

UPLC-MS/MS法测定人血浆中盐酸尼卡地平

张镭¹, 李朋梅¹, 刘晓¹, 车慧², 张相林^{1*}

(1. 卫生部中日友好医院药理学部临床药理室, 北京 100029;

2. 中国人民解放军总后药品仪器检验所, 北京 100071)

摘要 目的: 建立超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)测定人血浆中盐酸尼卡地平浓度的方法。方法: 血浆经甲基叔丁基醚萃取后, 以UPLC分离, 电喷雾离子化(ESI⁺)串联质谱检测。盐酸尼卡地平、尼莫地平(内标)的多反应监测(MRM)扫描离子对 m/z 分别为 480.3⁺ 314.8 和 419.2⁺ 343.0。结果: 盐酸尼卡地平在 0.1~40.0 ng·mL⁻¹ 范围内线性关系良好 ($r=0.9998$); 日内、日间 RSD 均小于 12%。结论: 该方法检测快速、专一、灵敏, 可满足盐酸尼卡地平临床药理学研究的要求。

关键词: 盐酸尼卡地平; UPLC-MS/MS; 血浆药物浓度; 药理学

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)11-1837-05

UPLC-MS/MS determination of nifedipine hydrochloride in human plasma

ZHANG Lei¹, LI Peng-mei¹, LU Xiao¹, CHE Hui², ZHANG Xiang-lin^{1*}

(1. Department of Pharmacy, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

2. PIA Institute for Drug Control, Beijing 100071, China)

Abstract Objective To establish an UPLC-MS/MS method for the determination of nifedipine hydrochloride in human plasma. **Methods** Nifedipine hydrochloride and internal standard were extracted from plasma with methyl tert-butyl ether and determined by UPLC-MS/MS using electrospray ionization (ESI⁺). The drugs were detected on multiple reaction monitoring mode by the transitions precursor to the product ion (m/z 480.3⁺ 314.8 and m/z 419.2⁺ 343.0). **Results** Calibration curve was linear in the range from 0.1-40.0 ng·mL⁻¹ with a correlation coefficient of 0.9998. The intra- and inter-day precisions (RSDs) were all less than 12%. **Conclusion** The UPLC-MS/MS method for the quantitative determination of nifedipine hydrochloride in human plasma presented simple process, sensitive detection and acceptable precision. Therefore, it can be used for clinical pharmacokinetic studies of nifedipine hydrochloride in human plasma.

Key words nifedipine hydrochloride; UPLC-MS/MS; drug plasma concentration; pharmacokinetic

尼卡地平(nifedipine)是常用的第二代二氢吡啶类钙通道阻滞剂,具有较强的冠状动脉和全身动脉阻力血管扩张作用。与硝苯地平相比,尼卡地平对冠状血管比周围血管更具有选择性^[1],其副作用(如眩晕等)也相对较少,但具有同等的抗心绞痛作用^[2]。静脉或口服给予尼卡地平可使收缩压和舒张压降低,降低后负荷,代偿性增加心率和每搏输出量,同时也表现出减少左心室舒张期功能失调的作用^[3]。尼卡地平还可降低劳累性心绞痛患者心绞痛发作频率并增进运动耐受力。近年来,尼卡地平已在临床取得较好的应用效果。

本研究建立了一种采用UPLC-MS/MS技术,以尼莫地平为内标分析人血浆中盐酸尼卡地平浓度的方法,该方法操作简便,灵敏度高,最低定量限达0.1 ng·mL⁻¹,可满足盐酸尼卡地平缓释制剂的药理学研究及血药浓度监测的需求。

1 药品、试剂与仪器

1.1 药品与试剂 盐酸尼卡地平对照品(nifedipine hydrochloride, 含量99.4%,批号100586-200401,中国药品生物制品检定所);尼莫地平对照品(nimodipine, 含量100%,批号100270-200002,中国药品生物制品检定所);盐酸尼卡地平缓释胶囊(40 mg·粒⁻¹,批号20080212,安斯泰

