

左旋氨氯地平片在 Beagle 犬体内的药动学研究

李晓波¹, 张首亚¹, 袁 征¹, 徐 勤^{2*}

1. 广州中医药大学科技产业园 GLP 中心 (国家中医药管理局二级实验室), 广东 广州 510445

2. 广州中医药大学, 广东 广州 510006

摘要: **目的** 建立一种快速、灵敏测定 Beagle 犬血浆中左旋氨氯地平浓度的高效液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 法, 研究左旋氨氯地平片在 Beagle 犬体内的药动学。 **方法** 色谱条件采用 Phenomenex Synergi Hydro-RP C₁₈ 色谱柱 (30 mm×2 mm, 4 μm); 流动相: 0.1%甲酸水-0.1%甲酸甲醇, 梯度洗脱; 体积流量: 0.6 mL/min; 柱温: 室温; 进样量: 20 μL。质谱条件电喷雾离子源 (ESI); 多级反应监测 (MRM); 正离子模式; 喷雾气温度 (TEM): 400 °C; 雾化气 (GS1): 344.95 kPa; 加热辅助气 (GS2): 413.7 kPa; 气帘气 (CUR): 206.85 kPa; 碰撞气 (CAD): 68.95 kPa; 离子喷雾电压 (IS): 5 500 V; 扫描时间: 200 ms; 用于定量分析的 MRM 离子对分别为左旋氨氯地平 m/z 409.0→238.1, 内标硝苯地平 m/z 347.0→315.2、347.0→271.3。6 只 Beagle 犬灌服 6.8 mg/kg 苯磺酸左旋氨氯地平片后, 以硝苯地平为内标, 血浆样品经醋酸乙酯萃取。绘制左旋氨氯地平的药-时曲线, 计算主要药动学参数。 **结果** 左旋氨氯地平在 0.05~20.00 ng/mL 线性关系良好, 定量下限为 0.05 ng/mL。批内、批间精密性 RSD 值均小于 10%, 平均提取回收率为 89.3%~93.6%, 基质效应为 99.9%~102.7%。主要药动学参数 C_{max} = (6.47±0.72) μg/L, t_{max} = (2.3±0.5) h, $t_{1/2}$ = (11.0±4.6) h, MRT = (15.6±6.8) h, AUC_{0-4} = (68.81±19.29) h·μg/L, $AUC_{0-∞}$ = (71.58±20.35) h·μg/L。 **结论** 本法特异、灵敏、准确、可靠, 可用于 Beagle 犬血浆中左旋氨氯地平的药物浓度测定及左旋氨氯地平片药动力学研究。

关键词: 左旋氨氯地平片; 左旋氨氯地平; 高效液相色谱-串联质谱法; 药动学; Beagle 犬

中图分类号: R969.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2016)02-0138-05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2016.02.002

Pharmacokinetics of Levamlodipin Tablets in Beagle dogs *in vivo*

LI Xiao-bo¹, ZHANG Shou-ya¹, YUAN Zhen¹, XU Qin²

1. Center of GLP (Level 2 Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine), Sci-tech Industrial Park, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510445, China

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To A rapid and sensitive LC-MS/MS method for determination of levoamlodipine in Beagle dog plasma, and study the pharmacokinetics of Levamlodipin Tablets in Beagle dogs. **Methods** The analysis was separated on a Phenomenex Synergi Hydro-RP C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), and mobile phase was 0.1% formic acid water - 0.1% formic acid methanol by gradient elution at a flow rate of 0.6 mL/min. The column temperature was at 40 °C, and the injection volume was 20 μL. MS detection was performed with multiple reaction monitoring (MRM) mode using positive electrospray ionization (ESI). TEM was 400 °C, and GS1, GS2, CUR, and CAD were 344.95, 413.7, 206.85, and 68.95 kPa, respectively. IS was 5 500 V, and scanning time was 200 ms. The ion pairs of m/z 409.0→238.1 and m/z 347.0→315.2 and 347.0→271.3 were used to qualify levamlodipin and internal standard nifedipine. Six Beagle dogs were ig administered with Levamlodipin Tablets 6.8 mg/kg, and nifedipine was used as the internal standard, and the plasma samples were pretreated by ethyl acetate extraction. Mean plasma concentration-time curves of levoamlodipine in Beagle dogs were obtained, and main pharmacokinetic parameters were calculated. **Results** Levamlodipin has a

