

UPLC-MS/MS 测定人血浆中长春西汀和阿朴长春胺酸的含量及其应用

张林琪, 苏文俏, 郭建军*, 游宇, 胡林, 周文(湖南恒兴医药科技有限公司, 长沙 410205)

摘要: 目的 建立和验证 UPLC-MS/MS 测定人血浆中长春西汀和阿朴长春胺酸的方法, 并用于临床样品检测。方法 以长春西汀-d5、阿朴长春胺酸-d4 为内标, 人血浆样品经蛋白沉淀法沉淀处理, 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈-水(含 0.05% 甲酸), 梯度洗脱, 流速 0.35 mL·min⁻¹; 电喷雾离子化源正离子监测模式。结果 长春西汀和阿朴长春胺酸线性范围分别为 0.04~20.0 ng·mL⁻¹(*r*=0.999 7)、0.50~250 ng·mL⁻¹(*r*=0.999 6), 检测限分别为 0.01, 0.10 ng·mL⁻¹, 待测物与内标提取回收率均为 94.81%~105.0%, 基质效应为 94.51%~105.0%, RSD 均 < 5%; 批内、批间精密度 RSD 均 < 10%。结论 本法特异性强、快速、准确, 重复性好, 适用于长春西汀临床生物样品检测及生物等效性研究。

关键词: 长春西汀; 阿朴长春胺酸; 血药浓度; 超高效液相色谱串联质谱法

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)04-0489-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2023.04.009

引用本文: 张林琪, 苏文俏, 郭建军, 等. UPLC-MS/MS 测定人血浆中长春西汀和阿朴长春胺酸的含量及其应用[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(4): 489-493.

Determination of Vinpocetine and Apovincaminic Acid in Human Plasma by UPLC-MS/MS and Its Application

ZHANG Linqi, SU Wenqiao, GUO Jianjun*, YOU Yu, HU Lin, ZHOU Wen(EverPro Medical Co., Ltd., Changsha 410205, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish and validate a UPLC-MS/MS for the determination of vinpocetine and apovincaminic acid in human plasma and apply to the determination of clinical samples. **METHODS** Vinpocetine-d5 and apovincaminic acid-d4 were used as internal standards. Human plasma samples were prepared with acetonitrile to precipitate to protein. The chromatographic column was Waters ACQUITY UPLC® BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), the mobile phase was acetonitrile-water(containing 0.05% formic acid). Gradient elution with a flow rate of 0.35 mL·min⁻¹. Mass spectrometry conditions: Electrospray ionization source(ESI), positive ion detection mode. **RESULTS** The linear range were 0.04–20.0 ng·mL⁻¹(*r*=0.999 7) for vinpocetine and 0.50–250 ng·mL⁻¹(*r*=0.999 6) for apovincaminic acid, and the limit of quantification were 0.01, 0.10 ng·mL⁻¹, respectively. The recoveries of test sample and internal standard were in the range of 94.81%–105.0%, and the matrix effect were 94.51%–105.0%, RSDs were <5%. The RSDs of intra- and inter-batch precision were all <10%. **CONCLUSION** The method is specific, rapid, accurate and reproducible. Therefore, it is suitable for the determination of vinpocetine concentration in plasma and can applied to its bioequivalence study.

KEYWORDS: vinpocetine; apovincaminic acid; plasma concentration; UPLC-MS/MS

长春西汀(vinpocetine, VP)是从夹竹桃科多年生草本长春花(*Catharanthus roseus* L.)中开发得到的一种吲哚类生物碱。20 世纪 80 年代, Gedeon Richter 公司最先开发并推出长春西汀, 作为钠通道阻滞剂和磷酸二酯酶 1 制剂, 其具有强效的血管扩张作用, 用于潜在的脑血管疾病的治疗。2007 年 11 月, Gedeon Richter 公司的长春西汀片(10 mg, 每盒 30 片; 每盒 90 片)在中国获进口药品批准, 适应证为脑血管疾病, 包括脑梗死、脑出血和动脉硬化等诱发的各种症状。研究表明,

