

# SPE-LC-ESI-MS/MS 测定人血浆中咪达普利拉浓度及其在药动学研究中的应用

邱畅<sup>a</sup>, 温预关<sup>a\*</sup>, 张明<sup>a</sup>, 倪晓佳<sup>b</sup> (广州市精神病医院, a. 药品临床研究基地, b. 药剂科, 广州 510370)

**摘要:** 目的 建立测定人血浆中咪达普利拉浓度的固相萃取高效液相串联质谱电喷雾检测法(SPE-LC-ESI-MS/MS)。方法 以美国 Agilent Eclipse plus C<sub>18</sub>(4.6 mm × 150 mm 3.5 μm) 为色谱柱, 流动相为甲醇-水(含 0.005 mol · L<sup>-1</sup> 甲酸铵, 含 0.1% 甲酸)(87:13); 流速: 0.5 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温: 40 °C。样品用 Agilent C8 固相小柱净化。经电喷雾离子源正离子化后, 通过三重四级杆串联质谱仪, 采用选择反应监测(SRM) 对咪达普利拉(*m/z* 378.2 → 206.2) 和内标依那普利拉(*m/z* 349.1 → 206.1) 进行测定。结果 咪达普利拉的高(20 μg · L<sup>-1</sup>)、中(10 μg · L<sup>-1</sup>)、低(1 μg · L<sup>-1</sup>) 3 个质量浓度的方法回收率分别为 102.44%、102.46% 和 105.69%, 日内(*n* = 5)、日间(*n* = 3) RSD 均小于 15%; 分析方法的最低定量限为 0.5 μg · L<sup>-1</sup>。线性范围为 0.5 ~ 25 μg · L<sup>-1</sup>, 回归方程为  $y = 0.4807x + 0.0087 \times 10^{-4}$ ,  $r = 0.9976$  (*n* = 6)。结论 该方法灵敏、准确、简单、快速, 可用于临床血药浓度监测和药动学研究。

**关键词:** 咪达普利拉; 血药浓度; 高效液相串联质谱电喷雾法

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)18-1432-04

## Determination of Imidaprilat in Human Plasma by SPE-LC-ESI-MS/MS and Its Application in Pharmacokinetic Study

QIU Chang<sup>a</sup>, WEN Yu-guan<sup>a\*</sup>, ZHANG Ming<sup>a</sup>, NI Xiao-jia<sup>b</sup> (Guangzhou Psychiatric Hospital, a. Clinical Research Base, b. Department of pharmacy, Guangzhou 510370, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To develop a SPE-LC-ESI-MS/MS method for assay of imidaprilat in human plasma. **METHODS** Imidaprilat was extracted with Agilent C8 solid phase extraction cartridge. The reconstituted residues were separated on Agilent Eclipse plus C<sub>18</sub>(4.6 mm × 150 mm 3.5 μm) with the mobile phase consisting of methanol-water with 5 mmol · L<sup>-1</sup> ammonium formate and 0.1% formic acid (87:13). Agilent 6410 triple quad mass spectrometer system equipped with an electrospray ionization ion-trap source was used as the detector and operated in the positive ion mode. Selected reaction monitoring(SRM) using the precursor to product ion combinations of *m/z* 378.2 → 206.2 and *m/z* 349.1 → 206.1 was performed to detect imidaprilat and the internal standard respectively. **RESULTS** The method recoveries for imidaprilat of low, middle and high concentrations were 102.44%, 102.46% and 105.69% respectively. The within-day (*n* = 5) and between-day (*n* = 3) variations were less than 15%. The calibration curves for imidaprilat had good linearity ( $r = 0.9976$ , *n* = 6) over the range of 0.5 - 25 μg · L<sup>-1</sup>. The limit of quantitation was 0.5 μg · L<sup>-1</sup>. **CONCLUSION** The method provides a sensitive, accurate, precise and reliable analytical procedure for clinical monitoring of imidaprilat plasma concentration and can be used in its pharmacokinetic studies.

