

# 人血浆中吲哚帕胺的测定

苑金鹏<sup>①</sup> 张士俊<sup>a</sup> 程传格 江婷 林玉斌<sup>b</sup>

(山东省分析测试中心 济南市经十路东科院路 19 号 250014)

<sup>a</sup>(天津药物研究院 天津市 300193)

<sup>b</sup>(济南市环境检测站 济南市 250010)

**摘要** 在碱性条件下用二氯甲烷提取, 以甲磺酸多沙唑嗪为内标, 采用 XDB C<sub>18</sub> 反相柱(5 $\mu$ ), 质谱检测器采用 AP-ESI, 正离子模式, 采集方式为 SIM, 流动相为乙腈-水-醋酸-醋酸铵(50:50:0.1:0.2, V/V), 用液相色谱-质谱联用法(LC-MS) 测定人血浆中吲哚帕胺浓度。吲哚帕胺在 1—150ng/mL 范围内线性关系良好, 提取回收率大于 80%, 精密度(RSD) 均小于 10%, 检出限为 1.0ng/mL。该法方便、准确、灵敏, 适用于吲哚帕胺缓释制剂的药代动力学研究, 也可以用于临床测定吲哚帕胺血浆药物浓度。

**关键词** 吲哚帕胺, 液相色谱-质谱法, 血药浓度。

中图分类号: O657.63

文献标识码: B

文章编号: 1004-8138(2006)02-0324-04

## 1 前言

吲哚帕胺(Indapamide, 简称 INDP) 是一种具有利尿作用和钙离子拮抗作用的新型降压药。大量临床试验表明, 它具有降压效果好, 作用时间长, 副作用小, 可长期使用等优点, 是一种安全高效的理想降压药, 具有良好的市场前景<sup>[1]</sup>。缓释制剂可在平稳降压的同时, 进一步减少副作用。国外曾用高效液相色谱法对不同剂型药物做过质量控制的研究<sup>[2,3]</sup>, 国内报道的关于人血浆中吲哚帕胺浓度的检测方法的灵敏度低, 不能满足缓释制剂人体生物等效性的研究要求。本文用二氯甲烷为萃取溶液, 用 LC-MS 检测血浆中吲哚帕胺的浓度, 最低检测浓度可以达到 1.0ng/mL, 该法专属性好, 灵敏度高。

## 2 实验方法

### 2.1 药品与试剂

钠催离(吲哚帕胺缓释片), 规格 1.5mg/片, 施维雅制药有限公司产品, 市售, 批号 3C9023。

吲哚帕胺对照品, 中国药品生物制品检定所, 批号 10257-002; 乙腈(色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 二氯甲烷(分析纯, 天津市化学试剂厂); 氢氧化钠(分析纯, 上海华美医用精细化工厂); 乙酸铵(分析纯, 天津市天大化学实验厂)。

### 2.2 实验仪器

HP 1100 LC-MSD 液相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司); LG-2.4A 高速离心机(北京医用离心机厂); XK-96A 快速混匀器(姜堰市新康医疗器械有限公司); N-EVAPMIII 氮吹仪(Organomation Associates, Inc)。

① 联系人, 电话: (0531) 82605312; E-mail: yuanjip@126.com

作者简介: 苑金鹏(1978—), 男, 山东省德州市人, 助理研究员, 从事药物分析工作。

收稿日期: 2005-10-19; 接受日期: 2005-12-06

## 2.3 色谱条件及质谱条件

色谱条件: 流动相为乙腈-水-醋酸-醋酸铵 (50 : 50 : 0.1 : 0.2, V/V), 经 0.45 $\mu$ m 微孔滤膜过滤, 在线脱气, 流速 1.0 mL/min, 不分流。色谱柱: XDB C<sub>18</sub>柱 (5 $\mu$ m), 4.6 $\times$ 250mm (ID $\times$ L)。进样量 20 $\mu$ L。检测器: 质谱。

