

液相色谱-质谱联用法测定人血浆中坎地沙坦

张志涛, 霍强, 蒋志文*

(蚌埠医学院药理学系, 蚌埠 233030)

摘要 目的: 建立测定人血浆中坎地沙坦的液相色谱-质谱联用法。方法: 血浆样品经液-液萃取后, 以甲醇-水-异丙醇 (55: 30: 15) 为流动相, 采用 Inertsil ODS-3 柱 (150 mm × 2.1 mm, 5 μm), 通过电喷雾离子化离子阱时间串联质谱, 以选择离子反应监测 (SRM) 方式进行检测。用于定量分析的二级碎片离子分别为 m/z 423 (坎地沙坦) 和 m/z 418 (内标缬沙坦)。结果: 线性范围为 1.024~307.2 ng·mL⁻¹, 最低定量浓度为 1.024 ng·mL⁻¹, 每个样品测试时间仅 4.8 min。在坎地沙坦酯片临床药物动力学研究项目中, 应用此法可在 1 周内测试 600 个血浆样品。结论: 该法灵敏度高, 操作简便、快速、准确, 适用于临床药物动力学研究。

关键词: 坎地沙坦; 液相色谱-质谱联用法; 血浆药物浓度

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)05-0778-04

LC-MS determination of candesartan in human plasma

ZHANG Zhi-tao, HUO Qiang, JIANG Zhi-wen*

(Faculty of Pharmacy, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China)

Abstract Objective To develop a sensitive and specific LC/MS method for determination of candesartan in human plasma. **Methods** Candesartan and internal standard valsartan were extracted from plasma using liquid-liquid extraction, then separated on a Inertsil ODS-3 column (150 mm × 2.1 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of methanol-water-isopropanol (55: 30: 15) at a flow rate of 0.2 mL·min⁻¹. A Finnigan LCQ ion trap mass spectrometer equipped with electrospray ionization source was used as detector and was operated in the positive ion mode. Selected reaction monitoring (SRM) using the precursor⁺ product ion combinations of m/z 441⁺ 423 and m/z 436⁺ 418 was used to quantify candesartan and internal standard, respectively. **Results** The linear calibration curves were obtained in the concentration range of 1.024~307.2 ng·mL⁻¹. The limit of quantification was 1.024 ng·mL⁻¹. Each plasma sample was chromatographed within 4.8 min. The method was successfully used in several pharmacokinetic studies for candesartan. More than 600 plasma samples were assayed within one week. **Conclusion** The method is proved to be suitable for clinical investigation of candesartan pharmacokinetics, which offers advantages of specificity, speed, and greater sensitivity over the previously reported methods.

Key words candesartan; liquid chromatography-ion trap mass spectrometry; plasma drug concentration

坎地沙坦 (candesartan) 是一种高度选择性长效 AT₁ 受体拮抗剂, 临床主要用于治疗原发性高血压。与同类型的其他药物相比, 药效显著而持久, 有很好的应用前景。坎地沙坦为前药坎地沙坦酯的体内长效活性代谢成分, 坎地沙坦酯在吸收过程中完全转化为坎地沙坦^[1], 因此以坎地沙坦的血药浓度为指标进行药物动力学研究。由于坎地沙坦的血药浓度低, HPLC-UV 检测不够灵敏, 而用荧光法测定时,

对仪器的稳定性及样品前处理等要求苛刻^[2,3]。本文采用液相色谱-质谱联用法测定人血浆中坎地沙坦, 并将其成功用于临床药物动力学样品分析。

1 材料与方法

1.1 仪器 美国 Finnigan 公司 LCQ Advantage MAX 型高效液相色谱-质谱联用仪, 配有电喷雾离子源 (ESI) 以及 Xcalibur 1.3 数据处理系统, Surveyor LC 泵, Surveyor 自动进样器; XW-80A 型漩涡混合器 (上

