

LC-MS 法测定人血浆中赖诺普利样品前处理方法改进

黄艳¹, 吴月¹, 郭晓烽¹, 吴飞¹, 丁黎^{1,*}, 文爱东², 杨林²

¹中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009;

²第四军医大学西京医院国家药品临床研究基地 I 期临床试验研究室, 西安 710032

摘要 目的:改进人血浆中赖诺普利的 LC-MS 测定法。方法:通过对样品前处理方法的改进,减少样品对离子源的污染和血浆内源性物质对待测物色谱峰的干扰;通过对复溶样品所用溶液的 pH 值的调整,改善色谱峰形;通过提高色谱柱温度,提高传质速率,改善色谱峰形。色谱柱为 Sepax GP-C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 5 μm) 柱,流动相为 20 mmol·L⁻¹ 醋酸铵(含 0.1% 甲酸)-甲醇(75:25, v/v),内标为甲硝唑,检测仪器为 Agilent 1100 LC-MSD,离子源为 ESI,检测离子为 m/z 406.3(赖诺普利)、m/z 172.1(内标),裂解电压为 150 V。结果:赖诺普利与内标的峰形良好,色谱图中杂峰较少,在 2~300 ng·mL⁻¹ 浓度范围内赖诺普利与内标峰面积比值与浓度线性关系良好,最低定量限为 2 ng·mL⁻¹。本法提取回收率为 91.6%~96.4%,批内和批间的精密度均小于 15%。结论:该方法灵敏度高,无杂质干扰,分析速度快,可以应用于临床血药浓度的测定和药代动力学研究。

关键词 赖诺普利;LC-MS;药代动力学

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1673-7806(2008)02-104-04

Improved LC-MS method in pretreatment for the determination of lisinopril in human plasma and its application

HUANG Yan¹, WU Yue¹, GUO Xiao-feng¹, DING Li^{1,*}, WEN Ai-dong², YANG Lin²

¹Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

²Research Section for Phase I Clinical Trial, Base State for Drug Clinic Trial, Xijing Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract **Objective:** To develop a LC-MS method for the determination of lisinopril concentration in human plasma. **Methods:** After being deproteinated by methanol, plasma samples were separated by LC-MS on Sepax GP-C₁₈ column with mobile phase consisting of 20 mmol·L⁻¹ ammonium acetate (containing 0.1% formic acid) water solution - methanol (75:25, v/v) and metronidazole being used as the internal standard. The analytes were ionized in the electro spray ionization interface of the mass spectrometer and detected in the selected ion monitoring (SIM) mode using target ions at m/z 406.3 for lisinopril and m/z 172.1 for the internal standard. The fragmental voltage was 150 V. **Results:** The calibration curve was linear over the range of 2~300 ng·mL⁻¹ with 2 ng·mL⁻¹ of the limit of quantification for lisinopril in plasma. The intra-batch and inter-batch precision were less than 15% and accuracy ranged from 91.6% to 96.4%. **Conclusion:** The developed method is suitable for pharmacokinetic study of lisinopril in human plasma.

Keywords Lisinopril; LC-MS; Pharmacokinetics

赖诺普利 (lisinopril) 为新一代血管紧张素转换酶抑制剂,临床上用于降压,预防并延缓糖尿病患者肾功能损害的进展等^[1,2]。

目前,国内外文献中已报道的人血浆中赖诺普利测定方法,尚有一定局限:(1) 高效液相色谱荧光测定法^[3]。血浆样品经固相萃取和荧光试剂衍生化后进行荧光检测,该法血浆样品前处理过程较为繁琐,且灵敏度不高。(2) LC-MS 及 LC-MSⁿ 测定法^[4-8]。文献^[4]中血浆样品预处理采用固相萃取技术,成本较高且费时;采用 10%^[8] 或 20%^[5] 高氯酸直接沉淀法处理血浆样品,强酸环境下样品不稳定,不适合大量样品进行自动进样分析;血浆样品经甲醇直接沉淀^[6],并经甲醇再处理后进行 LC-MS 检测,最低定量限为 2.5 ng·mL⁻¹,但该方法采用了两次处理两次吹氮气的方法以纯化样品,操作繁琐,易增加实验误差;采用乙腈直接沉淀法处理血浆样品^[7],方法回收率较低。