质谱条件: AP-ESI, 正离子模式, 雾化压力 275.8 kPa, 保护气 10 L/min N<sub>2</sub>, 毛细管电压 4000 V, 离子源温度 100 $^{\circ}$ C, 碎片电压为 220 V, 采集方式: SIM。采集离子: 吡啶帕胺  $m/Z$  = 366.1 (M + H), 甲磺酸多沙唑嗪  $m/Z$  = 452.2 (M + H)。

## 2.4 标准储备液的配制

精密称取吡啶帕胺, 用色谱纯乙腈配成浓度为 1 $\mu$ g/mL 的标准储备液, 密封, 4 $^{\circ}$ C 避光保存。精密称取甲磺酸多沙唑嗪, 用高纯水配成浓度为 200 ng/mL 的标准储备液, 密封, 4 $^{\circ}$ C 避光保存。

## 2.5 血浆样本处理

在 5 mL 具塞离心管中准确加入待测血浆 1 mL, 加入内标甲磺酸多沙唑嗪溶液 (200 ng/mL) 0.1 mL, 再加入少量乙酸铵和 1 mol/L 氢氧化钠 0.2 mL 及萃取液 二氯甲烷 5 mL, 充分振荡萃取 4 min, 离心后取下层有机相 4 mL, 用氮气吹干溶剂, 然后用 0.2 mL 流动相复溶, 供分析用。进样量 20 $\mu$ L。

## 2.6 测定方法学确证

校准曲线: 于 0.9 mL 空白人血浆中加入内标 (200 ng/mL) 和不同浓度的吡啶帕胺 (INDP) 标准品溶液各 50 $\mu$ L, 得到 INDP 浓度为 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 和 150 ng/mL 的标准血浆样品, 复管操作, 处理和测定方法同上。

回收率: 于 0.9 mL 空白人血浆中加入内标 (200 ng/mL) 和不同浓度的 INDP 标准品溶液各 50 $\mu$ L, 得到 INDP 的终浓度为 5、20 和 100 ng/mL 的标准血浆样品, 每个浓度重复 5 个样品, 处理和测定方法同上。与未经处理的样品比较计算绝对回收率。

日内重现性: 同回收率测定方法配制和处理 5、20 和 100 ng/mL 的标准血浆样品, 连续测定 5 次, 计算重现性。

日间重现性和样品稳定性: 同回收率测定方法配制和处理 5、20 和 100 ng/mL 的标准血浆样品, 复管操作, 流动相复溶后的样品于室温下密闭放置, 2 份样品连续 3 天测定, 考察测定仪器的日间重现性和样品室温放置稳定性。

冻融稳定性: 同回收率测定方法配制 5、20 和 100 ng/mL 3 个浓度的标准血浆样品, 4 管重复操作, 取各两份样品直接处理测定, 另两份样品冷冻一周, 复融, 同法处理测定, 比较冷冻前后的含量变化。

质控: 精密称取样品适量, 加少量乙腈溶解后, 以水稀释至含吡啶帕胺 25、100 和 500 ng/mL 3 个浓度和内标 50 ng/mL 的标准溶液, 相当于提取样品的 5、20 和 100 ng/mL 浓度, 经预试验表明本品经冷冻后复溶, 含量稳定, 因此, 将上述样品分装后冷冻保存作为质控样品, 测定校准曲线时或测定样品中间穿插测定质控样品, 临测定时加入内标, 以考察每次测定的系统差异。

## 2.7 样本测定

1 名志愿者禁食 12 h 后, 于早晨口服钠催离 6 mg (4 片), 温开水 200 mL 送下。服药后 4 h 进食标准餐。每组服药前取空白血浆, 试验制剂组于服药后 1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、24 h 取静脉血 3 mL。肝素抗凝, 离心分离血浆, 按“血浆样本处理”方法处理样本, 进样分析, 测得血药浓度。