**KEY WORDS:** imidaprilat; plasma concentration; SPE-LC-ESI-MS/MS

咪达普利拉(imidaprilat)是咪达普利在体内的活性代谢物,可抑制血管紧张素转化酶活性,阻止血管紧张素 I 向血管紧张素 II 的转化,使外周血管舒张,降低血管阻力,产生降压作用。

ACEI 的致咳不良反应较普遍,常会因此影响患者的依从性,目前认为 ACEI 诱发咳嗽的机制可能是因为内源性的缓激肽和 P 物质刺激敏感患者气管黏膜上的受体诱发的。而咪达普利拉的咳嗽发生

率很低,可以提高患者依从性。同时其引起心悸、血管性水肿的不良反应发生率也低于其他 ACEI 类。

因咪达普利拉是咪达普利在体内的活性代谢物,所以关于咪达普利拉的检测方法文献报道的不多,有的是采用放射免疫测定法<sup>[1-4]</sup>, HPLC-EC<sup>[5-6]</sup> 法。本试验建立了快速、简便、准确、灵敏的液/质联用法测定人血浆中咪达普利拉浓度,并对 7 名健康志愿者单剂量口服咪达普利拉片的药动学进行了研

作者简介: 邱畅,女,副主任药师 研究方向: 临床药学工作 \* 通讯作者: 温预关,男,主任药师 研究方向: 临床药理 Tel: (010) 81891425-8632 E-mail: wenyuguande@163.com

• 1432 • Chin Pharm J 2011 September, Vol. 46 No. 18

中国药学杂志 2011 年 9 月第 46 卷第 18 期

究, 以为今后临床安全、合理用药提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司) 包括 G1379B 自动脱气机, G1310A 自动调配四元泵, G1329A 自动进样器, G1316A 可调柱温箱; Agilent 6410 triple quad LC/MS; XW-80A 型旋涡混合器(原上海医科大学仪器厂); BP110S 型电子分析天平(德国 Sartorius); MIKRO12-24 型高速离心机(德国 Hettich 公司); 111 型真空干燥箱(德国 MMM-GROUP); Agilent 固相萃取装置(Agilent SampleQ12 SPE manifold instructions), Agilent C<sub>8</sub> 固相小柱(Agilent Sample C<sub>8</sub>, 100 mg · mL<sup>-1</sup>, 批号: 5982-1011); 隔膜真空泵(津腾 型号: GM-0.33A)。

### 1.2 试剂

咪达普利拉对照品(批号: 4-JQW-176-4, 纯度 99.5%, 海南医学院附属医院); 内标物为盐酸依那普利拉(批号: 100707-200401, 纯度 99.8%, 中国药品生物制品检定所)。

乙腈为色谱纯, 甲酸铵为质谱纯, 甲酸为色谱级, 水为重蒸去离子水。

### 1.3 对照品和内标溶液

称取咪达普利拉、依那普利拉对照品各若干(分别含咪达普利拉、依那普利拉各 10 mg), 分别置于 10 mL 量瓶中, 用流动相溶解定容至刻度, 即配制成质量浓度为 1 g · L<sup>-1</sup> 的贮备液, 贮存于 4 °C 冰箱避光保存备用。试验前按试验所需稀释成相应浓度的标准工作液。另稀释配置质量浓度为 50 μg · L<sup>-1</sup> 的内标依那普利拉流动相溶液。

## 2 方法和结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: 美国 Agilent Eclipse plus C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm 3.5 μm); 流动相: 甲醇-水(含 0.005 mol · L<sup>-1</sup> 甲酸铵, 含 0.1% 甲酸) (87:13); 流速: 0.5 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温: 40 °C。

