

LC-MS 法评价两种苯磺酸氨氯地平片的人体生物等效性

梁超¹, 程晓华², 张红^{2*}, 徐文炜², 胡晓²

(1. 江西省人民医院普通外科, 南昌 333000; 2. 南昌大学医学院临床药理研究所, 南昌 330006)

[摘要] **目的:**建立 LC-MS 法测定人体血浆中苯磺酸氨氯地平的药物浓度, 并进行两种制剂的生物等效性评价。**方法:**20 例健康受试者单剂量交叉口服 10 mg 苯磺酸氨氯地平供试制剂或参比制剂后, 采用 LC-MS 测定人体血浆中不同时间点苯磺酸氨氯地平的浓度, 计算其药代动力学参数和相对生物利用度, 评价两制剂的生物等效性。**结果:**苯磺酸氨氯地平供试制剂和参比制剂主要药代动力学参数如下: C_{max} 分别为 (6.21 ± 1.88) 、 (6.03 ± 1.08) ng/ml, AUC_{0-120} 分别为 (250.68 ± 52.61) 、 (246.14 ± 52.11) ng·h/ml, T_{max} 分别为 (6.0 ± 2.3) 、 (6.1 ± 2.5) h, $t_{1/2}$ 分别为 (40.45 ± 6.68) 、 (43.74 ± 9.05) h。本方法在 0.1~20.0 ng/ml 浓度范围内线性关系良好。最低可定量浓度为 0.1 ng/ml, 两制剂主要药代动力学参数经统计学检验无显著性差异。**结论:**本方法简单、快速、准确, 两种制剂具有生物等效性。

[关键词] 氨氯地平; 苯磺酸盐类; 色谱法, 高压液相; 光谱分析, 质量; 药代动力学; 生物利用度

[中图分类号] R 972.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)03-0299-03

Liquid chromatography-mass spectrometry in evaluation of bioequivalence of two kinds of amlodipine besylate tablets

LIANG Chao¹, CHENG Xiao-hua², ZHANG Hong^{2*}, XU Wen-wei², HU Xiao² (1. Department of General Surgery, The People's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang 330006, China; 2. Institute of Clinical Pharmacology, Medical School, Nanchang University, Nanchang 330006)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method for determining the concentration of amlodipine besylate in human plasma and to evaluate the bioequivalence of 2 kinds of amlodipine besylate tablets. **Methods:** Twenty healthy male volunteers were enrolled into a single crossover study. A single dose of the suspension equivalent to 10 mg amlodipine besylate or a reference preparation was given in a crossover way. The plasma concentrations of amlodipine besylate were determined by LC-MS method in the volunteers at different time points; the pharmacokinetic parameters and relative bioavailability were calculated and the bioequivalence of the 2 preparations were evaluated. **Results:** The pharmacokinetic parameters for experimental and the reference preparations were: C_{max} (6.21 ± 1.88) vs (6.03 ± 1.08) ng/ml; AUC_{0-120} (250.68 ± 52.61) vs (246.14 ± 52.11) ng h/ml; T_{max} (6.0 ± 2.3) vs (6.1 ± 2.5) h; $t_{1/2}$ (40.45 ± 6.68) vs (43.74 ± 9.05) h, respectively. The linear range of the present method was 0.1-20.0 ng/ml; the lowest detectable concentration of amlodipine besylate was 0.1 ng/ml. There was no significant difference in pharmacokinetic parameters between the 2 tablets. **Conclusion:** The present method is simple to use, fast, and accurate. The 2 preparations of amlodipine besylate are bioequivalent.

