

LC-MS/MS法测定人血浆及尿液中缬沙坦的浓度及其药动学研究

冯仕银*,雍小兰#,黄娟,杜晓琳,李楠,王蓝天(成都军区总医院临床药学科,成都 610083)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)05-0619-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.05.13

摘要 目的:建立测定人血浆及尿液中缬沙坦浓度的方法。方法:血浆样品经酸化后用乙醚提取浓度后进行分析;尿液样品直接稀释进样,均采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定,色谱柱为Aglient ZORBAX SB-C₁₈,流动相为0.1%甲酸-乙腈(梯度洗脱),流速0.2 ml/min。电喷雾离子源(ESI),正离子多反应监测模式测定,缬沙坦定量分析的离子对为 m/z 436.4→253.2,定性分析离子对为 m/z 436.4→291.3;内标氯沙坦定量分析的离子对为 m/z 423.4→207.1,定性分析离子对为 m/z 423.4→180.2。结果:血浆和尿液中缬沙坦的线性范围分别为4~5 000 ng/ml($r=0.9985$)、20~50 000 ng/ml($r=0.9988$);最低定量限分别为4、20 ng/ml;血浆萃取回收率为61.21%~70.30%;内标归一化基质效应因子的RSD分别为3.20%、11.21%;日内和日间RSD均≤8.34%。结论:所用方法快速、灵敏度高,适用于人血浆及尿液中缬沙坦的浓度测定及药动学研究。

关键词 液相色谱-串联质谱法;缬沙坦;血药浓度;尿液浓度;药动学

Determination of Valsartan in Human Plasma and Urine by LC-MS/MS and Its Pharmacokinetic Study

FENG Shiyin, YONG Xiaolan, HUANG Juan, DU Xiaolin, LI Nan, WANG Lantian (Dept. of Clinical Pharmacy, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for the determination of valsartan concentration in human plasma and urine. METHODS: Plasma sample were acidified and extracted with diethyl ether for analysis, and urine sample was diluted directly for analysis. The samples were all determined by LC-MS/MS, and the separation was performed on a Aglient ZORBAX SB-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% formic acid (gradient elution) at flow rate of 0.2 ml/min. Ion transition was determined ESI ion source under multiple ion reaction monitoring with quantitative pair m/z 436.4→253.2 and qualitative ion pair m/z 436.4→291.3 for valsartan, and quantitative pair m/z 423.4→207.1 and m/z 423.4→180.2 for internal standard losartan. RESULTS: The linear range of valsartan were 4-5 000 ng/ml in plasma and 20-50 000 ng/ml in urine; the limit of quantification were 4 ng/ml and 20 ng/ml; plasma extraction recovery of valsartan were 61.21%-70.30%. The variation coefficient of internal standard normalized matrix effect were 3.20% and 11.21%. The within-day and between-day RSDs were no more than 8.34%. CONCLUSIONS: The method is proved to be rapid and sensitive, and suitable for the determination of valsartan in human plasma and urine and pharmacokinetics study.

KEYWORDS LC-MS/MS; Valsartan; Plasma concentration; Urine concentration; Pharmacokinetics

缬沙坦(valsartan)系口服非肽类长效、低毒、特异性较高的血管紧张素Ⅱ类受体拮抗药,其选择性作用于AT₁受体,临床主要用于治疗高血压等心血管疾病。目前,国内有少量文献报道采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定缬沙坦的血药浓度,但未见测定其尿药浓度的相关报道。本研究参考文献方法,结合本实验室条件建立了一个快速、简便、灵敏,适合血浆和尿液样品中缬沙坦浓度的测定方法,并将其应用于缬沙坦人体内的药动学研究。

1 材料

1.1 仪器

API3200型液相色谱-三重四级杆质谱联用仪(美国AB公司);LC-20AD型液相色谱系统(日本Shimadzu公司);AB135-S型十万分之一电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);Turbo Vap LV型浓缩仪(美国Caliper公司)。