VP 在体内经水解反应转变为代谢物阿朴长春胺酸(apovincaminic acid, AVA), 其体内药动学行为也能反映原形药物体内吸收情况^[1-10]。

目前有报道采用 LC-MS/MS 同时测定动物基质中 VP 和 AVA^[1-4], 以及分别测定人血浆中 VP 或 AVA 的单一成分^[5-6]; Vatsova 等^[7]采用 GC-MS 测定人血浆中 VP; Vlase 等^[8]采用 LC-MS 同时测定人血浆中的 VP 和 AVA。但采用 LC-MS/MS 同时测定人血浆中 VP 和 AVA 方法目前还未见报道。本实验采用 UPLC-MS/MS 同时测定人血浆中 VP

作者简介: 张林琪, 女, 硕士, 中级工程师
E-mail: pharma_guojianjun@163.com

E-mail: linqi.zhang@everpro-medical.com

*通信作者: 郭建军, 男, 博士, 高级工程师

及其代谢物 AVA 血药浓度, 并应用于长春西汀片给药后人体生物等效性研究的血浆样本检测。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

AB5500 三重四级杆质谱仪(美国 AB Sciex 公司); Waters ACQUITY UPLC I-CLASS 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); MS205DU 型十万分之一天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); 5430R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); KQ-250E 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器); Medium-S800GUVF 型超纯水仪(上海和泰仪器); SCDEALL® VX-II 多管道涡旋振荡器[安筒(北京)科技有限公司]。

受试制剂: 长春西汀片(东北制药集团沈阳第一制药有限公司, 批号: 95190603; 规格: 每片 5 mg)。参比制剂: 长春西汀片(Gedeon Richter 公司, 批号: T72413A; 规格: 每片 10 mg)。VP 对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100947-201804; 含量: 99.8%); AVA 对照品(批号: 6-JBZ-121-5; 纯度: 98%); VP-d5 对照品(批号: 7-YKZ-183-3; 纯度: 98%); AVA-d4 对照品(批号: 9-WEN-42-1; 纯度 95%)均购自加拿大 Toronto Research Chemicals 公司; 甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 Merck 公司); 甲酸、二甲亚砜(国药集团化学试剂有限公司); 水为自制超纯水; 其余试剂均为分析纯。

1.2 检测条件

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm); 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.05%甲酸-水, 梯度洗脱(0~3.00 min, 55%B, 3.01~3.90 min, 5%B, 3.90~4.80 min, 55%B); 流速 0.35 mL·min⁻¹, 柱温为 50 °C, 进样量为 10 μL。

1.2.2 质谱条件 电喷雾离子化源(ESI); 喷雾电压: 5 000 V; 帘气压力: 35 psi; 雾化气(GS1): 50 psi; 辅助气(GS2): 55 psi; 雾化气温度: 550 °C; 采用正离子方式检测: 多重反应监测(MRM)扫描方式; 用于定量分析的离子反应分别为 VP m/z 351→280, VP-d5 m/z 356→281, AVA m/z 323→280, AVA-d4 m/z 327→283, 见图 1~2。

1.3 对照品溶液的配制

精密称取 VP 和 AVA 对照品各 10 mg, 分别加入甲醇、50%甲醇-水配制成浓度为 500 μg·mL⁻¹ 的储备液。精密称取 VP-d5 对照品 2 mg, 加

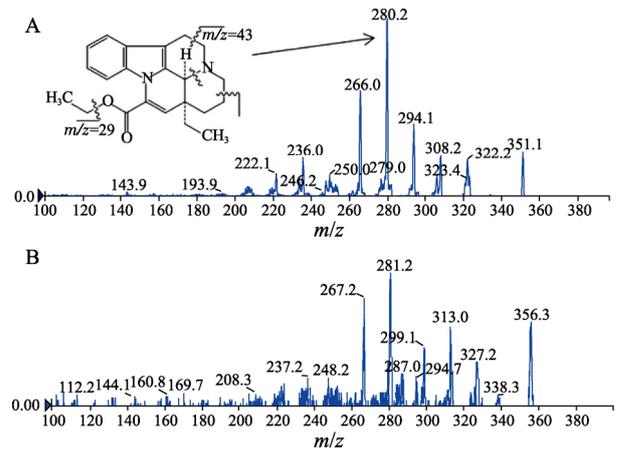


图 1 长春西汀(A)、长春西汀-d5(B)的二级碎片质谱图
Fig. 1 Secondary debris mass spectrum of vinpocetine(A), vinpocetine-d5(B)

