

HPLC-MS/MS法测定人血浆中莫沙必利及其代谢物含量

潘群^{1,2}, 秦永平^{*}, 向瑾¹, 梁茂植¹, 余勤¹, 南峰¹

(1 四川大学华西医院临床药理研究室, 成都 610041; 2 四川大学华西药学院, 成都 610041)

摘要 目的: 建立高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)测定人血浆中莫沙必利含量及其代谢物(M1)的相对含量。**方法:** 采用 Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱(50 mm × 3.0 mm, 3 μm), 流动相为甲醇-0.04% 甲酸(58:42)。血浆样品在碱性条件下用乙酸乙酯提取浓缩后进样, 以西沙必利为内标, MRM 模式检测。莫沙必利, M1 和内标检测离子对的 *m/z* 分别为 422.1/198.0, 314.3/198.1 和 466.2/184.0。结果: 莫沙必利在 0.25~128 μg·L⁻¹ 范围内线性关系良好(*r*=0.9999), 最低定量限为 0.25 μg·L⁻¹, 方法回收率为 99.8%~103.5%, 批内、批间 RSD 分别小于 5.2% 及 6.4%。结论: 本法具有快速、灵敏、准确等特点, 适用于莫沙必利血药浓度测定及药代动力学研究和血浆中莫沙必利代谢物 M1 的测定。

关键词: 莫沙必利; 代谢物; 高效液相色谱-串联质谱法; 血药浓度

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)11-1842-04

HPLC-MS/MS quantitative determination of mosapride and its metabolite in human plasma

PAN Qun^{1,2}, QIN Yong-ping^{*}, XIANG Jin¹, LIANG Mao-zhi¹, YU Qin¹, NAN Feng¹

(1. Department of Clinical Pharmacology, West China Hospital Sichuan University Chengdu 610041, China

2. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract Objective To establish an HPLC-MS/MS method for the determination of mosapride and its metabolite (M1) in human plasma. **Methods** Phenomenex Gemini C₁₈ column (50 mm × 3.0 mm, 3 μm) was used. The mobile phase was methanol-0.04% formic acid (58:42). The alkalized sample was extracted with acetic ether and the content of drug was determined by HPLC-MS/MS using electrospray ionization. Mosapride, M1 and cisapride (S) were detected on multiple reaction monitoring (MRM) mode by the transitions from the precursor to the production (*m/z* 422.1/198.0, 314.3/198.1 and 466.2/184.0). **Results** For mosapride, calibration curve was linear in range from 0.25 to 128 μg·L⁻¹ (*r*=0.9999), the limit of quantitation in plasma was 0.25 μg·L⁻¹, the method recovery was 99.8%~103.5%, the RSD of inter- and intra-day precision were less than 5.2% and 6.4%, respectively. **Conclusion** This method is found to be rapid, sensitive and accurate for determination of mosapride and its metabolite in human plasma.

Key words mosapride; metabolite; HPLC-MS/mosapride/M1; plasma drug concentration

莫沙必利(mosapride), 又名贝络纳, 用于改善非溃疡性消化不良病人的胃肠道症状。关于生物样品中莫沙必利的测定方法国内外多有报道, 主要方法有高效液相色谱法^[1]及高效液相色谱-质谱联用法^[2], 但是有关莫沙必利代谢物的血药浓度测定国内尚未查见, 国外有动物组织中莫沙必利代谢物^[3]测定的报道。本研究应用 LC-MS/MS 技术不仅对血浆中莫沙必利进行了定性和定量分析, 并且

对其去 *N*-对氟苯甲基代谢物(M1)进行了定性和相对定量研究, 研究证明, 该方法适用于莫沙必利临床血药浓度测定、药代动力学及生物利用度研究。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与色谱、质谱条件 10 Avp 型高效液相色谱仪(日本, 岛津), API 3000 三重四极杆串联质谱仪(美国, ABI 公司)。Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱(50 mm × 3.0 mm, 3 μm), 柱温为 35 °C, 流动