本文在文献基础上,对血浆样本前处理方法进行改进,采用甲醇直接沉淀蛋白,再经氯仿处理脱去脂溶性干扰物后进行 LC-MS 分析;并对色谱条件进行优化(色谱柱、柱温、溶样溶液的筛选等),提高了柱效,改善了赖诺普利色谱峰峰形,预处理步骤简单,专属性高;方法灵敏,最低定量限达到 2 ng·mL⁻¹;可用于赖诺普利片在健康受试者体内的药代动力学研究。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 液相色谱-质谱联用仪(含:双高压泵、自动进样器、柱温箱、电喷雾离子化接口、四极杆质谱检测器),色谱工作站:Agilent Chemstation (A. 10. 02)。

受试制剂:赖诺普利片(AstraZeneca UK Limited,捷赐瑞TM);赖诺普利对照品(北京万全阳光医药科技有限公司提供,纯度为 98. 78%);甲硝唑对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号:100191-200305)。

甲醇为色谱纯;醋酸铵、甲酸为分析纯;试验用水为去离子水。

2 方法

2.1 对照品溶液的配制

精密称取赖诺普利对照品 10.0 mg,置 10 mL

量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 1.0 mg·mL⁻¹ 赖诺普利的储备液。使用时稀释至所需浓度。

精密称取甲硝唑对照品 10.0 mg,置 10 mL 量瓶中,加入甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 1.0 mg·mL⁻¹ 内标储备液。使用时用甲醇稀释至浓度为 2.0 μg·mL⁻¹ 的内标液。

2.2 色谱条件

流动相:20 mmol·L⁻¹ 醋酸铵水溶液(含 0.1% 甲酸)-甲醇(75:25, v/v);流速:0.25 mL·min⁻¹;色谱柱:Sepax GP-C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 5 μm);柱温:45 °C;进样量:3 μL。

2.3 质谱条件

离子检测方式:选择性离子检测(SIM);离子极性:正离子(positive);离子化方式:气动辅助电喷雾离子化;检测对象:赖诺普利为[M+H]⁺ m/z 406.3;内标(甲硝唑)为[M+H]⁺ m/z 172.1;传输区电压:150 V;干燥气流速:8 L·min⁻¹;雾化室压力:45 psig;干燥气温度:350 °C。

2.4 血浆样品处理

取血浆样品 1 mL,置 10 mL 离心管中,加入甲硝唑内标液 40 μL,涡旋混匀,加入甲醇 5 mL,涡旋 2 min,静置 30 min,于 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,吸取上清液 4.5 mL 转移至 10 mL 离心管中,于 45 °C 水浴以氮气流吹干。残渣以 20 mmol·L⁻¹ 醋酸铵水溶液(含 0.2% 甲酸) 150 μL 溶解,涡旋 2 min,加入氯仿 200 μL,涡旋 1 min,于 16 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,吸取上清液 120 μL 至已加入 40 μL 甲醇的自动进样器样品瓶中,混匀,吸取 3 μL 进行 LC-MS 分析。

2.5 药代动力学研究

12 名男性健康志愿者,年龄(33.3 ± 3.0) a,身高(170.6 ± 3.1) cm,体重(62.9 ± 2.4) kg,体重指数 21.6 ± 0.9,无烟酒嗜好。试验前经询问病史、体格检查和实验室检查未发现异常,实验方案经第四军医大学西京医院伦理委员会审议通过,受试者本人签署知情同意书。

受试者禁食过夜(至少 12 小时),次日清晨 7:30 空腹给药,250 mL 温开水送服,服药后 2 h 内不饮水,4 h 后进食,口服药物前抽取空白血样 4 mL,于服药后 1、2、4、5、6、7、8、10、12、15、24、36、48、60 h 各采集静脉血 4 mL。血浆置含有肝素的抗凝试管中,立即离心,分离血浆于 -20 °C 保存至测定。