* 通讯作者: Tel: (0552) 3175228 Fax: (0552) 3175234 E-mail: zzwj51@yahoo.com.cn

海琪特分析仪器有限公司); TDL- 5型离心机(北京仪诚科技公司); ALC 4239R型高速大容量台式离心机。

1.2 药品与试剂 坎地沙坦对照品(含量 99.0%), 缬沙坦(内标, 含量 99.0%), 均由北京法玛泰医药技术开发有限公司提供; 坎地沙坦酯片(北京法玛泰医药技术开发有限公司, 规格 8 mg); 甲醇为色谱纯(Merck); 异丙醇为色谱纯(Fisher Scientific); 甲酸、乙醚均为分析纯; 水为重蒸水(Milli-Q); 空白人血浆由蚌埠中心血站提供。

1.3 色谱条件 色谱柱为 Inertsil ODS-3 柱(150 mm × 2.1 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水-异丙醇(55:30:15); 流速为 0.2 mL · min⁻¹; 柱温为 25 °C。

1.4 质谱条件 离子源为 ESI 源; 喷雾电压 5.0 kV; 毛细管温度 275 °C; 鞘气速度 10.5 L · min⁻¹; 辅助气速度 3 L · min⁻¹; 正离子方式检测, 扫描方式为选择反应监测(SRM), 用于定量的离子分别为坎地沙坦 m/z 母离子 (M+1) 441⁺ 子离子 423 内标缬沙坦 m/z 母离子 (M+1) 436⁺ 子离子 418 扫描时间为 0.5 s

1.5 血浆样品处理 取血浆 0.5 mL 置于 10 mL 具塞试管中, 依次加入 0.2 mol · L⁻¹ 盐酸溶液 0.5 mL, 缬沙坦内标溶液 (216 ng · mL⁻¹, 流动相溶解) 100 μL, 涡旋 30 s 加入提取溶剂乙醚 5 mL, 涡旋振荡 15 min, 3000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 分取有机相 4 mL, 残余溶液中再加入乙醚 5 mL, 同法操作, 合并有机相, 加入 10% 丙二醇的甲醇溶液 0.1 mL, 涡旋振荡 1 min, 35 °C 下 N₂ 吹干, 残渣以 500 μL 流动相溶解, 取上清液 10 μL 进样。

2 结果

2.1 方法的专属性

分别取 6 名受试者的空白血浆 0.5 mL, 按“血浆样品处理”依法操作, 进样 10 μL, 得色谱图 1-A; 将一定浓度的坎地沙坦对照品溶液与缬沙坦内标溶液分别加入空白血浆, 同法操作, 得色谱图 1-B; 取 1 名受试者服药后 6 h 的血浆样品 0.5 mL, 同法操作, 得色谱图 1-C。结果表明, 空白血浆中内源性物质不干扰坎地沙坦的测定, 坎地沙坦和缬沙坦的保留时间分别为 3.3 和 4.2 min, 该色谱条件能够将受试者血浆样品中坎地沙坦与内标缬沙坦有效分离。

坎地沙坦为含羧基侧链的二苯四氮唑衍生物, 采用正离子方式检测, 其准分子离子峰为 m/z 441, 选择性对其进行二级质谱扫描, 得到 1 个很强的脱水碎片离子 m/z 423 以 SRM 扫描方式选择其进行