来制药(中国)有限公司);乙腈、甲基叔丁基醚及甲醇为色谱纯(美国 Fisher公司),水为重蒸水,其他试剂均为分析纯;空白血浆由中日友好医院检验科提供。

1.2 仪器 UPLC-MS/MS联用系统: Waters ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪, Waters Quattro Premier XE 三重四级杆串联质谱仪, MassLynx 4.1 质谱工作站(美国 Waters公司); 3K15高速离心机(美国 Sigma公司), YKH-II型液体快速混合器(江西医疗器械厂), LIBROR L-200SM 型天平(日本岛津公司), 1210型超声振荡仪(美国 Branson公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters ACQUITY C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈 - 0.2% 甲酸水溶液 (70:30), 使用前经 0.22 μm 微孔滤膜过滤并超声脱气 (60W, 47 kHz); 流速 0.15 mL · min⁻¹; 进样室温度 10 °C, 柱温 30 °C; 进样量 5 μL。

2.2 质谱条件 采用电喷雾电离源正离子模式 (ESI⁺), ESI毛细管电压 3.5 kV, 锥孔气流 50 L · h⁻¹, 脱溶剂气流 400 L · h⁻¹, 离子源温度 100 °C, 脱溶剂气温度 400 °C, 锥孔电压 25 V (盐酸尼卡地平), 18 V (尼莫地平), 碰撞能量 30 eV (盐酸尼卡地平), 7 eV (尼莫地平), 采用多反应监测 (MRM) 扫描方式选择监测反应离子对为: m/z 480.3⁺ 314.8⁻ (盐酸尼卡地平)、 m/z 419.2⁺ 343.0⁻ (尼莫地平) 见图 1。

2.3 溶液的配制 精密称取盐酸尼卡地平对照品和内标盐酸尼莫地平适量, 以甲醇溶解配制 500.0 μg · mL⁻¹ 对照品储备液和 510.0 μg · mL⁻¹ 内标储备液, 以流动相稀释得到相应浓度对照品和内标溶液, 于 4 °C 冰箱保存。

2.4 血浆样品的处理 取血浆 0.3 mL 置 1.5 mL 具塞聚四氟乙烯离心管中, 加入尼莫地平内标溶液 (84.0 ng · mL⁻¹) 30 μL, 涡旋振荡 0.5 min 混匀, 加入萃取液甲基叔丁基醚 0.7 mL, 涡旋振荡 3 min, 高速离心 (12000 r · min⁻¹) 10 min, 分取上层有机相, 室温下氮气吹干, 残渣用 150 μL 流动相复溶, 涡旋振荡 3 min 后高速离心 (12000 r · min⁻¹) 10 min, 取上清液 5 μL 进行 UPLC-MS/MS 分析。

2.5 方法的专属性 空白血浆、空白血浆外加对照品盐酸尼卡地平 (5.0 ng · mL⁻¹)、内标尼莫地平 (84.0 ng · mL⁻¹) 及健康受试者给药后收集的血浆样品, 按“血浆样品的处理”项下操作后进样分析。

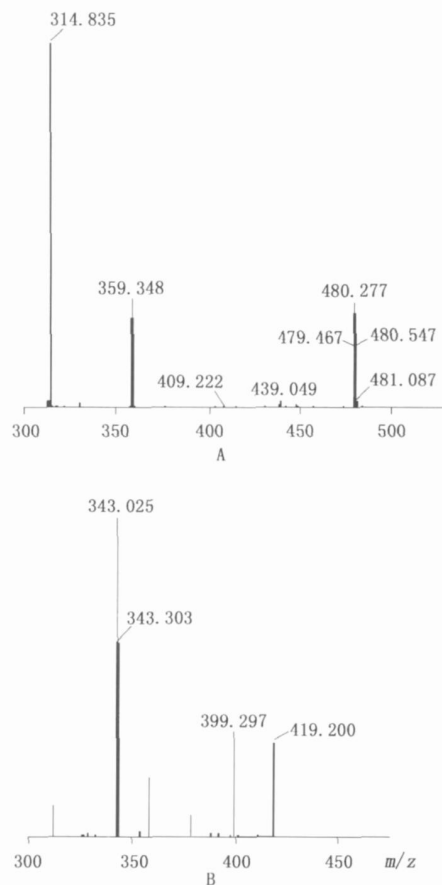


图 1 盐酸尼卡地平 (A) 和内标 (B) 的二级质谱图

Fig 1 The MS² spectrograms of nifedipine hydrochloride (A) and internal standard (B)

