HPLC-MS/MS法测定大鼠血浆中盐酸维拉帕米的血药浓度及其药动学研究

贾　琪[1]，马文娟[1]，姚广哲[1]，欧阳慧子[2]，常艳旭[1]，何　俊[1, 2*]

1. 天津中医药大学，天津市现代中药重点实验室，天津　301617

2. 天津中医药大学第一附属医院，天津　300193

摘　要：目的 建立HPLC-MS/MS法以测定大鼠血浆中盐酸维拉帕米的血药浓度，并考察其药动学特征。**方法** 采用ZORBAX Eclipse Plus C_{18}色谱柱（100 mm×2.1 mm，3.5 μm），流动相为A相0.1%甲酸水，B相乙腈，梯度洗脱；体积流量为0.3 mL/min，柱温为30 ℃，进样量为5 μL。离子源为电喷雾离子源（ESI），以多反应离子监测（MRM）进行正离子检测。盐酸维拉帕米监测离子对为*m*/*z* 455.3→*m*/*z* 165.0，内标地西泮监测离子对为*m*/*z* 285.0→*m*/*z* 154.1。6只SD大鼠在ig盐酸维拉帕米33.33 mg/kg后，对其进行药动学的研究。**结果** 盐酸维拉帕米在5～2 000 ng/mL显示线性关系良好；日内日间精密度（RSD）为1.3%～2.0%，准确度（RE）范围为0.1%～18.0%；提取回收率是90.87%～92.42%，基质效应为82.82%～101.99%。盐酸维拉帕米在大鼠体内主要药动学参数C_{max}、t_{max}、$t_{1/2}$、Ke、AUC $_{(0\text{-}tn)}$和AUC $_{(0\text{-}\infty)}$分别为（922.1±300.4）ng/mL、（0.54±0.25）h、（6.46±3.18）h、（0.13±0.05）1/h、（7 634.1±4 436.6）h· ng/mL和（10 548.1±8 024.8）h· ng/mL。**结论** 该方法灵敏度高、专属性强，适用于测定大鼠血浆中盐酸维拉帕米的血药浓度及其药动学研究。

关键词： HPLC-MS/MS；大鼠血浆；盐酸维拉帕米；血药浓度；药动学

中图分类号： R969.1　　**文献标志码：** A　　**文章编号：** 1674-6376（2019）09-1780-05

DOI： 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.09.012

Determination of plasma concentration and pharmacokinetics of verapamil hydrochloride in rat plasma by HPLC-MS/MS

JIA Qi[1], MA Wenjuan[1], YAO Guangzhe[1], OUYANG Huizi[2], CHANG Yanxu[1], HE Jun[1,2]

1. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. First Teaching Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish a HPLC-MS/MS method for the determination of verapamil hydrochloride in rat plasma and to investigate its pharmacokinetics. **Methods** The determination was carried out on ZORBAX Eclipse Plus C_{18} column (100 mm×2.1 mm, 3.5 μm), mobile phase was phase A 0.1% formic acid water, phase B acetonitrile with gradient elution, flow rate was 0.3 mL/min, column temperature was 30℃. The sample volume was 5 μL. The ion source was an electrospray ionization source (ESI) with positive ion detection using multiple reactive ion monitoring (MRM). The monitoring ion pair of verapamil hydrochloride was *m*/*z* 455.3→*m*/*z* 165.0, and the internal standard diazepam monitoring ion pair was *m*/*z* 285.0→*m*/*z* 154.1. Six SD rats were perfused with hydrochloric acid. Pharmacokinetic studies were performed after verapamil 33.33 mg/kg. **Results** The linear relationship of verapamil hydrochloride in the range of 5 — 2 000 ng/mL was good; intra- and inter-day precision and accuracy were 1.3% — 2.0% and 0.1% — 18.0%, respectively. The extraction recovery is 90.87% — 92.42%, and the matrix effect is 82.82% — 101.99%. The main pharmacokinetic parameters C_{max}, T_{max}, $T_{1/2}$, Ke, $AUC_{(0\text{-}tn)}$ and $AUC_{(0\text{-}\infty)}$ of verapamil hydrochloride in rats were (922.1±300.4) ng/mL, (0.54±0.25) h, (6.46±3.18) h, (0.13±0.05) 1/h, (7 634.1±4 436.6) h·ng/mL and (10 548.1±8 024.8) h·ng/mL. **Conclusion** This method is sensitive and specific, and is suitable for the determination of plasma concentration and pharmacokinetics of verapamil hydrochloride in rat plasma.

