

LC-MS/MS法测定人血浆中阿折地平的浓度

杜晓琳*, 雍小兰, 王蓝天, 李楠, 黄娟, 冯仕银(成都军区总医院临床药学科, 成都 610083)

中图分类号 R969.1;R972*.4 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)08-1073-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.08.22

摘要 目的:建立测定人血浆中阿折地平浓度的方法。方法:人血浆样本经乙腈沉淀蛋白后采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法进样测定,色谱柱为Zorbax Eclipse XDB-C₁₈,流动相为甲醇-10 mmol/L 乙酸铵(含1%甲酸)(80:20, V/V)。选用多重反应监测扫描方式进行质谱监测,监测离子反应分别为 m/z 583.3→167.1(阿折地平)、 m/z 285.1→154.0(内标地西洋)。结果:阿折地平的血药浓度在0.05~40 ng/ml范围内线性关系良好,定量下限为0.05 ng/ml。日内、日间RSD分别为3.01%~7.75%,0.99%~12.08%;平均提取回收率为110.20%~111.99%。结论:该方法简便、快速、灵敏、专属性强、重现性好,适用于人血浆中阿折地平浓度的测定。

关键词 阿折地平;液相色谱-串联质谱法;药动学

Determination of Content of Azelnidipine in Human Plasma by LC-MS/MS

DU Xiao-lin, YONG Xiao-lan, WANG Lan-tian, LI Nan, HUANG Juan, FENG Shi-yin(Dept. of Clinical Pharmacy, Chengdu Military Command General Hospital, Chengdu 610083, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of azelnidipine. METHODS: Plasma samples were processed by protein precipitation and determined by LC-MS/MS. Chromatography was performed on a Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column using mobile phases of methanol-10 mmol/L ammonium acetate (containing 1% formic acid) (80:20, V/V). The MS detection was used multiple reaction monitoring mode with MS/MS ion transitions at m/z 583.3→167.1 (azelnidipine) and m/z 285.1→154.0 (internal standard diazepam). RESULTS: There was a good relationship of blood concentration in the range of 0.05-40 ng/ml in plasma with the lower limit of quantitation of 0.05 ng/ml. The RSD of intra- and inter-day was 3.01%-7.75%, 0.99%-12.08%, respectively. The extraction recovery was 110.20%-111.99%. CONCLUSIONS: This is a rapid, sensitive, selective and reliable method for the determination of azelnidipine in human plasma.

KEYWORDS Azelnidipine; LC-MS/MS; Pharmacokinetics

- 及其药代动力学[J].中国药科大学学报,2014,45(6):698.
- [5] Shan H. *New crystalline form vi of agomelatine, preparation method and application thereof: European Patent Application, EP2431355A1* [P].2012-03-21.
- [6] Yan Y, Chen J, Geng N, et al. Improving the solubility of agomelatine via cocrystals[J]. *Cryst Growth Des*, 2012, 12(5):222-6.
- [7] Shan H, Yuan Z, Zhu X, et al. *Agomelatine hydrobromide hydrate and preparation thereof: United States, US 20130012592 A1* [P].2013-01-10.
- [8] EMA. *CHMP Assessment report for valdoxan*[EB/OL]. [2011-12-31]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/000915/WC500046226.
- [9] DrugBank. *Agomelatine: DB06594*[EB/OL]. [2011-12-15]. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB06594>.
- [10] Henrion J, Descamps O, Luwaert R, et al. Hypoxic hepatitis in patients with cardiac failure: incidence in a coronary care unit and measurement of hepatic blood flow[J]. *J Hepatol*, 1994, 21(5):696.
- [11] Watanabe T, Kusuhara H, Sugiyama Y. Application of physiologically based pharmacokinetic modeling and clearance concept to drugs showing transporter-mediated distribution and clearance in humans[J]. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*, 2010, 37(6):575.
- [12] Song L, Du Q, Jiang X, et al. Effect of CYP1A2 polymorphism on the pharmacokinetics of agomelatine in Chinese healthy male volunteers[J]. *J Clin Pharm Ther*, 2014, 39(2):204.
- [13] 邹黎.阿戈美拉汀的药代动力学和组织分布研究[D].重庆:重庆医科大学,2012.
- [14] Jones HM, Dickins M, Youdim K, et al. Application of PB-PK modelling in drug discovery and development at Pfizer [J]. *Xenobiotica*, 2012, 42(1):94.
- [15] Bieche I, Narjoz C, Asselah T, et al. Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP) 1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues[J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2007, 17(9):731.

