

LC-MS/MS法测定大鼠血浆中维拉帕米与其代谢产物去甲维拉帕米的浓度及其药动学研究

郑侠^{1,2*}, 刘昌辉^{1#}, 王宁生¹, 宓德卿¹(1.广州中医药大学临床药理研究所, 广州 510405; 2.广东省医学实验动物中心, 广东佛山 528248)

中图分类号 R965;R972 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)01-0049-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.01.17

摘要 目的:建立测定大鼠血浆中维拉帕米(Ver)及其代谢产物去甲维拉帕米(Nor)浓度的方法,并研究其药动学。方法:取大鼠6只灌胃 Ver 10 mg/kg,采用液相色谱-串联质谱法,以他莫昔芬为内标,检测给药前和给药后24 h内 Ver和Nor的血药浓度,并用3p97软件计算药动学参数。液相色谱条件:色谱柱为Alltima C₁₈,流动相为甲醇-0.05%甲酸水(梯度洗脱),柱温为40℃;质谱条件:电喷雾电离源,Ver、Nor和他莫昔芬的选择检测离子质荷比(*m/z*)分别为455.3/165.0、441.0/165.0和372.2/129.1。结果:Ver、Nor检测质量浓度的线性范围均为2~1 000 ng/ml($r_{\text{Ver}}=0.999 4$, $r_{\text{Nor}}=0.999 2$),最低检测限均为0.5 ng/ml;药动学参数: c_{max} 分别为(669.91±80.99)、(681.86±79.79) ng/ml, $t_{1/2}$ 分别为(2.26±0.31)、(2.44±0.29) h, $\text{AUC}_{0-\infty}$ 分别为(1 331.33±165.20)、(2 341.66±201.20) ng·h/ml。结论:本方法专属性强、灵敏度高、准确性好,可用于Ver和Nor的血药浓度测定,且二者在大鼠体内的药动学符合二室模型。

关键词 维拉帕米;去甲维拉帕米;大鼠;液相色谱-串联质谱法;药动学

Determination of Verapamil and Its Metabolite Norverapamil in Rats Plasma by LC-MS/MS and Its Pharmacokinetics Study

ZHENG Xia^{1,2}, LIU Chang-hui¹, WANG Ning-sheng¹, MI Sui-qing¹(1.Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2.Experimental Animal Center of Guangdong Province, Guangdong Foshan 528248, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish a method for determining concentrations of verapamil (Ver) and its metabolite norverapamil (Nor) in rat plasma and to study its pharmacokinetics. **METHODS:** After intragastrical administration of Ver 10 mg/kg in 6 rats, the plasma concentrations of Ver and Nor were determined by LC-MS/MS within 24 h before and after medication using tamoxifen as internal standard. The pharmacokinetic parameters were calculated by 3p97 software. The determination was performed on Alltima C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.05% formic acid (gradient elution) with column temperature of 40 °C. The LC-MS/MS system was operated using an electrospray ionization; the ion of monitor: *m/z* 455.3/165.0 (Ver), 441.0/165.0 (Nor) and 372.2/129.1 (tamoxifen). **RESULTS:** The linear ranges of Ver and Nor were 2-1 000 ng/ml ($r_{\text{Ver}}=0.999 4$, $r_{\text{Nor}}=0.999 2$), and the lowest limit of quantification was 0.5 ng/ml. The pharmacokinetics parameters were as follows: c_{max} : (669.91±80.99) vs. (681.86±79.79) ng/ml; $t_{1/2}$: (2.26±0.31) vs. (2.44±0.29) h; $\text{AUC}_{0-\infty}$: (1 331.33±165.20) vs. (2 341.66±201.20) ng·h/ml. **CONCLUSIONS:** The method is proved to be specific, sensitive and accurate, and suitable for the determination of Ver and Nor concentration in plasma. The pharmacokinetics of them in rats are in line with two-compartment model.

KEY WORDS Verapamil; Norverapamil; Rats; LC-MS/MS; Pharmacokinetics

维拉帕米(Verapamil, Ver)属于第1代苯基烷胺类钙离子通道拮抗药,临床上被广泛应用于治疗心律失常、高血压、缺血性心脏病以及肥厚性心肌病等。近年Ver在阵发性室上性心动过速方面研究也有报道^[1-2]。Ver口服给药后吸收迅速,首关代谢强,生物利用度低(10%~20%)^[3]。去甲维拉帕米(Norverapamil, Nor)是Ver的主要代谢产物之一,其主要由细胞色素P₄₅₀(CYP)3A4酶代谢^[4]。笔者建立一种快速、灵敏、简便、取样量少的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法检测Ver与Nor在大鼠体内的血药浓度,旨在为临床进行药动学研究提供参考。