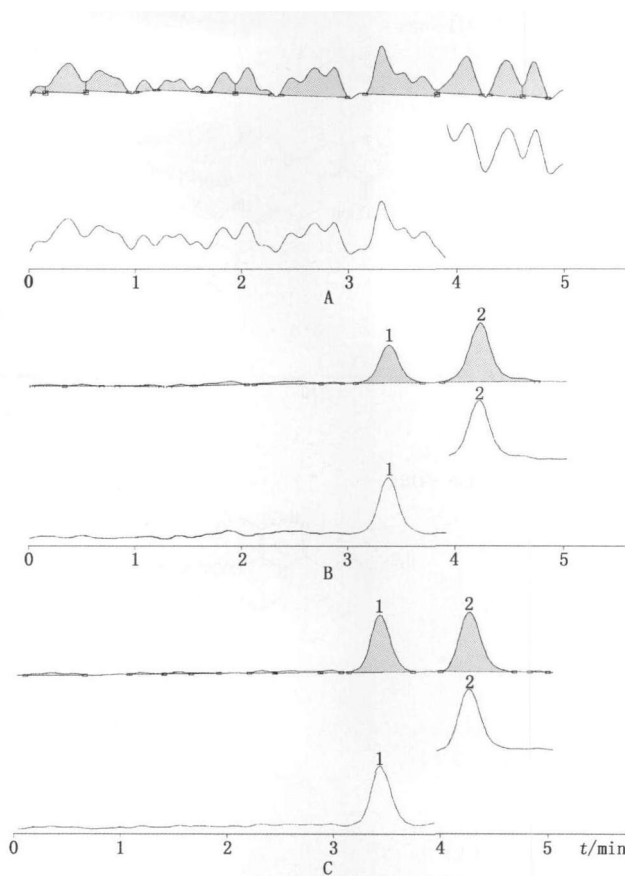


图 1 坎地沙坦专属性质谱图

Fig 1 Chromatograms of candesartan

A 空白血浆 (blank plasma) B 坎地沙坦 46 ng · mL⁻¹ 与缬沙坦 216 ng · mL⁻¹ 的对照品血浆 (plasma spiked with 46 ng · mL⁻¹ candesartan and 216 ng · mL⁻¹ valsartan) C 受试者给药后 6 h 血浆样品 (plasma sample after administration 6 h)

1. 坎地沙坦 (candesartan) 2. 缬沙坦 (valsartan)

定量分析, 图 2-A 给出了坎地沙坦的二级全扫描质谱图。图 2-B 为内标缬沙坦的二级全扫描质谱图, 使用质子化的准分子离子峰 (m/z 436) 作为母离子, 利用生成的主要碎片离子 m/z 418 进行定量分析。以这种方式获得的色谱图具有高度的专属性。

2.2 标准曲线和线性范围 精密称取坎地沙坦对照品 9.6 mg 置 25 mL 量瓶中, 加流动相适量溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成 384 μg · mL⁻¹ 对照品储备液。分别精密量取上述储备液适量, 加流动相稀释制成 5.12 15.36 38.4 76.8 153.6 230.4 307.2 768 1536 ng · mL⁻¹ 的系列对照品溶液。分别精密量取系列对照品溶液 100 μL, 35 °C 下 N₂ 吹干, 加入空白血浆 0.5 mL, 配成含坎地沙坦 1.024 3.072 7.680 15.36 30.72 46.08 61.44 153.6 307.2 ng · mL⁻¹ 的对照品血浆, 按“1.5”项下方法自“依次加入 0.2 mol · L⁻¹ 盐酸溶液 0.5 mL”起同

