐布雷定及其活性代谢产物浓度的方法。方法:血样以叔丁基醚提取后,采用液-质联用(LC-MS/MS)法进样测定。色谱柱为 Waters C₁₈,流动相为 5 mmol/L 醋酸铵-甲酸-甲醇(70:0.1:30),流速为 0.3 ml/min,柱温为 30 ℃,内标为氨溴索;采用电喷雾离子化(ESI)离子源,以多反应监测(MRM)模式检测,伊伐布雷定、去甲伊伐布雷定离子对的 *m/z* 分别为 469.2/177.1、455.2/177.1。结果:伊伐布雷定、去甲伊伐布雷定血药浓度分别在 0.48~120、0.16~40 ng/ml 范围内线性关系良好(*r* 分别为 0.999 8 和 0.999 7);方法回收率分别为 96.35%~98.33%、96.20%~102.50%;日内、日间 RSD 均 < 7%;血浆样品长期冻存(-20 ℃ 冷冻 1 个月)稳定性良好,反复冻融 3 次及室温放置 4 h 条件下,样品浓度均无显著变化。结论:本方法快速、简便、灵敏、准确,可用于伊伐布雷定的药动力学研究。

关键词 液-质联用法;伊伐布雷定;去甲伊伐布雷定;血药浓度;药动力学

Determination of Ivabradine and Active Metabolites in Human Plasma by LC-MS/MS

XIAO Wei-hong, HE Wei, XU Hong-feng, HU Song, ZHANG Geng (Wuhan Municipal First Hospital, Wuhan 430022, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish a method for the determination of ivabradine and active metabolites in human plasma. **METHODS:** After extracted with MTBE, LC-MS/MS was adopted for the determination of blood sample. The determination was performed on Waters C₁₈ column with mobile phase consisted of 5 mmol/L ammonium acetate-methanoic acid-methanol (70:0.1:30) at the flow rate of 0.3 ml/min. The column temperature was 30 ℃. The internal standard was ambroxol. Plasma concentrations were determined by MRM mode with ion pairs of 469.2/177.1 (ivabradine) and 455.2/177.1 (*N*-demethylivabradine). **RESULTS:** The linear range of ivabradine and *N*-demethylivabradine was 0.48-120 ng/ml (*r*=0.999 8) and 0.16-40 ng/ml (*r*=0.999 7), respectively. Method recoveries were 96.35% -98.33% and 96.20% -102.50%, respectively. RSDs of intra-day and inter-day were lower than 7%. The spiked plasma samples were stable at -20 ℃ in a long-term stability test. After three freeze-thaw cycles, at indoor temperature stored for 4 h, the concentrations of sample were not obviously changed. **CONCLUSIONS:** The method is simple, sensitive and accurate, and can be used for pharmacokinetic study of ivabradine.

KEYWORDS LC-MS/MS; Ivabradine; *N*-demethylivabradine; Plasma concentration; Pharmacokinetics

盐酸伊伐布雷定是一种窦房结心房肌细胞起搏(I_f)电流选择特异性抑制剂,能起到减缓窦房结起搏点活动速率的作用。其在体内经肝药酶代谢为去甲伊伐布雷定从而发挥减慢心率的作用,用于治疗伴有正常窦性心律、对β受体阻滞药禁忌或不能耐受的慢性稳定性心绞痛。其优点是单纯减慢心率,降低心肌耗氧量,增加冠状动脉的血流灌注量,同时对心肌收缩、房室传导及心室复极化无影响,从而提高了患者的耐受性^[1]。本文建立了测定人体血浆中伊伐布雷定及其活性代谢产物去甲伊伐布雷定的液-质联用(LC-MS/MS)法,可用于其人体药动力学研究。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1100 液相色谱系统,包括 G1311A 型四元输液泵、G1313A 型自动进样器、G1316A 型柱温箱和 G1379A 型脱气机