*主管药师,硕士。研究方向:药动学。电话:028-86570439。E-mail:duxiaolinqq@126.com

(收稿日期:2014-09-24 修回日期:2014-10-25)
(编辑:李劲)

阿折地平是新一代长效二氢吡啶类钙拮抗药,于2003年在日本首次上市,临床上广泛用于轻症或中等症状原发性高血压、肾障碍伴高血压以及重症高血压等的降压^[1]。该药可以降低患者的反射性心动过速,特别是降低颜面潮红及头痛的发生率^[2]。现已有研究报道了阿折地平的人体血浆浓度检测方法^[3-6],笔者在已有研究基础上进行了方法优化,并按照对生物样本分析方法的新要求进行了方法学考察^[7-8]。结果表明,本方法节约受试者血浆样本、前处理方法简便易行、节约有机试剂、检测时间短,适合人体药动学研究的血浆样本高通量检测工作。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A型高效液相色谱仪(日本岛津公司);API3200型三重四级杆串联质谱仪,配备电喷雾电离源(ESI源)以及Analyst1.5.1软件(美国ABI公司);Millipore超纯水系统(美国Millipore公司);AB135-S型十万分之一天平(瑞士Mettler Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

阿折地平原料药(江苏康缘药业股份有限公司,纯度:99.6%,批号:130701);地西洋标准品(中国食品药品检定研究院,纯度:99.9%,批号:171225-201304);甲醇、乙腈、乙酸、乙酸铵为色谱纯,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

色谱柱:Zorbax Eclipse XDB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);甲醇-10 mmol/L 乙酸铵(含1%甲酸)(80:20, V/V);流速:1 ml/min,柱后不分流;柱温:40 ℃。

离子源:电喷雾离子源;离子喷射电压:5 500 V;温度:550 ℃;源内气体1(GS₁, N₂)压力:75 psi;源内气体2(GS₂, N₂)压力:75 psi;气帘气(N₂)压力:35 units;正离子方式检测;扫描方式为多重反应监测(MRM);阿折地平和内标解簇电压(DP)分别为40、30 V;碰撞能量(CE)分别为35、40 eV;用于定量分析的离子反应分别为 m/z 583.3→167.1(阿折地平)、 m/z 285.1→154.0(内标地西洋)。

2.2 溶液的制备

用十万分之一天平准确称取阿折地平10.18 mg,置于5 ml量瓶中,甲醇溶解后用甲醇-水(1:1, V/V)定容至刻度,摇匀,即得质量浓度为2 mg/ml的阿折地平贮备液,置于4 ℃冰箱避光保存。标准曲线溶液(质量浓度依次为40、10、4.0、1.0、0.4、0.1、0.05 ng/ml)分别由贮备液加甲醇-水(1:1)依次稀释而得。

另用十万分之一天平准确称取地西洋标准品10.38 mg,置于10 ml量瓶中,甲醇溶解后用甲醇-水(1:1, V/V)定容至刻度,摇匀,即得质量浓度为1.0 mg/ml的地西洋贮备液,置于4 ℃冰箱保存,取适量用乙腈稀释至1.25 ng/ml即得内标溶液。

2.3 血样处理

取阿折地平工作液100 μl、空白血浆100 μl及内标工作液(1.25 ng/ml地西洋,乙腈配制)300 μl,涡旋30 s混匀,4 ℃以离心半径为8 cm,转速为14 000 r/min低温离心10 min,取上清液进样20 μl。样品处理全过程需避光。

2.4 专属性考察

分别取6份不同来源的空白血浆,除不加内标(用乙腈代替)外,其他按“2.3”项方法操作,进样分析。结果表明,阿折地平和内标的保留时间处均无内源性杂质干扰测定。色谱见图1。