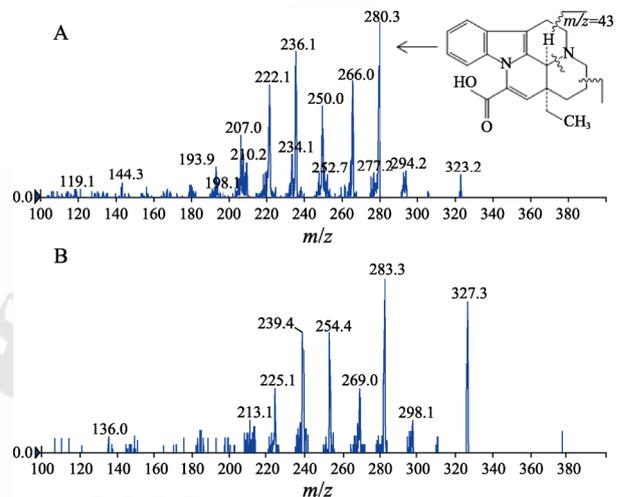


图 2 阿朴长春胺酸(A)、阿朴长春胺酸-d4(B)的二级碎片质谱图
Fig. 2 Secondary debris mass spectrum of apovincaminic acid(A), apovincaminic acid-d4(B)

36%DMSO-甲醇配成浓度为 4 mg·mL⁻¹ 的 VP-d5 内标储备液。精密称取 AVA-d4 对照品 2 mg, 加 50%甲醇-水配成浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的 AVA-d4 内标储备液。以上溶液均于 4 °C 保存。

1.4 血浆样品处理

样品于室温环境下融化后, 涡旋混匀; 取血浆样品 100 μL, 加入 10 μL “1.3” 项下内标工作溶液, 涡旋混匀, 加入 300 μL 乙腈, 涡旋 5 min; 5 500×g 离心 10 min; 移取 200 μL 上清液于 96 孔板中, 6 °C 条件下进样 10 μL。

2 方法学考察

2.1 选择性和特异性考察

使用 6 个单一个体来源的空白基质分别配制成定量下限浓度水平的样品、只含内标的样品以及只含待测物(定量上限浓度水平)的样品, 以分别

考察内源性物质对待测物和内标的干扰、内标对待测物的干扰及待测物对内标的干扰,结果见图3。VP:待测物及内标干扰0.00%;AVA:待测物及内标干扰0.00%。

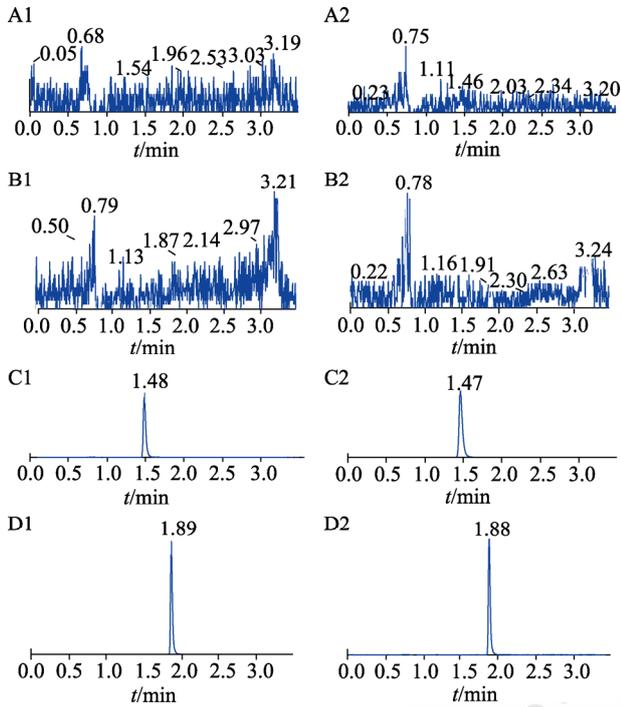


图3 血浆中长春西汀、阿朴长春胺酸和内标(长春西汀-d5、阿朴长春胺酸-d4)色谱图

A1、A2、B1、B2-空白血浆;C1-给药后的血浆样品(长春西汀);C2-给药后的血浆样品(长春西汀-d5);D1-给药后的血浆样品(阿朴长春胺酸);D2-给药后的血浆样品(阿朴长春胺酸-d4)。

Fig. 3 Chromatograms of vinpocetine, apovincaminic acid and internal standard(vinpocetine-d5, apovincaminic acid-d4) in plasma

A1, A2, B1, B2-blank plasma; C1-plasma samples after administration (vinpocetine); C2-plasma samples after administration(vinpocetine-d5); D1-plasma samples after administration(apovincaminic acid); D2-plasma samples after administration(apovincaminic acid-d4).