收稿日期: 2015-10-15

基金项目: 广东省科技计划项目 (2015A040404042); 广东省产学研专项资金企业创新平台项目 (2013B090800013); 广东省协同创新与平台环境建设项目 (2014B40404066)

作者简介: 李晓波 (1986—), 女, 硕士, 主管中药师, 研究方向为药动学及毒理学。E-mail: 383295854@qq.com

*通信作者 徐 勤 (1963—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为药物安全性评价及毒性病理。E-mail: xubin@163.com

good linear relation between 0.05 — 20.0 ng/mL, and the LLOQ was 0.05 ng/mL. RSD values of intra-assay and inter-assay were both less than 10%. The extraction recovery was 89.3% — 93.6%. The matrix effect was 99.9% — 102.7%. The main pharmacokinetic parameters were $C_{\max}=(6.47 \pm 0.72)\mu\text{g/L}$, $t_{\max}=(2.3 \pm 0.5)\text{h}$, $t_{1/2}=(11.0 \pm 4.6)\text{h}$, $\text{MRT}=(15.6 \pm 6.8)\text{h}$, $\text{AUC}_{0-t}=(68.81 \pm 19.29)\text{h}\cdot\mu\text{g/L}$, $\text{AUC}_{0-\infty}=(71.58 \pm 20.35)\text{h}\cdot\mu\text{g/L}$. **Conclusion** The developed method is specific, sensitive, accuracy and reliable, and it is suitable for determination of levamlodipin in plasma and pharmacokinetic studies of Levamlodipin Tablets in Beagle dogs.

Key words: Levamlodipin Tablets; levamlodipin; LC-MS/MS; pharmacokinetic; Beagle dog

左旋氨氯地平是新一代长效二氢吡啶类钙通道阻滞剂,在临床上用于治疗高血压、心绞痛以及纠正心肌肥厚、心力衰竭等病理状态^[1-2]。氨氯地平有左旋和右旋两种对映体,左旋氨氯地平的药效作用是1:1外消旋体的2倍,是右旋氨氯地平的1000倍,右旋氨氯地平几乎无降压作用,且能引发不良反应^[3-4]。因此,左旋氨氯地平安全性和耐受性更高,且具有起效时间长、药效持久长、谷峰比值高等特征^[5]。本实验建立LC-MS/MS法测定Beagle犬血浆中左旋氨氯地平,较之文献报道^[6-10]的HPLC法、LC-MS/MS法、UPLC-MS/MS法血浆用量更少(0.1 mL)、灵敏度更高(最低定量下限为0.5 ng/mL),为左旋氨氯地平的药动学研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验药物

苯磺酸左旋氨氯地平片由施慧达药业集团(吉林)有限公司生产,以左旋氨氯地平计2.5 mg/片,批号130915-2。苯磺酸左旋氨氯地平对照品由中国食品药品检定研究院提供,批号100548-201103。硝苯地平对照品由中国食品药品检定研究院提供,批号100338-201103。

1.2 动物

普通级Beagle犬6只,雌雄各半,体质量10~12 kg,购自高要市康达实验动物科技有限公司,实验动物使用许可证号SCXK(粤)2014-0009,动物合格证号为44004200000116。

1.3 试剂

甲醇,色谱纯,德国默克制药公司。甲酸,色谱纯,德国CNW科技公司。超纯水,美国Millipore公司。其余试剂均为分析纯。

1.4 仪器

API4000 液相色谱/三重四极杆串联质谱联用仪,配置Shimadzu LC-20AD液相色谱仪,美国AB SCIEX公司。CPA225D电子精密天平,德国Sartorius集团。5810R台式高速大容量离心机,德国Eppendorf公司。G5402-90002封板机,美国