* 通讯作者, Tel: (028) 85423372, 13880945101; E-mail: qinying1@163.com

相为甲醇 - 0.04% 甲酸 (58:42), 流速 0.2 mL·min⁻¹。电喷雾离子源, 正离子 MRM 模式定量。莫沙必利, M1 和西沙必利 (IS) 检测离子对的 *m/z* 分别为 422.1/198.0 314.3/198.1 和 466.2/184.0 碰撞活化电压 CE 分别为 30 25 39 V 其他检测条件均为气帘气 CUR 8 碰撞活化气 CAD 7 喷雾电压 IS 5400 V, 干燥气温度 TEM 400 °C, 离子去簇电压 DP 50 V, 环形聚焦电压 FP 275 V, Q 聚焦电压 EP 8 V。

1.2 试药 枸橼酸莫沙必利对照品 (批号 100656 - 200501) 由中国药品生物制品检定所提供。内标西沙必利对照品 (含量 99.8%, 批号 971016) 由成都科伦公司提供。甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂为分析纯, 水经 Millipore RiosTM 16 纯水器处理。

1.3 溶液的配制

莫沙必利储备液及对照品谱液: 精确称取枸橼酸莫沙必利对照品 7.4 mg 置于 100 mL 量瓶中, 加乙腈 30 mL 溶解后, 用纯水定容至刻度即成莫沙必利 (48 mg·L⁻¹) 储备液, 置 4 °C 冰箱保存。临用前用水稀释得所需浓度莫沙必利对照品溶液。

内标储备液及工作液: 精密称取西沙必利对照品 4.0 mg 置 50 mL 量瓶中, 用 pH 2.7 的甲醇 - 磷酸盐缓冲液 (57:43) 50 mL 溶解并定容至刻度, 即得西沙必利储备液 (80 mg·L⁻¹)。临用前取储备液 100 μL 于 100 mL 量瓶中, 加水至刻度混匀, 即得内标溶液 (80 μg·L⁻¹)。

2 方法与结果

2.1 标准曲线

取莫沙必利储备液 (48 mg·L⁻¹) 0.4 mL 加 50% 甲醇 2.6 mL 混匀即得浓度为 6400 μg·L⁻¹ 的对照品溶液, 取该溶液 100 μL, 加入空白血浆 4.9 mL, 混匀得对照品血浆 A 管 (血浆浓度为 128 μg·L⁻¹), 其余各管用空白血浆依次对倍稀释得浓度分别为 64 32 16 8 4 2 1, 0.5, 0.25 μg·L⁻¹ 的对照品血浆, 分装后 - 30 °C 保存备用。

取各浓度对照品血浆 200 μL 于 5.0 mL 圆底试管内, 加入内标溶液 (80 μg·L⁻¹) 100 μL, 再加 1.0 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 100 μL, 旋涡混匀后用乙酸乙酯 3.0 mL 旋涡萃取 5 min, 离心 (3200 r·min⁻¹) 7 min, 转上清液于尖底试管内, 置 45 °C 水浴中通气流烘干, 残渣溶于 50 μL 流动相, 旋涡混匀 1 min, 转入全自动进样器样品瓶内, 进样 10 μL。记录莫沙必利和内标的色谱峰面积, 以两者的峰面积比 (*Y*) 对应其浓度 (*X*) 进行加权 (1/*X*) 线性回归得莫沙必利血浆标准曲线为:

$$Y = 0.0388X + 0.0035 \quad r = 0.9999$$

表明莫沙必利在 0.25~128 μg·L⁻¹ 范围内线性关系良好。

2.2 保留时间及检测限 空白血浆莫沙必利及 IS 对照品血浆、样品血浆色谱图见图 1, 莫沙必利、IS 和代谢物 M1 保留时间 *t_R* 分别为 1.27, 1.19, 1.10 min, 莫沙必利最低定量浓度为 0.25 μg·L⁻¹, 测定 5 次的 RSD 为 2.6%。