1.2 药品与试剂

* 硕士。研究方向:临床药理学。电话:028-86570439。E-mail: fengshiyin@163.com

通信作者:主任药师。研究方向:临床药理学。电话:028-86570439。E-mail: yongxlan@126.com

缬沙坦标准品(中国药品生物制品检定研究院,批号:100651-201203,纯度:99.8%);内标:氯沙坦钾标准品(中国药品生物制品检定研究院,批号:100597-200501);甲醇为色谱纯,二氯甲烷、乙醚为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

色谱柱:Aglient Zorbax SB-C₁₈(100 mm×2.1 mm,3.5 μm);流动相:A泵(0.1%甲酸)-B泵(乙腈)。线性梯度洗脱程序:0~0.01 min B泵60%;0.01~0.1 min B泵60%→95%;0.1~0.4 min B泵95%→98%;0.4~2.0 min B泵98%→98%;2.0~2.1 min B泵98%→60%;2.1~4.5 min B泵60%→0,停止。流速:0.2 ml/min;进样针润洗液:甲醇-水(50:50, V/V);进样量:15 μl;柱温:40℃。采用电喷雾离子源(ESI),正离子多反应监测模式(MRM)测定;离子源喷雾电压:5 500 V;干燥气温度:500℃;碰撞气压力:22 kPa;雾化气压力:18 kPa;用于定量分析的离子反应为 m/z 436.4→253.2(缬沙坦)、 m/z 423.4→207.1(氯沙坦钾);用于定性分析的离子反应为 m/z 463.4→291.3(缬沙坦)、 m/z 423.4→180.2(氯沙坦钾)。二级质谱图见图1。

2.2 溶液的配制

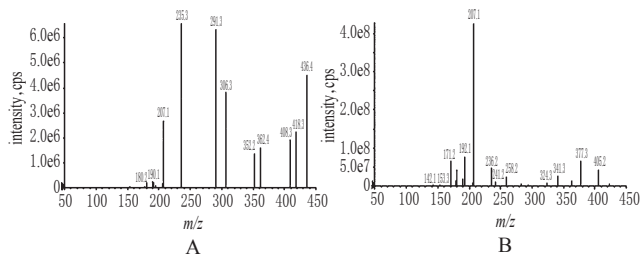


图1 二级质谱图

A.缬沙坦;B.内标氯沙坦钾

Fig 1 Secondary mass spectra

A.valsartan; B.internal standard losartan

准确称取缬沙坦标准品 20.01 mg, 置 25 ml 量瓶中, 先后用甲醇-纯水溶解后, 用 50% 乙腈定容, 摇匀, 即得缬沙坦贮备液 (800 μg/ml), 置于 -80 °C 冰箱避光保存。

内标氯沙坦钾用 50% 乙腈配制相当于 2 mg/ml 的贮备液, 临用时稀释成 200 ng/ml 的内标工作液。

2.3 血浆样品的预处理

取血浆样品 100 μl, 加入内标工作液 (200 ng/ml) 100 μl, 加入 0.1 mol/L 盐酸 100 μl 混匀, 加乙醚 3.5 ml, 涡旋混匀 5 min, 4 °C 低温以转速为 3 200 r/min 离心 10 min, 上层有机溶剂转至尖底玻璃试管, 45 °C 水浴, 氮气挥干, 乙腈-0.1% 甲酸水 (1:1, V/V) 200 μl 复溶, 以上清液进样 15 μl。

2.4 尿液样品的预处理

尿液样品 50 μl, 加入内标工作液 (2 μg/ml) 50 μl, 加乙腈-纯水 (1:1, V/V) 850 μl 充分混匀后, 4 °C 低温以转速为 12 000 r/min 离心 10 min, 以上层清液进样 15 μl。

2.5 方法学验证

2.5.1 专属性 (1) 血浆: 分别取 6 个不同来源的空白血浆、空白血浆+缬沙坦+内标、给药后 1 h 的血浆样品适量, 按“2.3”项方法操作后进样分析。缬沙坦和内标的保留时间分别为 2.47、1.76 min 左右, 两物质峰形良好, 血浆内源峰对测定无干扰, 见图 2A、B。(2) 尿液: 取空白尿液质量, 同空白血浆样品方法操作并进行测定。缬沙坦和内标的保留时间分别为 2.37、1.75 min 左右, 两物质峰形良好, 尿液内源峰对测定无干扰, 见图 2C、D。

