

LC-MS/MS 法测定人血浆中奈比洛尔浓度及其在中国人体内的药代动力学

司 倩, 陈渊成, 黄黎华, 程 昱, 何 华, 柳晓泉*

(中国药科大学药物代谢与动力学研究中心, 南京 210009)

摘 要 本文建立了一种快速测定人血浆中奈比洛尔血药浓度的 LC-MS/MS 法, 并研究其在中国健康人体内的药代动力学行为。以氨氯地平作为内标, 采用 C₁₈ 反相柱(150 mm × 2.0 mm, 4.6 μm), 柱温 35 °C。流动相为乙腈-水(含 0.05% 甲酸)(45:55), 流速 0.2 mL/min; 电喷雾离子化(ESI), 正离子扫描, 选择性反应监测(SRM) 药和内标分别为: 奈比洛尔 m/z 406.2 → 151.0; 氨氯地平 m/z 409.0 → 238.2。在本文建立的方法下, 奈比洛尔在 0.025 ~ 25 ng/mL 呈良好的线性关系, $r = 0.9986$, 最低检测浓度为 0.008 ng/mL, 低、中、高浓度下的回收率、日内及日间精密性均符合方法学要求。健康受试者口服 5 mg 奈比洛尔片后的 $t_{1/2}$, AUC_{0-t} , c_{max} , MRT 分别为: (14.4 ± 5.5) h, (7.35 ± 2.48) ng·h/mL, (1.05 ± 0.35) ng/mL, (16.5 ± 5.3) h。结果表明: 该方法专属性强, 适用于奈比洛尔血样的定量分析。

关键词 奈比洛尔; LC-MS/MS; 药代动力学

中图分类号 R969.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2011)02-0136-140

Determination of nebivolol in human plasma by LC-MS/MS and study of its pharmacokinetics on the Chinese

SI Qian, CHEN Yuan-cheng, HUANG Li-hua, CHENG Yu, HE Hua, LIU Xiao-quan*

Center of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract A simple, sensitive and rapid liquid chromatographic-electro-spray ionization tandem mass spectrometric method was developed for the quantification of nebivolol in human plasma. Amlodipine was used as the internal standard (IS). Separation was performed using a Shimadzu C₁₈ column (150 mm × 2.0 mm, 4.6 μm) maintained at 35 °C and the mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile and water (containing 0.05% formic acid) (45:55) was delivered at a flow rate of 0.2 mL/min; The analytes were analyzed by electro-spray ionization (ESI) in the selected reaction monitoring mode. The precursor to product ion transitions of m/z 406.2-151.0 and m/z 409.0-238.2 were used to measure nebivolol and the IS, respectively. The linearity ranged from 0.025 to 25 ng/mL ($r = 0.9986$); and the limit of detection of nebivolol in human plasma was 0.008 ng/mL. The recovery, intra- and inter-assay precisions met the requirements of bioanalytical method. The $t_{1/2}$, AUC_{0-t} , c_{max} , MRT of nebivolol in healthy volunteers were (14.4 ± 5.5) h, (7.35 ± 2.48) ng·h/mL, (1.05 ± 0.35) ng/mL, and (16.5 ± 5.3) h for a single oral dose of 5 mg nebivolol, respectively. The method is selective and suitable for the quantification of nebivolol in human plasma.

Key words nebivolol; LC-MS/MS; pharmacokinetics

奈比洛尔是一个脂溶性的 β₁ 受体阻断剂, 不仅对 β₁ 受体具有高选择性, 而且具有血管舒张活性, 但奈比洛尔不会引起支气管平滑肌和血管平滑肌收缩, 无内源性拟交感活性, 无膜稳定作用, 对胰岛素

敏感性无影响, 不影响脂类代谢且不和 5-羟色胺受体、多巴胺受体和肾上腺素能 α₁、α₂ 受体结合^[1]。因此, 奈比洛尔避免了其他受体阻断剂引起的不良反应, 而且有望在糖尿病患者及高脂血症患者的降

压方面发挥重要作用。奈比洛尔降压效果显著,且所需浓度也较其他受体阻断剂低,不良反应小^[2]。

由于奈比洛尔是经过 CYP2D6 代谢,而 CYP2D6 又有着明显的代谢多态性,在不同代谢人群体内的药代动力学参数有着较大差异^[3]。目前已报道的有关奈比洛尔药代动力学的研究均是在外国人体内进行的^[4-8],临床用药也是依据奈比洛尔在外国人体内的药代动力学研究结果,因此,测定及研究奈比洛尔在中国人体内的药代动力学具有重要意义。