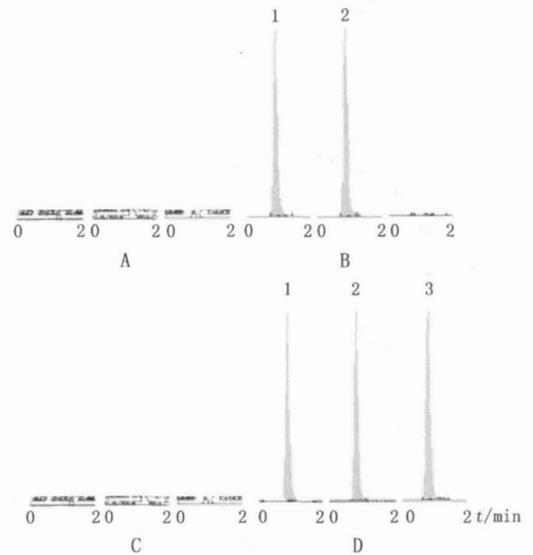


图 1 空白血浆 (A)、空白血浆加对照品 (B)、受试者服药前血浆 (C) 及受试者服药后血浆 (D) 色谱图

Fig 1 The chromatograms of blank plasma (A), blank plasma added standard (B), sample plasma before medication (C) and sample plasma after medication (D).

1. 莫沙必利 (mosapiride) 2 内标 [cisapride (IS)] 3. mosapiride metabolite (M1)

2.3 对照品血浆稳定性考察 取 - 30 °C 保存的 64.00 (高), 16.00 (中), 4.00 (中低), 0.50 (低) μg·L⁻¹ 浓度的对照品血浆在 6 10, 16 48 d 按标准曲线项下操作, 分别测定莫沙必利与内标的峰面积比, 再由当日标准曲线回归方程计算出莫沙必利浓度均值分别为 (63.59 ± 1.44), (16.15 ± 0.42), (4.20 ± 0.20), (0.52 ± 0.02) μg·L⁻¹, 对应的 RSD 分别为 2.3%, 2.6%, 4.7%, 3.9%, 表明对照品血浆在 - 30 °C 条件下保存 48 d 其浓度无明显变化。此外还测定了以上高、中、中低、低浓度的对照品血浆冻融 1, 2 3 次的浓度, 计算其 RSD 分别为 7.6%, 6.1%, 7.3%, 8.9%; 高、中、中低、低浓度对照品血浆室温放置 0, 2 4 h 的浓度均值分别为 (64.05 ± 4.78), (16.22 ± 1.08), (4.37 ± 0.34), (0.50 ± 0.02) μg·L⁻¹, 计算其 RSD 分别为 7.4%, 6.6%, 7.6%,

4.0%,表明冻融和室温放置对测定结果无明显影响。

2.4 萃取回收率 取空白血浆加莫沙必利对照品溶液配制成 64 16 4 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 4个浓度的样品,每个浓度 5份,按标准曲线制备项下操作后进样。将所得峰面积与相应浓度的对照品溶液直接进样所得峰面积相比,得萃取回收率分别为 (58.3 \pm 3.3)%, (65.2 \pm 3.5)%, (60.7 \pm 4.5)%, (66.0 \pm 3.7)%,其 RSD分别为 5.6%, 5.4%, 7.4%, 5.6%。

2.5 方法回收率和精密度 取空白血浆加莫沙必利对照品溶液配制成 64 16 4 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 4个浓度的样品,于同日内连续测定 5次,计算其方法回收率分别为 (101.6 \pm 2.6)%, (103.5 \pm 2.7)%, (103.2 \pm 5.3)%, (99.8 \pm 4.1)%;同法测定,计算其批内 RSD分别为 4.2%, 5.2%, 2.7%, 2.6%;于 2周内测定 3批每批 5次,计算其批间 RSD分别为 6.4%, 5.1%, 5.2%, 3.9%。