[KEY WORDS] amlodipine; benzenesulfonates; chromatography, high pressure liquid; spectrum analysis, mass; pharmacokinetics; biological availability

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(3): 299-301]

苯磺酸氨氯地平 (amlodipine besylate) 是第三代双氢吡啶类钙拮抗药。和同类降血压药相比, 具有口服吸收好, 不受食物影响, 生物利用度高, 清除半衰期长, 起效缓慢, 每天服药 1 次降压作用即可维持 24 h, 且不良反应轻微等优点, 目前已成为临床上治疗高血压的一线药物。由于氨氯地平血浆浓度仅为纳克级水平, 一般的高效液相色谱法难以准确测定其体内的药物浓度, 本试验参考文献建立一种灵敏、准确、操作简捷的 LC-MS 检测方法, 通过测定血浆中不同时间的苯磺酸氨氯地平浓度对江西汇仁药

业有限公司研制的苯磺酸氨氯地平与辉瑞制药有限公司生产的络活喜进行生物等效性评价。

1 材料和方法

1.1 仪器和药品 LCMS-2010A 高效液相色谱-质谱联用仪; SCL-10Avp 系统控制器, LC-10ADvp 双泵, SIL-HTc 自动进样器, CTO-10Avp 柱温箱; 苯

[作者简介] 梁超, 硕士生, 主治医师。

* Corresponding author. E-mail: zh2003nc@yahoo.com.cn

磺酸氨氯地平对照品购自中国药品生物制品检定所(纯度为99.7%);苯磺酸氨氯地平片由江西汇仁药业有限公司研制(规格:5 mg/片,批号:20031002,供试制剂);络活喜由辉瑞制药有限公司提供(规格:5 mg/片,批号:45805033,参比制剂)。

1.2 试验设计 20名男性健康志愿者,年龄(23±1)岁,体质量(62±3) kg,身高(170±4) cm。受试者均无药物过敏史,无肝、肾疾病史,精神状态良好,受试前全面体格检查均正常(其中包括心电图、心率、血压、肾功能、肝功能、血常规及尿常规等),受试前2周内未服用任何药物,试验期间忌烟、酒。试验前均签署知情同意书。本试验采用双周期、自身交叉对照设计,将20名健康男性志愿者随机分为两组,每组10人,禁食12 h后分别空腹口服供试制剂或参比制剂10 mg,分别于服药前(0 h)及服药后2、4、6、8、10、14、24、36、48、72、96、120 h采集上肢静脉血4.5 ml至肝素化试管中,离心(3 000 r/min)10 min,分离出血浆置-20℃冷冻保存(整个过程避光进行)。整个试验在临床医生、护士的监督下进行。

1.3 色谱条件 色谱柱:Shim-pack ODS C₁₈(2.0 mm×150 mm,5 μm);柱温:35℃;流动相:A相为含0.2%甲酸和0.5 mmol/L醋酸铵的水溶液,B相为甲醇,梯度洗脱。梯度洗脱程序如下:0.2~4.5 min,B:40%~98%;4.5~6.0 min,B:98%;6.0~6.5 min,B:98%~40%;6.5~11.0 min,B:40%;流速为0.2 ml/min。

1.4 质谱条件 离子化方式:电喷雾离子化(ESI);选择性离子监测(SIM);曲型脱溶剂装置(CDL)温度250℃;加热块(block)温度200℃;CDL电压:25 V;检测电压:+1.60 kV;检测离子:氨氯地平([M+Na]⁺,m/z):431.00,内标([M+H]⁺,m/

z):419.00;雾化气流速1.5 L/min;干燥气流速2.0 L/min。

1.5 血样处理 取血浆1.0 ml,精密加入10 μl内标(2.0 μg/ml尼莫地平),再加0.1 mol/L Na₂CO₃200 μl,混匀后加6 ml乙醚,振荡5 min,4 500 r/min离心5 min,取上清液4.5 ml,置40℃恒温水浴,用N₂吹干,以100 μl甲醇溶解,取5 μl进样。

1.6 标准曲线制备 取空白人血浆1.0 ml,加不同量的标准品,使其浓度分别为0.1、0.25、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0和20.0 ng/ml,按1.5项下条件处理后进样,记录样品和内标峰面积,利用样品浓度C对样品与内标峰面积比R作直线回归。