2.5.2 标准曲线的制备及定量下限 (1) 血浆标准曲线: 取空白血浆 100 μl, 加不同量的标准品, 使其成质量浓度为 5 000、4 000、2 000、1 000、500、20、4 ng/ml 的系列标准血浆样品。按“2.3”项方法操作, 进样后记录色谱峰面积, 以缬沙坦与内标的峰面积比(y)对血浆浓度(x)进行加权线性回归得: $y=0.001 00x+0.001 71$ ($r=0.998 5$), 权重为 $1/x^2$, 缬沙坦血药浓度在 4~5 000 ng/ml 范围内线性关系良好。定量下限为 4 ng/ml。(2) 尿液标准曲线制备及定量下限: 取空白尿液 50 μl, 加不同量的标准品, 使其成质量浓度为 50 000、40 000、20 000、10 000、5 000、1 000、200、20 ng/ml 的系列标准尿液样品, 按“2.4”项方法操作, 进样后记录色谱峰面积, 以缬沙坦与内标的峰面积比(y)对血浆浓度(x)进行加权线性回归得: $y=0.000 07x+0.000 195$ ($r=0.998 8$), 权重为 $1/x^2$, 缬沙坦在 20~50 000 ng/ml 范围内线性关系良好。定量下限为 20 ng/ml。

2.5.3 精密度及方法回收率 (1) 血浆: 配制低、中、高质量浓度为 10、500、4 000 ng/ml 的标准品血浆样品, 按“2.3”项方法操作, 分别在同 1 天内连续测定 6 次和 1 周内测定 3 批样品,

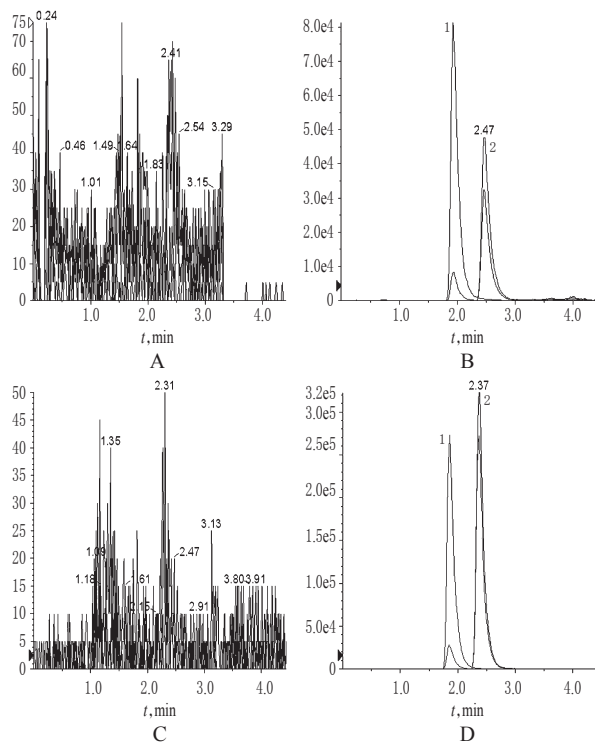


图2 高效液相色谱图

A.空白血浆;B.空白血浆+缬沙坦+内标;C.空白尿液;D.空白尿液+缬沙坦+内标;1.氯沙坦;2.缬沙坦

Fig 2 LC-MS/MS chromatograms of valsartan

A.blank plasma; B.blank plasma+valsartan+internal standard; C.blank urine sample; D.blank urine+valsartan+internal standard; 1.losartan; 2.valsartan

计算日内、日间 RSD, 日内 RSD < 8.2%, 日间 RSD < 7.2%, 具体见表 1。另取 50% 乙腈作基质分别配制低、中、高质量浓度为 10、500、4 000 ng/ml 的样品, 每浓度平行测定 6 份样品, 计算方法回收率在 85.6%~104.7% 之间, 符合生物样本测定的要求。(2) 尿液: 配制低、中、高质量浓度为 50、10 000、40 000 ng/ml 的标准品尿液样品, 按 2.5.3 项方法操作, 分别在同 1 天内连续测定 6 次和 1 周内测定 3 批样品, 计算日内、日间 RSD, 日内 RSD < 8.0%, 日间 RSD < 5.7%, 具体见表 1。另取 50% 乙腈作基质分别配制低、中、高质量浓度为 50、10 000、40 000 ng/ml 的样品, 每质量浓度平行测定 6 份样品, 计算方法回收率在 85.6%~117.9% 之间, 符合生物样本测定的要求。

