

液相-质谱法测定人体血浆中苯磺酸氨氯地平的含量

孔祥华¹, 宋 灏²

(1. 焦作市妇幼保健院 药剂科, 河南 焦作 454000; 2. 四川大学 华西药学院, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的: 探讨液相-质谱法测定人体血浆中苯磺酸氨氯地平含量。方法: 采用 Agilent 1100 型高效液相色谱仪与 Bruker Esquire 3000 质谱仪检测人体血浆中的苯磺酸氨氯地平含量, 确认标准曲线, 分析日内、日间密度以及回收率。结果: 苯磺酸氨氯地平的标准曲线为 $y = 0.5796x - 0.0094$, 日内与日间精密度的 RSD% 都在 5% 以下, 回收率在 95.0% 以上, 并且不同试验浓度的不同试剂血药浓度对比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 液相-质谱法检测人体血浆中苯磺酸氨氯地平含量具有方便、灵敏、快速等优点。

[关键词] 液相-质谱法; 血浆; 微量药物分析; 苯磺酸氨氯地平

[中图分类号] R969.1; R972.4 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1000-2707(2014)02-0239-03

在当前的药物分析中, 高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 是最常用的手段, 具有高效、快速的分析特点, 是研究药物及其代谢物的有效方法^[1-2]。但是 HPLC 存在定性功能较弱、专属性较差、灵敏度相对较低和色谱分离时间较长等缺点。由于血浆样品具有个体间差异大、药物浓度低、内源性物质干扰多等特点, 所以必须根据待测药物的生物基质、性质和预期的浓度范围, 建立准确、专属、灵敏的生物样品定量分析方法, 为此质谱技术也开始应用于药物的分析^[3-5]。液相色谱和质谱技术的联用, 极大地提高了质谱的选择性, 扩大了对于有机分子的适用性, 不需要分析物之间实现完全的色谱分离, 具备丰富的定性定量信息和优异的灵敏度, 分析时间大为缩短^[6]。苯磺酸氨氯地平在治疗心血管疾病中临床给药剂量为 5~10 mg/d, 体内药物浓度极低, 造成检测困难, 不能满足人体内分析的需要^[7-8]。本研究探讨了液相-质谱法在血浆苯磺酸氨氯地平分析中的应用, 报告如下。

1 资料与方法

1.1 试剂与药品 甲醇 (色谱纯) 购自默克公司, 甲酸、正己烷、乙酸乙酯、乙醚、氢氧化钠、二氯甲烷及环己烷 (分析纯) 购自中国医药集团上海化学试剂公司化学试剂厂。内标盐酸克伦特罗对照品 (含量 >99%) 由上海市药检所提供; 对照制剂: 苯

磺酸氨氯地平片, 中国药检所提供, 纯度为 99.99%。试验制剂: 苯磺酸氨氯地平片, 批号 041101, 山西康宝生物制品股份有限公司提供。

1.2 设备及方法 Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (Agilent, 美国), API3000 液相色谱, 质谱-质谱联用仪 (ABI, 美国), TGL-16G 台式离心机 (上海安亭科学仪器厂), KW-80A 旋涡混合器 (上海医科大学仪器厂), Agilent 化学数据处理工作站。色谱条件: 流动相: 流动相 A 是由 25 mmol/L Na_2HPO_4 水溶液与甲醇、乙腈以体积比 55:22.5:22.5 (V:V:V) 混合而成; 流动相 B 是由甲醇、乙腈、水以体积比 45:45:10 (V:V:V) 混合而成。流速: 1 mL/min; 进样浓度 0.2 $\mu\text{g/mL}$, 进样体积 20 μL ; Phenomenex Luna C18 反相柱, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 237 nm。梯度洗脱条件: 用 100% 的流动相 A 洗脱 25 min, 流动相 A 与 B 梯度洗脱 20 min, 流动相 A 与 B 梯度洗脱; 用 100% 的流动相 A 平衡柱子 10 min。Bruker Esquire 3000 质谱仪 (Bruker-Franzen Analytik GmbH, 德国), 实验参数设置: 有效时间 200 ms, 离子源温度 250 $^{\circ}\text{C}$, 光谱平均值 8, 喷雾电压 ± 4.0 kV, 目标离子数 20 000, 扫描时间 0.15 s。帘气 (CUR) 为 8 L/min, 碰撞气 (CAD) 为 4 L/min。