# 3 结果与讨论

## 3.1 方法的特异性

对空白血样、对照品溶液、加入标准血样和实际样品同时测定的色谱图进行比较, 空白样品中

没有 INDP 和内标峰, 对照品溶液中 INDP 和内标色谱峰的保留时间分别为 5.8 和 4.3min 左右, 加入标准血样和实际样品中的 INDP 和内标色谱峰与对照品溶液一致, 表明本方法测定的特异性较好(见图 1)。

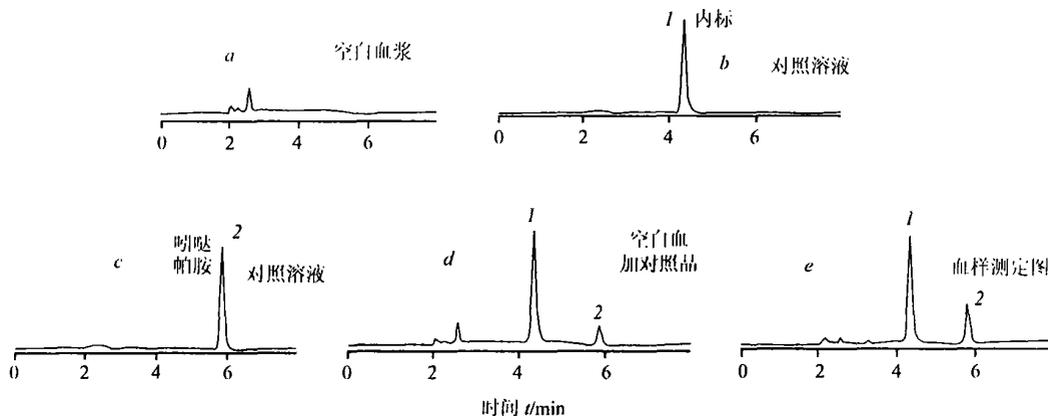


图 1 吡啶帕胺方法的特异性的色谱图

a——空白血浆; b——内标标准液; c——INDP 标准液; d——空白血浆加对照品; e——志愿者血浆测定图。

图内符号: 1——内标; 2——INDP。

### 3.2 校准曲线

以测得各标准血浆样品中吡啶帕胺的峰面积与内标峰面积的比例为自变量, 各样品的实际浓度为因变量作直线回归, 所得校准曲线结果见表 1。

表 1 吡啶帕胺测定方法的校准曲线数据

C	1	2	5	10	20	50	100	150
$R_1$	0.0156	0.0195	0.0540	0.1162	0.1862	0.4574	1.0219	1.5158
$R_2$	0.0061	0.0188	0.0503	0.1064	0.1945	0.4802	1.0105	1.5849
平均	0.0108	0.0191	0.0521	0.1113	0.1904	0.4688	1.0162	1.5504

C: 含量(ng/mL); R: 样品与内标峰面积比值, 检测灵敏度为 1ng/mL。C = 97.20601R + 0.705185( $r = 0.9995$ )。

### 3.3 回收率和精密度

配制 5, 20 和 100ng/mL 3 种浓度标准血浆样品各 5 个复管, 经二氯甲烷提取后测得的峰面积与同浓度的标准样品溶液测得的峰面积相比所得平均回收率为 91.8%。吡啶帕胺日内测定的准确性和日间测定的重现性较好, 相对标准偏差均在 10% 以内(表 2)。

表 2 吡啶帕胺测定方法的日内及日间精密度和回收率

浓度 (ng/mL)	日内精密度 (%)	日间精密度 (%)	回收率 (%)
2.0	8.5	9.8	86.0
50	6.7	7.6	87.8
150	3.5	4.6	89.5

### 3.4 稳定性试验

本试验测定了吡啶帕胺样品于冷冻 7 天后溶解, 提取测定方法同冷冻前, 结果显示, 血浆中吡啶帕胺的含量没有明显改变(见表 3)。

表 3 吡啶帕胺测定方法的冻融稳定性(ng/mL)