2.6 基质效应考察 在应用 HPLC-MS/MS法进行生物样品的测定时,可能会产生基质效应,为考察该效应,我们将空白血浆按标准曲线项下处理后所得残渣分别用 64 16 4 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 4个浓度的莫沙必利对照品溶液解进样,所得峰面积与相应浓度的工作液直接进样所得峰面积相比,每个浓度测定 3次的比值均在 0.75 ~ 0.81 之间,其 RSD为 3.2%,表明本法存在一定基质效应,但对测定结果无明显影响。

3 方法应用

本法用于 24名健康男性受试者于 2个周期内交叉服用新工艺生产的枸橼酸莫沙必利分散片(试验制剂)和旧工艺生产的枸橼酸莫沙必利分散片(参比制剂)各 10 mg后采集血样的测定。试验制剂(A)及参比制剂(R)的莫沙必利、M1均值血药浓度-时间曲线见图 2。由图可知,试验制剂和参比制剂的莫沙必利和 M1血药浓度-时间曲线变化趋势基本一致,M1的达峰时间较莫沙必利稍晚,M1相对浓度较莫沙必利低,估计与自身浓度不同、质谱响应和萃取回收率不一致等因素有关。

4 讨论

4.1 代谢物 M1的定性及相对定量 莫沙必利在血浆中主要代谢为去 N-对氟苯甲基代谢物(M1)^[4],已有研究证明莫沙必利代谢物 M1在动物体内具有一定的药理活性^[5],目前,有关生物样品中莫沙必利代谢物测定的报道仅见 Yoichi Aoki 等^[3]用 HPLC-MS/MS法测定了马组织中莫沙必利

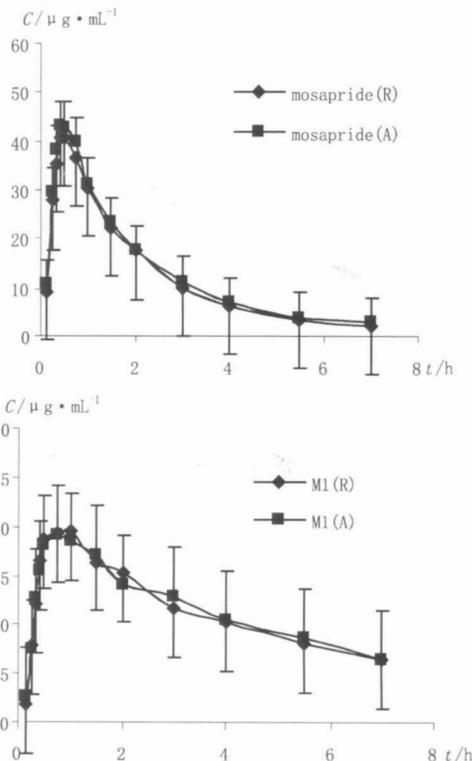


图 2 莫沙必利和 M1均值血药浓度-时间曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time curves of mosapride and M1 in healthy volunteers

及其代谢物(M1)的含量,本研究利用 HPLC-MS/MS的定性功能,首先对已预处理后较高浓度血样进样作 Q1扫描,通过提取离子成功找到了文献报道的代谢物 m/z 为 314.3 的准分子离子峰。再对 m/z 314.3 作 MS²扫描发现,其主要碎片离子峰 m/z 为 198.1(基峰),与文献和莫沙必利主要碎片离子相同(见图 3),保留时间较莫沙必利短,且样品中该峰高度随采血时间不同而有规律变化,由此可以确定该成分为莫沙必利的去 N-对氟苯甲基代谢物 M1。由于 M1 没有对照品,考虑到 M1 与莫沙必利结构相似,其质谱主要碎片和检测条件与莫沙必利基本相同,因此 M1 相对浓度由其峰面积与内标的峰高比经当日莫沙必利标准曲线求出。

4.2 内标选择 西沙必利与 MS 具有相似的化学结构,且萃取回收率与 MS 相近,其在血浆中的稳定性在本室建立的西沙必利血药浓度测定方法中已有报道^[6],3周内测定的日间 RSD 小于 5%,所以本方法选择西沙必利作为内标。

