

HPLC-MS/MS 法测定人血浆中左西孟旦

宋晓楠, 王晓波, 袭荣刚

[摘要] 目的 建立快速、灵敏的 HPLC-MS/MS 法测定人血浆中的左西孟旦浓度。方法 以氘氯噻嗪为内标, 血浆样品经甲基叔丁基醚沉淀蛋白, 以甲醇为流动相, 采用 C_{18} 色谱柱进行分离, 电喷雾离子化源, 以多重反应监测方式进行负离子检测。结果 测定血浆中左西孟旦方法的线性范围为 0.5 ~ 1200 ng/ml, 定量下限可达 0.5 ng/ml。结论 本方法专属性好, 准确、快速, 适用于左西孟旦注射液的临床药代动力学研究。

[关键词] 左西孟旦; HPLC-MS/MS 法; 药代动力学

[中图分类号] R969.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1008-9926(2012)01-041-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1008-9926.2012.01.11

Determination of Levosimendan with HPLC-MS/MS in Human Plasma

SONG Xiao-nan, WANG Xiao-bo, XI Rong-gang

Hospital 210 of PLA, Dalian 116013, China

[Abstract] **Objective** To develop a simple, quick and sensitive HPLC-MS/MS method for the quantification of levosimendan in human plasma. **Methods** Following protein precipitation with methyl tert-butyl ether, levosimendan was separated on an Agilent Eclipse XDB C_{18} (150 mm $\times$ 4.6 mm, i. d., 5 μ m) with methanol as the mobile phase. A tandem mass spectrometer equipped with electrospray ionization source was used as the detector and operated in the negative ion mode. **Results** The linear concentration range of the calibration curve for levosimendan was 0.5-1200 ng/ml. The lower limit of quantification of levosimendan was 0.5 ng/ml. **Conclusion** The methods proves to be sensitive, simple and rapid, suitable for the pharmacokinetic study of levosimendan injection.

[Key words] levosimendan; HPLC-MS/MS; pharmacokinetic

左西孟旦(levosimendan)是新一代钙离子增敏剂类强心药物,兼有钙离子增敏(为主)、磷酸二酯酶抑制及血管扩张等作用。它与目前临床常用的强心苷、 β 受体激动剂和磷酸二酯酶抑制剂三类强心药物的不同之处在于左西孟旦并不是通过增加心肌细胞内钙离子浓度来增加心肌收缩力作用,故不存在钙超载的危险(如导致心律失常、心肌缺血甚至猝死、进一步引起心衰等)^[1,2]。本文旨在建立快速、灵敏、易操作的 HPLC-MS/MS 法测定人血浆中的左西孟旦,以研究左西孟旦注射液在人体内的药代动力学特点。

1 材料与方法

1.1 仪器 Agilent 1200 液相色谱仪(美国 Agilent 公司); API 3200 串联四级杆质谱仪、Analysis 1.4.1 数据采集软件(美国 Applied Biosystems 公司); Mettler

Toledo AL104 分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司); 80-2 离心沉淀机(巩义市英峪予华仪器厂); XW-80A 涡旋混合器(上海医科大学仪器厂); DK-98-II A 电热恒温水浴锅(天津泰斯特仪器有限公司); ACO-004 空气泵(广东日生集团有限公司)。1.2 试药 左西孟旦注射液(规格: 12.5 mg/5 ml, 成都圣诺生物制药有限公司,批号: 061201); 左西孟旦标准品(纯度: 97.5%, 北京泽鼎国际医药科技发展有限公司,批号: 061108); 内标氘氯噻嗪(纯度: 98.5%, 中国药品生物制品检定所); 甲醇、甲基叔丁基醚均为色谱纯(美国 Tedia 公司)。

1.3 研究对象 受试者均为健康男性,年龄(21 $\pm$ 2)岁,身高(1.76 $\pm$ 0.06) m,体质量(66.3 $\pm$ 7.4) kg,体重指数(BMI) 21.3 $\pm$ 1.7。所有志愿者经血压、心电图、胸透、血常规、尿常规、肝肾功能检查正常,充分了解试验内容后均自愿签署知情同意书。受试期间不允许长时间卧床,禁止大量活动,禁止吸烟、饮酒及含酒精、咖啡因类饮料,试验期间禁用一切非试验药物。