* 主管医师。研究方向:医院药学。电话:027-85332411。E-mail: xiaoweihong2005@sina.com

(美国 Agilent 伦公司); API 4000 型三重四极杆串联质谱仪,配备电喷雾电离源(美国 AB 公司); LG-80 型离心机(上海安亭医学仪器厂); SK-1 型快速混匀器(上海沪西分析仪器厂); Thermo BR4i 型离心机(法国 Thermo 公司); CP225D 型分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.2 药品与试剂

伊伐布雷定对照品(美国 Sigma 公司,批号:914908,含量:99.0%)、去甲伊伐布雷定对照品(美国 Sigma 公司,批号:241782,含量:98.6%);内标:氨溴索对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100657-201101,含量:99.2%);甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。空白人血浆来自武汉市中心血站。

2 方法^[2-5]与结果

2.1 色谱及质谱条件

色谱柱: Waters C₁₈(150 mm×2.1 mm, 5 μm); 流动相: 5 mmol/L 醋酸铵-甲酸-甲醇(70:0.1:30); 流速: 0.3 ml/min; 柱温:

30 ℃;进样量:10 μl。

采用电喷雾离子化(ESI)离子源,以多反应监测(MRM)的模式检测,伊伐布雷定、去甲伊伐布雷定、内标氨溴索的离子对 m/z 为 469.2/177.1、455.2/177.1、226.0/152.1;离子喷射电压(IS):6 500 V;温度:400 ℃;离子源气体压力:50 psi;聚焦电压(EP):11 V;碰撞室射出电压(CXP):10 V;离子去簇电压(DP):75 V;碰撞活化电压(CE):25 V。数据的采集和处理均使用 Analyst 1.5 软件。

2.2 溶液的准备

分别准确称取伊伐布雷定对照品 24 mg 和去甲伊伐布雷定对照品 8 mg,置于 100 ml 量瓶中,加流动相溶解并定容至刻度,摇匀,得到 240 μg/ml 伊伐布雷定和 80 μg/ml 去甲伊伐布雷定混合对照品溶液,置于 4 ℃ 冰箱保存备用。临用前用流动相稀释成标准曲线溶液和工作溶液。同法以甲醇制备成质量浓度为 0.09 μg/ml 的氨溴索内标溶液。

2.3 血浆样品的处理

取血浆 0.5 ml 于 10 ml 离心管中,加 0.09 μg/ml 氨溴索内标溶液 0.2 ml,涡旋振荡 30 s,加入叔丁基醚 4 ml,涡旋振荡 2 min,以离心半径为 8 cm、转速为 3 000 r/min 离心 10 min。吸取上清液用氮气吹干,用流动相 50 μl 溶解残渣,进样 10 μl。

2.4 方法专属性考察

在选定的色谱及质谱条件下,血浆中内源性杂质对测定无干扰,伊伐布雷定、去甲伊伐布雷定与内标峰形良好,分离完全,其保留时间分别为 1.79、1.68、2.51 min。质谱图见图 1;色谱图见图 2。