得色谱图 (见图 2), 盐酸尼卡地平和内标尼莫地平的保留时间分别为 0.89 min 和 1.69 min。

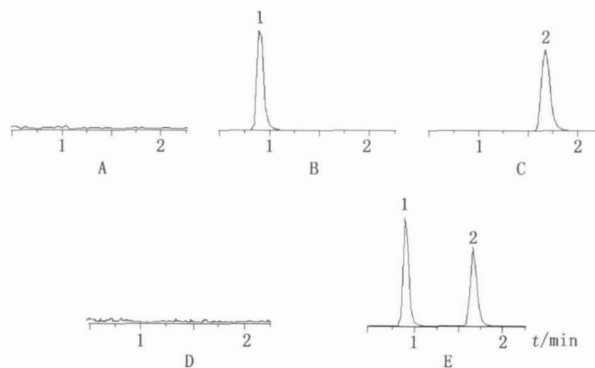


图 2 血浆中盐酸尼卡地平的色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of nifedipine hydrochloride

A 空白血浆 (blank plasma) B 空白血浆 + 盐酸尼卡地平 (blank plasma spiked with nifedipine) C 空白血浆 + 内标 (blank plasma spiked with internal standard) D 受试者空白血浆 (subject blank plasma) E 受试者服药后 3 h 血浆 (subject plasma 3 h after administration of nifedipine hydrochloride)

1 盐酸尼卡地平 (nifedipine hydrochloride) 2 内标 (internal standard)

2.6 标准曲线与线性范围 取空白血浆 0.3 mL, 加入不同浓度的对照品溶液, 配制成浓度分别为 0.1, 0.3, 1.25, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 ng·mL⁻¹ 的对照品血浆, 按“血浆样品的处理”项下操作后进样分析。以血浆中添加盐酸尼卡地平的浓度为 X 轴, 盐酸尼卡地平与内标峰面积比为 Y 轴, 采用加权 (1/X²) 最小二乘法进行线性回归, 得盐酸尼卡地平的

$$Y = 3.148X + 0.238 \quad r = 0.9998$$

标准曲线回归方程为:
结果表明盐酸尼卡地平血浆浓度在 0.1~40.0 ng·mL⁻¹ 范围内线性关系良好。

2.7 准确度与精密度 在 0.3 mL 空白血浆中分别精密加入不同浓度对照品溶液, 配制成低、中、高 (0.3, 5.0, 20.0 ng·mL⁻¹) 3 种浓度的质控样品, 在同一日内取低、中、高 3 种浓度对照品血浆各 5 份, 按“血浆样品的处理”项下操作后进样分析, 以当日当批回归方程计算盐酸尼卡地平浓度, 与加样浓度比较, 计算准确度 (方法学回收率)、日内精密度; 并于不同日内取低、中、高 3 种浓度对照品血浆各 5 份, 按“血浆样品的处理”项下操作后进样分析, 重复测定 3 d, 计算准确度与日间精密度, 结果见表 1。

表 1 血浆中盐酸尼卡地平的日内、日间精密度及方法学回收率

Tab 1 Intra- and inter- day precision and accuracy of nica d ip ine hydrochloride