Agilent公司。MTS2/4DS25摇板机,德国IKA公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Phenomenex Synergi Hydro-RP C₁₈色谱柱(30 mm×2 mm, 4 μm);流动相:0.1%甲酸水(A)-0.1%甲酸甲醇(B),梯度洗脱(0.01~0.8 min, 55% A; 0.8~2 min, 55% A→10% A; 2.01~3 min, 10% A→55% A);体积流量:0.6 mL/min;柱温:室温;进样量:20 μL。

2.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI);多级反应监测(MRM);正离子模式;喷雾气温度(TEM):400℃;雾化气(GS1):344.95 kPa;加热辅助气(GS2):413.7 kPa;气帘气(CUR):206.85 kPa;碰撞气(CAD):68.95 kPa;离子喷雾电压(IS):5 500 V;扫描时间:200 ms;用于定量分析的MRM离子对分别为左旋氨氯地平 m/z 409.0→238.1,内标硝苯地平 m/z 347.0→315.2、347.0→271.3。

2.3 储备液的配制

分别精密称取1 mg左旋氨氯地平、内标硝苯地平于10 mL量瓶中,加入少量DMSO将药物溶解完全,加甲醇至刻度,分别得到1 mg/mL左旋氨氯地平对照品储备液和1 mg/mL硝苯地平对照品储备液。贮存于4℃冰箱中备用。

2.4 血浆样品的采集

6只Beagle犬,实验前禁食不禁水12 h以上,按与苯磺酸氨氯地平人临床剂量(5 mg)的犬等效剂量(6.8 mg/kg)ig给药,给药容积为20 mL。分别于给药前及给药后1、2、3、4、6、8、12、24、36、48、72、96 h从Beagle犬前肢胫前静脉取血约2 mL,肝素抗凝,3 000 r/min离心10 min,分离血浆,冷冻保存于-80℃冰箱中。

2.5 血浆样品的处理

取100 μL血浆样品,分别加入50 ng/mL内标硝苯地平溶液20 μL、0.1 mol/L氢氧化钠20 μL、醋

酸乙酯 600 μL , 600 r/min 振荡 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 10 min, 置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 15 min。取 450 μL 上清液于 40 $^{\circ}\text{C}$ 氮气流下吹干, 残渣用 120 μL 甲醇-水 (6:4) 复溶, 涡流混匀后即得。

2.6 质控 (QC) 样品的配制

将左旋氨氯地平对照品储备液用甲醇-水 (1:1) 稀释, 得到 3、20、160、320 ng/mL 左旋氨氯地平对照品溶液。取空白血浆 1 mL, 分别加入 50 μL 上述对照品溶液, 得到 3、20、160、320 ng/mL 含药血浆。分别取 100 μL 含药血浆, 按血浆样品的处理项下方法操作, 得到血浆浓度分别为 0.15、1.00、

8.00、16.00 ng/mL 的 QC 样品。

2.7 方法学验证试验

2.7.1 特异性试验 分别取空白血浆、空白血浆加入 50 ng/mL 内标硝苯地平溶液、空白血浆加入 0.15 ng/mL 左旋氨氯地平和 50 ng/mL 内标硝苯地平、给药 3 h 后的血浆样品加 50 ng/mL 内标硝苯地平, 按血浆样品的处理项下方法操作, 依法进行测定。在本实验条件下, 左旋氨氯地平、内标硝苯地平的保留时间分别为 1.69、2.63 min, 峰形良好, 血浆内源性物质均不干扰左旋氨氯地平和内标硝苯地平的测定, 可以满足血浆样品的快速分析, 见图 1。