2.2 标准曲线的制备

分别配制浓度为0.04, 0.08, 0.20, 1.0, 5.0, 10.0, 16.0, 20.0 ng·mL⁻¹和0.50, 1.0, 2.5, 12.5, 62.5, 125, 200, 250 ng·mL⁻¹的长春西汀和阿朴长春胺酸血浆标准样品,分别按“1.4”项下血浆样品处理方法进行处理后进样分析,以待测物峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标(Y),以待测物在生物样品中的浓度C为横坐标(X),采用最小二乘法进行线性回归。典型的回归方程为VP: $Y=0.146X+0.000306(r=0.9997)$,线性范围为0.04~20.0 ng·mL⁻¹;定量下限浓度为0.04 ng·mL⁻¹,检测限为0.01 ng·mL⁻¹。AVA:胺酸 $Y=0.0228X+0.000908(r=0.9996)$,线性范围为0.50~250 ng·mL⁻¹,定量下限浓度为0.50 ng·mL⁻¹,检测限为0.1 ng·mL⁻¹。

2.3 准确度与精密度考察

准确度和精密度考察取同一分析批的定量下限和低、中、高3个浓度的质控样品(长春西汀和阿朴长春胺酸的浓度分别为0.40, 0.12, 1.20, 14.00 ng·mL⁻¹和0.50, 1.50, 40.00, 175.00 ng·mL⁻¹)进行评价。待测物的定量下限及低、中、高浓度质控样品,每一浓度水平各处理6份,连续测定3批,结果见表1。结果表明,VP的准确度在-2.00%~6.30%,批内和批间精密度RSD均<3.50%,AVA的准确度在-2.70%~5.00%,批内和批间精密度RSD均<3.50%。

表1 人血浆中长春西汀、阿朴长春胺酸的准确度与精密度
Tab. 1 Accuracy and precision of vinpocetine and apovincaminic acid in human plasma

待测物	浓度/ng·mL ⁻¹		RSD/%		RE/%
	理论值	测定值	批内(n=6)	批间(n=3)	
长春西汀	0.40	0.39	3.03	3.36	-2.00
	0.12	0.13	3.20	3.19	4.30
	1.20	1.28	1.47	1.57	6.30
	14.00	14.50	1.53	2.76	3.50
阿朴长春胺酸	0.50	0.49	3.27	3.31	-2.70
	1.50	1.58	2.83	2.92	5.00
	40.00	41.80	1.17	1.22	4.40
	175.00	176.00	1.40	2.38	1.00

2.4 提取回收率

提取回收率选取3个浓度(低、中、高质控浓度)进行考察,测定其峰面积,与未经过提取过程的相同浓度水平的基质样品峰面积进行比较。每个浓度水平平行6份。VP:回收率为100.8%~105.0%,总体变异RSD为2.24%,内标回收率96.81%,RSD为1.92%;AVA:回收率为96.30%~100.8%,总体变异RSD为2.33%,内标回收率为94.81%,RSD为3.71%。

2.5 基质效应

基质效应选取3个浓度(低、中、高质控浓度)进行考察,各浓度于6个不同来源个体基质中进行考察,以未经过提取的基质样品峰面积与相同浓度水平的纯溶液样品峰面积的比值来评价。低、中、高浓度的内标归一化基质效应RSD范围为VP 0.52%~2.24%,AVA 0.43%~1.60%。

2.6 溶血与高脂基质效应

溶血与高脂基质效应选取3个浓度(低、中、高质控浓度)进行考察,以2%溶血样品与2%高脂基质效应样品的准确度和精密度进行评价,每一浓度水平平行考察6份。结果见表2。

表2 长春西汀、阿朴长春胺酸的溶血与高脂基质效应(n=6)
Tab. 2 Hemolysis and high-fat matrix effect of vinpocetine and apovincaminic acid(n=6)

