

液相色谱-串联质谱法测定人血浆中的维拉帕米

张宏武, 冯小龙, 张彦玲, 杨汉煜

(石药集团药物研究院, 河北石家庄 050051)

关键词 液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS); 维拉帕米(verapamil); 血浆浓度(plasma concentration)

中图分类号: O658 文献标识码: B 文章编号: 1000-8713(2007)01-0113-02 栏目类别: 技术与应用

维拉帕米(Verapamil, Ver)是第一代钙离子拮抗剂,临床上主要用于心律失常、心绞痛和高血压的治疗。有关生物样品中Ver的分析方法报道较多,主要有高效液相色谱(HPLC)-紫外检测法^[1,2]、HPLC-荧光检测法^[3,4]和高效毛细管电泳法^[5],但色谱分析时间均大于8 min。最近有文献报道采用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)^[6]测定人血浆中Ver及其活性代谢物去甲维拉帕米的对映异构体。本文旨在建立一种专属、快速、灵敏的LC-MS/MS用于测定人血浆中的Ver,以研究该药在体内的药代动力学特点。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

美国AB公司API4000型液相色谱-质谱联用仪,配有电喷雾离子源(ESI),以及Analyst 1.4数据处理系统;美国Agilent公司1100液相色谱系统。

盐酸维拉帕米对照品由中国药品生物制品检定所提供,内标氢溴酸西酞普兰(citalopram, Cit)对照品(99.6%)由上海红升医药生物技术有限公司提供;异博定购自德国基诺药厂(规格240 mg,生产批号940918D,生产时间2002年6月);甲醇为色谱纯,购自Fisher公司;其他试剂均为分析纯;空白人血浆由河北省中心血站提供。受试血浆样品由河北省人民医院国家药物临床试验机构提供。

1.2 色谱条件

采用Zorbax Eclipse XDB C₈色谱柱(5 μm, 150 mm × 4.6 mm, Agilent公司),流动相为甲醇-水-甲酸(体积比为70:30:1),流速为0.5 mL/min。

1.3 质谱条件

电喷雾离子源;电离电压为5 500 V;雾化温度为500 ℃;卷帘气、雾化气、辅助气和碰撞气均为N₂,流量分别为25, 30, 40和6 L/min;正离子方式检测;扫描方式为多离子反应监测(MRM),用于定量分析的离子反应分别为m/z 455 → m/z 165(Ver), m/z 325 → m/z 109(内标, Cit),碰撞诱导解离(CID)电压均为36 V。

1.4 进样条件

采用自动进样器程序进样以优化进样过程,进样程序如下:采集信号 → 等待1 min → 吸取下一个待分析样品 → 进样。

1.5 血浆样品处理

取血浆样品200 μL,依次加入100 μL水、100 μL内标溶液(100 μg/L Cit水溶液)和200 μL 1.0 mol/L的Na₂CO₃,混匀,再加入有机提取溶剂正己烷-异丙醇(体积比为95:5)2 mL,涡流混合1 min,以3 500 r/min离心5 min后,取上层有机相至另一干燥试管中,加入色谱流动相0.4 mL,涡流混合1 min,以3 500 r/min的转速离心5 min后,将下层流动相转移至自动进样瓶中,进样5 μL用于LC-MS/MS分析。

2 结果

2.1 方法的专属性

分别取受试者空白血浆、加入Ver标准品的血浆溶液和受试者给药后收集的血浆样品,按“1.5”节方法操作,以考察方法的专属性。结果(见图1)表明,空白血浆中内源性物质不干扰待测物和内标的测定。