1.4 HPLC-MS/MS 条件 色谱条件: Agilent E-

作者简介: 宋晓楠,主管药师。研究方向: 临床药理。Tel: (0411)

85847091; E-mail: shunshiyu@yahoo.com.cn

作者单位: 116013 辽宁大连,解放军 210 医院

clipse XDB C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, i. d., 5 μm) 色谱柱; 流动相: 甲醇; 流速: 0.8 ml/min; 柱温: 室温; 进样量: 10 μl。质谱条件: 离子源: 电喷雾离子化源 (ESI); 离子喷射电压: -4500 V; 温度: 500℃; 源内气体 1 (GS1, N₂) 压力: 50 psi; 气体 2 (GS₂, N₂) 压力: 40 psi; 气帘气体 (CUR, N₂) 压力: 30 psi; 负离子方式检测; 扫描方式为多重反应监测 (MRM)。左西孟旦的解簇电压 (DP): -45 eV; 碰撞能量 (CE): -32 eV; 氢氯噻嗪的解簇电压 (DP): -40 eV; 碰撞能量 (CE): -33 eV; 用于定量分析的离子反应分别为 m/z 279.0 → m/z 227.0 (左西孟旦) 和 m/z 295.9 → m/z 204.9 (氢氯噻嗪)。

1.5 血浆样品处理 精密取血浆样品 0.2 ml 于离心管中, 加入内标溶液 (氢氯噻嗪, 1 μg/ml) 20 μl, 涡旋混匀, 加入甲基叔丁基醚 4 ml, 涡旋 1 min, 4000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2 ml, 于 40℃ 水浴吹干。残渣在测定前用 200 μl 流动相溶解, 涡旋混合, 精密吸取 10 μl 进行分析, 记录左西孟旦及内标峰面积, 内标法计算左西孟旦的浓度。

1.6 标准曲线和定量下限 取左西孟旦标准系列溶液 20 μl, 空气流吹干, 加入空白血浆 0.2 ml, 配制相当于左西孟旦浓度为 0.5、5、10、100、200、400、800 和 1200 ng/ml 的血浆样品, 按 1.5 项下操作, 每一浓度进行双样本分析, 进样 10 μl, 记录色谱图。以待测物浓度为横坐标, 待测物与内标的峰面积比值为纵坐标, 用加权 ($W = 1/\chi^2$) 最小二乘法进行回归运算, 求得的回归方程即为标准曲线。

取左西孟旦对照品液 (浓度为 5.0 ng/ml) 20 μl, 空气流吹干, 加入空白血浆 0.2 ml, 配制相当于左西孟旦浓度为 0.5 ng/ml 的样品, 在方法学确证第 1 天进行 6 样本分析, 并根据当日标准曲线计算每一样本测得浓度。

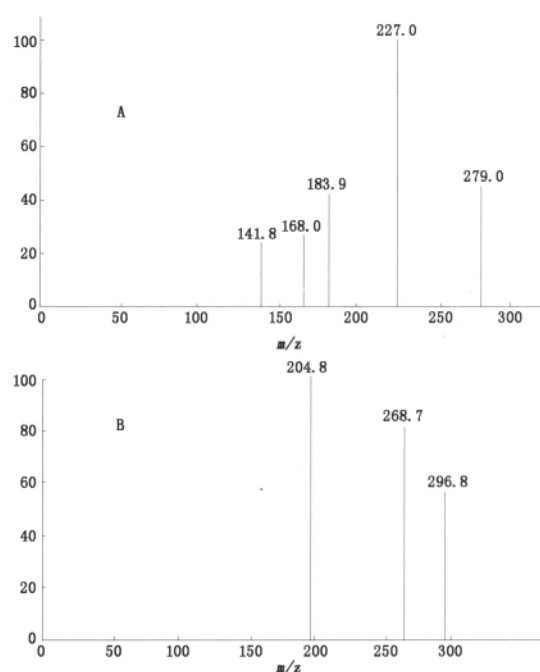
1.7 精密度和准确度 取空白血浆 0.2 ml, 按 1.6 项下的方法配制低、中、高 (1.0、240.0、1000.0 ng/ml) 3 个浓度的质控 (QC) 样品, 每一浓度进行 6 样本分析, 连续测定 3 d, 根据当日的标准曲线, 计算样品的测得浓度, 根据样品的测定结果计算方法的准确度与精密度。

