

液相色谱串联质谱法测定人血浆中硝苯地平浓度

刘拥军,王秀丽,栾杨,姚庆强(山东省医学科学院药物研究所,济南 250062)

摘要:目的 建立测定人血浆中硝苯地平浓度的 LC-MS/MS方法。方法 血浆样品经液液提取后,以甲醇(含 0.1%乙酸):水(含 0.1%乙酸 + 2.5 mmol·L⁻¹甲酸胺) = 80:20 为流动相,使用 Agilent 1100 VL 型离子阱质谱仪,电喷雾离子源正离子模式,采用多反应离子监测方式测定硝苯地平(MRM, m/z 347→315)。结果 血浆中硝苯地平的线性范围为 1.0~100.0 ng·mL⁻¹。定量下限为 1.0 ng·mL⁻¹。准确度在 85%~115%之间,日内、日间精密度(RSD)在 ±15%之内。结论 该方法准确,特异性强,可用于硝苯地平药动力学研究。

关键词:硝苯地平;液相色谱串联质谱;药动力学

中图分类号:R972.4 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2008)01-0051-03

Quantitation of Nifedipine in Human Plasma by LC-MS/MS

LIU Yong-jun, WANG Xiu-li, LUAN Yang, YAO Qing-qiang(*Institute of Materia Medica, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a LC-MS/MS method to determine nifedipine in human plasma. **METHODS** After a L/L extraction, the plasma samples were separated on a Zorbax SB-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm) column with methanol (content 0.1% HAc) - H₂O (content 0.1% HAc + 2.5 mmol·L⁻¹ ammonium formate) (80:20) as mobile phase. Electrospray ionization source (ESI) was applied and operated in positive ion mode. Multiple reactions monitoring (MRM) mode was used and nifedipine was quantified by monitoring the ion transition of m/z 347→315. **RESULTS** The linear calibration curves were obtained over the concentration range of 1.0 - 100 ng·mL⁻¹ in plasma. The lower limit of quantitation was 1.0 ng·mL⁻¹. Accuracy was within 85%~115%, within day and between day precision were within ±15%. **CONCLUSION** The method proved to be accurate and specific, and can be applied to pharmacokinetic study of nifedipine.

KEY WORDS: nifedipine; LC-MS/MS; Pharmacokinetics

硝苯地平为钙离子拮抗剂,广泛用于高血压、心绞痛及其他心血管病的治疗。文献报道^[1-6]其血药浓度有 HPLC、LC-MS、GC、GC-MS 等检测方法。笔者应用液相色谱离子阱质谱联用建立了测定人血浆中硝苯地平浓度的 LC-MS/MS 方法并用于临床测定。

1 仪器和试剂

液质系统:Agilent 1100 Trap VL 液质联用系统(包括四元输液泵,自动进样器,在线脱气机,ESI 源)。数据处理系统:Agilent Chemstation A.09.03 和 Bruker 质谱软件。

硝苯地平对照品(中国药品生物制品检定所);甲醇(色谱纯,EDIA 公司);甲酸胺、乙酸乙酯和乙酸(均为分析纯);空白人血浆(山东省血液中心)。

2 LC-MS/MS 条件

色谱条件:Zorbax SB C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm);流动相:甲醇(含 0.1%乙酸):水(含 0.1%乙酸和 2.5 mmol·L⁻¹甲酸胺)为 80:20;流速:1.0 mL·min⁻¹,柱后分流 0.3 mL·min⁻¹进入质谱;进样量:20 μL;柱温:室温。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI 源);喷雾气(N₂)压力

1.74 kPa;干燥气(N₂)流量 10 L·min⁻¹。毛细管温度为 350℃;正离子方式检测;扫描模式为多反应离子监测(MRM),用于定量分析的离子反应为 m/z 347→315,碎裂电压 0.9 V。

3 血浆样品处理

取血浆 1.0 mL,加入 4.0 mL 乙酸乙酯,涡旋混合 1 min,静置 30 min,分取上层有机相 3.0 mL 于另一试管中,于 100℃水浴挥干,残留物加入 100 μL 流动相溶解,取 20 μL 进行分析。整个操作过程尽可能避免。