Key words: HPLC-MS/MS; rat plasma; verapamil hydrochloride; blood concentration; pharmacokinetics

收稿日期： 2019-02-16

基金项目： 国家自然科学基金资助项目（81673824）

第一作者： 贾　琪（1994—），女，硕士研究生，河北张家口人，研究方向为药物分析。Tel：18202632979　E-mail：jqlucy97@163.com

***通信作者：** 何　俊（1981—），男，副研究员，博士生导师，吉林通化人，研究方向为药物分析。Tel：（022）59596163　E-mail：hejun673@163.com

盐酸维拉帕米，又称作异搏定，是罂粟碱的衍生物，为第一代钙离子拮抗剂，属于IV类抗心律失常药[1-5]。盐酸维拉帕米是一种口服以及静脉钙通道阻断剂[6]，临床上可以治疗特发性的肥厚型心肌病、高血压、偏头痛、心律失常[7-12]、肾病综合征和变异性心绞痛[13]。盐酸维拉帕米也可分别作为CYP3A4和P-gp的底物与抑制剂，常常作为药物间相互作用研究的工具[14]。目前文献报道盐酸维拉帕米血药浓度的检测方法主要包括HPLC-紫外检测法[15-16]、荧光检测法[17-18]、高效毛细管电泳法[19-20]。但这些方法的色谱分析时间较长[3]，血清用量大，且分析操作方法繁琐，致使灵敏度不足，不利于血药浓度的测定及药动学研究。因此，建立快速、灵敏的检测方法已成为盐酸维拉帕米血药浓度检测及其药动学研究的需要。本实验对已报道的测定方法进行优化，建立了一种可以快速检测大鼠血浆中盐酸维拉帕米血药浓度的HPLC-MS/MS分析方法，并用于盐酸维拉帕米的药动学研究，为其临床合理用药提供一定的参考依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1200型高效液相色谱仪（Agilent，USA）；Agilent 6430三重四级杆串联质谱仪（Agilent，USA）；Agilent Mass Hunter分析软件（Agilent，USA）；AX205型十万分之一天平（Mettler Toledo，Switzerland）；Milli-Q超纯水制备仪（天津信睿生物科技有限公司）；3K15型高速离心机（Sigma，Germany）；G3KT18273型微型旋涡混合仪（赛默飞世尔科技有限公司）。

1.2 试药

盐酸维拉帕米（批号100223-200102）购于中国食品药品检定研究院，地西泮（批号20160701）购自天津万象恒远科技有限公司；甲醇和乙腈（色谱纯）购自Merck公司；甲酸（色谱纯）购自ROE公司；超纯水为自制。

1.3 材料

健康SD雄性大鼠，(250±10)g，购自北京华阜康实验动物技术有限公司，实验动物许可证：SCXK（京）2014-0004。应用单次ig给药方式，给药剂量设定为33.33 mg/kg（相当于临床用药量320 mg/d）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱采用ZORBAX Eclipse Plus C_{18}柱（100 mm×2.1 mm，3.5 μm）；流动相为A相0.1%甲酸水，B相乙腈；梯度洗脱，洗脱程序为0～2 min，33%～65% B；2～3 min，65%～85% B；3～6 min，85%～89% B；6～8 min，89%～89% B；洗脱时间8 min；体积流量为0.3 mL/min；柱温为30 ℃；进样量是5 μL。