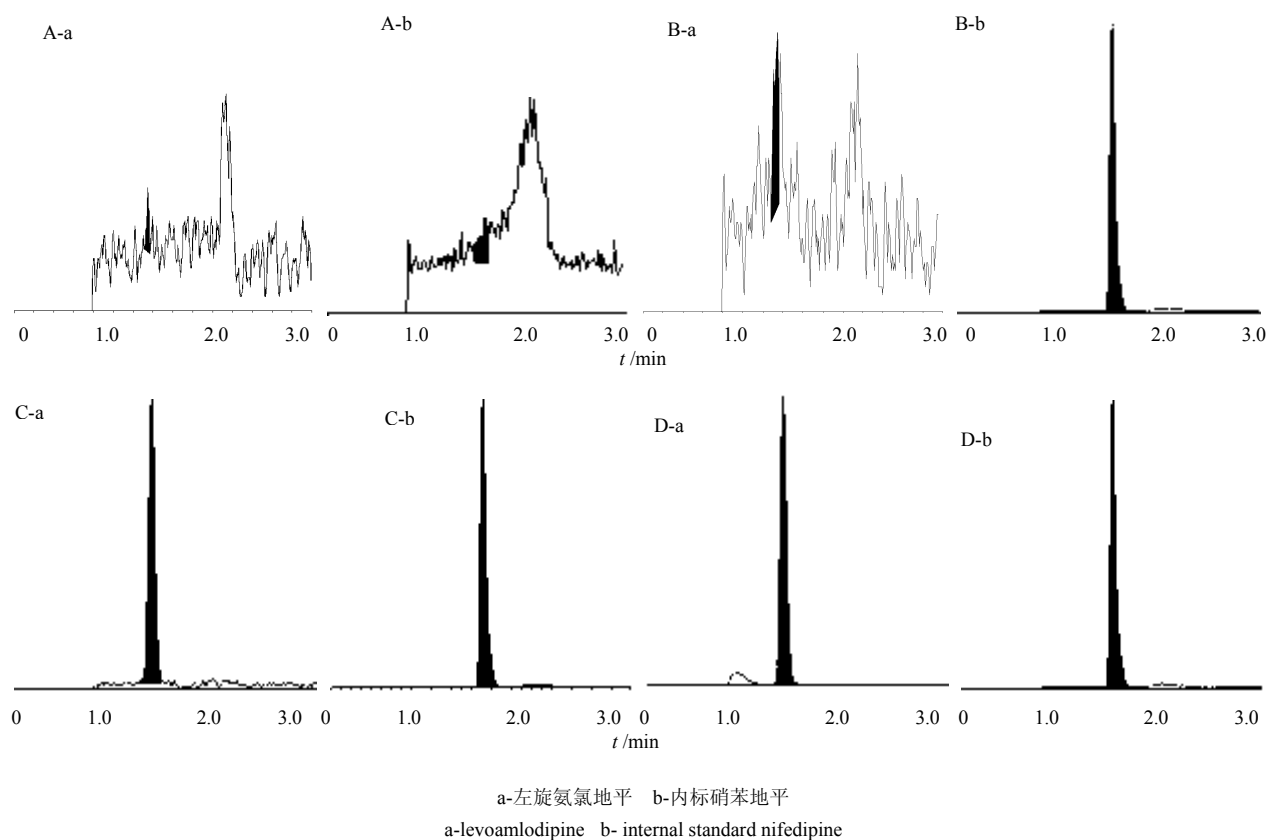


图 1 空白血浆 (A)、空白血浆+内标 (B)、空白血浆+左旋氨氯地平+内标 (C) 和给药 3 h 后的血浆样品 (D) 的 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of blank plasma (A), blank plasma sample spiked with internal standard (B), blank plasma sample spiked with levoamlodipine and internal standard (C), and sample administered with levoamlodipine after 3 h (D)