| 质控样品 (quality control) | C /ng·mL ⁻¹ | 日内 (intra- day) | | | | 日间 (inter- day) | | | |
|---------------------------|---------------------------|-----------------|---------------|------------------------|----------|-----------------|---------------|------------------------|----------|
| | | 均值 (mean) | SD (n = 5) | 方法学回收率 (accuracy) % | RSD % | 均值 (mean) | SD (n = 5) | 方法学回收率 (accuracy) % | RSD % |
| 定量下限 (LLOQ) | 0.1 | 0.107 | 0.009 | 107.4 | 8.1 | 0.103 | 0.012 | 102.6 | 12.1 |
| 低浓度 (L) | 0.3 | 0.308 | 0.007 | 102.7 | 2.3 | 0.301 | 0.024 | 100.5 | 8.0 |
| 中浓度 (M) | 5.0 | 5.093 | 0.278 | 101.9 | 5.5 | 4.806 | 0.456 | 96.1 | 9.5 |
| 高浓度 (H) | 20.0 | 19.451 | 0.590 | 97.3 | 3.0 | 19.200 | 1.212 | 96.0 | 6.3 |

2.8 萃取回收率 在 0.3 mL 空白血浆中分别精密加入不同浓度的盐酸尼卡地平工作溶液, 配制成低、中、高 (0.3, 5.0, 20.0 ng·mL⁻¹) 3 种浓度的质控样品各 5 份, 按“血浆样品的处理”项下操作后进样分析, 以血浆中盐酸尼卡地平的峰面积与相应浓度对照品溶液中盐酸尼卡地平峰面积的比值计算出上述 3 种浓度的萃取回收率分别为 81.1% (RSD = 8.9%), 84.7% (RSD = 4.3%), 86.3% (RSD = 1.2%)。同法求得内标的萃取回收率为 92.8% (RSD = 6.3%)。

2.9 基质效应 取 5 种不同来源空白血浆各 0.3 mL 置 1.5 mL 具塞聚四氟乙烯离心管中, 按“血浆样品的处理”项下萃取并吹干后, 再加入尼莫地平内标溶液 (84.0 ng·mL⁻¹) 30 μL 以及不同浓度的盐酸尼卡地平工作溶液适量。于室温下氮气吹干, 残渣用 150 μL 流动相复溶, 涡旋振荡 3 min 配制成低、中、高 (0.3, 5.0, 20.0 ng·mL⁻¹) 3 种浓度的供试液各 5 份。样品经高速离心 (12000 r·min⁻¹) 10 min 后取上清液 5 μL 进行 UPLC-MS/MS 分析, 以供试液中盐酸尼卡地平的峰面积与相应浓度对照品溶液中盐酸尼卡地平峰面积的比值计算上述 3 种浓

度的基质效应, 结果见表 2。

表 2 血浆中盐酸尼卡地平的基质效应

Tab 2 Matrix effect of nica d ip ine hydrochloride

| 质控样品 (the quality control sample) | C /ng·mL ⁻¹ | 基质效应 (matrix effect) % | | |
|--------------------------------------|---------------------------|------------------------|------------|-----|
| | | 均值 (mean) | SD (n = 5) | RSD |
| 低浓度 (L) | 0.3 | 91.2 | 5.0 | 5.4 |
| 中浓度 (M) | 5.0 | 102.8 | 5.9 | 5.7 |
| 高浓度 (H) | 20.0 | 102.3 | 3.8 | 3.7 |

2.10 稳定性试验 用空白血浆配制低、中、高 (0.3, 5.0, 20.0 ng·mL⁻¹) 3 种浓度的质控样品各 3 份, 于 -80℃ 冷冻放置, 分别在 0, 24, 48, 72, 120, 240, 360 h 取样于室温下避光自然解冻, 按照“血浆样品的处理”项下操作后进样分析, 以当日回归方程计算盐酸尼卡地平浓度, 以考察样品冷冻放置稳定性; 考察各浓度质控样品室温避光放置 (0, 1, 3, 6, 8, 24 h) 稳定性; 考察各浓度质控样品于 -20℃ 冷冻保存, 反复冻融 5 次样品稳定性。考察各浓度质控样品处理定容后置于自动进样器内 10℃ 避光放置 (0, 2, 6, 12, 24 h) 稳定性。结果见表 3。