奈比洛尔在人体内的血药浓度较低,目前国外文献报道的奈比洛尔血浆浓度测定的方法有 LC-APCI-MS^[7],HPLC-荧光^[9],LC-API-MS-MS^[10],国内文献少见。本研究采用 LC-ESI-MS-MS 进行奈比洛尔血药浓度测定,方法简单、快速、灵敏,并研究奈比洛尔在中国人体内的药代动力学行为,为指导中国人临床用药提供依据。

1 材 料

1.1 药品与试剂

奈比洛尔片(江西青峰药业有限公司,批号:20081228,规格:5 mg/片);氨氯地平(辉瑞制药有限公司);乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司);水为超纯水,其他试剂为市售分析纯。

1.2 仪 器

Finnigan TSQ Quantum 高效液相色谱质谱联用仪(美国 Thermo 公司);XW-80A 旋涡混合器(上海沪西分析仪器厂有限公司);5430R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);Forma 700 Series 超低温冰箱(美国 Thermo 公司)。

2 方 法

2.1 色谱条件

色谱柱:Shimadzu C₁₈ 柱(150 mm × 2.0 mm, 4.6 μm);流动相:乙腈-水(含 0.05% 甲酸) = 45:55;流速:0.2 mL/min;柱温:35 °C;进样量:4 μL。内标:氨氯地平。

2.2 质谱条件

电喷雾离子化(ESI);选择性反应监测(SRM);毛细管温度:310 °C;电离电压:4 500 V;鞘气:N₂;流量:30 L/min;辅助气:Ar,流速:5 L/min;扫描方式:正离子扫描。选择母离子/子离子离子对及其碰撞

能量如下:奈比洛尔, m/z 406.2 → m/z 151.0 (29 eV);氨氯地平, m/z 409.0 → m/z 238.2 (20 eV)。

2.3 对照品溶液的配制

精密称取奈比洛尔标准品 10.0 mg,用乙腈溶解并定容,配制成 1.00 mg/mL 贮备液,临用时用乙腈-水(50:50)的溶液稀释到相应的浓度。

精密称取氨氯地平标准品 10.0 mg,用甲醇溶解并定容,配制成 1.00 mg/mL 贮备液,临用时用甲醇-水(50:50)的溶液稀释成 50 ng/mL 的内标液。

2.4 血浆样品的处理

取人血浆 500 μL,精密加入 50 ng/mL 内标液 25 μL,涡旋振荡 30 s,加入 0.1 mmol/L NaOH 溶液 50 μL,涡旋振荡 30 s;加入提取液(二氯甲烷-乙醚,30:70)4 mL,涡旋振荡 3 min,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液 3 mL,置 40 °C 恒温水浴,用 N₂ 吹干。以乙腈 100 μL 溶解残渣,经 12 000 r/min 离心 10 min 后,取上清液 80 μL,再次以 12 000 r/min 转速离心 10 min,取上清液 4 μL 进样,用峰面积比进行定量分析。

2.5 标准曲线的制备

精密量取奈比洛尔标准贮备液,用乙腈-水(50:50)溶液稀释成 0.5,1,5,10,50,100,200 和 500 ng/mL 的标准溶液,分别吸取上述系列浓度的标准溶液 25 μL 于空白血浆 475 μL 中,按上述“2.4”项下方法处理,得血浆质量浓度分别为 0.025,0.05,0.25,0.5,2.5,5,10 和 25 ng/mL 的标准溶液。

2.6 药代动力学实验

健康志愿者 12 名,试验前均签署知情同意书,经检查血常规,肝、肾功能,心电图均正常,无药物过敏史及滥用史,经伦理委员会批准。所有受试者禁食 10 h 以上,试验当日空腹单次服用试验试剂奈比洛尔片剂 1 片(5 mg),温水 240 mL 送服,服药后 2 h 允许饮水,4 h 和 10 h 后统一进标准餐。健康受试者取样点选择在给药前 0 h 及给药后 0.25,0.5,1,1.5,2,3,4,6,8,10,12,18,24,36,48 h 分别取静脉血 4 mL,置肝素化试管中,3 500 r/min 离心 10 min,分离血浆,于 -20 °C 贮存。测定时采用“2.4”项下方法提取后,进样。