1.3 对象选择 本研究选择健康志愿者 30 名, 心、肺、肝、肾功能均正常, 无药物依赖史, 不吸烟、不嗜酒, 在试验前 2 周至整个试验期间禁服任何其它药物, 并签署知情同意书。男 18 例, 女 12 例, 平均年龄 (24.12 \pm 2.44) 岁, 平均身高 (169.60 \pm

5.560) cm, 平均体重 (65.85 ± 5.74) kg, 平均体重指数 (22.63 ± 4.12) kg/m²。

1.4 给药方案与血样采集 所有受检者给药前 1 d 晚餐后开始禁食, 给药当天 8:00 ~ 10:00 空腹服用对照制剂或试验制剂 2 片 (5 mg/片), 用 250 mL 温开水送服。分别于给药后 1、4、8、24 及 72 h 共 5 个时间点取桡部静脉血 (埋置肝素留置针头), 每次取血 3 mL, 收集于加有肝素的离心管内, 3 500 r/min 离心 10 min 后, 分离血浆置于 -20 °C 冰箱中保存。在给药后受检者正常饮食与饮水活动。

1.5 溶液配制 精密称取苯磺酸氨氯地平对照品适量 (1 ~ 100 mg) 置于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解配制成浓度为 100 mg/L 的氨氯地平对照品储备溶液, 置于 4 °C 冰箱内保存待用。内标溶液 (克伦特罗) 配制: 称取内标对照品适量, 置于 100 mL 容量瓶中, 通过甲醇溶解配制成浓度为 1 mg/L 的内标溶液, 置于 4 °C 冰箱内保存备用。标准曲线血样配制: 取 0.5 mL 空白健康受试者血浆若干份, 加样苯磺酸氨氯地平标准溶液 50 μ L, 得到浓度分别为 0.1、0.5、1、5 和 10 μ g/L 的氨氯地平标准曲线用血样。精密移取血浆 0.5 mL, 置 15 mL 试管内, 精密加入内标 50 μ L, 振摇均匀, 加入 1 mol/L NaOH 溶液 100 μ L, 再精密加入乙醚 5 mL, 混匀后 3 500 r/min 离心 8 min。将乙醚溶液移于离心管中, 40 °C 水浴, 保持干燥。进样前用 100 μ L 甲醇复溶解, 进样 50 μ L 作色谱-质谱联用分析。

1.6 统计方法 采用 SAS9.0 软件建立数据库并进行统计分析, 血药浓度对比采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 色谱-质谱条件的优化 考察了乙酸乙酯、乙醚、正己烷、二氯甲烷、环己烷及二种溶剂的混合液。乙醚对氨氯地平的萃取效率最高 (95.0%), 故采用乙醚为萃取溶剂。由于氨氯地平属弱碱性药物, 故选择在 ESI 电喷雾电离方式下正离子扫描。

2.2 联用效果分析 在选择色谱-质谱条件下, 药物、内标和内源性杂质均分离完全, 内源性杂质不干扰苯磺酸氨氯地平的测定, 见图 1。

2.3 标准曲线与线性范围 取 0.5 mL 空白血浆若干份, 分别加入苯磺酸氨氯地平对照品溶液, 其

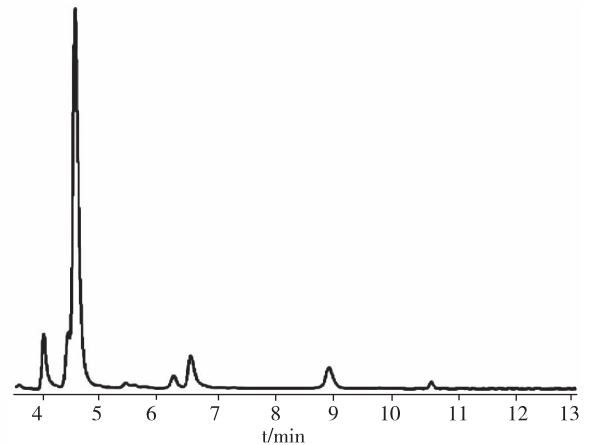


图 1 色谱-质谱条件下的分离效果

Fig. 1 The separation effect under the condition of chromatography - mass spectrometry