质谱条件: 电喷雾电离源(ESI), 正离子化, 毛细管电压 4 000 V, 喷雾气压力 344.75 kPa, 干燥气体流速 10 L · min<sup>-1</sup>, 干燥气体温度 350 °C。扫描方式为选择性离子监测, 咪达普利拉 *m/z* 378.2 → 206.2 碰撞能量 15 单位, 裂解电压 135 V, 四级杆捕捉时间 0.2 s, 电子倍增器 500 V; 依那普利拉 *m/z* 349.1 → 206.1 碰撞能量 15 单位, 裂解电压 135 V,

四级杆捕捉时间 0.2 s, 电子倍增器 500 V。进样量为 15 μL。咪达普利拉和依那普利拉的保留时间分别为 2.96 和 3.11 min。LC-MS/MS 图谱见图 1。

### 2.2 血样预处理

取含药血浆 0.5 mL 置 2 mL 的带塞锥形离心管中, 加入 50 μg · L<sup>-1</sup> 的依那普利拉流动相溶液 50 μL, 加 5% 甲酸水溶液 0.5 mL, 快速振荡 5 s, 加入已活化的固相小柱(固相小柱先用 5 mL 甲醇活化后, 再用 4 mL 去离子水洗脱), 用 1 mL 去离子水洗脱, 再用 3 mL 甲醇洗脱, 收集甲醇洗脱液至带塞磨口锥形玻璃离心管内, 振荡 5 s, 42 °C 真空干燥至干。进样前加入流动相混合溶液 200 μL, 快速振荡 5 s 使残渣溶解, 3 500 r · min<sup>-1</sup>, 离心 10 min, 吸取上清液 15 μL 进样。

### 2.3 标准曲线的制备和定量下限的确定

取空白血浆 0.5 mL, 分别加入质量浓度为 0、5、10、50、100、200 和 250 μg · L<sup>-1</sup> 的咪达普利拉对照品溶液 50 μL, 振荡 3 s, 使血浆药物浓度分别相当于 0、0.5、1、5、10、20 和 25 μg · L<sup>-1</sup>, 其余项按“2.2”项下处理。经 HPLC-MS/MS 分析, 以咪达普利拉峰面积与内标峰面积之比(*y*) 为纵坐标, 以血浆咪达普利拉浓度 *x* 与内标依那普利拉浓度之比为横坐标, 权重系数为 1/*x*<sup>2</sup>, 血浆中咪达普利拉浓度在 0.5 ~ 25 μg · L<sup>-1</sup> 内呈良好的线性关系, 典型代表方程为:  $y = 0.4807x + 0.0087 \times 10^{-4}$ ,  $r = 0.9976$  ( $n = 6$ )。血浆样品咪达普利拉定量下限浓度为

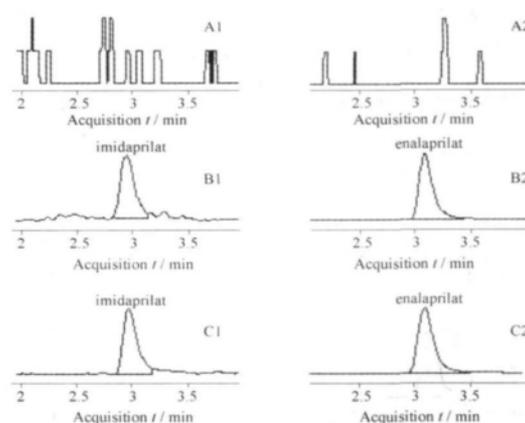


图 1 HPLC-MS/MS 测定血浆中咪达普利拉的典型色谱图  
A1 ~ 2 - 空白血浆; B1 ~ 2 - 空白血浆 + 咪达普利拉(0.5 μg · L<sup>-1</sup>) + 依那普利拉(5 μg · L<sup>-1</sup>); C1 ~ 2 - 10 号受试者第 1 周期服药后 48 h 采血时间点血药浓度(0.76 μg · L<sup>-1</sup>)