2.7 药代动力学参数计算及数据处理

峰浓度 c_{\max} 和达峰时间 t_{\max} 是直接从测定结果

中获得,非房室模型药代动力学参数采用标准的方法计算:消除速率常数 K_e 采用血药浓度-时间曲线的末端消除相的最小线性回归分析计算,消除半衰期 $t_{1/2}$ 采用 0.693 除以消除速率常数 K_e 来计算,末端曲线下面积 AUC_{0-t} 采用线性梯形面积法计算, 0 h 到无穷的曲线下面积 $AUC_{0-\infty}$ 采用以下公式计算: $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + c_t/K_e$ (c_t 代表最终采血点时的浓度),血浆药物清除率 CL 采用 $c_0/AUC_{0-\infty}$ 来计算 (c_0 代表给药剂量) 及表观分布容积 V_d 采用血浆药物清除率 CL 除以消除速率常数 K_e 来计算。实验数据及药代动力学参数的计算结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 方法专属性

取空白血浆,空白血浆加入奈比洛尔后及健康志愿者受试者血浆,按“2.4”项下方法提取后,进行 SRM 扫描测定,考察其专属性。在本试验条件下,内标氨氯地平 and 奈比洛尔的保留时间 (t_R) 分别为 1.67 min 和 1.72 min,血浆中的内源性物质不干扰奈比洛尔色谱峰和内标峰,见图 1。

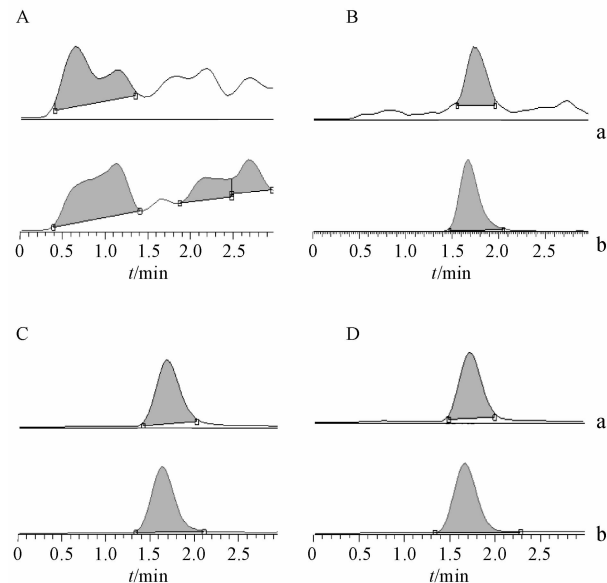


Figure 1 SRM ion-chromatograms resulting from the analysis of (A) blank (drug and internal standard free) human plasma for nebulivol and IS; (B) 25 pg/mL (LLOQ) of nebulivol spiked with IS; (C) plasma sample from forehead vein at 8 h after an oral dose of 5 mg nebulivol spiked with IS to the human subjects; and (D) 500 pg/mL of nebulivol spiked with IS. a: nebulivol, $t_R = 1.72$ min; b: IS, $t_R = 1.67$ min

3.2 线性范围

精密量取各个浓度的奈比洛尔贮备液 25 μ L 于

空白血浆 475 μ L 中,并加入质量浓度为 50 ng/mL 的内标液 25 μ L,制备成血浆浓度为 $0.025, 0.05, 0.25, 0.5, 2.5, 5, 10$ 和 25 ng/mL 标准曲线,共 5 份。按“2.4”项下方法提取后,进样,以奈比洛尔峰面积与内标峰面积之比 R 对标准品加入量(浓度 c) 作线性回归,得相应的回归方程: $R = 0.00075c + 0.055$, $r = 0.9986$,权重系数 $1/C^2$ 。按上述方法人血浆中奈比洛尔的线性范围为 $0.025 \sim 25$ ng/mL,最低检测限为 0.008 ng/mL。