浓度分别为 0.1、0.5、1、5、10 和 20 μ g/L, 以样品峰面积和内标峰面积的比值 (y) 为纵坐标, 以药物浓度 (x , μ g/L) 为横坐标进行线性回归, 得到 $y = 0.5796x - 0.0094$ ($r = 0.9996$, $n = 6$), 定量限 0.1 μ g/L。配制低、中、高三个浓度 (0.1、1 和 10 μ g/L) 的质控血样各 5 份, 采用同样方法进行日内与日间色谱-质谱分析, 计算精密度。结果见表 1。平均浓度为 (2.12 ± 0.10) μ g/L, 而 RSD% 最大不超过 5%, 满足要求。加样回收率: 配制低、中、高三个浓度 (0.1、1 和 10 μ g/L) 的标准血样各 5 份, 于日内进行色谱-质谱分析, 将药物峰面积和内标峰面积的比值代入标准曲线的方程中得到相对回收率, 都在 95.0% 以上。见表 2。

表 1 苯磺酸氨氯地平精密度分析

Tab. 1 Precision analysis on amlodipine besylate

样品浓度 (μ g/L)	日内 RSD% ($n = 5$)	日间 RSD% ($n = 5$)
0.1	2.3	3.6
1	3.9	4.1
10	3.9	4.9

表 2 苯磺酸氨氯地平回收率分析

Tab. 2 Recovery analysis on amlodipine besylate

样品浓度 (μ g/L)	测定的浓度 (μ g/L)	回收率 (%)
0.1	0.09 ± 0.04	96.52 ± 2.12
1	0.98 ± 0.41	95.22 ± 3.74
10	9.97 ± 0.67	98.50 ± 3.63

2.4 血药浓度 30 名受检者服用对照制剂和试验制剂后的氨氯地平的血药浓度见表 3, 结果显示在相同时间两种试剂的血药浓度对比无统计学意

义($P>0.05$)。

表 3 相同时间点两种试剂的血药浓度($\mu\text{g/L}, \bar{x} \pm s$)
Tab. 3 Blood drug concentrations of
two reagents at same time

时间(h)	血药浓度($\mu\text{g/L}$)		t	P
	对照制剂	试验制剂		
1	1.26 ± 0.42	1.21 ± 0.52	0.421	> 0.05
4	5.24 ± 1.96	5.00 ± 2.62	1.012	> 0.05
8	3.86 ± 1.28	3.84 ± 1.77	0.128	> 0.05
24	2.52 ± 0.96	2.62 ± 0.98	0.563	> 0.05
72	1.48 ± 0.58	1.42 ± 0.49	0.321	> 0.05

3 讨论

药物是用来诊断、预防及治疗疾病的一类特殊物质,药物杂质是指在药物生产及贮存过程中引进或产生的有效成分以外的其它化学物质^[9]。由于药物的服用剂量越来越低,因此其在机体内的浓度也越来越低,药物达峰值时的高浓度以及消除过程中接近定量限的低浓度的范围广^[10]。高效液相色谱法是 20 世纪迅速发展起来的高效、快速的仪器分析技术,不过高效液相色谱需要待测药物具有一定的紫外或荧光吸收,检测时存在一定的局限性^[11]。因此对于生物样品中微量药物分析,常规的高效液相色谱法的应用效果比较差。另外,药代动力学研究中对药物样本量通常较大,需要简便、快速的分析方法。有高效液相色谱技术与质谱技术优点的液相-质谱法就迅速成为样品中微量药物分析的有效工具^[12]。

苯磺酸氨氯地平是一种长效 1,4-二氢吡啶类钙离子拮抗剂,能够减少心脏能量消耗和对氧的需求,降低心脏的后负荷,还可阻滞钙离子跨膜进入心肌和血管平滑肌细胞,扩张外周小动脉和冠状动脉,主要用于治疗变异型心绞痛、慢性稳定性心绞痛和高血压,但临床给药剂量较低^[13-14]。文献主要报道了用色谱方法测定氨氯地平的血药浓度,灵敏度偏低^[15-16]。