1.8 临床试验方法 临床试验在解放军 210 医院国家药物临床试验机构进行。30 名男性健康志愿者, 分低、中、高 (0.5、1.0、2.0 mg) 3 个剂量组, 每组 10 名, 由低剂量组开始试验, 取得安全性评价后, 进行下一剂量组试验。药物经静脉推注 10 min, 给药前采血, 在给药后的 1、5、10、20、40、60 min、1.5 h、

2、4、6、8、12 h 采集上肢静脉血 5 ml, 抗凝血样, 4000 r/min 离心 10 min, 分离上层血浆, 置于 -70℃ 冰箱冷藏待用。

2 结果

2.1 质谱分析结果 左西孟旦和内标在 ESI 电离方式下, 主要生成 $[M-H]^-$ 准分子离子峰, 分别为 m/z 279.0 和 m/z 296.0, 分别进行产物离子扫描分析, 左西孟旦和内标生成的主要碎片离子分别为 m/z 227.0 和 m/z 204.8 (见图 1), 将其作为定量分析时检测的产物离子。



A: 左西孟旦; B: 氢氯噻嗪

图 1 左西孟旦和氢氯噻嗪的产物离子扫描质谱图

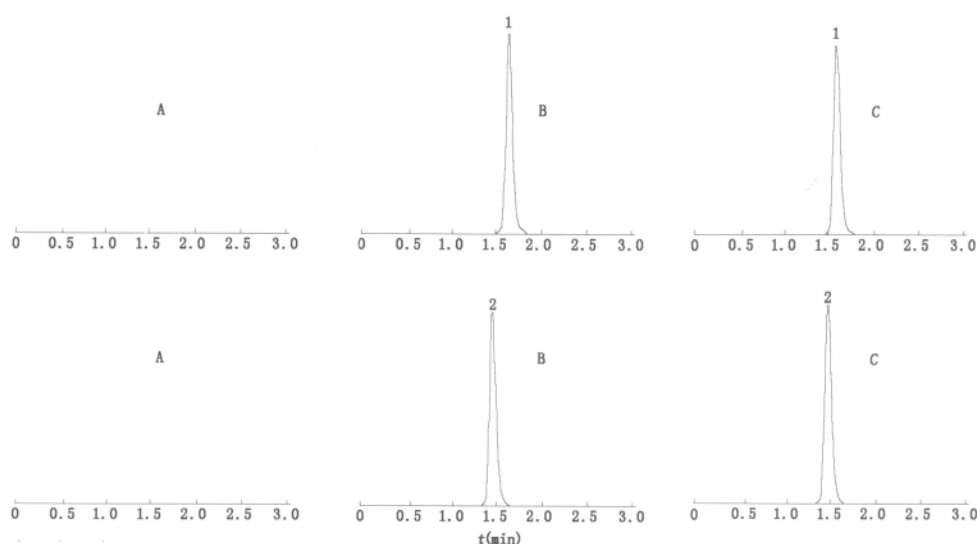
2.2 方法专属性 取空白血浆 0.2 ml, 除不加内标溶液外, 其余按 1.5 项下血浆样品处理项下操作, 进样 10 μl; 将左西孟旦标准溶液和内标溶液加入空白血浆中 (浓度分别为 15、100 ng/ml), 依法操作; 取给药后 6 名受试者的血浆样品, 分别依法操作, 得到色谱图 2, C 为其中一名受试者的血浆样品图样。结果表明, 血浆的内源性物质不干扰左西孟旦和内标氢氯噻嗪的测定。

2.3 标准曲线和定量限 左西孟旦标准曲线为:

$$Y = 0.0221X + 0.0214, r = 0.9988$$

线性范围为 0.5 ~ 1200 ng/ml。

左西孟旦定量下限浓度的日内精密度 RSD 为 5.89%, 准确度 RE 为 0.1%, 结果表明 LC-MS/MS 法测定血浆中左西孟旦的定量限可达 0.5 ng/ml。



A: 空白血浆; B: 加入左西孟旦及氢氯噻嗪的血浆样品; C: 给药后 1h 血浆样品; 1: 左西孟旦; 2: 氢氯噻嗪

图 2 血浆中左西孟旦和氢氯噻嗪的色谱图

2.4 精密度与准确度 结果表明, 本方法精密、准确, 符合有关规范的要求^[3], 见表 1。

表 1 LC-MS/MS 法测定血浆样品
中左西孟旦的准确度与精密度

加入浓度 (ng/ml)	测得浓度 (ng/ml)	日内 RSD (%)	日间 RSD (%)	准确度 (%)
5	5.20 ± 0.28	6.95	5.39	4.00
200	210.64 ± 9.64	5.07	4.29	5.32
800	789.89 ± 39.9	4.73	4.99	1.26