2.5.4 萃取回收率及基质效应 (1) 用空白血浆按“2.3”项方法操作后得的挥干残渣作为空白基质, 空白基质中加入 200 μl 用乙腈-0.1% 甲酸水 (1:1, V/V) 复溶液配置的低、中、高质量浓度的缬沙坦工作液, 进样 15 μl 进行 LC-MS/MS 分析, 记录得到未萃取样品测定的峰面积作为分母。按“2.3”项方法操作制备相应萃取样品并测定其峰面积作为分子, 计算萃取回收率。选择 6 个不同来源的空白人血浆, 制备低浓度的缬沙坦血浆样品, 按“2.3”项下方法操作得到有基质的峰面积, 与相应质量浓度的对照品工作液直接进样得到无基质样品的峰面积, 计算内标归一化基质效应因子^[1]进行基质效应的评价, 具体结果见表 1。(2) 尿液样品直接稀释进样未做萃取回收率。选择 6 个不同来源的空白人尿液, 按“2.4”项下方法操作得到有基质的峰面积, 与相应质量浓度的对照品工作液直接进样得到无基质样品的峰面积, 计算内标归一化基质效应因子^[1]进行基质效应

表1 精密度、回收率及基质效应试验法($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Precision, recovery and matrix effect of valsartan($\bar{x} \pm s, n=6$)

样品	理论质量浓度, ng/ml	日内测得量, ng/ml	RSD, %	日间测得量, ng/ml	RSD, %	萃取回收率, %	方法回收率, %	内标归一化基质效应RSD, %
血浆	10	9.78 ± 0.80	8.21	9.48 ± 0.68	7.22	61.21 ± 3.28	90.43 ± 7.00	3.20
	500	499.19 ± 8.26	1.65	487.98 ± 14.14	2.90	62.51 ± 2.31	97.42 ± 1.56	
	4 000	4 202.02 ± 78.22	1.86	4 082.15 ± 115.90	2.84	70.30 ± 1.90	101.83 ± 1.00	
尿液	50	55.51 ± 4.47	8.05	50.96 ± 4.25	8.34		111.02 ± 8.95	11.21
	10 000	10 475.99 ± 76.26	0.73	10 386.60 ± 261.61	2.52		104.75 ± 0.77	
	40 000	36 172.51 ± 1 137.31	3.14	39 101.43 ± 2 257.29	5.76		90.45 ± 2.84	

的评价,结果见表1。

2.5.5 稳定性 (1)血浆:配制低、中、高质量浓度的血浆样品,考察在-80℃冰箱中保存15、49、71 d,反复冻融3次,在室温放置7 h,重复进样3次,萃取物放置(4℃冰箱)2、4、6 h,溶解后于进样室放置(10℃)3、6 h的稳定性良好(RSD < 9.0%)。(2)尿液:配制低、中、高质量浓度的尿液样品,考察在-80℃冰箱中保存15、63、78 d,反复冻融3次,在室温放置6 h,重复进样3次,溶解后于进样室放置(10℃)3、6 h的稳定性良好(RSD < 11.9%)。

2.6 药动学研究

将本文建立的LC-MS/MS法应用于缬沙坦胶囊的药动学研究。经解放军成都军区总医院伦理委员会批准,筛选健康志愿者16人,男女各半,年龄(23 ± 3)岁,体质量指数(20.6 ± 1.7)kg/m²。16名健康受试者口服缬沙坦胶囊160 mg于给药前(0 h)及给药后0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、12、16 h时取肘静脉血4 ml。采集所得血样分离血浆后置-80℃冰箱保存待测。按“2.3”项方法处理进样,所得质量浓度数据采用Phoenix WinNonlin 6.3程序按照非房室模型进行处理,主要药动学参数见表2,其平均药-时曲线见图3。