表 3 稳定性试验

Tab 3 Stability test of nicardipine hydrochloride

| 放置条件 (condition) | 0.3 ng•mL ⁻¹ | | | 5.0 ng•mL ⁻¹ | | | 20.0 ng•mL ⁻¹ | | |
|---|-------------------------|----------|-------|-------------------------|----------|-------|--------------------------|----------|-------|
| | 实测值 (detected) | | | 实测值 (detected) | | | 实测值 (detected) | | |
| | 均值 (mean) | SD (n=3) | RSD % | 均值 (mean) | SD (n=3) | RSD % | 均值 (mean) | SD (n=3) | RSD % |
| -80℃冷冻保存 15 d (-80℃, 15 d) | 0.323 | 0.015 | 4.6 | 5.059 | 0.179 | 3.5 | 19.945 | 1.062 | 5.3 |
| 室温避光放置 24 h (~25℃ & away from light 24 h) | 0.277 | 0.018 | 6.6 | 4.564 | 0.237 | 5.2 | 18.230 | 0.439 | 2.4 |
| 反复冻融 5次 (five times freezer-thawing) | 0.318 | 0.012 | 3.6 | 4.961 | 0.236 | 4.8 | 19.054 | 0.732 | 3.8 |
| 样本处理后于 10℃避光保存 24 h (10℃ & away from light 24 h) | 0.282 | 0.021 | 7.5 | 4.678 | 0.235 | 5.0 | 18.700 | 0.528 | 2.8 |

2.11 方法应用

将本研究建立的 UPLC-MS/MS 方法应用于盐酸尼卡地平缓释胶囊的药学研究。通过体检筛选 20 名健康男性志愿者,告知试验内容及利害,获得知情同意后正式开始试验。20 名受试者于试验前 1 日晚餐后禁食,试验日早 8 点空腹口服盐酸尼卡地平胶囊 1 粒 (40 mg),于服药前 (0 h) 和服药后 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24, 36 h 于上臂静脉各取血 1 次,每次 3~5 mL,血样肝素抗凝,离心,分离血浆,于 -80℃ 冰箱中冷冻保存。

按“血浆样品的处理”项下操作,以当日的标准曲线计算各时间点的血药浓度,同时分析低、中、高 (三样本) 的质控样品,根据质控样品测定结果决定当日数据的取舍。

20 名健康男性志愿者口服盐酸尼卡地平缓释胶囊 1 粒 (40 mg) 后,平均血药浓度-时间曲线见图 3,主要药动学参数见表 4。

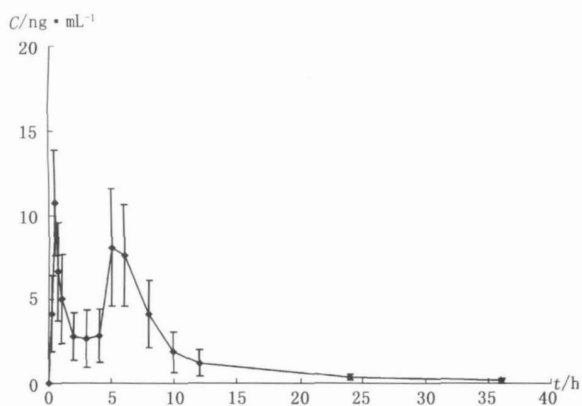


图 3 20 名受试者单剂量口服盐酸尼卡地平 40 mg 后的平均血药浓度-时间曲线

Fig 3 Mean plasma concentration-time curve of nicardipine hydrochloride after a single oral dose of 40 mg

表 4 20 名健康男性志愿者单剂量口服 40 mg 盐酸尼卡地平胶囊后的主要药动学参数 (mean±SD)

Tab 4 Pharmacokinetic parameters of nicardipine hydrochloride in plasma of 20 volunteers after a single oral dose of 40 mg (mean±SD)

| 参数 (parameters) | 实测值 (found value) |
|---|-------------------|
| $C_{max1}/ng\cdot mL^{-1}$ | 10.98±2.77 |
| T_{max1}/h | 0.48±0.07 |
| $C_{max2}/ng\cdot mL^{-1}$ | 8.64±3.48 |
| T_{max2}/h | 5.33±0.65 |
| $t_{1/2ke}/h$ | 6.45±1.68 |
| $AUC_{0-\infty}/ng\cdot h\cdot mL^{-1}$ | 64.19±25.07 |
| $MRT_{0-\infty}/h$ | 8.40±1.94 |
| $AUC_{0-36}/ng\cdot h\cdot mL^{-1}$ | 61.85±23.38 |
| MRT_{0-36}/h | 7.29±1.22 |