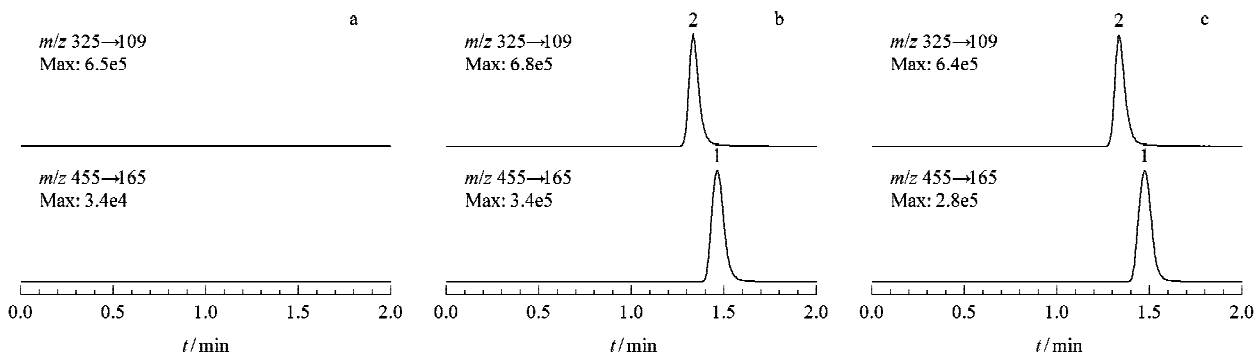


图1 血浆中Ver(峰1)及内标Cit(峰2)的典型MRM色谱图

a. 空白血浆; b. Ver标准血浆溶液; c. 受试者样品。

2.2 线性范围

取空白血浆200 μL,分别加入以水配制的Ver标准系列溶液100 μL,使其在血浆中的质量浓度为5.0, 10, 30, 100,

200, 500 μg/L,除不加100 μL水外,按“1.5”节方法操作。用加权最小二乘法进行回归运算,求得的典型的回归方程为Y = 0.005 49 X + 0.017 5 (r = 0.998 7),其中Y为Ver与内

标的峰面积比, X 为 Ver 的质量浓度 ($\mu\text{g/L}$)。由标准曲线可以看出, Ver 的线性范围为 $5.0 \sim 500 \mu\text{g/L}$, 定量下限为 $5.0 \mu\text{g/L}$ 。

2.3 准确度与精密度试验

取空白血浆 $200 \mu\text{L}$, 按“2.2”节方法配制 Ver 低、中、高 3 个浓度 (分别为 $10, 100, 400 \mu\text{g/L}$) 的质量控制 (QC) 样品, 每一浓度水平进行 6 样本分析, 连续测定 3 d, 以当日的标准曲线计算 QC 样品的浓度, 将 QC 样品的结果进行方差分析, 求得本法的准确度与精密度。本法的日内、日间精密度 (以相对标准偏差 (RSD) 计) 均小于 6.6% , 准确度 (以偏差 (RE) 计) 在 $\pm 3.9\%$ 之内, 结果见表 1。

表 1 方法的准确度与精密度

加样量/ ($\mu\text{g/L}$)	测得值/ ($\mu\text{g/L}$)	RSD/%		RE/%
		日内	日间	
10	9.9	4.9	6.6	-1.3
100	99	3.7	4.4	-1.1
400	384	4.2	4.3	-3.9

2.4 提取回收率

分别取低、中、高 3 个浓度 (分别为 $10, 100, 400 \mu\text{g/L}$) 的标准系列溶液, 按“2.3”项下操作, 计算提取后的色谱峰面积与未经提取直接进样获得的色谱峰面积之比, 考察样品的提取回收率。每一浓度水平进行 6 样本分析。3 种浓度水平下 Ver 的绝对提取回收率分别为 79.6% , 77.3% 和 76.0% 。内标溶液经同法提取处理, 其回收率为 93.2% 。

2.5 基质效应考察

取血浆样品 $200 \mu\text{L}$, 依次加入 $200 \mu\text{L}$ 水, 1.0 mol/L 的 Na_2CO_3 $200 \mu\text{L}$, 混匀, 再加入有机提取溶剂正己烷-异丙醇 (体积比为 $95:5$) 2 mL , 涡流混合 1 min , 离心 5 min (3500 r/min) 后, 取上层有机相至另一干燥试管中, 加入以流动相配制的标准系列溶液及内标溶液 0.4 mL , 涡流混合 1 min , 离心 5 min (3500 r/min) 后, 将下层流动相进样, 测得峰面积 A , 取以流动相配制的标准系列溶液及内标溶液直接进样, 测得峰面积 B ; 以 A/B 考察方法的基质效应, 结果表明本方法无基质效应现象 (A/B 为 98%)。

2.6 稳定性考察

取 Ver 低、高 2 个浓度 (分别为 $10, 400 \mu\text{g/L}$) 的 QC 样品进行稳定性考察, 结果表明, Ver 血浆样品在冻融循环 3 次实验中、血浆样品室温放置 4 h 内及血浆样品萃取后室温放置 24 h 内均稳定, 偏差在 $\pm 4.6\%$ 之内。