成分	浓度/ ng·mL ⁻¹	2%溶血样品		2%高脂基质效应样品	
		RSD/%	RE/%	RSD/%	RE/%
长春西汀	0.12	1.90	-0.90	2.40	5.10
	1.20	0.50	-5.00	1.00	5.30
	14.00	0.80	1.20	1.30	7.30
阿朴长春胺酸	1.50	1.30	6.20	2.30	5.40
	40.00	1.00	-1.30	0.90	3.90
	175.00	0.80	2.70	1.40	3.00

2.7 稳定性

根据中国药典 2020 年版第四部 9012《生物样品定量分析方法验证指导原则》，考察溶液长/短期稳定性、基质长/短期稳定性、冻融稳定性、全血稳定性、处理后稳定性、再进样重现性等。结果表明，VP、AVA 溶液(储备液和工作液)在室温放置 47 h 及 4 °C 放置 92 d、在 ≤-60 °C 条件下冷融 4 次、血浆中室温放置 27 h 及冰浴放置 2 h、血浆样品在 ≤-60 °C 条件下放置 93 d、血浆样品处理液中 6 °C 放置 80 h、全血冰水浴中放置 2 h 的稳定性良好；VP、AVA 分别在血浆样品处理液中 6 °C 放置 48, 74 h 后再进样重复性良好。内标 VP-d5、AVA-d4 在储备液及工作液中室温放置 47 h 稳定性良好。

3 血药浓度的测定

前期生物等效性研究试验方案经长沙市第一医院医学伦理委员会批准(中国临床试验登记号: CTR20191732), 30 名健康受试者, 受试制剂和参比制剂分别给药 10 mg 后分别于给药前 0 h 和给药后 10, 20, 30, 45 min, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.25, 2.5, 3, 4, 6, 8, 12, 24 h 采集静脉血约 4.0 mL, 全血采集置于含 EDTA-K₂ 抗凝剂的真空采血管中, 并轻柔颠倒数次, 确保血液与抗凝剂均匀混合。全部血样于 60 min 内进行离心(4 °C, 1 900×g 离心 10 min)。离心后移取血浆样品至冻存管中并保存于-80 °C 冰箱待测, 血浆样品按“1.4”项下方法进行处理后测定。以当日标准曲线计算各时间点的血药浓度, 得到血药浓度-时间曲线, 见图 4。

4 讨论

健康受试者单次服用 VP 10 mg 后, VP 的 C_{max} 约为 4~6 ng·mL⁻¹, 对定量下限要求较高。虽已有文献^[8]报道了同时检测人血浆中 VP 和 AVA, 但是由于使用 LC-MS, 定量下限为 4 ng·mL⁻¹, 且专属性较差, 无法满足 VP 片生物等效性研究需求。目

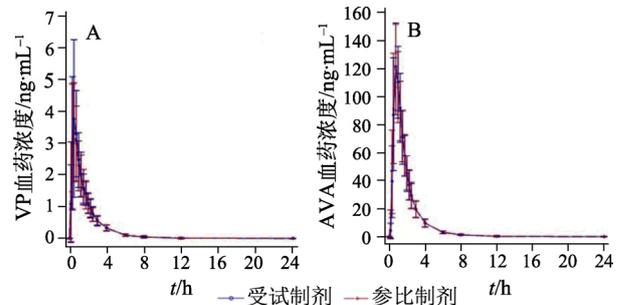


图4 受试者口服长春西汀片后长春西汀(A)、阿朴长春胺酸(B)血药浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s$, n=30)

Fig. 4 Plasma concentration-time profiles of vinpocetine(A) and apovincaminic acid(B) in human following oral administration($\bar{x} \pm s$, n=30)