Fig. 1 LC-MS/MS Chromatograms of imidaprilat

A1 ~ 2 - blank plasma; B1 ~ 2 - blank plasma and imidaprilat and enalaprilat; C1 ~ 2 - plasma sample collected from a subject 48 h after a single dose

0.5  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $S/N > 10$ ), 平行对 5 个浓度为 0.5  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的含药血浆样品处理后进行色谱分析, 其测得结果为  $(0.51 \pm 0.09) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , RSD 为 17.64%, 说明最低定量浓度为 0.5  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  是准确可靠的。

#### 2.4 回收率及精密度试验

按“2.3”项下方法分别配制低(1  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )、中(10  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )和高(20  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )质量浓度的咪达普利拉血浆溶液各 15 份, 分为 3 批, 每批 5 份, 并与每批的标准曲线同时进行, 依“2.2”项下处理后取 15  $\mu\text{L}$  进样, 计算质控样品的测得浓度, 与配制浓度对照, 求得本法的准确度和精密度; 所得峰面积除以相应浓度的标准溶液峰面积计算提取回收率。精密度和提取回收率结果见表 1。

#### 2.5 血浆样品的稳定性试验

按“2.3”项下方法分别配制低(1  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )、中(10  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )和高(20  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )质量浓度的咪达普利拉流动相溶液(均含 5  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  依那普利拉)的 3 组血浆样品。考察溶媒稳定性: 样品分别经冰箱避光 2  $^{\circ}\text{C}$  放置 1、2 和 3 d 的稳定性。考察血浆样品处理后进样前室温避光放置稳定性实验: 样品分别经冰箱避光 2  $^{\circ}\text{C}$  放置 1、2 和 3 d 的稳定性。考察血浆样品稳定性实验: 样品分别经室温放置 12 和 24 h, 冻融 1、3 次, -20  $^{\circ}\text{C}$  冻存 30 和 90 d 的稳定性。结果中、高 2 个浓度样品检测结果的 RSD 3 种条件均小于 15%, 低浓度样品检测结果的 RSD 3 种条件均小于 20%。

#### 2.6 介质效应考察

取 9 管空白血浆各 0.5 mL 平分为 3 组, 每组 3 管, 除不加标准系列溶液和内标外, 按“2.2”处理后, 于残渣中分别加入低(10  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )、中(100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )、高(200  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )质量浓度的咪达普利拉和内标依那普利拉(50  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )各 50  $\mu\text{L}$  和流动相 0.1 mL。以此种处理方法测得的咪达普利拉和内标峰面积与空白试管中加入 0.1 mL 流动相后, 再加入相应浓度的咪达普利拉和内标各 50  $\mu\text{L}$  混

匀后测得的峰面积的比值计算百分比。结果低(1  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )、中(10  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )和高(20  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )质量浓度的咪达普利拉和内标依那普利拉(5  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )的介质影响百分比分别为 88.80%、93.93%、90.58% 和 88.77%, 可见血浆介质对低、中、高 3 种质量浓度药物的测定影响均在 85% ~ 115% 内, 可视为无介质效应影响。

#### 2.7 质控样品的监控

按“2.3”标准曲线制备方法项分别配制低(1  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )、中(10  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )和高(20  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )浓度的咪达普利拉血浆样品置 -20  $^{\circ}\text{C}$  冻存备用, 此即为血浆质控样品。检测每批血浆样品前需做随行标准曲线, 并随行检测质控样品低、中、高 3 个浓度, 每个浓度至少双样本, 并应均匀分布在未知样品测试顺序中; 如质控样品检测结果其相对标准差均在 15% (低浓度在 20%) 内时, 即可认为仪器检测正常, 否则该批样品需重新检测。