2.2 质谱条件

离子源是电喷雾离子源（ESI），检测模式是多反应离子监测（MRM），由正离子监测；Delta EMV（+）：300 V；Gas Temp：310 ℃；Gas Flow：11 L/min；Nebulizer：206.84 kPa；定量分析离子对及质谱参数见表1。

表1 定量分析离子对及质谱参数

Table 1 Quantitative analysis of ion pairs and mass spectrometry parameters

化合物	母离子	子离子	碎裂电压	碰撞能量
盐酸维拉帕米	455.3	165.0	135	27
地西泮（内标）	285.0	154.1	140	27

2.3 标准品溶液的配制

精密称取10 mg盐酸维拉帕米对照品，溶解在甲醇中，制成浓度为1 mg/mL的储备液，并储存在4 ℃冰箱备用。另取地西泮对照品10 mg，用甲醇溶解并稀释成浓度为1 mg/mL的内标溶液，储存于4 ℃冰箱备用。

2.4 血浆样品处理方法

精密量取体积为100 μL的血浆样品，将其置于1.5 mL离心管中，依次加入内标溶液20 μL（地西泮，1 μg/mL），甲醇20 μL，涡旋并混匀，之后加入醋酸乙酯800 μL，涡旋并振荡5 min，以转速14 000 r/min离心10 min后，取其上清液800 μL，以氮气吹干，加入100 μL的50%甲醇重新溶解，涡旋并振摇5 min后以转速14 000 r/min离心10 min，取其上清液，进样分析。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性 精密量取100 μL空白血浆，加入40 μL的甲醇，按照“2.4”项下处理并取上清液进样分析，得到图（A）；在空白血浆中加入一定浓度的盐酸维拉帕米对照品溶液及内标溶液，按照同样的方法处理，得到图（B）；灌胃给药后大鼠的血浆样品，以相同的方法处理，得到图（C）。盐酸维拉帕米和内标地西泮的保留时间分别是5.72 min和6.80 min。血浆样品中的内源性成分和目标性成分不会产生相互影响，结果见图1。

2.5.2 标准曲线及线性范围 精密量取体积为100 μL的大鼠空白血浆，加入20 μL的内标溶液后，再加

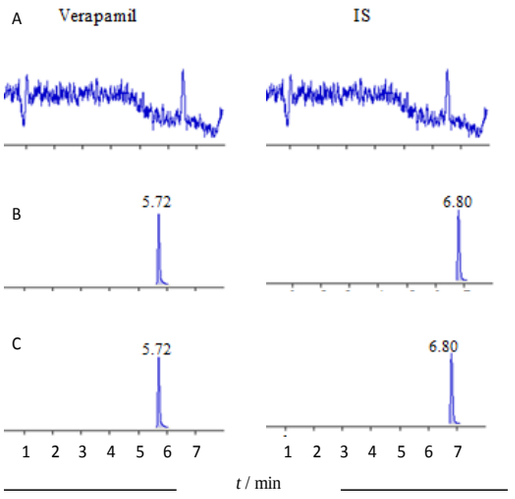

图1 空白血浆样品(A)、空白血浆中加入一定浓度的混合对照品溶液(B)、大鼠ig给药后血浆样品(C)的MRM图

Fig.1 MRM map of blank plasma sample (A), blank plasma added to a certain concentration of mixed reference solution (B), and plasma samples after intragastric administration in rats (C)

入一系列浓度的盐酸维拉帕米对照品溶液20 μL，配制成含盐酸维拉帕米5、10、50、100、500、1 000、2 000 ng/mL的血浆样品，依照“2.4”项下的血浆样品处理方法进行处理操作，取上清液进样分析并记录其色谱图，使用盐酸维拉帕米与内标的峰面积比值(Y)作为纵坐标，使用盐酸维拉帕米的浓度(X)作为横坐标，通过加权最小二乘法计算线性回归，并将权重系数设定为$1/X^2$，获得盐酸维拉帕米的线性回归方程及相关系数(Y=4.214 088 X+0.076 162，r^2=0.997 8)，盐酸维拉帕米的最低定量限为5 ng/mL(S/N≥10)。