4 方法学考察

4.1 方法的专属性

取 10 μg·mL⁻¹硝苯地平甲醇对照溶液,电喷雾离子源(ESI 源),喷雾气(N₂)压力 12 psi,干燥气流量 4 L·min⁻¹,毛细管温度为 325℃,使用灌注进样方式,流速 5 μL·min⁻¹,在正离子模式下,硝苯地平主要生成 [M+H]⁺, [M+Na]⁺ 和 [M+K]⁺ 离子峰, m/z 分别为 347, 369 和 385,见图 1。选择性对 [M+H]⁺ 峰进行碎裂产物离子扫描,将硝苯地平生成的主要碎片离子(m/z = 315)作为定量分析的产物离子,见图 2。

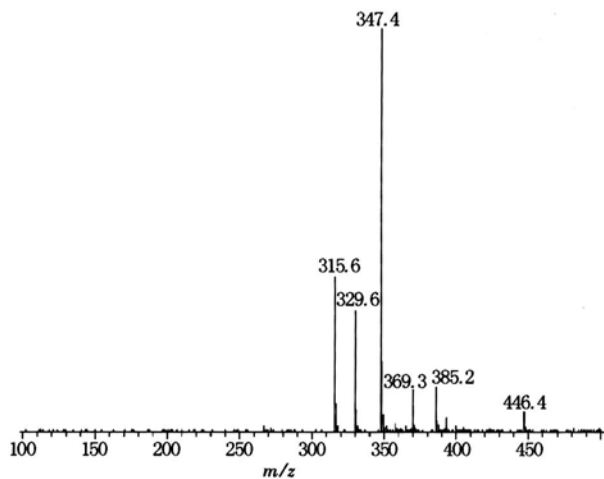


图1 10 µg · mL⁻² 硝苯地平扫描图

Fig 1 Mass spectra of Nifedipine (10 µg · mL⁻¹)

取空白血浆 1.0 mL,按“血浆样品处理”项下操作,进样 20 µL,得空白血浆色谱图 3-A;取硝苯地平对照溶液,进样分析,得硝苯地平对照色谱图 3-B;将一定浓度硝苯地平标准溶

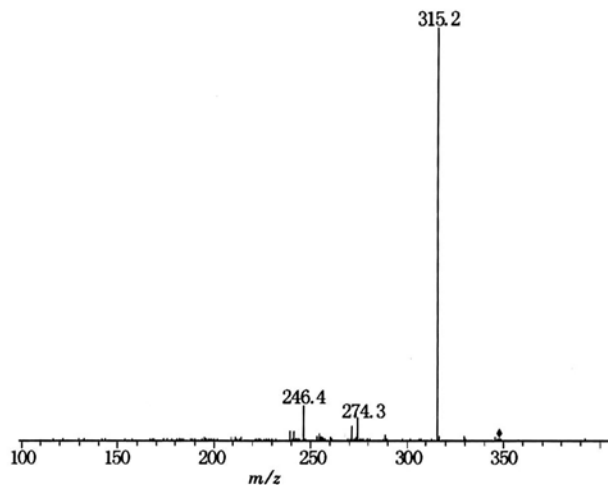


图2 硝苯地平[M+H]⁺ (m/z=347) 的碎片离子图

Fig 2 MS/MS spectra of Nifedipine (m/z = 347)

液加入空白血浆,同法操作,得样品添加对照色谱图 3-C;取志愿者口服硝苯地平后血浆样品,同法操作,得志愿者血浆样品色谱图 3-D。结果表明血浆内源性物质不干扰硝苯地平

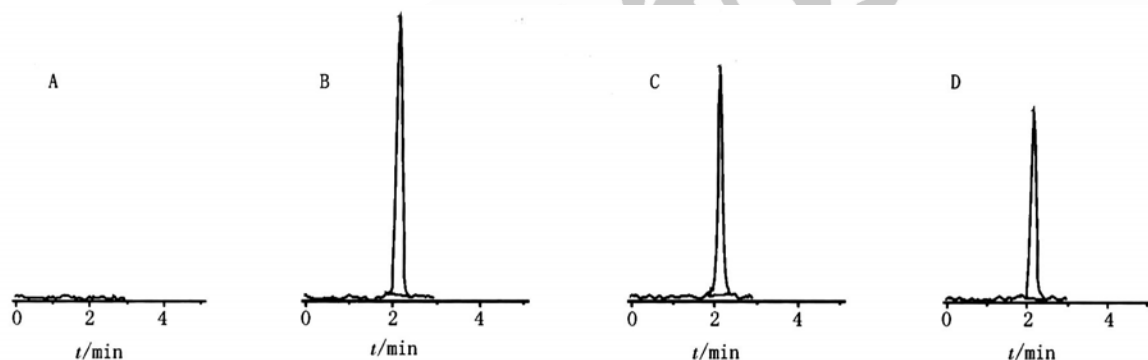


图3 色谱图 (MRM m/z 347 → 315)