1.7 精密度测定 苯磺酸氨氯地平浓度分别为0.25、2.5和10.0 ng/ml的系列血样,1 d内重复进样5次求日内精密度,连续测定5 d求日间精密度。

1.8 回收率测定 苯磺酸氨氯地平浓度分别为0.25、2.5和10.0 ng/ml的系列血样各1 ml,按1.5项下方法处理并测定其浓度,以标准血浆样品苯磺酸氨氯地平测得量与加入量相比。

1.9 数据处理 据苯磺酸氨氯地平片血药浓度,绘制血药浓度-时间曲线,用BAPP程序计算主要药代动力学参数。供试制剂相对于参比制剂的生物利用度 $F = AUC_{0-t_n}(\text{供}) / AUC_{0-t_n}(\text{参})$ 。对AUC及C_{max}数据进行对数转换,再进行方差分析和双单侧t检验。

2 结果

2.1 方法专属性 见图1。结果表明药物及内标峰形良好,血浆中内源性杂质不干扰药物的测定,基线噪音小,苯磺酸氨氯地平和内标的保留时间分别为6.1 min和7.8 min。

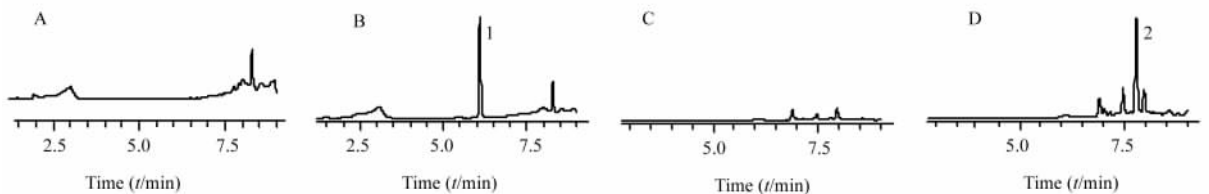


图1 典型选择离子色谱图

Fig 1 LC-MS chromatograms of amlodipine besylate in plasma

A,C: Blank plasma; B,D: Plasma samples of volunteer; 1: Amlodipine besylate; 2: Nimodipine

2.2 方法学考察 本方法中苯磺酸氨氯地平的线性范围为0.1~20.0 ng/ml,最低定量浓度为0.1

ng/ml,回归方程 $R = 0.1416C + 0.0008$, $r = 0.9997(n=5)$ 。0.25、2.5和10.0 ng/ml苯磺酸氨

氯地平的日内回收率 RSD 分别为 7.83%、3.48%、3.82%；日间回收率 RSD 分别为 4.89%、1.92%、1.47%。其方法回收率分别为 $(97.72 \pm 7.52)\%$ 、 $(93.83 \pm 3.63)\%$ 、 $(93.40 \pm 6.26)\%$ 。

2.3 人体药代动力学研究 20 名健康受试者单剂量口服 10 mg 苯磺酸氨氯地平供试制剂或参比制剂后的平均药-时曲线见图 2, 主要药动力学参数见表 1。将供试制剂与参比制剂的 C_{\max} 、 AUC_{0-120} 、 $AUC_{0-\infty}$ 药动力学参数对数转换后, 进行方差分析, 结果无显著差异, 说明两制剂具有生物等效性。苯磺酸氨氯地平片剂的相对生物利用度为 $(102.6 \pm 12.7)\%$ 。

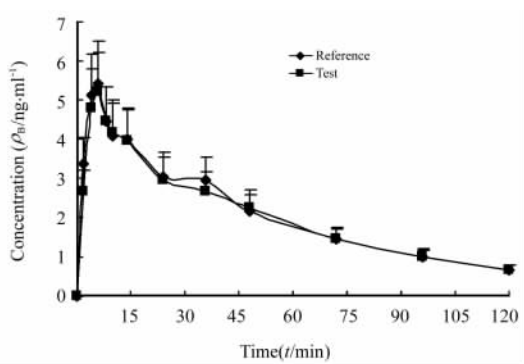


图 2 口服苯磺酸氨氯地平片后的平均药-时曲线

Fig 2 Concentration-time curve after oral dose of amlodipine besylate tablet

$n=20, \bar{x} \pm s$

表 1 苯磺酸氨氯地平的主要药动力学参数

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of amlodipine besylate tablets