3 结果

3.1 专属性考察

在上述 LC-MS 条件下,在 m/z 200 ~ 600 范围内扫描赖诺普利,形成的主要离子为 $[M + H]^+$ 峰

m/z 406.3;在 m/z 100 ~ 300 范围内扫描甲硝唑,形成的主要离子为 $[M + H]^+$ 峰 m/z 172.1。赖诺普利和内标出峰时间分别在 4.8 min 和 3.6 min 左右。赖诺普利和内标峰形良好,6 份不同来源的空白血浆内源性物质对测定均无干扰,见图 1。

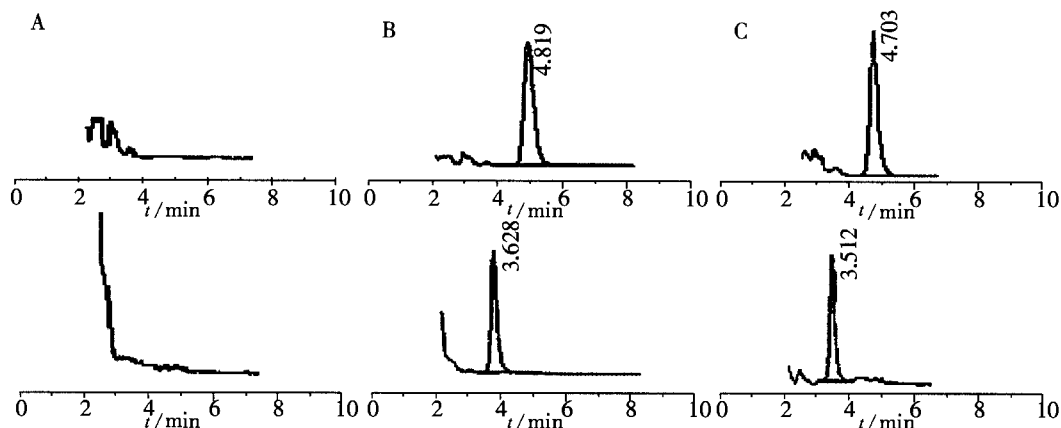


图 1 赖诺普利与内标甲硝唑色谱图。

(A) 空白血浆;(B) 空白血浆 + 赖诺普利 + 内标;(C) 志愿者服药后血浆样品 + 内标。

Fig. 1 LC-MS chromatograms of Blank plasma (A), Plasma spiked with lisinopril and metronidazole (B), Plasma sample after lisinopril administration (C).

3.2 标准曲线及最低定量限

取 10 mL 玻璃离心管数支,加入空白血浆 1 mL,分别精密加入不同浓度的赖诺普利标准液,配成含赖诺普利分别为 2、5、10、30、100、200、300 $ng \cdot mL^{-1}$ 的标准含药血浆,按“血浆样品的处理”项下操作并测定,计算赖诺普利峰面积 A_s 和内标峰面积 A_i 的比值。以平均比值 $f(f = A_s/A_i)$ 对血药浓度 C 作权重回归计算,得回归方程: $f = 0.006372 \times C + 0.0008863$, $r = 0.9997$,权重系数 $w = 1/C^2$ 。血浆中赖诺普利在 2 ~ 300 $ng \cdot mL^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好。本方法的最低定量浓度为 2 $ng \cdot mL^{-1}$ 。

3.3 精密度试验

配制赖诺普利浓度分别为 5、30、260 $ng \cdot mL^{-1}$ 的低、中、高浓度的标准含药血浆样品(每个浓度平行做 5 份),按“血浆样品处理”项下操作后测定。连续测定 3 批,低、中、高 3 种浓度的批内 RSD 分别为 6.2%、3.8%、2.6%,批间 RSD 分别为 7.0%、12.3%、13.5%。