2.7 方法学应用

图 2 中给出了 18 名受试者单剂量口服 1 片异博定 (含 240 mg 盐酸维拉帕米) 后, Ver 的血药浓度-时间曲线。

3 讨论

Ver 是一种碱性药物, 需对生物样品进行碱化处理后才能用有机溶剂提取, 碱化液类别及 pH 值对该药的提取回收率均有较大影响。试验中曾考察了多种碱化试剂, 结果发现用 1.0 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液作为碱化试剂时 Ver 的提取率高且稳定。本文也考察了不同组成的有机溶剂对 Ver 提取回收率的影响, 最终选用以正己烷-异丙醇 ($95:5$) 为提

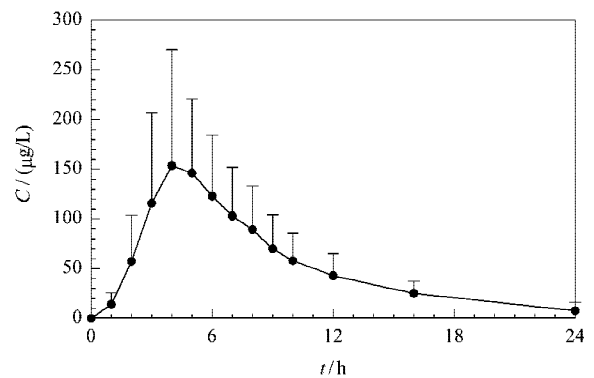


图 2 18 名受试者单剂量口服 240 mg 盐酸维拉帕米后平均血药浓度-时间曲线

取溶剂时提取率最高且稳定。本文结合 Ver 酸性条件下在有机溶剂中溶解度小的特点, 采用酸性流动相反提有机溶剂的方法, 可明显减少操作步骤, 节省提取时间, 减小交叉污染。

在正常的进样条件下, 每个样品的循环时间为自动进样器准备样品的空闲时间 + 色谱柱的死体积时间 + 样品有效分析时间^[7]。Agilent 公司 1100 自动进样器的空闲时间为 1 min , 本文选用的是柱长为 150 mm 的 Zorbax Eclipse XDB C_8 色谱柱, 在 0.5 mL/min 的流速下死体积时间为 2 min , Ver 的有效分析时间为 1 min , 即每个样品的循环时间为 4 min 。本文方法在当前样品的分析过程中, 将下一个要分析的样品提前准备好并注入色谱系统, 这既节省了自动进样器准备样品的空闲时间, 又节省了色谱柱的死体积时间, 使分析时间大为缩短, 工作效率成倍提高。在本文中, 每个样品的循环时间缩短为 2 min , 分析速度远快于文献报道的 8 min ^[1-3], 11 min ^[5], 15 min ^[6] 和 30 min ^[4], 每天可进行 360 个样品的测定, 本文方法非常适合于临床药代动力学大量样本的分析。

4 结论

本文采用 $200 \mu\text{L}$ 血浆进行 LC-MS/MS 分析, 定量下限为 $5.0 \mu\text{g/L}$, 灵敏度高于文献^[1-5]的报道, 具有专属、快速、灵敏的特点, 适合并已成功地应用于临床维拉帕米药代动力学的研究。

参考文献:

- [1] 谢林, 刘晓东, 周云曙, 王进, 刘国卿. 中国药科大学学报, 1995, 26(6): 347
- [2] 谭力, 杨胜茹, 柳晓泉, 袁倚盛. 药学学报, 1995, 30(9): 689
- [3] 杨坚, 贾晶莹, 张慧, 余琛. 中国临床药理学杂志, 2001, 10(2): 99
- [4] 邹豪, 郭涛, 蒋雪涛, 隋因, 周俭平. 第二军医大学学报, 2000, 21(10): 977
- [5] 芮建中, 周晓东, 凌树森, 袁倚盛, 相秉仁, 安登魁. 药学学报, 1998, 33(7): 517
- [6] Hedeland M, Fredriksson E, Lennernas H, Bondesson U. J Chromatogr B, 2004, 804(2): 303
- [7] 王英武, 唐云彪, 武毅, 王贞佐, 顾景凯. 质谱学报, 2003, 24(Z1): 19