2.7.2 标准曲线与定量限的确定 取 1 mg/mL 左旋氨氯地平对照品储备液适量, 用流动相制成系列浓度的溶液。取空白血浆 100 μL , 加入 20 μL 左旋氨氯地平对照品溶液, 按血浆样品的处理项下方法操作, 配制得到含左旋氨氯地平 20、10、3、1、0.5、

0.2、0.1、0.05 ng/mL 血浆样品, 依法进样测定。以左旋氨氯地平与内标物的峰面积比值为纵坐标, 左旋氨氯地平与内标物的质量浓度比值为横坐标, 用加权最小二乘法进行回归, 即得到左旋氨氯地平的的标准曲线和回归方程。每个分析批建立 1 条标准曲

线, 每一个质量浓度进行双样本分析。典型回归方程为 $Y=0.059\ 2\ X+0.000\ 703$ ($r=0.996\ 2$)。结果表明左旋氨氯地平在 $0.05\sim 20.00\ \text{ng/mL}$ 线性关系良好。定量下限 ($S/N>10$) 为 $0.05\ \text{ng/mL}$ 。

2.7.3 精密度和准确度试验 取血浆浓度分别为 0.15 、 1.00 、 8.00 、 $16.00\ \text{ng/mL}$ 的 QC 样品, $1\ \text{d}$ 内测定, 每个质量浓度分析 6 个样本, 计算批内精密度和准确度。连续 $3\ \text{d}$ 测定, 每一个质量浓度每天分析 6 个样本, 计算批间精密度和准确度, 见表 1。

表 1 精密度与准确度结果

Table 1 Results of accuracy and precision

质量浓度/ ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	准确度试验		精密度试验	
	批内 RE/%	批间 RE/%	批内 RSD/%	批间 RSD/%
0.15	2.7	5.0	4.4	7.1
1.00	4.8	1.3	3.6	5.7
8.00	5.1	4.2	7.7	6.3
16.00	8.9	3.9	3.1	7.7

2.7.4 提取回收率试验 取血浆浓度分别为 0.15 、 1.00 、 $16.00\ \text{ng/mL}$ 的 QC 样品, 每一个浓度进行 3 个样本分析。取空白血浆 $100\ \mu\text{L}$, 按血浆样品的处理项下方法操作, 不加内标溶液, 最后用 $100\ \mu\text{L}$ 甲醇水复溶即空白血浆提取样品, 加入 $20\ \mu\text{L}$ 左旋氨氯地平对照品溶液和 $20\ \mu\text{L}$ 内标溶液, 涡旋混匀后取 $450\ \mu\text{L}$ 于 $40\ ^\circ\text{C}$ 氮气流下吹干, 残渣以 $120\ \mu\text{L}$ 溶解相复溶, 涡旋混匀, 得到 0.15 、 1.00 、 $16.00\ \text{ng/mL}$ 未经提取的 QC 样品, 表示 100% 的回收率。以每一个浓度两种处理方法的测得的左旋氨氯地平峰面积和内标峰面积比值计算百分比, 作为左旋氨氯地平的提取回收率。结果 0.15 、 1.00 、 $16.00\ \text{ng/mL}$ 的 QC 样品中左旋氨氯地平的提取回收率分别为 89.3% 、 90.2% 、 93.6% , RSD 值分别为 3.9% 、 4.8% 、 3.6% ($n=3$)。

2.7.5 基质效应 取空白血浆 $100\ \mu\text{L}$ (来自 6 个不

同个体), 按血浆样品的处理项下方法操作, 取全部上清液加入 $20\ \mu\text{L}$ 左旋氨氯地平对照品溶液和 $20\ \mu\text{L}$ 内标溶液, 涡流混匀后取 $450\ \mu\text{L}$ 于 $40\ ^\circ\text{C}$ 氮气流下吹干, 残渣用 $120\ \mu\text{L}$ 溶解相复溶, 涡旋混匀, 得到 0.15 、 $16.00\ \text{ng/mL}$ 的 QC 样品, 每一个浓度进行 3 个样本分析。另取蒸馏水 $100\ \mu\text{L}$ 代替空白血浆, 同上述处理方法, 每一个浓度进行 3 个样本分析。通过计算基质存在下的峰面积, 与基质不存在下的峰面积比值, 分别计算左旋氨氯地平 and 内标的基质因子。结果左旋氨氯地平 0.15 、 $16.00\ \text{ng/mL}$ 的 QC 样品的基质效应分别为 99.9% 、 102.7% , RSD 值分别为 2.9% 、 0.03% , 结果表明本方法测定左旋氨氯地平不受基质效应干扰。