#### 2.8 药动力学研究应用

男性健康志愿者 7 名, 单剂量口服咪达普利片, 于服药前及服药后 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 16.0, 24.0, 36.0 及 48.0 h 各抽取静脉血 5 mL, 分离血浆, 于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存, 供血药浓度测定用。7 名健康志愿者单剂量口服咪达普利片后, 药动力学参数见表 2, 平均血药浓度-时间曲线见图 2。所有受试者在入组前均签署知情同意书, 该知情同意书和试验方案经伦理委员会讨论通过。

### 3 讨论

国外文献一般使用放射免疫法(RIA)测定咪达普利拉血浆浓度。但是 RIA 方法需要使用放射性配体及特殊装置; 使用较为复杂, HPLC-EC 法一般是用来测定一些实验透析液的浓度, 不适用血浆样品的测定, 这两种方法灵敏度达不到药动力学研究的要求, 不方便大批量样品的药动力学研究。

本试验样品处理方法采用固相萃取方法, 可以减少溶剂使用量、废物发生、可消除乳化现象, 及回

表 1 回收率与日内、日间精密度

Tab. 1 Recovery and precision of imidaprilat in human plasma

$\rho$ / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Intra-day( $n=5$ )		Inter-day( $n=3$ )		Method recovery( $n=5$ )	Extra recovery( $n=5$ )
	$\rho_{\text{calculated}} / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD / %	$\rho_{\text{calculated}} / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD / %	RSD / %	RSD / %
1	1.04 $\pm$ 0.13	12.81	1.06 $\pm$ 0.12	11.72	105.69	72.27
10	10.52 $\pm$ 0.63	6.02	10.25 $\pm$ 0.74	7.24	102.46	73.35
20	20.88 $\pm$ 0.81	3.89	20.49 $\pm$ 1.53	7.46	102.44	70.63

表2 7名受试者口服咪达普利片后的主要药动学参数.  $n=7$ ,  $\bar{x} \pm s$

Tab. 2 Main pharmacokinetic parameters in 7 healthy volunteers after a single dose administration of imidaprilat.  $n=7$ ,  $\bar{x} \pm s$

Parameters	Single dose/10 mg
$t_{1/2}/h$	28.37 ± 12.97
$t_{max}/h$	10.57 ± 2.76
$\rho_{max}/\mu g \cdot L^{-1}$	10.36 ± 5.47
$AUC_{0-48}/\mu g \cdot h \cdot L^{-1}$	172.97 ± 80.13
$AUC_{0-\infty}/\mu g \cdot h \cdot L^{-1}$	252.41 ± 149.56
$V/L$	1722.22 ± 613.62
$CL/L \cdot h^{-1}$	47.15 ± 16.01
$MRT_{0-48}/h$	19.14 ± 1.99

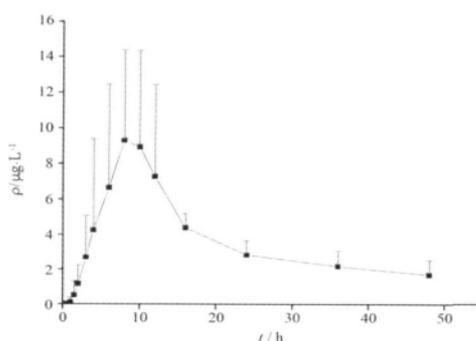


图2 7名健康志愿者单剂量口服咪达普利片后的平均药-时曲线.  $n=7$ ,  $\bar{x} \pm s$

Fig.2 Mean concentration-time curve of imidaprilat tablet after a single dose oral administration in 7 healthy volunteers.  $n=7$ ,  $\bar{x} \pm s$   
收率和重现性都比液液萃取好。且建立的咪达普利拉血浆中的测定方法测定一个样品的时间为3.6