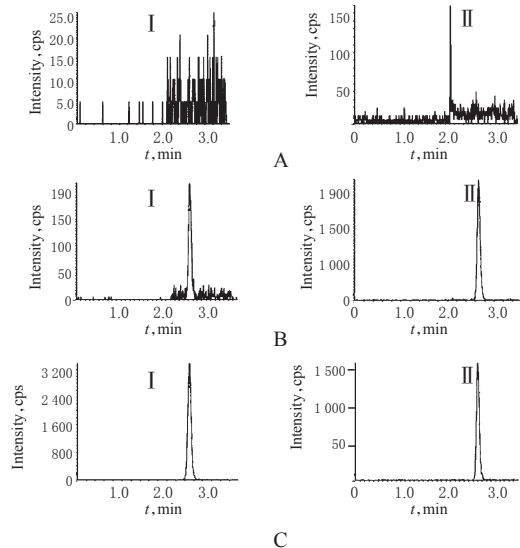


图1 LC-MS图谱

A. 空白血浆; B. 空白血浆+0.05 ng/ml阿折地平对照品溶液+内标溶液; C. 健康受试者单次口服阿折地平8 mg 3 h后血浆样本; I. 阿折地平; II. 地西洋

Fig 1 LC-MS chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma with 0.05 ng/ml Azelnidipine reference solution and diazepam; C. plasma sample 3 h after administrating 8 mg azelnidipine to healthy volunteers; I. azelnidipine; II. diazepam

2.5 标准曲线制备及定量下限考察

用空白血浆配制相当于阿折地平质量浓度分别为0.05、0.1、0.4、1.0、4.0、10、40 ng/ml的样品,按“2.3”项方法操作,记录样品和内标峰面积,利用样品与峰面积比对样品浓度作直线回归,得回归方程为: $y=2.1x+0.029 8$ ($r=0.999 8$)。结果表明,阿折地平血药浓度在0.05~40 ng/ml范围内线性关系良好,本试验的最低检测浓度(定量下限)为0.05 ng/ml。

2.6 精密度及准确度试验

按照文献[7]对生物样本检测方法学精密度及准确度的最新要求,本试验增加了定量下限的精密度考察,即取空白血浆按“2.5”项方法制备定量下限、低、中、高质量浓度(0.05、0.1、1.0、30 ng/ml)的质控样本,每一浓度进行6样本分析,连续测定3 d,根据当日的标准曲线,计算QC样品的测定浓度。将QC样品的结果进行方差分析,计算方法的精密度与准确度(方法回收率),结果见表1。

2.7 稳定性考察

本研究分别考察了阿折地平低、中、高质量浓度(0.1、1.0、30 ng/ml)的血浆质控样本在自动进样器放置4 h、室温放置3 h、反复冻融3次和-80 ℃冰箱冷冻保存67 d的稳定性。结果表明,阿折地平血浆样本在上述条件下均稳定。稳定性试验结果见表2。

2.8 提取回收率与基质效应^[8]

表1 精密度及回收率试验结果($n=18$)Tab 1 Results of precision and recovery test($n=18$)

样本	加入浓度, ng/ml	日内精密密度		日间精密密度		方法回 收率,%
		测得浓度, ng/ml	RSD, %	测得浓度, ng/ml	RSD, %	
定量下限	0.05	0.047 1	7.75	0.048 3	5.29	96.6
低浓度	0.1	0.100	7.15	0.104	12.08	104.0
中浓度	1	1.02	3.01	1.02	0.99	102.0
高浓度	30	30.3	3.27	30.1	1.23	100.3

表2 稳定性试验结果($n=3$)Tab 2 Results of precision test($n=3$)

保存条件	加入浓度,ng/ml	测得浓度,ng/ml	RSD,%
自动进样器(4℃)放置4 h	0.1	0.098 5	6.11
	1.0	1.027	4.60
	30	29.7	0.89
室温放置3 h	0.1	0.100 8	2.12
	1.0	1.07	4.95
	30	32.4	3.66
反复冻融3次	0.1	0.092 6	2.68
	1.0	0.92	2.40
	30	26.1	0.96
-80℃长期冻存67 d	0.1	0.103	1.49
	1.0	1.06	7.63
	30	29.6	4.60

本研究考察了低、中、高质量浓度(0.1、1.0、30 ng/ml)下血浆样本的提取回收率($n=3$)。以各待测物血浆样品提取后的色谱峰面积与空白血浆经提取后加入相应浓度的阿折地平溶液获得的色谱峰面积的比值计算回收率,阿折地平低、中、高质量浓度下的提取回收率分别为110.83%、110.20%和111.99%;同法计算内标的提取回收率为106.21%、110.33%和104.80%。