* 硕士研究生。研究方向:药物分析。电话:020-36587663。E-mail:h220zhx@yahoo.com.cn

通信作者:助理研究员。研究方向:中药有效性与安全性及药动学。电话:020-36585532。E-mail:realluich@gmail.com

1 材料

1.1 仪器

API4000型LC-MS/MS仪,包括电喷雾离子源(ESI)、数据处理系统(美国AB公司);1200型液相色谱系统(美国Agilent公司)。

1.2 药品与试剂

Ver对照品(批号:V4629,纯度:>98%)、Nor对照品(批号:V108-20MG,纯度:>98%)和他莫昔芬对照品(内标,批号:T5648,纯度:>99%)均购于美国Sigma公司;甲醇、甲酸为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

SD大鼠6只,♂,体质量(280±30)g,由广东省医学实验动物中心提供,动物合格证号:SCKX(粤)2008-0002。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

精密称取 Ver、Nor 和内标对照品各 10 mg, 分别置于 10 ml 量瓶中, 加 5 ml 甲醇使其溶解, 用甲醇定容至 10 ml, 得 1 mg/ml 的母液, 用时用甲醇稀释至所需质量浓度即可。

2.2 色谱条件与质谱条件

色谱柱: Alltima-C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 5 μm), 保护柱: Alltima-C₁₈; 流动相: 甲醇-0.05% 甲酸水(梯度洗脱, 具体程序: 0~0.1 min 为 0→45% 甲醇, 0.1~0.6 min 为 45% 甲醇, 0.6~1.1 min 为 45%→98% 甲醇, 1.1~7.3 min 为 98% 甲醇, 7.3~8.3 min 为 98%→45% 甲醇, 8.3~14.5 min 为 45% 甲醇), 流速: 0.3 ml/min; 柱温: 40 °C; 进样量: 5 μl。

ESI 源; 检测方式: 正离子检测; 扫描方式: 多反应离子监测(MRM); Ver、Nor 和他莫昔芬的选择检测离子质荷比(*m/z*) 分别为 455.3/165.0 ([M+1]⁺)、441.0/165.0 ([M+1]⁺)、372.2/129.1 ([M+1]⁺); 雾化气流速: 30 L/min; 干燥气流速: 30 L/min; 干燥气温度: 400 °C; 检测器电压: 4 500 V。

2.3 血浆样品的采集与处理

2.3.1 血浆样品的采集: 取大鼠 6 只, 实验前 12 h 禁食不禁水, 参考文献^[5]拟定药理学研究方案, 灌胃给药 Ver 10 mg/kg, 于给药前和给药后 0.17、0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、12、24 h 眼眶静脉丛采血 100 μl, 置于 1.5 ml 肝素化的塑料管中, 于 4 °C、1 500×g 离心 10 min 分离血浆, 置于-80 °C 冷冻贮存备用。

2.3.2 血浆样品的处理: 取血浆 20 μl, 加入 1 μg/ml 内标对照品溶液 5 μl, 涡旋振荡 30 s, 加入甲醇 100 μl, 涡旋振荡 3 min, 16 000×g 离心 10 min, 取上清液 5 μl 进样测定。

2.4 方法专属性考察

取大鼠空白血浆、空白血浆+Ver+Nor+内标、血浆样品(给药后 2 h)+内标, 依法处理后进样测定。结果显示, 空白血浆对检测无干扰, Ver、Nor 和内标的保留时间分别为 5.78、5.77、6.77 min。色谱图见图 1。

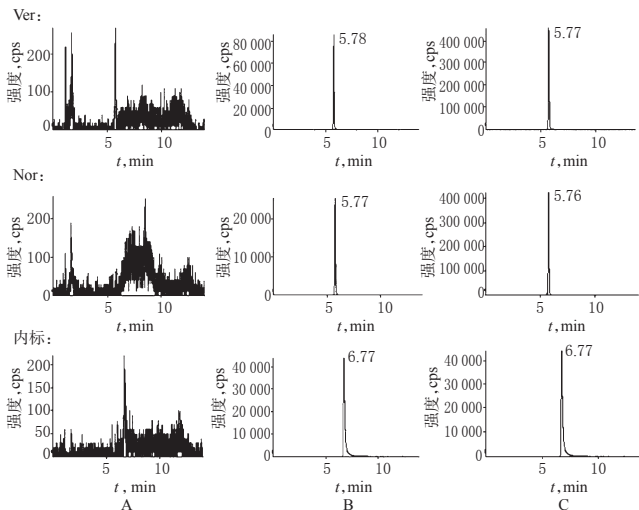


图 1 液相色谱-串联质谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+Ver+Nor+内标; C. 血浆样品+内标