2.5 回收率 基质效应 本试验考察了左西孟旦低、中、高 3 个浓度的提取回收率, 分别为 (90.5 ± 2.05) %、(89.1 ± 4.34) % 和 (90.9 ± 2.17) %。内标提取回收率为 (94.3 ± 3.05) %。本试验考察了低、中、高 3 个浓度的基质效应, 左西孟旦为 (98.5 ± 4.81) %, 内标为 (99.6 ± 2.52) %, 表明本方法可有效地避免人血浆基质效应。

2.6 稳定性 本试验考察了左西孟旦的稳定性。结果表明其血浆样品经预处理后室温放置 8 h 稳定, 血浆样品经历 3 次冷冻解冻循环稳定, 血浆样品于 -70℃ 冷冻 30 d 稳定。

2.7 检测方法质控 受试者血浆样品的测定在分析方法确证完成之后进行。在测定血浆样品中的药物浓度时进行质量控制, 以保证所建立的方法在实际应用中的可靠性。每个未知样品一般测定 1 次, 必要时复测。来自同一个体的血浆样品在同一批中测定。每个分析批血浆样品测定时建立相应的标准

曲线, 并随行测定低、中、高 (1.0、240.0、1000.0 ng/ml) 3 个浓度的质控样品。每个浓度至少双样本, 并均匀分布于未知样品的测试顺序中。质控样品测定结果的偏差均小于 15%, 低浓度点偏差均小于 20%^[4-5]。

2.8 检测方法在药代动力学研究中的应用 左西孟旦的平均血药浓度-时间曲线见图 3。试验数据经 DAS 2.0 软件处理, 计算主要药动学参数, 结果见表 2。静脉注射左西孟旦注射液, 其体内代谢过程基本符合一室模型特征。3 个剂量的 $t_{1/2}$ 均值基本不变; 其 AUC 呈剂量相关性, AUC 与给药剂量呈良好的线性关系 ($r^2 = 0.9991$); 表观分布容积 (V_d) 均值为 6.494 ~ 7.356 L。故静脉推注左西孟旦注射液后, 起效迅速, 且消除较快, 存在于体内的时间较短。

表 2 单剂量静脉注射左西孟旦的药代动力学参数

参数	0.5	1.0	2.0 (mg)
Ke (min)	0.0195 ± 0.0059	0.0153 ± 0.0028	0.0161 ± 0.0055
$t_{1/2}$ (min)	38.51 ± 12.04	46.8 ± 29.70	47.22 ± 14.30
V_d (L)	7.356 ± 1.620	7.213 ± 1.823	6.494 ± 1.902
CL (L/min)	0.139 ± 0.035	0.106 ± 0.012	0.097 ± 0.019
MRT (min)	69.36 ± 21.41	69.96 ± 16.39	75.51 ± 20.70
AUC_{0-1} (ng·min/ml)	3842.12 ± 1081.83	9525.12 ± 1092.25	21273.57 ± 3970.10
$AUC_{0-\infty}$ (ng·min/ml)	4092.21 ± 1045.06	9757.07 ± 1080.08	21472.62 ± 4019.45