2.7.6 稳定性试验 配制浓度分别为 0.15 、 $16.00\ \text{ng/mL}$ 的含药血浆样品, 在所评价的条件下储存后, 继续处理得到血浆浓度分别为 0.15 、 $16.00\ \text{ng/mL}$ 的 QC 样品, 每一个浓度进行 3 个样本分析, 以每一个浓度的测定值与加入值的比值计算百分比。含药血浆样品在室温放置 $6\ \text{h}$ 后测定, 考察样品室温放置稳定性; 含药血浆样品在 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱储存和冷冻, 取出置于室温完全融化后在同样条件下重新冷冻。第 1 次循环间隔时间应大于 $24\ \text{h}$, 后续的循环间隔时间大于 $12\ \text{h}$, QC 样品在经历 3 个冷冻 - 解冻循环后测定, 考察样品冷冻 - 解冻循环稳定性; 含药血浆样品储存于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱 $22\ \text{d}$ 后测定, 考察样品冷冻保存长期稳定性。含药血浆样品处理后得到的 QC 样品在室温放置 $24\ \text{h}$ 后测定, 考察处理后样品的室温放置稳定性。结果见表 2, 结果表明在上述考察的条件下, 左旋氨氯地平能保持稳定。

2.8 药动学参数计算

6 只 Beagle 犬 ig $6.8\ \text{mg/kg}$ 苯磺酸左旋氨氯地平片后, 不同时间采集血浆样品并进行处理, 由回归方程测定左旋氨氯地平血药浓度, 绘制左旋氨氯地平的药 - 时曲线, 见图 2。

表 2 不同条件下左旋氨氯地平在 Beagle 犬血浆中的稳定性试验 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 2 Stability of levamlodipin in plasma of Beagle dogs at various conditions ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

加入质量浓 度/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	室温放置 6 h		3 次冻融		$-80\ ^\circ\text{C}$ 冰冻 22 d		处理后放置 24 h	
	测得质量浓 度/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD/%	测得质量浓 度/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD/%	测得质量浓 度/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD/%	测得质量浓 度/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD/%
0.15	0.16 ± 0.01	6.2	0.15 ± 0.00	0.0	0.16 ± 0.01	6.2	0.14 ± 0.01	7.1
16.00	15.17 ± 0.67	4.4	14.23 ± 2.03	14.3	14.83 ± 0.31	2.1	15.13 ± 0.50	3.3

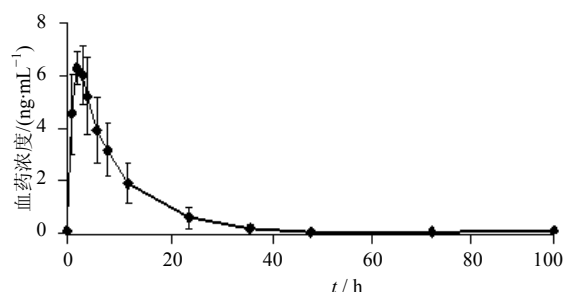


图2 苯磺酸左旋氨氯地平在 Beagle 犬体内的平均血药浓度-时间曲线 ($n=6$)

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curve of levoamlodipine in Beagle dogs ($n=6$)