Fig 1 LC-MS/MS chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma+Ver+Nor+internal standard; C. plasma sample+internal standard

2.5 线性关系与最低检测限考察

取空白血浆 20 μl, 加入一定质量浓度的 Ver、Nor 对照品溶液 5 μl, 制成 Ver、Nor 均为 2、5、10、20、50、100、200、500、1 000

ng/ml 的血浆样品, 按“2.3.2”项下方法处理, 进样测定。以 Ver、Nor 质量浓度(*c*)为横坐标, Ver、Nor 分别与内标的峰面积之比(*Y*)为纵坐标, 进行线性回归。得 Ver、Nor 的回归方程分别为: $Y=20.539c-0.9404$ ($r=0.9994$)、 $Y=47.789c+0.5039$ ($r=0.9992$), 二者检测质量浓度的线性范围均为 2~1 000 ng/ml, 最低检测限均为 0.5 ng/ml (信噪比>3)。

2.6 回收率与精密度试验

取空白血浆 20 μl, 制备成 Ver、Nor 质量浓度分别为 5、50、500 ng/ml 的血浆样品, 按“2.3.2”项下方法处理, 进行 5 样本分析, 连续测定 3 d, 根据当日标准曲线计算样品质量浓度, 分别计算绝对回收率、相对回收率、日内 RSD、日间 RSD, 结果见表 1。

表 1 回收率与精密度试验结果 ($n=5$)

Tab 1 Results of recovery and precision tests ($n=5$)

药物	质量浓度, ng/ml	回收率, %		RSD, %	
		绝对回收率	相对回收率	日内	日间
Ver	5	85.2±4.2	104.2±4.3	4.2	4.8
	50	88.5±3.5	101.8±2.2	3.0	4.1
	500	90.3±2.4	97.4±1.6	2.1	3.5
Nor	5	80.3±4.8	103.7±3.6	3.9	4.7
	50	84.7±3.1	100.4±2.7	3.7	4.3
	500	85.4±2.5	98.5±2.1	3.1	3.8

2.7 稳定性考察

取大鼠空白血浆 20 μl, 制备成 Ver、Nor 质量浓度分别为 5、50、500 ng/ml 的血浆样品, 室温放置 28 d (测定时间为放置 1、7、14、21、28 d) 及-80 °C 反复冻融 5 次 (测定时间为冻融后 2、4、6、8、10 h), 于相应测定时间测定 Ver 与 Nor 的质量浓度。结果, 3 个质量浓度血浆样品中 Ver 与 Nor 的 RSD 均<5%, 表明 Ver 与 Nor 在室温放置及反复冻融条件下均稳定。

2.8 药理学实验

取“2.3.1”项下各时间点的血浆样品, 处理后进样测定 Ver 与 Nor 的血药浓度, 绘制药-时曲线。用 3p97 软件计算药理学参数。Ver 和 Nor 在大鼠体内的药-时曲线见图 2, 药理学参数见表 2。

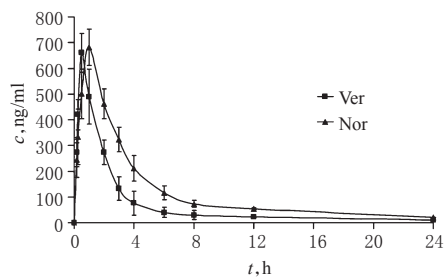


图 2 Ver 和 Nor 在大鼠体内的药-时曲线 ($n=6$)

Fig 2 Plasma concentration-time profiles of Ver and Nor in rats ($n=6$)

表 2 Ver 和 Nor 在大鼠体内的药理学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Pharmacokinetic parameters of Ver and Nor in rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	Ver	Nor
K_e , /h	0.307±0.014	0.286±0.029
$t_{1/2}$, h	2.26±0.31	2.44±0.29
t_{max} , h	0.48±0.23	1.26±0.47
c_{max} , ng/ml	669.91±80.99	681.86±79.79
AUC_{0-24h} , ng·h/ml	1 320.78±165.04	2 179.68±275.99
$AUC_{0-\infty}$, ng·h/ml	1 331.33±165.20	2 341.66±201.20

静脉药物配置中心药品损耗的原因及干预对策

罗焕华*, 邱丽筠, 于克炜, 俞淑文[#](济南市中心医院, 济南 250013)