本实验建立并优化了色谱-质谱联用模型,成功地进行氨氯地平人血浆浓度的测定。在色谱优化中,流动相中有机溶剂的比例越高,流动相黏度就越小,而且有机相比比例较高,为此选用有机相甲醇比例为 70%。酸性条件下氨氯地平易成盐不利于有机溶剂提取,在血浆中加入 1 mol/L NaOH 溶液 100 μL 控制提取介质的 pH 值,保证提取效率,

减少了血浆蛋白的干扰。结果显示,苯磺酸氨氯地平的标准曲线为 $y = 0.5796x - 0.0094$,日内与日间精密度的 RSD% 都在 5% 以下,回收率都在 95.0% 以上,实验结果表明在同一时间点,两种检测试剂的血药浓度差异无统计学意义($P>0.05$)。

液相-质谱法在人体血浆苯磺酸氨氯地平分析中具有方便、灵敏、快速等优点。

4 参考文献

[1] 康自华,阳小成,陈婷. 高效液相色谱法在药物分析中的应用[J]. 广东微量元素科学,2006(8):18-22.

[2] Kamel A,Prakash C. High performance liquid chromatography/atmospheric pressure ionization/tandem mass spectrometry (HPLC/API/MS/MS) in drug metabolism and toxicology[J]. Current Drug Metabolism,2006(8):837-852.

[3] Storch A. Intermittent subcutaneous apomorphine in advanced Parkinson disease[J]. Psychopharmako therapie, 2005(1):17-22.

[4] Ingram WM,Priston MJ,Sewell GJ. Improved assay for R(-)-apomorphine with application to clinical pharmacokinetic studies in Parkinsons disease[J]. Journal of Chromatography B,2006(1-2):1-7.

[5] 陈赛贞,徐珊珊,陈斌,等. 健康志愿者口服氨氯地平片的药代动力学和生物等效性研究[J]. 中国药业,2005(9):25-27.

[6] 林黛琴,万承波,邱萍,等. 液相色谱-串联质谱法快速测定食品中 4 种黄色工业染料[J]. 质谱学报,2013(3):89-90.

[7] 张琰,杨蕾,刘梅,等. 苯磺酸氨氯地平片在健康人体的药动学及生物等效性评价[J]. 第四军医大学学报,2006(2):172-175.

[8] Tellez MR,Khan IA,Scabaneberg BT,et al. The Steam distillation solid phase microextraction for the detection of Ephedra sinical herbal preparations[J]. Journal of Chromatography A,2004(1):51-56.

[9] 李真,龚培力,曾繁典. 药物杂质及其对安全性的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2001(6):451-453.

[10] 郭跃伟. 液相色谱/光谱/紫外/质谱及核磁共振联用技术在中草药有效成分研究中的应用[J]. 天然产物研究与开发,2003(5):456-461.

[11] 黄雅佩,吴官非,夏焜,等. 高效液相色谱法测定鱼肉中的碱性橙 II 和碱性嫩黄 O 两种工业染料[J]. 化学试剂,2013(5):80-82.

[12] Smyth WF. Electro spray ionization mass spectrometric behavior of selected drug and their metabolites[J]. Analytica Chimica Acta,2003(492):1-16. (下转第 244 页)

3 讨论

IgA 肾病不是一个独立的疾病,而是一组以 IgA 为主的免疫球蛋白颗粒状弥漫沉积在肾小球系膜区及毛细血管袢的临床综合征。研究显示持续性蛋白尿是 IgA 肾病病情进展的主要危险因素,即使轻度范围内蛋白尿亦和 IgA 肾病病变程度呈正相关^[1,3]。Donadio JV 等^[4]认为尿蛋白 $>1.0\text{ g}/24\text{ h}$ 是 IgA 肾病进展的独立危险因素,因此,降低蛋白尿是延缓 IgA 肾病进展的关键。