A - 空白血浆; B - 对照品; C - 样品添加对照; D - 样品

Fig 3 Chromatograms (MRM m/z 347 → 315)

A - blank; B - reference; C - reference add to sample; D - sample

测定,硝苯地平保留时间为 2.1 min。

4.2 标准曲线和定量下限

取硝苯地平储备液 (1.0 µg · mL⁻¹) 适量,用甲醇稀释配成浓度分别为 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 ng · mL⁻¹ 的硝苯地平对照应用液系列。

取空白血浆 1.0 mL,分别加入上述硝苯地平对照应用液系列各 200 µL,配制相当于硝苯地平血浆浓度为 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0 和 100.0 ng · mL⁻¹ 的对照样品,每一浓度 5 份,按“血浆样品处理”项下依法操作,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线。各浓度测定值见表 1。结果表明,血浆中硝苯地平浓度为 1.0 ~ 100.0 ng · mL⁻¹ 时,浓度与峰面积有良好的线性关系,定量下限为 1.0 ng · mL⁻¹。

4.3 方法精密度

取空白血浆,按“标准曲线”项下的方法配制低、中、高三个浓度 2.0, 20.0 和 100.0 ng · mL⁻¹ 的硝苯地平血浆样品,按

表 1 硝苯地平标准曲线数据 (n = 5, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Standard curve of nifedipine (peak area) (n = 5, $\bar{x} \pm s$)

浓度 / ng · mL ⁻¹	峰面积	RSD / %
1.0	2 535.8 ± 332.8	13.1
2.0	5 074.4 ± 645.6	12.7
5.0	12 063.8 ± 820.2	6.8
10.0	24 319.4 ± 1 671.0	6.9
20.0	51 448.4 ± 2 163.9	4.2
50.0	136 122.4 ± 5 543.9	3.3
100.0	261 155.8 ± 19 038.8	7.3

“血浆样品处理”项下操作,每一浓度连续测定 5 次,以硝苯地平的峰面积来计算日内精密度。每一浓度在 5 d 各分别配制分析一次,以硝苯地平峰面积来计算日间精密度,结果见表 2。

表 2 日内、日间精密数据 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Within-day and day-to-day precision of nifedipine (n=5, $\bar{x} \pm s$)

浓度 /ng·mL ⁻¹	日内		日间	
	峰面积	RSD/%	峰面积	RSD/%
2	5 755.0 ±564.0	9.8	5 083.0 ±561.1	11.0
20	49 597.0 ±2 700.0	5.4	47 124.0 ±2 749.6	5.8
100	257 377.0 ±11 834.5	4.6	252 147.0 ±10 597.4	4.2

4.4 提取回收率试验

取空白血浆,按“标准曲线”项下的方法配制低、中、高三个浓度(2.0、20.0和50.0 ng·mL⁻¹)的硝苯地平血浆样品,按“血浆样品处理”项下依法操作,每一浓度进行5样本分析,计算提取回收率,结果见表3。

表 3 提取回收率数据 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Extraction recovery of nifedipine (n=5, $\bar{x} \pm s$)

浓度 /ng·mL ⁻¹	测得浓度 /ng·mL ⁻¹	RSD/%	回收率/%	RSD/%
2	2.0 ±0.2	10.7	101.0 ±10.8	10.7
20	19.3 ±1.3	6.7	96.7 ±6.6	6.8
50	50.6 ±1.8	3.5	101.2 ±3.6	3.4

4.5 稳定性试验

取空白血浆,按“标准曲线”项下的方法配制低、中、高三个浓度(2.0、20.0和50.0 ng·mL⁻¹)的硝苯地平血浆样品,分别在室温放置24 h、3次-20℃冷冻解冻循环后和-20℃存放7 d后,按“血浆样品处理”项下依法操作,测定硝苯地平浓度,计算相对标准偏差,结果见表4。