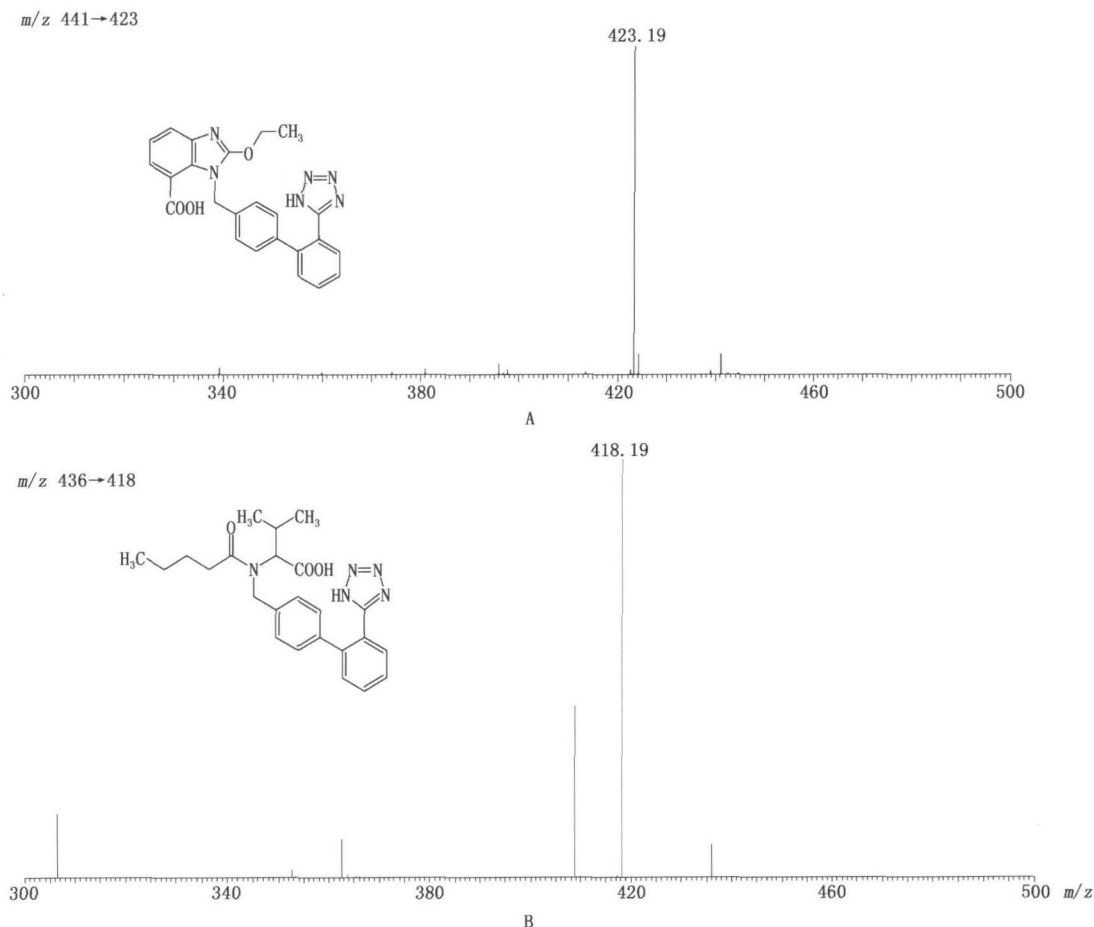


图 2 坎地沙坦 (A) 和缬沙坦 (B) 的二级质谱全扫描图

Fig 2 Full scan MS/MS spectra of candesartan (A) and valsartan (B)

法操作, 建立标准曲线。以对照品血浆中待测物浓度为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标, 用加权 ($1/C^2$) 最小二乘法进行回归运算, 求得的直线回归方程即为标准曲线。典型的回归方程为:

$$Y = 0.00568 + 0.01444C \quad r = 0.9966$$

线性范围为 $1.024 \sim 307.2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 最低定量浓度为 $1.024 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 精密度与准确度 取空白血浆 0.5 mL , 按“2.2”项下方法制备坎地沙坦低、中、高 3 个浓度 ($3.072, 46.08, 153.6 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的质量控制 (QC) 样品, 每一浓度进行 6 样本分析, 连续测定 3 d 并与标准曲线同时进行, 以当日的标准曲线计算 QC 样品浓度, 将结果进行方差分析, 求算本法的准确度与精密度, 结果见表 1。实验数据表明, 该分析方法符合有关国际规范^[4]要求。

2.4 提取回收率及样品稳定性考察

分别取低、中、高 3 个浓度 (分别为 $3.072, 46.08, 153.6 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的系列对照品溶液, 按“2.2”项下方法操作, 以提取后的色谱峰面积与未

表 1 坎地沙坦的准确度与精密度

Tab 1 Accuracy and precision of candesartan in human plasma

$C / \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$		精密度 (precision), RSD %		相对偏差 (relative error) %
加入 (added)	测定 (measured)	日内 (intra-day)	日间 (inter-day)	
3.072	3.472	5.8	10.2	13.0
46.08	41.30	1.2	8.4	10.4
153.6	151.1	2.9	6.4	1.6