3.4 提取回收率试验

制备浓度分别为 5、30、260 $ng \cdot mL^{-1}$ 的赖诺普利标准溶液 1 mL,每种浓度制备 2 份,45 $^{\circ}C$ 水浴中以氮气流吹干,残渣以 150 μL 的 20 $mmol \cdot L^{-1}$ 醋酸铵水溶液(含 0.2% 甲酸)溶解,取 120 μL 加入内标液

40 μL ,涡旋混匀,作为对照溶液;另制备浓度分别为 5、30、260 $ng \cdot mL^{-1}$ 的赖诺普利血浆样品 1 mL 各 5 份,分别加入甲醇 5 mL 于上述离心管中,涡旋 2 min,静置 30 min,于 4000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min,取上清液 4.5 mL 至另一 10 mL 离心管中,45 $^{\circ}C$ 水浴中以氮气流吹干,残渣以 150 μL 的 20 $mmol \cdot L^{-1}$ 醋酸铵水溶液(含 0.2% 甲酸)溶解,涡旋 2 min,再加入氯仿 200 μL ,涡旋 1 min,于 16000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 5 min,吸取上清液 120 μL 至自动进样器样品瓶中,加入内标液 40 μL ,涡旋混匀。吸取 3 μL 进行 LC-MS 分析。计算得低、中、高 3 种浓度的提取回收率分别为 (92.9 \pm 5.8)%、(91.6 \pm 2.6)%、(96.4 \pm 4.1)%。

3.5 准确度试验(相对回收率)

配制赖诺普利浓度分别为 5、30、260 $ng \cdot mL^{-1}$ 的低、中、高 3 种浓度的标准含药血浆,按“血浆样品的处理”项下操作测定,计算相对回收率。赖诺普利低、中、高 3 种浓度的相对回收率分别为 106.5%、100.3%、101.9%。

3.6 样本稳定性考察

制备含赖诺普利浓度分别为 5、30、260 $ng \cdot mL^{-1}$ 的标准含药血浆适量,每种浓度分取 12 份,每份 1 mL。在 3 份配制好后反复冻融 3 次;3 份于室温放置 13 h;3 份配制好后放入 -20 $^{\circ}C$ 冰箱中冷

冻保存 2 月后取出化冻的条件下,考察样品的稳定性,与即时处理的样品进行比较。结果表明,赖诺普利血浆样品在上述条件下稳定性均良好。

3.7 介质效应

取 5 份不同来源的空白血浆,分别按“血浆样品的处理”项下操作制备空白血浆上清液适量,备用。配制浓度为 $5, 30, 260 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准溶液 1 mL, 每种浓度各做 5 份,再加入内标液 $40 \mu\text{L}$, 涡旋混匀,以氮气流吹干。残渣以流动相溶解,进样分析,记录样品峰面积 A_x 。另配制浓度为 $5, 30, 260 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准溶液 1 mL 各 5 份,再加入内标液 $40 \mu\text{L}$, 涡旋混匀,以氮气流吹干。残渣以空白血浆上清液复溶,进样分析,记录样品峰面积 A_s 。计算 A_x 和 A_s 的比值 f 。低、中、高 3 种浓度赖诺普利的介质效应分别为 107.4%、100.6% 和 102.5%。数据表明,本实验条件下血浆基质对离子化没有影响。

3.8 药动学研究

12 名受试者口服受试制剂 20 mg 后,平均血药浓度-时间曲线见图 2。

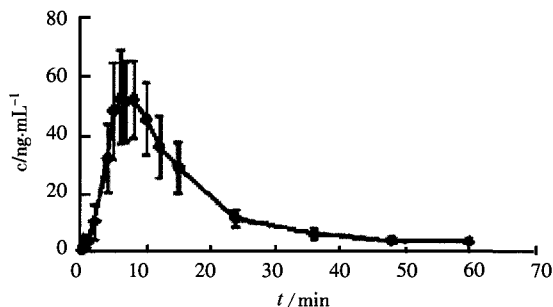


图 2 12 名健康受试者口服赖诺普利受试制剂 20 mg 后的平均血药浓度-时间曲线。

Fig. 2 Plasma concentration - time profile of lisinopril observed after oral administration of 20 mg lisinopril to 12 healthy volunteers ($\bar{x} \pm s, n = 12$).