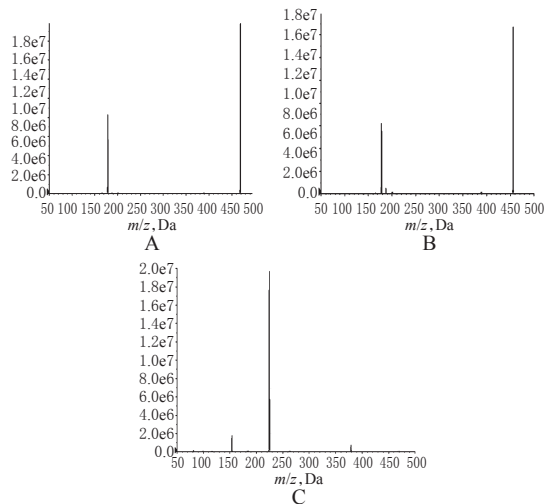


图1 质谱图

A. 伊伐布雷定; B. 去甲伊伐布雷定; C. 氨溴索

Fig 1 Mass spectrum

A. ivabradine; 2. N-demethylivabradine; C. ambroxol

2.5 标准曲线与定量下限考察

取洁净离心管,加入系列混合对照品标准曲线溶液 20 μl,再加入空白血浆 180 μl,振荡混匀,配制相当于伊伐布雷定血浆浓度为 120、60、30、12、2.4、1.2、0.48 ng/ml,去甲伊伐布雷定血浆浓度为 40、20、10、4、0.8、0.4、0.16 ng/ml 的溶液,按“2.3”项方法操作,取 10 μl 进行 LC-MS/MS 分析,记录色谱。分别以伊伐布雷定、去甲伊伐布雷定浓度(c_1 、 c_2)为横坐标,伊伐布雷定、去甲伊伐布雷定与内标的峰面积比值(Y_1 、 Y_2)为纵坐标,用最小二乘法($W=1/x^2$)进行加权运算,求得的方程即为

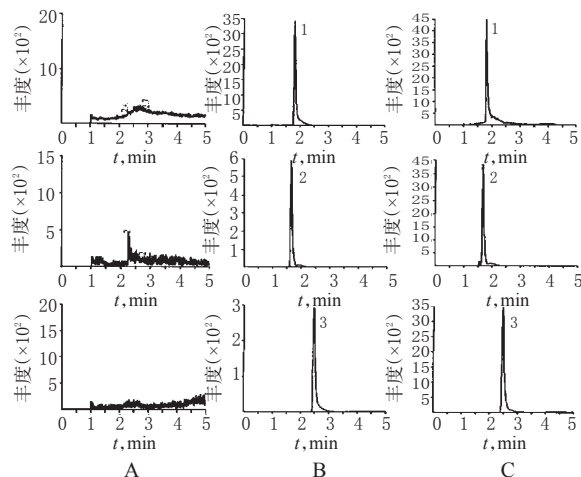


图2 色谱图

A. 空白血浆; B. 混合对照品; C. 服药后 2 h 血浆样品; 1. 伊伐布雷定; 2. 去甲伊伐布雷定; 3. 氨溴索

Fig 2 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. mixed control; C. plasma sample 2 h after medication; 1. ivabradine; 2. N-demethylivabradine; 3. ambroxol

定量标准曲线,分别为 $Y_1 = 0.271 \times c_1 + 0.015$ ($r = 0.9998$)、 $Y_2 = 0.0953 \times c_2 + 0.007$ ($r = 0.9997$)。结果表明,伊伐布雷定和去甲伊伐布雷定血药浓度分别在 0.48~120 ng/ml 和 0.16~40 ng/ml 范围内线性关系良好。

取洁净离心管,加入混合对照品溶液 20 μl,加入空白血浆 180 μl,配制成相当于伊伐布雷定和去甲伊伐布雷定浓度分别为 0.48 ng/ml 和 0.16 ng/ml 的血浆样品,共制备 5 份样品,按“2.3”项方法操作,取 10 μl 进行 LC-MS/MS 分析,记录色谱图,根据当日标准曲线计算每一样本浓度,并计算结果的平均值与 RSD。结果伊伐布雷定和去甲伊伐布雷定的测得值平均值分别为 (0.47 ± 0.02) ng/ml 和 (0.16 ± 0.01) ng/ml, RSD 分别为 6.5% 和 5.3%,表明该方法用于测定血浆中伊伐布雷定和去甲伊伐布雷定的定量下限可达 0.48 ng/ml 和 0.16 ng/ml。

2.6 方法回收率及精密度试验

制备低、中、高质量浓度血浆样品(伊伐布雷定和去甲伊伐布雷定的质量浓度分别为 1.2、12、60 ng/ml 和 0.4、4、20 ng/ml)各 5 份,按“2.3”项方法操作,进样分析,计算结果的均值与 RSD,得到日内精密度试验结果;另连续测定 3 d,得到日间精密度试验结果;再将日内精密度结果与实际浓度比较即可得到方法回收率,结果见表 1。