3.3 方法回收率

取空白人血浆 475 μ L,加入奈比洛尔标准品使其质量浓度分别为 $0.05, 0.5$ 和 10 ng/mL,低、中、高 3 种浓度下的血浆样品各 5 份。按“2.4”项下方法处理后进样,测定奈比洛尔的浓度。以实测浓度与加入的浓度之比乘以 100% 计算奈比洛尔的相对回收率,结果见表 1。

3.4 精密度和准确度

取空白人血浆 475 μ L,加入奈比洛尔标准品使其质量浓度分别为 $0.05, 0.5$ 和 10 ng/mL,低、中、高 3 种浓度下的血浆样品各 5 份。按“2.4”项下方法处理后进样,测定日内及日间精密度,结果见表 1。

3.5 稳定性

3.5.1 室温放置稳定性 取新鲜血浆 475 μ L,加入不同量的奈比洛尔标准液,使质量浓度分别为 $0.05, 0.5$ 和 10 ng/mL,样品分成两组,一组即刻处理,另一组于室温放置 8 h 后,按照“2.4”项下方法处理,低、中、高浓度室温放置 8 h 后测定回收率和 RSD,结果见表 2。

3.5.2 进样板放置稳定性 取新鲜人血浆 475 μ L,加入不同量的奈比洛尔标准液,使质量浓度分别为 $0.05, 0.5$ 和 10 ng/mL,按照“2.4”项下方法处理,分别在 0 h 和 24 h 进样,比较两者的回收率,考察样品在进样板上放置的稳定性,低、中、高浓度 4 $^{\circ}$ C 进样板放置 24 h 后测定的回收率和 RSD,结果见表 2。

3.5.3 血浆样品冻融稳定性 取新鲜血浆 475 μ L,加入不同量的奈比洛尔标准液,使质量浓度分别为 $0.05, 0.5$ 和 10 ng/mL,样品分成两组,一组即刻处理,另一组于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱冻存 24 h 后,在 37 $^{\circ}$ C 水浴中溶解,统一按照“2.4”项下方法处理,低、中、高浓度在经过 3 个冻融循环后测定的回

收率和 RSD, 结果见表 2。

Table 1 Recovery and precision of nebivolol in human plasma ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Added (ng/mL)	Recovery		Intra-day		Inter-day	
	Recovery/%	RSD/%	Found/(ng/mL)	RSD/%	Found/(ng/mL)	RSD/%
0.05	101.99 ± 8.68	8.51	0.05 ± 0.003	7.59	0.05 ± 0.004	8.51
0.5	109.71 ± 6.14	5.59	0.48 ± 0.05	11.14	0.55 ± 0.03	5.59
10	103.98 ± 8.95	8.61	9.96 ± 0.67	6.77	10.40 ± 0.90	8.61

3.5.4 冻存稳定性 取新鲜血浆 475 μL , 加入不同量的奈比洛尔标准液, 使质量浓度分别为 0.05、0.5 和 10 ng/mL, 样品分成两组, 一组即刻处理, 另

一组于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存 30 d 后, 按照“2.4”项下方法处理, 低、中、高浓度在经过 30 d 冻存后测定的回收率和 RSD, 结果见表 2。

Table 2 Stability of nebivolol with different concentrations in human plasma ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Storage condition	0.05		0.5		10 ng/mL	
	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%
A	106.42 ± 13.21	12.41	109.20 ± 3.43	3.14	99.08 ± 7.95	8.03
B	112.28 ± 6.42	5.71	95.02 ± 7.91	8.32	92.34 ± 3.88	4.20
C	100.54 ± 10.03	9.98	94.48 ± 4.24	4.48	101.2 ± 4.05	4.00
D	106.44 ± 5.87	5.52	93.20 ± 5.54	5.95	93.65 ± 5.07	5.42

A: After 8 h at room temperature; B: After 24 h in autosampler at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; C: After three freeze-and-thaw cycles at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; D: at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 days

奈比洛尔低、中、高 3 种浓度的质控样品在室温放置 8 h、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进样板放置 24 h、反复冻融 3 次及长期冻存后测定的回收率和 RSD 表明奈比洛尔在上述条件下稳定, 符合生物样品测定的要求。