表 4 血浆样品稳定性试验结果 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Stability test results of sample plasma (n=5, $\bar{x} \pm s$)

浓度 /ng·mL ⁻¹	室温 放置 24 h	RSD	3次冷冻- 解冻循环	RSD	-20℃ 放置 7 d	RSD
	/ng·mL ⁻¹	%	/ng·mL ⁻¹	%	/ng·mL ⁻¹	%
2.0	2.3 ±0.2	6.5	2.3 ±0.3	11.1	1.8 ±0.2	13.1
20.0	18.0 ±0.5	2.7	22.8 ±0.5	2.1	18.6 ±0.6	3.2
50.0	51.4 ±3.3	6.3	49.5 ±2.9	5.8	49.8 ±1.0	1.9

4.6 方法应用和质控样品测定

应用本方法成功的对20名受试者口服硝苯地平制剂(20 mg)后血浆中的硝苯地平进行了含量测定。在受试者血浆样品测定期间,随行测定含硝苯地平浓度为5.0、10.0、20.0和50.0 ng·mL⁻¹的对照血浆样品,结果分别为(5.1 ±0.4), (9.9 ±0.6), (20.6 ±1.3), (51.4 ±2.3) ng·mL⁻¹; RSD(%)分别为8.7、6.0、6.5、4.5。受试者口服硝苯地平参比制剂和试验制剂后药时曲线见图4。

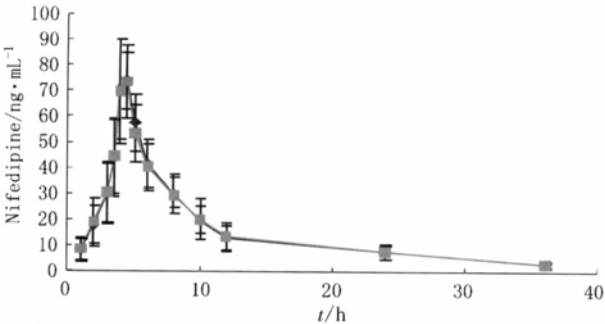


图 4 受试者口服硝苯地平参比制剂和试验制剂后药时曲线图
—◆—参比制剂;—■—试验制剂

Fig 4 Plot of Concentration 3/ hour of Reference Preparations and Test Preparations

—◆—Reference preparations; —■—Test preparations

5 讨论

硝苯地平对光十分敏感,样品处理及分析过程中应注意避光。硝苯地平服用剂量小,在血浆中浓度较低,应用液相紫外检测器分析有一定的难度,现在一般应用GC-MS或LC-MS进行分析,应用气相分析需程序升温,分析速度较慢,单级质谱定量易受杂质干扰,本实验应用LC-MS/MS方法建立了人血浆中硝苯地平的浓度,对硝苯地平分子的特征碎片进行定量,硝苯地平不必与其他杂质峰完全分离,方法快速、准确,特异性强,可用于药动力学研究。

REFERENCES

[1] HANG T J, ZHANG L. Relative bioavailability and pharmacokinetics of two oral nifedipine sustained-release capsules in Chinese volunteers after single dose administration [J]. Chin Pharma J (中国药学杂志), 2000, 35(10): 681-683.

[2] YU Z Y, LI Y Z, XIE J X, et al. Determination of Plasma Concentration and Relative bioavailability of nifedipine sustained-release tablets by HPLC [J]. Cap Med(首都医药), 2000, 7(2): 24-25.

[3] GE Q H, WANG H, FU M, et al. Pharmacokinetics and Bioequivalence of Domestic Nifedipine Controlled Release Tablets [J]. Chin Hypertension(高血压杂志), 2005, 13(5): 310-312.

[4] STREEL B, ZIMMER C, SIBENALER R. Simultaneous determination of nifedipine and dehydronifedipine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1998, 720(1-2): 119-128.

[5] NIOPAS I, DAFTSIOS A C. Determination of nifedipine in human plasma by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography: validation and application to pharmacokinetic studies [J]. J Pharm Biomed Anal, 2003, 32(6): 1213-1218.

[6] YRITI M, PARRA P, IGLESIAS E. Quantitation of nifedipine in human plasma by on-line solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2000, 870(1-2): 115-119.

收稿日期: 2006-07-11