表1 精密度及回收率试验结果

Tab 1 Results of precision and recovery tests

待测物	加入量, ng/ml	日内精密度		日间精密度		方法回收率, %
		测得量, ng/ml	RSD, %	测得量, ng/ml	RSD, %	
伊伐布雷定	1.2	1.18 ± 0.08	4.94	1.21 ± 0.10	6.96	98.33
	12	11.66 ± 0.77	6.79	11.56 ± 0.69	5.23	97.17
	60	57.81 ± 2.13	3.68	56.35 ± 1.36	4.51	96.35
去甲伊伐布雷定	0.4	0.39 ± 0.02	4.98	0.41 ± 0.02	5.39	97.50
	4	4.10 ± 0.29	5.17	3.87 ± 0.26	6.73	102.50
	20	19.24 ± 1.03	3.68	19.35 ± 0.89	5.60	96.20

2.7 样品的稳定性考察

制备低、中、高质量浓度血浆样品(伊伐布雷定和去甲伊伐布雷定的质量浓度分别为 1.2、12、60 ng/ml 和 0.4、4、20 ng/ml)

数份,分别考察血浆样品室温放置4 h、血浆样品反复冻融3次及血浆样品-20℃冷冻1个月的稳定性。按“2.3”项方法操作后进样测定,以当天标准曲线分别计算伊伐布雷定和去甲伊伐布雷定的血药浓度。结果血浆样品经上述条件处理,其浓度无明显变化,结果见表2。

表2 稳定性试验结果

Tab 2 Result of stability test

待测物	实际浓度, ng/ml	测得浓度, ng/ml			
		第1天	室温放置4 h	反复冻融3次	-20℃冷冻1个月
伊伐布雷定	1.18±0.08	1.16±0.03	1.26±0.07	1.15±0.05	1.18±0.08
	11.66±0.77	12.24±0.44	11.49±0.85	11.46±0.49	11.66±0.77
	57.81±2.13	58.97±3.78	58.10±2.39	58.62±4.28	57.81±2.13
去甲伊伐布雷定	0.39±0.02	0.39±0.04	0.38±0.02	0.38±0.03	0.39±0.02
	4.10±0.29	3.96±0.14	3.94±0.18	3.79±0.16	4.10±0.29
	19.24±1.03	19.64±0.95	19.19±1.09	19.98±1.78	19.24±1.03

2.8 未知样本的测定

应用本方法测定8名健康受试者单剂量口服盐酸伊伐布雷定7.5 mg后不同时间血浆中伊伐布雷定和去甲伊伐布雷定的浓度,并计算药动学参数。伊伐布雷定与去甲伊伐布雷定药动学参数分别为: $t_{1/2}$ (4.3±1.3)、(10.8±2.9)h, c_{max} (29.3±12.1)、(7.4±2.5) ng/ml, t_{max} (0.72±0.16)、(0.70±0.14)h, $AUC_{0-24 h}$ (124.6±26.2)、(64.8±16.5)ng·h/ml。平均药-时曲线见图3。

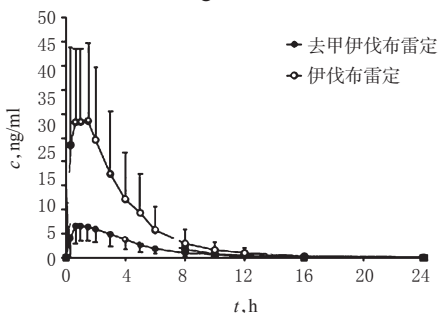


图3 健康受试者口服7.5 mg伊伐布雷定片后的平均药-时曲线
Fig 3 Mean concentration-time curves of ivabradine in healthy volunteers after oral administration of ivabradine tablet 7.5 mg

3 讨论

目前,国内、外关于血浆中伊伐布雷定及其代谢物浓度测定的文献均有报道。鉴于伊伐布雷定及去甲伊伐布雷定的检测下限较低,均采用LC-MS/MS法测定,但外文文献报道的血浆处理方法均采用固相萃取处理方法,成本较高,方法的推广有一定的难度。为此,笔者通过试验探索,建立了液-液萃取的样品处理方法,虽步骤稍微增加,但成本低廉、重现性高、检测限灵敏,且血浆中的杂质不干扰样品的测定。伊伐布雷定的标准曲线线性范围为0.48~120 ng/ml,去甲伊伐布雷定的标准曲线线性范围为0.16~40 ng/ml,线性关系良好。其他试验如精密度、稳定性、回收率均能满足方法学的要求。所以笔者认为本文建立的方法快速、简便、灵敏、准确,可以用于伊伐布雷定的人体药动学研究。