3 讨论

盐酸尼卡地平口服吸收迅速完全,但其首过效应强,口服后大部分经肝组织代谢或结合^[4],血药浓度低,对检测技术要求较高,文献报道多采用气相色谱法 (GC)^[5] 及液相色谱法 (HPLC)^[6] 等分析方法。近年来,随着盐酸尼卡地平缓释剂在临床的应用,已报道的 GC 或 HPLC 法,因检测灵敏度较低,无法满足其药动力学研究的需求。作为一种高灵敏度的检测手段,液相色谱-质谱联用技术已在盐酸尼卡地平的药动力学研究中得到应用^[7,8],但在国内文献中作者未见相关报道。本研究建立了一种采用 UPLC-MS/MS 技术,以尼莫地平为内标分析人血浆中盐酸尼卡地平浓度的方法。

在预试验中,对血浆样品的前处理方法进行了考察,结果发现,采用乙腈直接沉淀蛋白法获得的分析样本含杂质较多,即使高速离心 (12000 r·min⁻¹) 也无法获得满意结果,可能加剧色谱柱的损

耗并污染质谱,而且按该方法处理,基质效应严重,不同来源血浆样本间信号响应差异较大(RSD > 15%)。我们也考察了采用乙醚、氯仿、乙酸乙酯等为萃取剂的方案,结果发现,采用以上几种萃取剂所得回收率均低于甲基叔丁基醚萃取方案,而且采用甲基叔丁基醚萃取获得的样本杂质较少,基质效应也较低,适合液-质联用分析。在预试验中对血浆样品是否需要碱化处理也进行了考察,结果发现,50 μL 碳酸钠溶液($1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)碱化处理对萃取回收率影响较小,故最终采用甲基叔丁基醚直接萃取的方案。

该方法操作简便,特异性好,无干扰,精密度、灵敏度高,最低定量限达 $0.1\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($S/N \geq 10$),符合人体内血药浓度监测和药动力学研究的要求,可满足盐酸尼卡地平缓控释制剂的药动力学研究及血药浓度监测的需求。

参考文献

- 1 Lambert CR, Pepine CJ. Effects of intravenous and intracoronary nicardipine. *Am J Cardiol*, 1989, 64: 811
- 2 Dewood MA, Wolbach RA. Randomized double-blind comparison of side effects of nicardipine in angina pectoris. *Am Heart J*, 1990: 119.

468

- 3 Han et C, Rousseau MF, van Eyll *et al*. Effects of nicardipine on regional diastolic left ventricular function in patients with angina pectoris. *Circulation*, 1990, 81: 48
- 4 Sorokin EM, Clissold SP. Nicardipine: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the treatment of angina pectoris hypertension and related cardiovascular disorder. *Drugs*, 1987, 33(4): 296
- 5 CHEN Huǐ(陈汇), WU Wen-zhong(吴文中), ZHANG Qing-hua(张庆华), *et al*. GC determination of nicardipine and pharmacokinetics in human plasma(尼卡地平血药浓度测定及其人体药代动力学). *Acta Pharm Sin* (药学报), 2000, 35(8): 592
- 6 LI Ke(李克), ZHANG Xin(张昕), ZHAO Fei-lang(赵飞浪), *et al*. HPLC determination of concentration and the pharmacokinetic parameters of nicardipine in human plasma(高效液相色谱法测定人血浆中尼卡地平及药代动力学参数). *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1998, 29(3): 197
- 7 QM L, Wang P, Jin X. Liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of nicardipine in human plasma. *J Chromatogr B*, 2006, 830: 81
- 8 Katja Heinig Franz Bucheli. Application of column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of pharmaceutical compounds in tissue samples. *J Chromatogr B*, 2002, 769: 9

(本文于 2009 年 7 月 31 日修改回)