经提取直接进样获得的对照品溶液色谱峰面积之比, 考察样品的提取率。每一浓度进行 6 样本分析。3 种浓度下样品的提取回收率分别为 87.1%, 87.2%, 89.5%; RSD 分别为 14.5%, 1.2%, 2.8%。内标溶液经同样提取处理, 其回收率为 82.3%, RSD 为 3.6%。

将“2.2”项下的 QC 样品分别在室温放置 24 h 在 -20°C 冰箱中放置 1 d 反复冻融 3 次; 在 -20°C 冰箱中放置 15 d。测定血浆药物浓度, 考察结果表明血浆样品在室温放置和冷冻储存下稳定。

2.5 分析方法在药动力学研究中的应用

在坎地沙坦临床药动力学研究中, 18名中国男性健康受试者单剂量口服 8 mg 坎地沙坦酯, 于服药前和服药后 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 36, 48 h 取肘静脉血 3 mL, 4000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 分离血浆, 于 -20°C 冷冻储存, 直至测定。

图 3 中给出了 18 名受试者单剂量口服 1 片坎地沙坦酯片 (规格 8 mg) 后, 坎地沙坦的平均血药浓度-时间曲线。

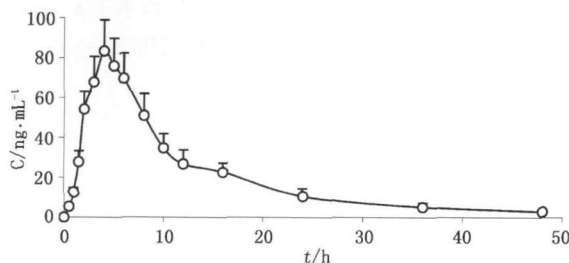


图 3 平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=18$)

Fig 3 Mean plasma concentration-time curve

根据所测坎地沙坦血浆浓度-时间数据, 利用 DAS 2.0 药动学程序计算主要药动力学参数 $t_{1/2}$, $C_{\max}$, $T_{\max}$, MRT, $\text{AUC}_{0-48\text{h}}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ 分别为 (12.8 ± 7.9) h, (97.06 ± 55.25) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, (4.6 ± 1.1) h, (16.16 ± 5.49) h, (954.4 ± 312.0) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, (1035.7 ± 329.8) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3 讨论

坎地沙坦血药浓度测定方法国内外报道多采用高效液相色谱法^[5]。采用电喷雾离子源, 在本文的色谱条件下, 即使待测物与内标物完全分离, 样品分

析时间也仅为 4.8 min, 大大提高了测试速度, 每天可处理 120 多个血浆样品。

通过对多种化合物进行筛选, 最后选择与待测物结构接近的缬沙坦为内标, 其色谱行为和提取回收率均与待测物坎地沙坦相似, 因而可获得良好的重现性。

流动相中添加异丙醇可有效改善峰形。样品酸化后用乙醚进行提取, 挥发快, 回收率高。样品提取后加入 0.1 mL 10% 丙二醇的甲醇溶液可防止提取液过分吹干。

参考文献

- 1 Easthope SE, Jarvis B. Candesartan cilexetil: an update of its use in essential hypertension. *Drugs* 2002; 62(8): 1253
- 2 Stenhoff H, Lagerstrom FO, Andersen C. Determination of candesartan cilexetil, candesartan and a metabolite in human plasma and urine by liquid chromatography and fluorimetric detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 731(2): 411
- 3 Gonzalez L, Lopez JA, Alonso RM, et al. Fast screening method for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J Chromatogr A* 2002; 949(1-2): 49
- 4 Shap VP, Midha KK, Dighe S, et al. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *J Pharm Sci* 1992; 81(3): 309
- 5 Nie J, Zhang M, Fan Y, et al. Biocompatible in-tube solid-phase microextraction coupled to HPLC for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma and urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomol Life Sci* 2005; 828(1-2): 62

(本文于 2007 年 11 月 26 日收到)