参考文献

- [1] Di Francesco D, Camm JA. Heart rate lowering by specific and selective If current inhibition with ivabradine: a new therapeutic perspective in cardiovascular disease[J]. *Drugs*, 2004, 64(16): 1 757.
- [2] Duffull SB, Aarons L. Development of a sequential linked pharmacokinetic and pharmacodynamic simulation model for ivabradine in healthy volunteers[J]. *Euro J Pharmaceu Sci*, 2000, 10(4): 275.
- [3] Portoles A, Terleira A, Calvo A, et al. Effects of hypericum perforatum on ivabradine pharmacokinetics in healthy volunteers: an open-label, pharmacokinetic interaction clinical trial[J]. *J Clin Pharmacol*, 2006, 46(10): 1 188.
- [4] 贾艳艳, 鹿成涛, 宋颖, 等. HPLC-MS/MS联用技术定量测定人血浆中伊伐布雷定及其代谢产物[J]. *质谱学报*, 2012, 33(2): 81.
- [5] 国家食品药品监督管理局. 化学药物制剂人体生物利用度和生物等效性研究技术指导原则[EB/OL]. (2005-03-01) [2014-02-01]. <http://www.sda.gov.cn/ws01/cc1616/83421.html>.

(收稿日期:2014-02-27 修回日期:2014-03-04)

国家卫生和计划生育委员会召开电视电话会议部署落实《卫生计生重要法律法规监督检查工作规划(2014-2017年)》

本刊讯 为确保《卫生计生重要法律法规监督检查工作规划(2014-2017年)》(以下简称《规划》)顺利实施,2014年5月8日下午,国家卫生和计划生育委员会召开电视电话会议,部署落实《规划》。国家卫生和计划生育委员会副主任陈啸宏同志出席会议并作了重要讲话。

陈啸宏指出,做好法律法规监督检查是推进卫生计生依法行政的客观要求,是深化卫生计生改革的重要举措,是转变职能加强全行业监管的有效途径。委党组高度重视这项工作,李斌主任多次作出指示,职能越转变,监督工作越是要跟上,要用几年时间有步骤地将卫生计生法律法规实施情况监督检查一遍。通过开展监督检查,全面了解卫生计生法律法规的落实情况,总结经验、发现问题、提出建议,对完善卫生计生法律法规建设、推动卫生计生行业依法行政和依法执业,推动医改政策的有效落实和生育政策的调整完善、促进卫生计生事业改革发展,提高卫生计生系统行政效能和服务水平、建设人民满意的卫生计生事业具有重要推动作用。

陈啸宏要求,开展法律法规监督检查是国家卫生计生委组建后新开展的一项重点工作,涉及面广、综合性强、协调任务重,需要大家统一思想、凝聚共识,共同做好这项工作。各地要高度重视,统筹规划,按照统一部署,结合实际制订相应的工作方案,认真组织实施并抓好抓实。要结合党的群众路线教育实践活动,以法律法规监督检查工作为抓手,进一步解决群众反映的突出问题,改进工作,提高水平,服务群众。要结合监督检查工作,广泛开展相关卫生计生法律法规的宣传和知识普及,营造良好的社会氛围。要认真开展自查和督导检查,监督检查中发现的违法违规行为要及时督促整改,对落实还不到的要明确提出要求,对涉及修改法律法规、完善政策措施等重大问题要认真研究,提出对策建议,为决策提供科学依据。要尽快建立健全合理、清晰、高效的协调工作机制,明确责任、规范流程、加强配合、形成合力,同时借助各方面力量和资源来共同做好监督检查工作,确保法律法规监督检查工作取得实效。