$(n=20, \bar{x} \pm s)$

Parameters	Test	Reference
$t_{1/2\beta}$ (t/h)	40.45 ± 6.68	43.74 ± 9.05
T_{\max} (t/h)	6.0 ± 2.3	6.1 ± 2.5
C_{\max} (ρ_B /ng · ml ⁻¹)	6.21 ± 1.88	6.03 ± 1.08
AUC_{0-120} (ng · ml ⁻¹ · h ⁻¹)	250.68 ± 52.61	246.14 ± 52.11
$AUC_{0-\infty}$ (ng · ml ⁻¹ · h ⁻¹)	291.30 ± 69.39	290.47 ± 65.55

3 讨论

目前测定人血浆苯磺酸氨氯地平方法有二级质谱法^[1-3]、高效液相色谱法^[5-7]和分光光度法^[8], 但多采用 HPLC 方法, 由于氨氯地平血浆浓度仅为纳克级水平, 一般的高效液相色谱法难以准确测定, 故本

试验参考文献^[4]报道建立单级质谱 LC-MS 测试法, 该方法具有简便、灵敏、精确度高的特点, 在保证样本测定准确性基础上, 而不需采用二级质谱联用, 可以用于测定体内苯磺酸氨氯地平的血药浓度。

国内文献^[4-5]报道的苯磺酸氨氯地平测定前血样样品处理方法多采用乙酸乙酯、正己烷等有机溶剂多步提取或采用固相萃取方法, 预处理和测定手段比较复杂, 本研究建立的健康人体内血药浓度的 LC-MS 测定方法, 尝试采用单一乙醚作为萃取有机相, 只需有机溶剂进行一步萃取, 大大简化了血浆样品的处理过程, 此方法特异性好、无干扰, 精密度、灵敏度等均符合人体内血药浓度监测和药动力学研究的要求, 可以满足体内低浓度药物测定并能很好的进行生物大样本分析。

本方法测得苯磺酸氨氯地平的相对生物利用度为 $(102.6 \pm 12.7)\%$, 两制剂的主要药动力学参数经统计学分析差异无显著性, 表明两制剂在吸收速度和吸收程度上具有生物等效性。

[参考文献]

- [1] Streeb B, Laine C, Zimmer C. Enantiomeric determination of amlodipine in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry[J]. Biochem Biophys Methods, 2002, 54: 357-368.
- [2] 张 琰, 杨 蕾, 刘 梅, 等. 苯磺酸氨氯地平片在健康人体的药理学及生物等效性评价[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27: 172-174.
- [3] 栾 燕, 张逸凡, 陈笑艳, 等. 氨氯地平在中国受试者体内的药物动力学及制剂的生物等效性[J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17: 327-329.
- [4] 张孝清, 陆宏国, 徐玉凤, 等. 苯磺酸氨氯地平片相对生物利用度研究[J]. 中国新药杂志, 2003, 12: 849-851.
- [5] 韩启银, 张根元, 陶伟博, 等. 高效液相色谱法测定苯磺酸氨氯地平分散片的含量[J]. 江苏药学与临床研究, 2005, 13: 19-20.
- [6] 刘新宇, 吴 芳, 范国荣, 等. 苯磺酸左旋氨氯地平片的 RP-HPLC 测定及其含量均匀度考察[J]. 药学实践杂志, 2001, 19: 222-224.
- [7] 汪正宇. 苯磺酸氨氯地平片的 HPLC 测定[J]. 安徽医药, 2006, 10: 581-582.
- [8] 袁 成, 焦素云, 王景祥. 氨氯地平片在健康人和高血压患者中的药物动力学[J]. 中国医院药学杂志, 1996, 16: 435-438.

[收稿日期] 2006-11-06

[修回日期] 2007-02-01

[本文编辑] 尹 茶