中图分类号 R95 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)01-0051-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.01.18

摘要 目的:减少静脉药物配置中心药品的损耗。方法:对我院静脉药物配置中心各环节即处方审核、分批次、排药及摆药、贴签、找退药等发生的药品损耗进行原因分析,并制订相关的干预对策;通过比较实施干预措施前、后6个月的工作环节失误和操作失误次数来评价干预成效。结果与结论:通过对各配置环节中的药品损耗采取改进原有工作模式、优化工作流程、充分利用医院信息系统的辅助功能等干预措施后,与干预前比较,工作环节失误和操作失误次数分别从695降低至346、438降低至163,表明所采取的干预措施可以有效减少药品损耗。

关键词 静脉药物配置中心;药品损耗;干预对策

Reasons for Drug Wastage in PIVAS and Intervention Countermeasures

LUO Huan-hua, QIU Li-yun, YU Ke-wei, YU Shu-wen[#](Jinan Central Hospital, Jinan 250013, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To reduce the wastage of drugs in PIVAS. METHODS: The reasons for loss of drug in our hospital were analyzed in links of prescription check, dividing batches, drug arrangement and dispensary, labeling and drug rejection, etc. Related countermeasures were formulated. The intervention effects were evaluated by comparing the number of link error and operation miss within 6 months before and after the implementation of intervention measures. RESULTS & CONCLUSIONS: After the implementation of the intervention strategies for the loss of drugs in links, such as improving previous working mode, optimizing operation process and utilizing the additional function of HIS, the number of link error and operation miss decreased from 695 and 438 to 346 and 163. It indicates that intervention measures can effectively avoid work mistake and reduce the loss of drugs.

KEY WORDS PIVAS; Drug wastage; Intervention countermeasures

由上述结果表明,Ver和Nor在大鼠体内的药动学符合二房室模型。

3 讨论

Ver药动学研究在国内已有相关报道^[6-7],但采用LC-MS/MS同时测定Ver及其代谢产物Nor在大鼠体内血药浓度的方法在国内尚未见文献报道。本文建立的方法,每个样本仅需血浆100 μl,整个药动学研究过程采血量少,一只大鼠可完成一条完整的药-时曲线,且在整个采血过程中大鼠的状态比较好,这样就能更真实地反映Ver在大鼠体内的药动学过程。

在建立LC-MS/MS法的预实验中,笔者曾选用等度洗脱,洗脱时间为5 min,但是峰形较差、响应值不高。通过调节pH、流速和流动相比,峰形、响应值都有所改善,但效果不是很理想。而采用梯度洗脱,虽然分析时间延长了,但峰形和响应值都有了很大改善。等度洗脱时,Ver、Nor和内标的半峰宽分别是0.4、0.4、0.5 min;而梯度洗脱时,Ver、Nor和内标的半峰宽分别是0.1、0.1、0.3 min,大大提高了检测的灵敏度。本研究建立的方法可为临床上Ver的药动学研究提供可靠的参考。

参考文献

* 主管护师。研究方向:静脉药物配置。电话:0531-85695975。E-mail: zxyllhh@163.com

[#] 通信作者:副主任药师,博士。研究方向:医院药学。电话:0531-85695280。E-mail: yushuwen@sdu.edu.cn

- [1] 游俊廷,刘捷安.维拉帕米治疗阵发性室上性心动过速52例临床观察[J].中国医药科学,2011,1(8):96.
- [2] 黄琳,张苑铃,任晓蕾,等.普罗帕酮与维拉帕米治疗阵发性室上性心动过速的系统评价[J].中国药房,2011,22(48):4572.
- [3] Choi DH, Li C, Choi JS. Effects of simvastatin on the pharmacokinetics of verapamil and its main metabolite, norverapamil, in rats[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2009, 34(3/4):163.
- [4] Hong SP, Chang KS, Koh YY, et al. Effects of lovastatin on the pharmacokinetics of verapamil and its active metabolite, norverapamil in rats: possible role of p-glycoprotein inhibition by lovastatin[J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(10):1447.
- [5] Xie SS, Hu N, Jing XY, et al. Effect of Huang-Lian-Jie-Du-Decoction on pharmacokinetics of verapamil in rats[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2010, 62(4):440.
- [6] 唐国凤.维拉帕米在大鼠体内的药代动力学[J].实用临床医药杂志,2010,14(24):44.
- [7] 张宏武,冯小龙,张彦玲,等.液相色谱串联质谱法测定人血浆中的维拉帕米[J].色谱,2007,25(1):113.

(收稿日期:2012-02-24 修回日期:2012-05-18)