表2 16名受试者服用缬沙坦后的平均药动学参数($\bar{x} \pm s, n=16$)

Tab 2 Mean pharmacokinetic parameters of valsartan in 16 healthy volunteers after oral administration of valsartan($\bar{x} \pm s, n=16$)

药动学参数	数值
$c_{max}, \mu\text{g/ml}$	5.08 ± 3.32
$t_{1/2}, \text{h}$	5.95 ± 1.23
t_{max}, h	3.00 ± 1.35
$AUC_{0-24\text{h}}, \text{h} \cdot \mu\text{g/ml}$	3 704.26 ± 28.59
$AUC_{\infty}, \text{h} \cdot \mu\text{g/ml}$	40 041.69 ± 32.34

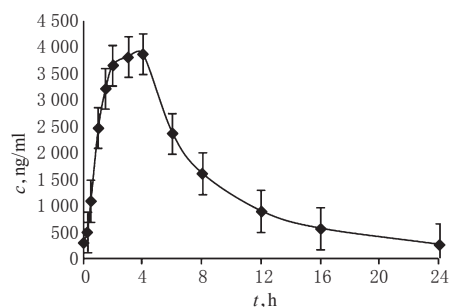


图3 16名受试者口服160 mg缬沙坦后的平均药-时曲线
Fig 3 The average plasma concentration-time curve of valsartan in 16 healthy volunteers after oral administration of valsartan 160 mg

同时收集16名健康受试者口服给药前(0 h)及给药后0~4、4~8、8~12、12~24 h的尿液,准确记录尿液体积,留取1.5 ml尿液2份,于-80℃保存。用本法测定缬沙坦的尿液浓度,累积排泄率-时间曲线见图4。

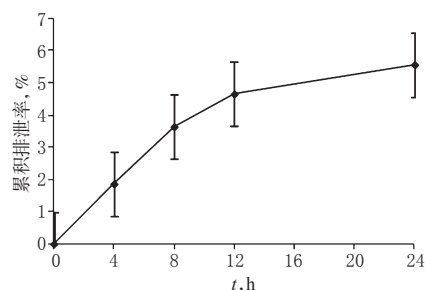


图4 16名受试者口服160 mg缬沙坦后的尿液累积排泄率-时间曲线

Fig 4 Accumulative urine excretion rate-time curve of valsartan in 16 healthy volunteers after oral administration of valsartan 160 mg

3 讨论

本研究采用LC-MS/MS法测定血浆及尿液中缬沙坦的质量浓度,稳定性好、通用性强,测定缬沙坦血浆样品的线性范围宽(4~5 000 ng/ml),定量下限为4 ng/ml,远低于李玲等^[2](24.2 ng/ml)和任小群等^[3](15 ng/ml)的研究结果,与王启平等^[4]的研究结果相同。血浆样品的预处理采用液-液萃取法,仅需100 μl血浆样品,与前述研究^[2-3](分别为200 μl和500 μl)比较,血浆用量更低,且萃取回收率稳定,基质效应影响小,但本法处理步骤较多容易出错。另外,本研究首次建立了尿液中缬沙坦浓度的测定方法,灵敏度高,基质效应影响小。

参考文献

- [1] 王鹏,蒋学华,王凌.LC-MS应用于生物样品检测中基质效应的评价[J].中国新药杂志,2011,20(20):1 953.
- [2] 李玲,谭志荣,陈尧,等.快速灵敏度的LC-MS/MS法测定人血浆中缬沙坦浓度[J].中国临床药理学与治疗学,2010,15(7):809.
- [3] 任小群,刘秀美,蒋学华,等.LC-MS/MS法测定人血浆中的缬沙坦及其人体生物等效性[J].华西药理学杂志,2014,29(3):295.
- [4] 王启平,陈省,李贞,等.高效液相色谱串联质谱法测定人血浆中缬沙坦的浓度[J].中国医院药学杂志,2010,30(20):1 759.

(收稿日期:2015-03-30 修回日期:2015-12-08)

(编辑:李 劲)