雷公藤具有多种免疫抑制作用和非特异性抗炎作用,可减少肾小球疾病的蛋白尿和红细胞尿,是目前中药治疗肾小球疾病较有效的药物。在本研究中,对照组治疗 6 月后 24 hTP、尿红细胞计数较治疗前均有明显下降($P < 0.01$),Alb 升高($P < 0.05$);SCr、BUN、ALT、WBC 均无明显变化($P > 0.05$)。雷公藤可能通过减轻肾组织中的炎症反应减少蛋白尿,从而起到保护肾脏的作用^[5-6]。但该药的不良反应很多,最常见的有肝功能损害、骨髓抑制(白细胞减少或全血细胞减少)、性腺抑制(女性月经紊乱、闭经、男性精子减少、死精)等^[6],影响了其在临床上大范围使用。在本研究中,对照组不良反应出现总频数为 38.1%,主要类型与文献一致^[7]。黄葵胶囊主要成分为黄蜀葵花,主要功效为清热利湿、解毒消肿,主要治疗慢性肾脏疾病。现代药理研究表明,黄蜀葵花及其提取物通过抗血小板聚集,抗氧化和消除氧自由基,抗肾小球免疫炎症反应,清除循环系统免疫复合物等机制降低蛋白尿^[8]。本研究结果显示黄葵胶囊减少蛋白尿疗效确切,同时具有一定的改善肾功能的作用,治疗有效率与雷公藤相近。对治疗组与对照组不良反应分析,治疗组不良反应出现总频数为 7/40 (17.5%),对照组出现总频数为 16/42 (38.1%)。

两组均发现有皮疹、胃脘不适的不良反应。治疗组皮疹出现频数略高于对照组,而胃脘不适则相反。除此之外,对照组的不良反应还涉及生殖、造血等系统和肝功能。

上述结果说明,黄葵胶囊与雷公藤多苷片对于 IgA 肾病的蛋白尿及镜下血尿均有明显疗效,但前者较后者不良反应少,值得在临床上推广应用。

4 参考文献

- [1] 乐伟波,梁少珊,邓康平,等. 1 126 例中国汉族成人 IgA 肾病患者的长期预后及危险因素分析[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2011(2):101-108.
- [2] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2012:156-163.
- [3] Bartosik LP, Lajoie G, Sugar L, et al. Predicting progression in IgA-Nephropathy[J]. Am J Kidney Dis, 2011(4):728.
- [4] Donadio JV, Grand JP. IgA nephropathy[J]. N Engl Med, 2012(347):738.
- [5] 张勇军,刘冬,孙永苹,等. 雷公藤多甙对糖尿病大鼠肾脏的保护作用及其可能的炎症机制[J]. 广东医学, 2013(17):2634-2636.
- [6] 辛丽娜,张莉丽. 黄葵胶囊与雷公藤治疗 IgA 肾病疗效比较[J]. 实用临床医药杂志, 2012(21):103-104.
- [7] 陈芸,盛梅笑. 雷公藤多苷治疗糖尿病肾病疗效及安全性的 Meta 分析[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2013(3):245-249.
- [8] Jepson RE, Vallance C, Syme HM, et al. Assessment of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in geriatric cats with variable plasma creatinine concentrations with and without azotemia[J]. Am J Vet Res, 2010(2):241-247.

(2013-12-12 收稿, 2014-02-14 修回)

编辑: 周 凌

(上接第 241 页)

- [13] 王俊伟,张松,郑经,等. LC-MS/MS 法定量测定人血浆中的氯氮平[J]. 分析试验室, 2011(2):58-59.
- [14] 孟繁华,郭继芬,李黎,等. LC-MS/MS 法同时测定人血浆伊曲康唑和羟基伊曲康唑浓度[J]. 中国新药杂志, 2011(2):41-42.
- [15] 李迎. 基于衍生化与 LC-MS 联用研究生物样品中难测

定药物的定量测定及其在药代动力学中的应用[D]. 中国人民解放军军事医学科学院, 2010.

- [16] 闻俊. 生物样品高通量液相色谱分析方法学研究及其药代动力学应用[D]. 第二军医大学, 2008.

(2013-12-13 收稿, 2014-02-10 修回)

编辑: 刘 平