采用 DAS 2.0 软件计算主要药代动力学参数。结果如下: $t_{1/2}$ 为 $(13.4 \pm 2.8) \text{ h}$, t_{max} 为 $(7.0 \pm 0.9) \text{ h}$; C_{max} 为 $(54.53 \pm 15.2) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $AUC_{(0-60)}$ 为 $(860.2 \pm 230.7) \text{ ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, $AUC_{(0-\infty)}$ 为 $(896.5 \pm 233.9) \text{ ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

4 讨论

4.1

应用 LC-MS 法测定血浆中药物浓度,血浆样品的预处理非常重要。选择甲醇直接沉淀蛋白的方法,虽然可以将蛋白沉淀除去,但血浆中的脂溶性干扰物依然存在,对离子源污染较严重,同时也影响检测灵敏度;赖诺普利系强极性的弱碱性物

质,本实验将样品残渣以 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵水溶液(含 0.2% 甲酸)溶解后,再以弱极性有机溶剂氯仿处理,脱去其中极性较赖诺普利弱的内源性脂质干扰物质,取一定体积的上清液(水层),再加入甲醇,使其甲醇的比例与流动相一致,混匀,进样分析。结果,与未经氯仿处理的样品溶液相比,处理后样品溶液外观更干净、透明;内源性物质对赖诺普利的测定无干扰,对离子源的污染降低。

4.2 文献^[5]报道,在流动相中加入三乙胺,可以改善色谱峰拖尾;但长期实践证明,在 LC-MS 中三乙胺对离子有淬灭作用,应避免使用。选择 2.1 mm 的细径柱较 4.6 mm 内径的常规柱相比^[3, 4, 8],不仅提高了柱效,同时也减少了对离子源的污染,节约了实验成本。采用 $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 柱温,使得待测物的传质速率提高,在提高柱效的同时也解决了色谱峰的拖尾问题。血样提取、吹干后的残渣一般用流动相复溶后进样分析,而在溶解血样残渣的溶液中添加 0.2% 甲酸,通过调节样品溶液的 pH 值来抑制赖诺普利羧酸基团的电离,使峰形尖锐。

4.3 本实验建立的 LC-MS 法可以用于人血浆中赖诺普利的定量测定。本实验测定的受试制剂的药动学参数与文献^[7]中的研究结果相近。

参考文献

- [1] 吴素芳,杨少辉,于晓静. 血管紧张素转化酶抑制剂的应用与评价[J]. 中国医刊, 2007, 42(1): 65-67.
- [2] 丁逸梅,杜云. RP-HPLC 法控制复方赖诺普利片质量方法研究[J]. 江苏药学与临床研究, 2004, 12(4): 9-11.
- [3] Sagirlı O, Ersoy L. An HPLC method for the determination of lisinopril in human plasma and urine with fluorescence detection[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004, 809(1): 159-165.
- [4] 黄荻,丁莉坤,丁黎,等. LC-MS 法定人血浆中赖诺普利及其在药代动力学中的应用[J]. 中国药科大学学报, 2006, 37(5): 428-431.
- [5] 张毕奎,陈本美,原海燕,等. 人血浆中赖诺普利的液相色谱-质谱法测定及生物等效性研究[J]. 中国新药与临床杂志, 2007, 26(6): 436-439.
- [6] 张红,梁超,程晓华,等. 国产赖诺普利片人体生物等效性研究[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(22): 1972-1974.
- [7] 张怡,李中东,刘罡一,等. 赖诺普利片的人体药代动力学和相对生物利用度[J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38(6): 435-438.
- [8] 覃韦韦,田媛,张尊建,等. 赖诺普利片在健康志愿者体内的生物等效性评价[J]. 中国新药与临床杂志, 2006, 25(12): 885-889.

(收稿日期: 2007-12-28)