min, 文献报道的方法需要6 min<sup>[7]</sup>。本方法节省时间、节约试剂。适用于大批量测定样品的临床药动学研究。

## REFERENCES

- [1] YAMANAKA K, MORIKAWA S, MURATA K, *et al.* Radioimmunoassay for imidapril, a new angiotensin-converting enzyme inhibitor, and imidaprilat, its active metabolite, in human plasma and urine [J]. *Pharm Biomed Anal*, 1996, 14(3): 281-287.
- [2] YAMANAKA K, TAKEHARA N, MURATA K, *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of imidaprilat, an active metabolite of imidapril, a new angiotensin-converting enzyme inhibitor, in spontaneously hypertensive rats [J]. *Pharm Biomed Anal*, 1997, 15(12): 1851-1859.
- [3] YAMANAKA K, TAKEHARA N, MURATA K, *et al.* Steady-state pharmacokinetics and pharmacodynamics of imidaprilat, an active metabolite of imidapril, a new angiotensin-converting enzyme inhibitor in spontaneously hypertensive rats [J]. *Pharm Sci*, 1996, 85(11): 1234-1237.
- [4] HOOEKAMER J F W, KLEINBLOESEM C H, NOKHODIAN A, *et al.* Pharmacokinetics of imidapril and its active metabolite imidaprilat following single dose and during steady state in patients with impaired liver function [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 1997, 51(6): 489-491.
- [5] OBATA T, YAMANAKA Y. Effect of OH scavenging action by non-SH-containing angiotensin converting enzyme inhibitor imidaprilat using microdialysis [J]. *Physiol Paris*, 1998, 92(1): 1-4.
- [6] OBATA T. Protective effect of imidaprilat, a new angiotensin-converting enzyme inhibitor against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced OH generation in rat striatum [J]. *Eur J Pharmacol*, 1999, 378(1): 39-45.
- [7] MABUCHI M, KANO Y, FUKUYAMA T, *et al.* Determination of imidapril and imidaprilat in human plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Chromatography B Biomed Sci Appl*, 1999, 734(1): 145-153.

(收稿日期: 2010-10-30)

## 关于举办2011年中国药学会暨第11届中国药师周的通知(第二轮)

由中国药学会主办、绿叶制药集团有限公司等协办的2011年中国药学会暨第11届中国药师周大会,定于2011年10月底在山东省烟台市举行(具体时间和地点,请见9月发出的第三轮报到通知)。本次大会是我国医药卫生科技界深入贯彻落实《中华人民共和国国民经济和社会发展第十二个五年(2011-2015年)规划纲要》和国务院《全民科学素质行动计划纲要实施方案(2011-2015年)》及《关于深化医药卫生体制改革的意见》的一次盛会。大会旨在通过对中药和天然药物、药物化学、临床药物评价、医院药学、生化与生物技术药物、生物药品与质量研究等二十个药学专业领域的深入交流,全面研讨药学会各分支学科发展现状和前景,展望我国医药卫生科技事业发展未来,为深化医药卫生体制改革,促进医药卫生科技事业和国民健康素质的科学发展贡献力量。

我国“十二五”时期有关规划已经明确指出,将加快经济结构转型升级,重点培育发展战略新兴产业,其中包括生物医药、生物医学工程产品等;将充分发挥“重大新药创制”等科技重大专项的引领支撑作用,积极推进关键技术和重大产品的创新,努力占领医药科技制高点,实现我国从制药大国向制药强国的顺利转变。大会将邀请国家领导人、医药卫生科技领域政府部门领导、两院院士等作主会场大会特邀报告,同时进行二十个专业分会场专题报告、论文交流和壁报交流。大会开幕式上颁发2011年中国药学会科学技术奖、中国药学会-赛诺菲安万特青年生物药物奖、中国药学会-石药集团青年药剂学奖、中国药学会优秀药师奖等。2011年全国医药经济信息网工作会议将同期召开,同期举办大型科普宣传公益活动,并设有系列卫星会议。

请登陆中国药学会网站(<http://www.cpa.org.cn>)或会议网站(<http://www.cpameeting.org.cn>)查询大会情况。

[本刊讯]