将数据用 Kinetica 4.4.1 药动学软件按非房室模型处理, 计算得到主要药动学参数 $C_{\max} = (6.47 \pm 0.72) \mu\text{g/L}$, $t_{\max} = (2.3 \pm 0.5) \text{ h}$, $t_{1/2} = (11.0 \pm 4.6) \text{ h}$, $\text{MRT} = (15.6 \pm 6.8) \text{ h}$, $\text{AUC}_{0-t} = (68.81 \pm 19.29) \text{ h} \cdot \mu\text{g/L}$, $\text{AUC}_{0-\infty} = (71.58 \pm 20.35) \text{ h} \cdot \mu\text{g/L}$ 。结果显示, Beagle 犬服用苯磺酸左旋氨氯地平片后, 吸收较快, 3 h 内可以达到峰值, 消除较慢, 半衰期为 11 h 左右。

3 讨论

本实验建立了测定 Beagle 犬血浆中左旋氨氯地平的 LC-MS/MS 法。在方法优化过程中, 最初选用尼莫地平作为内标, 发现左旋氨氯地平与尼莫地平的保留时间相差 3 min, 后尝试硝苯地平作为内标, 发现保留时间可缩短 1 min 内, 更有效地监测左旋氨氯地平的测定。考察提取条件时, 通过考察加入不同有机溶剂 (甲醇、乙腈) 进行蛋白沉淀、加入不同有机萃取剂 (乙醚、醋酸乙酯) 及不同 pH 值调节剂 (氨水、氢氧化钠), 发现加入 0.1 mol/L 氢氧化钠 (20 μL) 和醋酸乙酯 (600 μL), 左旋氨氯地平提取率高且稳定, 可有效去除样品中内源性物质干扰, 降低基质效应, 并且此液液萃取的

提取方式成本较低, 操作简单, 可满足大批量样品的分析测定。与文献报道的其他方法^[6-10]相比, 本方法特异、灵敏、准确、可靠, 特别是血浆用量少 (0.1 mL) 及灵敏度高 (0.5 ng/mL), 可更好地用于左旋氨氯地平的药浓度测定和药动力学研究。

参考文献

- [1] 黄仲义. 左旋氨氯地平治疗心血管相关疾病的研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志, 2008, 27(3): 236-238.
- [2] 赵兴东, 王 蓉. 苯磺酸左旋氨氯地平治疗 62 例高血压患者的临床疗效 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(6): 660-663.
- [3] Aroowsmith J E, Campbell S F, Cross P E, *et al.* Long-acting dihydropyridine calcium antagonists. 1. 2-Alkoxyethyl derivatives incorporating basic substituents [J]. *J Med Chem*, 1986, 29(9): 1696-1702.
- [4] 程艳玲, 仇士东. 左旋氨氯地平的临床药理及临床应用 [J]. 齐鲁药事, 2006, 25(10): 612-614.
- [5] 侯丽萍, 赵红玲, 英俊岐. 苯磺酸左旋氨氯地平的临床应用进展 [J]. 医学综述, 2011, 17(20): 3129-3131.
- [6] 陈丽佳, 吴伟明. 反相高效液相色谱法测定人血浆苯磺酸左旋氨氯地平浓度 [J]. 医药导报, 2006, 25(12): 1256-1259.
- [7] 邢翔飞, 朱景中, 金桂兰, 等. 左旋氨氯地平的 RP-HPLC 法分析及其在家兔体内药代动力学研究 [J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2002, 31(6): 623-625.
- [8] 刘 茜, 李 力, 杨 伦, 等. 液质联用法测定左旋氨氯地平的药浓度及其片剂的相对生物利用度研究 [J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(10): 774-777.
- [9] 房 晶, 范国荣, 李 雯, 等. 苯磺酸左旋氨氯地平血药浓度的 LC-MS/MS 法测定及其体内手性转化可能性考察 [J]. 第二军医大学学报, 2012, 33(7): 763-769.
- [10] 闫 旭, 贾 英, 刘 然, 等. UPLC-MS/MS 法研究苯磺酸左旋氨氯地平片的药动力学和生物等效性 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(13): 1566-1570.