2.5.3 精密度与准确度 精密量取100 μL的空白血浆，加入不同浓度的盐酸维拉帕米对照品溶液，使最终浓度为10、100、2 000 ng/mL，3种浓度的溶液各自制备6份，按照“2.4”处理并连续测定3 d，且与标准曲线同时进行，记录盐酸维拉帕米在不同质控水平下的浓度，计算出日内与日间的精密度，其结果见表2。

2.5.4 回收率及基质效应 取100 μL的大鼠血浆，按照“2.4”项下的处理方法，制备低、中、高3种浓度的血浆样品6份，进样量取5 μL，记录其峰面积，记为(A_1)；另取100 μL空白血浆，加入40 μL甲醇，按照“2.4”下的方法进行处理后，用相应的低、中、高3个浓度的盐酸维拉帕米对照品进行复溶，进样量设定为5 μL，记录其峰面积，记为(A_2)，则提取回收率的公式为$R=A_1/A_2$；于同样的条件来测定相应的低、中、高3个浓度对照品溶液的响应值，并记录相应的峰面积，记为(A_0)，则基质效应的公式为$M=A_2/A_0$。每种浓度的盐酸维拉帕米的提取回收率和基质效应见表3。

2.5.5 稳定性考察 取100 μL大鼠空白血浆，配成低、中、高3种浓度的血浆样品，分别考察其在室温下6 h再处理，将处理后的血浆样品置于自动进样器中12 h，反复冻融3次，在－70 ℃冰箱中冷冻14 d的稳定性，见表4。

2.6 药动学研究

取健康SD雄性大鼠6只，体质量为(250±10)g，在给药前禁食12 h，在此期间可以自由饮水，分别在给药前以及给药后于0.083、0.17、0.25、0.5、1、2、5、

表2 盐酸维拉帕米在大鼠血浆中的准确度和精密度(n=6)

Table 2 Accuracy and precision of verapamilol hydrochloride in rat plasma (n=6)

质量浓度/(ng·mL^{-1})	日内精密度			日间精密度		
	测量值/(ng·mL^{-1})	RSD/%	RE/%	测量值/(ng·mL^{-1})	RSD/%	RE/%
10	11.80±0.15	1.3	18.0	11.73±0.17	1.5	17.4
100	112.25±1.78	1.6	12.2	108.43±2.16	2.0	8.4
2 000	2 007.99±27.47	1.4	0.4	2 002.61±36.87	1.8	0.1

表3 盐酸维拉帕米于大鼠血浆中的提取回收率及基质效应(n=6)

Table 3 Extraction recovery and matrix effect of verapamil hydrochloride in rat plasma (n=6)

质量浓度/(ng·mL^{-1})	基质效应		提取回收率	
	测量值/%	RSD/%	测量值/%	RSD/%
10	82.82±1.60	1.9	91.25±0.90	1.1
100	96.87±5.67	5.9	90.87±0.78	6.45
2 000	101.99±3.23	3.2	92.42±0.34	2.0

表4 维拉帕米的稳定性（n=6）

Table 4 Stability of Verapamil（n=6）

浓度/(ng·mL^{-1})	室温6 h		自动进样器12 h		反复冻融3次		-70 ℃下存储14 d	
	测量值/(ng·mL^{-1})	RSD/%	测量值/(ng·mL^{-1})	RSD/%	测量值/(ng·mL^{-1})	RSD/%	测量值/(ng·mL^{-1})	RSD/%
10	11.38±0.47	4.1	11.10±0.55	4.9	11.57±0.62	5.4	11.19±0.47	4.2
100	107.20±1.97	1.8	112.32±1.76	1.6	113.05±3.17	2.8	113.83±3.44	3.0
2 000	1957.43±15.61	0.8	2 032.78±71.00	3.5	2 042.12±35.25	1.7	1 936.98±72.74	3.8