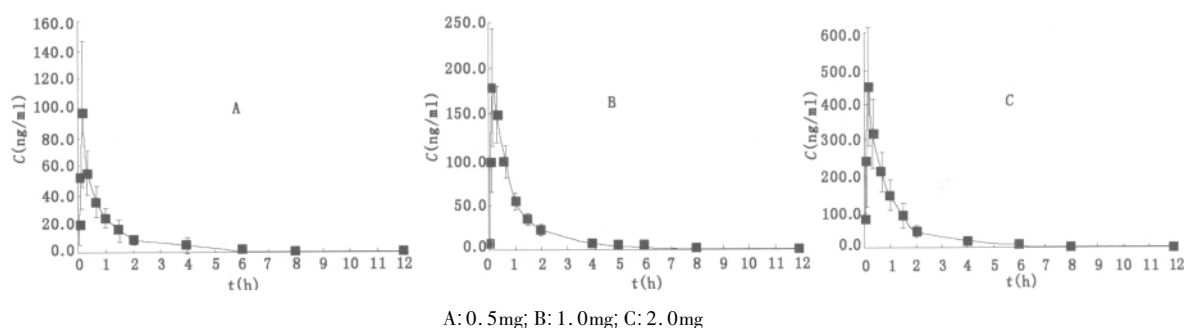


图 3 左西孟旦的平均血药浓度-时间曲线

3 结论

本文建立了 HPLC-MS/MS 法测定人血浆中的左西孟旦。该方法精密、准确、快速,线性范围宽,可满足左西孟旦注射液在人体内的药代动力学研究。

[参考文献]

- [1] Zhao HL, Cui X, Wang BJ, et al. Pharmacokinetics of levosimendan administered as intravenous injection in Chinese healthy volunteers [J]. *J Chin Pharmaceut Sci*, 2007, 16(1): 61-64
- [2] Liu YF, Min S. Application and prospects of levosimendan in clinical anesthesia and intensive care units [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem*, 2008, 27: 212-215

- [3] Shah VP, Midha KK, Findlay JW, et al. Bioanalytical method validation-A revisit with a decade of progress [J]. *Pharm Res*, 2000, 17: 1511-1517
- [4] Anttila S, Huuskonen H, Nevalainen T, et al. Site dependent bioavailability and metabolism of levosimendan in dogs [J]. *Eur J Pharm Sci*, 1999, 9: 85-91
- [5] Meyer UA, Zanger UM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997, 37: 269-296

(收稿日期: 2011-10-21; 修回日期: 2011-11-07)

(本文编辑 狄亚敏)

(上接 40 页)

表 3 灌胃和尾静脉注射 LH14 的主要药代动力学参数 ($n = 6$)

参数	尾静脉组 (25mg/kg)	灌胃组 (5mg/kg)
C_{max} (ng/ml)	11503.5 ± 5198.5	129.6 ± 23.9
T_{max} (h)	0.016	3.0
$AUC_{(0 \sim t)}$ (ng·h/ml)	6761.2 ± 1403.8	997.0 ± 251.6
$AUMC_{(0 \sim t)}$ (ng·h/ml)	20743.6 ± 9265.5	4937.9 ± 1690.3
MRT (h)	3.0 ± 0.9	4.8 ± 0.6
$t_{1/2}$ (h)	2.8 ± 0.7	2.9 ± 0.6

照品溶液的配制曾采用水、甲醇、乙腈等作溶剂,发现对照品均不能溶解。后采用含不同浓度的 DMSO 溶液作溶剂,发现浓度太高在 4℃ 条件会有晶体出现,浓度太低会有对照品析出,最终选定 25% DMSO 的甲醇溶液 LH14,发现溶解度良好。

本实验方法最低定量浓度为 2 ng/ml,已完全满足实验要求,且样品处理和测定过程简便,适合 SD 大鼠体内药代动力学研究。

[参考文献]

- [1] Nancy Z, Oscar M, Stephane R. Discovery of N-(2-Aminophenyl)-4-[(4-pyridin-3-ylpyrimidin-2-ylamino)methyl]benzamide (MGCD0103), an orally active histone deacetylase inhibitor [J]. *Med. Chem.*, 2008, 51: 4072-4075
- [2] Stephane R, Nancy Z, Frederic G, et al. SAR and biological evaluation of analogues of a small molecule histone deacetylase inhibitor N-(2-Aminophenyl)-4-[(4-pyridin-3-ylpyrimidin-2-ylamino)methyl]benzamide (MGCD0103) [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009, 19: 644-649
- [3] 时美慧, 顾若兰, 甘慧, 等. 1,5-二咖啡酰奎宁酸与其四酰化物相对生物利用度的研究 [J]. *解放军药学报*, 2011, 27(4): 286-288
- [4] 丁建刚, 高允生, 刘江林, 等. HPLC-MS/MS 法测定比格犬血浆中丹参酮 II_A 的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2009, 29(5): 769-772
- [5] 萧参, 陈坚行. 生物药剂分析方法确证 [J]. *中国药学杂志*, 1993, 28(7): 425-429
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (二部) [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010. 附录 195-196

(收稿日期: 2011-07-22; 修回日期: 2011-09-26)

(本文编辑 金杨红)