4.3 样品预处理方法的选择和优化 已建立的莫沙必利测定方法^[2]中采用正己烷-异戊醇(96.5:3.5)为萃取剂,由于 M1 极性较大,该萃取剂不能将其从血浆中提取出来,改用极性较大的乙酸

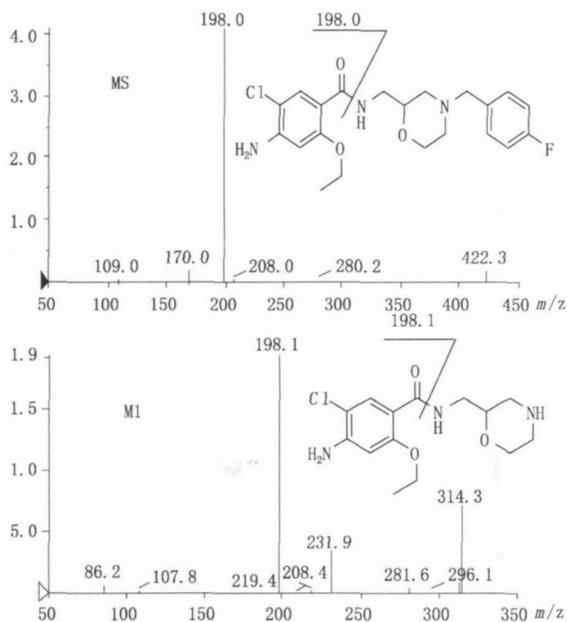


图 3 莫沙必利及其代谢物 M1 的二级质谱图及结构解析
Fig. 3 M^2 scan of mosapride metabolite(M1) and structure analyze

乙酯作萃取剂可将其提出,但由于无对照品,不能考察其萃取回收率。

4.4 流动相的考察 对乙腈-水、甲醇-水系统作流动相进行了考察,在比例相同的情况下,保留时间及峰形差别不大,由于甲醇成本较低,因此选用甲醇-水系统作流动相,比例为 58:42 时,保留时间及峰形适宜。流动相中加入甲酸可以明显改善峰形,加

入浓度以 0.04% 为宜,浓度再增加对峰形的改变不大。

参考文献

- 1 QN Yong-ping(秦永平), YU Qin(余勤), LIANG Mao-zhi(梁茂植), et al. Determination of mosapride in human plasma by RP-HPLC with UV detection(反相高效液相色谱紫外法测定血浆中莫沙必利浓度). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2005, 25(2): 181
- 2 QN Feng(秦峰), CHEN Ling-yun(陈凌云), MA Yuan-yuan(马源源) et al. Determination of mosapride in human plasma by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry(高效液相色谱-质谱/质谱联用法测定人血浆中莫沙必利). *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2007, 42(8): 882
- 3 Yoidi Aoki, Hileki Hakanata. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for determination of mosapride citrate in equine tissues. *J Chromatogr B*, 2007, 858: 135
- 4 Isao Yokoyama, Yasuyuki Mizuki, Toshikazu Yanaguchi et al. Simultaneous enantiomeric determination of a gastroprokinetic agent mosapride citrate and its metabolite in plasma using α_1 -acid glycoprotein HPLC column. *J Pharm Biomed Anal* 1997, 15: 1527
- 5 Yoshida N, Omoya H, Kato S et al. Pharmacological effects of the new gastroprokinetic agent mosapride citrate and its metabolites in experimental animals. *Arzneimittel Forsch*, 1993, 43(10): 1078
- 6 QN Yong-ping(秦永平), ZOU Yuan-gao(邹远高), LIANG Mao-zhi(梁茂植), et al. Determination of cisapride in human plasma by RP-HPLC(反相高效液相色谱法测定血浆中西沙必利浓度). *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2000, 20(11): 643

(本文于 2008 年 3 月 26 日修改回)