6、8、10、12、24 h的时间点于大鼠眼底静脉丛取血，置于肝素化的塑料管中，以转速7 000 r/min离心10 min，取上清液并储存在−70 ℃冰箱，直到进样分析。盐酸维拉帕米的平均血药浓度-时间曲线见图2所示。经软件DAS 1.0计算统计分析后，得到了大鼠口服盐酸维拉帕米后的药动学参数，见表5。

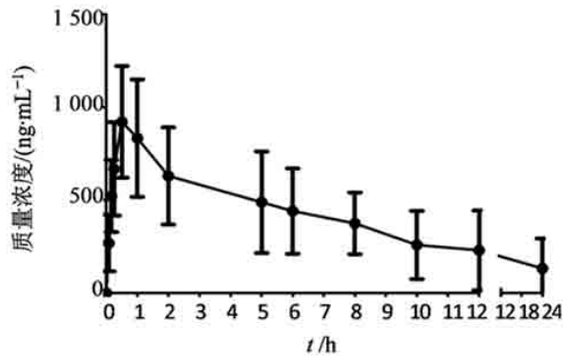

图2 盐酸维拉帕米的平均血药浓度-时间曲线

Fig. 2 Average blood concentration-time curve of verapamil hydrochloride

表5 盐酸维拉帕米的主要药动学参数（n=6）

Table 5 Main pharmacokinetic parameters of verapamil hydrochloride（n=6）

参数	单位	盐酸维拉帕米
C_{max}	ng·mL^{-1}	922.1±300.4
t_{max}	h	0.54±0.25
$t_{1/2}$	h	6.46±3.18
Ke	1/h	0.13±0.05
$AUC_{(0-tn)}$	h·ng·mL^{-1}	7 634.1±4 436.6
$AUC_{(0-\infty)}$	h·ng·mL^{-1}	10 548.1±8 024.8

3 讨论

本实验建立了大鼠血浆中盐酸维拉帕米的HPLC-MS/MS测定方法，与传统的HPLC-紫外检测法、荧光检测法和高效毛细管电泳法相比[15-20]，具有灵敏度高，专属性强，内源性干扰小的特点，更有利于进行药代动力学的相关研究。

在实验中通过对比不同的流动相（甲醇、乙腈），发现化合物在乙腈中的分离度较好，且在水相中加入0.1%的甲酸，可以使各个化合物获得较好的峰形，所以本实验中流动相采用了0.1%的甲酸水和乙腈。实验过程中，还研究了甲醇蛋白沉淀法、乙腈蛋白沉淀法和醋酸乙酯液液萃取法处理大鼠血浆。实验结果表明，采用醋酸乙酯液液萃取法处理大鼠血浆时，其提取回收率要明显高于甲醇沉淀蛋白法和乙腈沉淀蛋白法。

实验结果表明，口服给药后大鼠体内盐酸维拉帕米的药动学属于一室模型。给药5 min后，则可以在大鼠血浆中检测到盐酸维拉帕米，于30 min左右达到了最大血药浓度，C_{max}、$t_{1/2}$、$AUC_{(0-tn)}$和$AUC_{(0-\infty)}$分别为(922.1±300.4) ng/mL、(6.46±3.18) h、(7 634.1±4 436.6) h·ng/mL和(10 548.1±8 024.8) h·ng/mL。通过上述结果显示，在大鼠体内，盐酸维拉帕米被迅速吸收。

参考文献

[1] 赛 那, 张 微, 顾艳丽. LC-MS法测定盐酸维拉帕米缓释微球在大鼠体内的药动学行为 [J]. 沈阳药科大学学报, 2016, 33(10): 814-820.

[2] 喻 晖, 梅益斌, 张 伟. 盐酸维拉帕米治疗心绞痛的不良反应回归分析 [J]. 中国现代医生, 2017, 55(6): 106-108, 112.