按“样本前处理”以纯水代替空白血浆处理低浓度质控样本(0.1 ng/ml),进样后所得峰面积为 A_s ;同法用6个不同来源的空白血浆样品各3个处理低浓度质控样本(0.1 ng/ml),进样后所得峰面积为 A_m 。按公式 $A_m/A_s \times 100\%$ 计算所得基质效应因子,同法处理内标得到内标的基质效应因子,阿折地平与内标的比值为内标归一化基质效应因子。结果,阿折地平正常血浆内标归一化基质效应因子的RSD=6.07%,符合欧盟指导原则要求的 $< \pm 15\%$ 。

3 讨论

3.1 色谱、质谱条件及内标的选择

阿折地平在色谱柱上的保留强且为碱性药物,因此选择高比例有机相/水相中加酸均有助于缩短阿折地平的保留时间,预试不同比例的有机相以及不同浓度的甲酸和乙酸,最后确定甲醇比例为80%,水相比例为20%,水相组成为含1%甲酸的10 mmol/L乙酸铵水溶液。在该流动相组成及比例条件下,内标及待测物均有很好的保留时间及色谱峰型,且乙酸铵有助于提高质谱离子化效率,提高质谱信号。

本研究选择了与待测物有相似色谱行为和提取条件且性质稳定的化合物地西洋作为内标,避免了化合物与内标出峰时间相差太大导致检测时间过长,或者内标不稳定(例如需要避光)等因素给试验带来不必要的麻烦。

3.2 样本前处理

本试验考察了液-液萃取和直接沉淀蛋白法对阿折地平血浆样本进行提取,液-液萃取法进行前处理时需要加碱化试剂氢氧化钠使阿折地平变成分子形式而萃取到有机试剂层,碱化后的血浆杂质也会与阿折地平一同被萃取出来,并且影响阿折地平重复测定的精密度和准确度。降低碱化试剂浓度可以改善杂质的干扰,但同时阿折地平的提取回收率也会降低,因此放弃了液-液萃取法;有机试剂直接沉淀蛋白法则不需要加碱化试剂,简单易行,乙腈沉淀效果优于甲醇。本研究将内标以乙腈试剂配制,简化了加样步骤也提高了待测物灵敏度。方法学考察结果证明,乙腈沉淀蛋白法最低定量下限为0.05 ng/ml,方法灵敏度及重现性均符合相关要求,可以用于人体药动学研究。

本试验建立了LC-MS/MS法测定人血浆中阿折地平的浓度,方法简便、快速、灵敏度高、专属性强,前处理方法简单易行,既节约血浆样本又节省有机试剂,减少试剂对环境的污染,分析时间短,可以实现人体血浆样本的高通量检测工作,本方法已经成功应用于中国人体的生物利用度研究。二氢吡啶类药物存在光歧化反应,因此为了避免阿折地平见光分解,整个试验过程需要避光。

参考文献

- [1] 李后涛,周美丽,刘杰.抗高血压新药阿折地平[J].齐鲁药事,2009,28(2):123.
- [2] 焦海旭,张明秋,赵金艳,等.阿折地平降压效果评价及其抑制动脉粥样硬化的作用[J].吉林大学学报:医学版,2012,38(4):736.
- [3] 邹建军,朱余兵,于翠霞,等.液相色谱-质谱法测定人血浆中阿折地平的浓度及药动学[J].中国新药与临床杂志,2007,26(1):36.
- [4] Zou JJ1, Ji HJ, Zhou XH, et al. Determination of azelnidipine by LC-ESI-MS and its application to a pharmacokinetic study in healthy Chinese volunteers[J]. Pharmazie, 2008,63(8):568.
- [5] 贾静,南峰,梁茂植,等.高效液相色谱-串联质谱法测定人血浆中阿折地平浓度及药动学[J].中国医院药学杂志,2010,30(24):2 088.
- [6] Ding L, Li L, Ma P. Determination of azelnidipine in human plasma by liquid chromatography- electrospray ionization-mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2007,43(2):575.
- [7] 钟大放,李高,刘昌孝.生物样品定量分析方法指导原则:草案[J].药物评价研究,2011,34(6):4 095.
- [8] 王鹏,蒋学华,王凌.LC-MS应用于生物样品检测中基质效应的评价[J].中国新药杂志,2011,20(20):1 953.

(收稿日期:2014-08-29 修回日期:2014-09-20)

(编辑:李 劲)