加入 INDP 浓度	冻融前测定浓度	冻融后测定浓度
5	4.46	5.27
20	20.28	20.78
100	109.65	109.78

### 3.5 样本测定

1 名志愿者禁食 12h 后口服钠催离 6mg(4 片)测得药时曲线见图 2。

## 4 结论

国内报道人血浆中吲哒帕胺浓度的检测方法是采用高效液相色谱法<sup>[4]</sup>, 线性范围为 40—500 ng/mL, 并且需要的血样量较大, 不能满足进行缓释制剂人体生物利用度的测定灵敏度。本文探索性地利用反向高效液相色谱质谱联用方法进行了方法学研究, 大大提高了检测的灵敏度, 且分离度良好, 无杂峰干扰。

在提取溶液的选择中, 曾试验了正己烷、乙酸乙酯、乙醚和二氯甲烷等提取溶剂, 其中以二氯甲烷的提取率最高。碱化提取可以进一步提高提取率, 从而减小提取溶剂体积, 进而缩短挥发时间。

试验结果表明该方法具有简便, 快速, 准确, 灵敏度高和分离度好等特点。在此基础上, 进行了单个样本的研究, 获得了满意的结果。

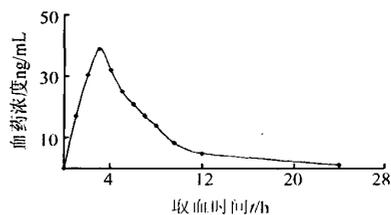


图 2 一志愿者的血药浓度-时间曲线

## 参考文献

- [1] 王鹏, 范静芸, 唐小勇. 吲哒帕胺的制备及纯化[J]. 北京理工大学学报, 2001, 21(4): 530—534.
- [2] Alonso R M, Jimenez R M, Ortiz E *et al.* Quantitative Determination of Indapamide in Pharmaceuticals and Urine by High-Performance Liquid Chromatography with Amperometric Detection[J]. *Journal of Chromatographic Science*, 1999, 37(8): 283—287.
- [3] Suski I, Altnoz S. Two Derivative Spectrophotometric Determinations of Indapamide in Pharmaceutical Dosage Forms[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002, 30(2): 357—364.
- [4] 陈端霞, 游凯, 傅如南. 人血清中吲哒胺的高效液相色谱法测定[J]. 中国医学科学院学报, 1990, 12(4): 286—289.

## Determination of Indapamide in Human Plasma by LC-MS

YUAN Jin-Peng ZHANG Shi-Jun<sup>a</sup> CHENG Chuan-Ge JIANG Ting LIN Yu-Bin<sup>b</sup>

(ShanDong Analysis and Test Center, Jinan 250014, P. R. China)

<sup>a</sup>(Tianjin Pharmaceutical Academy, Tianjin 300193, P. R. China)

<sup>b</sup>(Jinan Environmental Control Point, Jinan 250010, P. R. China)

**Abstract** The amount of indapamide in human plasma was determined by LC-MS with doxazosin mesylate as internal standard in reversed-phase Inertsil C<sub>18</sub> column (5 $\mu$ ) and mobile phase of acetonitrile : water : acetic acid : ammonium acetate (50 : 50 : 0.1 : 0.2, V/V) at flow rate of 1.0 mL/min. The plasma was extracted by dichloromethane in basic condition. Detection is performed with an electrospray ionization mass spectrometer in positive ion and selected-ion monitoring mode. Indapamide was separated completely under the optimal conditions in the linear range of 1.0—150 ng/mL with the RSD of less than 10%, the average recovery of more than 80% and detection limit of 1.0 ng/mL. The method is convenient, rapid, accurate and suitable for determination of Indapamide in human plasma and pharmacokinetic studies.

**Key words** Indapamide, LC-MS, Plasma Concentration.