[3] 杨汉煜. LC／MS／MS法测定人血浆中维拉帕米 [A]. // 中国药学会."以岭医药杯"第八届全国青年药学工作者最新科研成果交流会论文集 [C]. 中国药学会:中国药学会学术会务部, 2006: 5.

[4] 王 晶, 杨清华, 孙 欣. 盐酸维拉帕米注射液的含量及有关物质的HPLC测定 [J]. 中国新药杂志, 2004, 13(S1): 1364-1365.

[5] Barbosa Lima A, Ferreira L F, Barbosa S L, et al. Selective determination of verapamil in pharmaceutics and urine using a boron-doped diamond electrode coupled to flow injection analysis with multiple-pulse amperometric detection [J]. Electroanalysis, 2018, 30(8): 1880-1885.

[6] Vijayabaskar S, Mahalingam V, Kalaivani. Analytical

method development and validation for the analysis of verapamil hydrochloride and its related substances by using ultra perfomance liquid chromatography [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 137: 189-195.

[7] 陈 黎, 米春娟. 盐酸维拉帕米对有氧训练大鼠心肌细胞钙离子的影响 [J]. 北京体育大学学报, 2007, 30(8): 1057-1059.

[8] Li C X, Liu S P, Liu Z F, et al. Study on the interaction between verapamil hydrochloride and eosin Y by absorption, fluorescence and resonance Rayleigh scattering spectra and their analytical applications [J]. J Fluoresc, 2011, 21(2): 723-732.

[9] 戴 强, 崔 艳, 沈小璇, 等. 维拉帕米联合二甲双胍治疗2型糖尿病合并高血压的效果及对患者HOMA-β、ET-1的影响 [J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(10): 1058-1061.

[10] 郭衍梅, 袁建喜. 盐酸维拉帕米缓释片含服治疗高血压病的临床观察 [J]. 中外医学研究, 2015, 13(12): 152-153.

[11] 张克亮. 维拉帕米治疗偏头痛疗效分析 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2012, 15(4): 78-79.

[12] Li Y Q, Abbaspour M R, Grootendorst P V, et al. Optimization of controlled release nanoparticle formulation of verapamil hydrochloride using artificial neural networks with genetic algorithm and response surface methodology [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2015, 94: 170-179.

[13] Muhammad S, Xu G H, Wei F D, et al. Determination of verapamil HCl in pharmaceutical preparations by a fluorescent nano probe based on CdTe/CdS/ZnS quantum dots [J]. Nanomaterials, 2017, 7(11): 358.

[14] 陈 尧, 谭志荣, 王医成, 等. 液相色谱串联质谱法测定人体血浆维拉帕米浓度及生物等效性评价研究 [J]. 中国药学杂志, 2012, 47(7): 546-550.

[15] 张振杰, 王晓宇, 王 平, 等. 高效液相色谱法测定注射用盐酸维拉帕米的含量 [J]. 中国药业, 2007, 16(9): 18-19.

[16] 汪凤梅, 姚彤炜, 吴 越, 等. HPLC测定人肝转基因细胞中的盐酸维拉帕米 [J]. 中国现代应用药学, 2001, 18(5): 379-381.

[17] 邹 豪, 蒋雪涛, 马伯良, 等. RP-HPLC荧光检测法同时测定血浆中的盐酸维拉帕米和活性代谢物去甲维拉帕米的浓度 [J]. 中国药学杂志, 2001, 36(8): 35-37.

[18] 王嗣岑, 贺浪冲, 李玲那. 用HPLE—荧光检测法研究维拉帕米在大鼠体内的药代动力学和组织分布特性 [J]. 生命科学仪器, 2003, 1(6): 10-12.

[19] 刘 玲, 严子军. 维拉帕米的高效毛细管电泳手性分离 [J]. 中国医药工业杂志, 2006, 37(10): 702-704.

[20] 李学仁, 程庆春, 杨跃伟, 等. 高效毛细管电泳法研究美托洛尔、艾司洛尔和维拉帕米的对映体的手性分离 [J]. 中国药学杂志, 1999, 34(4): 45-46.