前尚无文献报道同时测定人血浆中 VP 和 AVA, 本研究根据两者的特点采用了 UPLC-MS/MS, 多重反应监测(MRM)扫描方式对同时分析两者进行了详细的方法研究, 大大提高了方法的专属性和灵敏度。VP 和 AVA 的质谱二级碎片较多, 并非单一的碎片, 本研究对定量分析所选的碎片离子进行了考察, 选择了相对响应强度最高的碎片离子 m/z 280。本研究旨在同时测定 VP 和 AVA, 但两者极性相差较大, 为了节省仪器分析时间, 所以色谱条件的有机相选择了乙腈。定量离子峰为 $[M+H]^+$, 故在流动相水中加入甲酸, 并考察了不同浓度甲酸的影响, 发现甲酸浓度为 0.05% 时, 可以使 $[M+H]^+$ 峰的响应达到最高。在柱温的选择上, 先后考察了不同的温度对 VP 和 AVA 的影响, 发现在柱温 50 °C 条件下, 待测物和内标出峰时间较早且无基质效应的干扰。内标为稳定同位素内标 VP-d5 和 AVA-d4, 分别和待测物具有几乎相同的质谱断裂方式和色谱保留行为, 避免了前处理过程和分析过程中的误差对结果的影响。有报道^[1-2,7]分别采用液液萃取和固相萃取进行样品前处理, 也有采用蛋白沉淀来处理血浆样品^[3-6], 但基质种属为犬或大鼠, 或定量下限太高^[3-6]。本研究采用蛋白沉淀法处理人血浆样品, 先后比较了甲醇和乙腈的沉淀蛋白效率, 甲醇沉淀回收率远低于乙腈, 且有一定的基质效应, 因此选择乙腈作为沉淀剂, 即使 100 μ L 的血浆样品也可以获得较高的回收率和较低的基质效应。与液液萃取和固相萃取相比, 操作简便快捷, 成本低, 样本前处理时间大大缩短。本研究的色谱分析方法时间仅为 4.80 min, 且可同时检测 VP 和 AVA, 1 d 可完成近 300 个样品的分析, 较大地提高了仪器分析效

率, 适用于临床样品的高通量分析。

本研究建立了一个采用 UPLC-MS/MS 同时测定人体内 VP、AVA 血药浓度的方法, 采用沉淀蛋白法对血浆样品进行处理, 简化了样品的前处理过程。本方法专属性好, 灵敏度高, 耗时短, 成本低, VP 和 AVA 定量下限分别可达 $0.04 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $0.50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 检测限分别为 $0.01, 0.10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 经方法学研究证明, 适合应用于 VP 的临床生物样本检测, 可为 VP 给药后人体生物等效性研究提供依据和参考。

REFERENCES

- [1] ZHANG L L, LU Y N, WANG X T, et al. Simultaneous determination of vinpocetine and apovincaminic acid in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2013, 48(22): 1954-1958.
- [2] XIA H M, SU L N, GUO J W, et al. Determination of vinpocetine and its primary metabolite, apovincaminic acid, in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878(22): 1959-1966.
- [3] YANG Y, LOU K, GONG W, et al. Simultaneous estimation of vinpocetine and its metabolite, apovincaminic acid, in beagle plasma by LC-MS-MS[J]. Chromatographia, 2011, 73(7/8): 775-779.
- [4] WANG M M, WANG L J, SUN J H, et al. Simultaneous determination of vinpocetine and its major active metabolite apovincaminic acid in rats by UPLC-MS/MS and its application to the brain tissue distribution study[J]. J Chromatogr Sci, 2018, 56(3): 225-232.
- [5] WU L P, LI T L, JIA Y M, et al. Determination of primary metabolite of vinpocetine in human plasma by LC-MS/MS[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2010, 45(6): 458-460.
- [6] VLASE L, IMRE S, LEUCUTA S. New HPLC-MS method for quantitative determination of apovincaminic acid in human plasma[J]. J Sep Sci, 2006, 29(3): 385-389.
- [7] VATSOVA M, TZVETANOV S, DRENSKA A, et al. Improved gas chromatographic-mass spectrometric method for the quantitative determination of vinpocetine in human plasma[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1997, 702(1/2): 221-226.
- [8] VLASE L, BODIU B, LEUCUTA S E. Pharmacokinetics and comparative bioavailability of two vinpocetine tablet formulations in healthy volunteers by using the metabolite apovincaminic acid as pharmacokinetic parameter[J]. Arzneimittel-Forschung, 2005, 55(11): 664-668.
- [9] LI R. Simultaneous determination of three intermediate impurities residues in vinpocetine by HPLC[J]. Mod Chem Ind(现代化工), 2020, 40(3): 225-229.
- [10] TANG L, AI C. Study on metabolites of vinpocetine in rats urine[J]. Her Med(医药导报), 2020, 39(12): 1619-1625.

收稿日期: 2022-03-28

(本文责编: 曹粤锋)