3.6 基质效应

取洁净玻璃试管, 分别加空白血浆 500 μL 和水 500 μL , 加入 0.1 mmol/L NaOH 50 μL , 涡旋混匀 30 s, 加入提取液(二氯甲烷-乙醚, 30:70) 4 mL 提取, 涡旋振荡 3 min, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 3 mL, 于 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中, N_2 挥干。加入高、中、低 3 个浓度的标准品(浓度分别为 0.05, 0.5 和 10 ng/mL) 25 μL 、内标 25 μL 及乙腈 50 μL 溶解残渣, 11 800 r/min 离心 10 min, 取上清液 80 μL , 11 800 r/min 离心 10 min, 取上清液 60 μL , 进样 4 μL 。用空白血浆样品处理结果比纯水处理的结果, 计算基质效应。低、中、高浓度测得基质效应的比值(%) 分别为 91.93, 104.06 和 107.59(表 3)。上述结果表明奈比洛尔样品在本实验条件下几乎不受基质效应的影响, 符合生物样本测定的要求。

Table 3 Matrix effects of nebivolol ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Added/(ng/mL)	Water		Blood		Ratio/%
	Mean area	RSD/%	Mean area	RSD/%	
0.05	37 706.2	8.37	34 663.40	6.72	91.93
0.5	271 972.00	8.19	283 003.60	5.73	104.06
10	4 931 662.60	5.46	5 305 994.40	2.45	107.59

3.7 药代动力学研究结果

由标准曲线方程测得各时间点受试志愿者血浆中奈比洛尔浓度, 并计算出各药代动力学参数, 结果见表 4, 受试志愿者口服奈比洛尔平均血药浓度-时间曲线见图 2。

Table 4 Pharmacokinetic parameters of nebivolol in healthy volunteers after a single oral administration of 5 mg nebivolol tablets ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Parameter	Value
$c_{\text{max}}/(\text{ng/mL})$	1.05 ± 0.35
t_{max}/h	1.30 ± 0.70
$t_{1/2}/\text{h}$	14.4 ± 5.50
MRT/h	16.5 ± 5.30
$\text{AUC}_{0-t}/(\text{ng}\cdot\text{h/mL})$	7.35 ± 2.48
$\text{AUC}_{0-\infty}/(\text{ng}\cdot\text{h/mL})$	7.98 ± 2.76
CL/F/(L/h)	701.67 ± 250.70
$V_d/F/(\text{L})$	14 592.50 ± 6 608.12

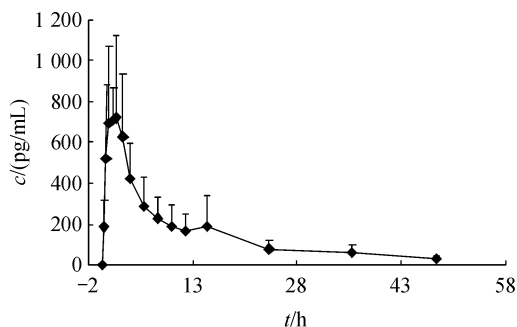


Figure 2 Mean plasma concentration-time curves of nebivolol in healthy Chinese volunteers after a single oral administration of 5 mg nebivolol tablets. $\bar{x} \pm s, n = 12$

4 讨论

奈比洛尔的血浆浓度测定方法,目前在国内外还未见报道,在国外报道的文献中主要测定方法有 HPLC-荧光, LC-API-MS-MS, LC-APCI-MS 测定,但前两种方法灵敏度较低,后一种方法不仅灵敏度低、提取方法也较复杂。本文建立的 LC-ESI-MS/MS 法测定人血浆中奈比洛尔的浓度,灵敏度高,而且每个样本测试仅需 3 min,大大缩短了分析周期。

在建立定量分析方法时,对流动相的 pH、流动相的组成及比例,复溶液等进行了优化筛选。流动相尝试了用甲醇及乙腈,但相同条件下乙腈做流动相应更高;同时也尝试了用不同比例的甲酸或甲酸-醋酸铵缓冲液做流动相,但综合下来用 0.05% 甲酸的响应最高,峰形好;奈比洛尔的保留时间在有机相比例范围为 30% ~ 70% 时变化不太明显,但响应及峰形变化较大,最终确定流动相比例为乙腈-水(含 0.05% 甲酸)(45:55)。血浆样品的处理过程尝试了沉淀蛋白(甲醇、乙腈)、固相萃取、不同比例、组成的有机溶剂的液液萃取等方法,但沉淀蛋白响应很低,固相萃取过程繁琐,其他有机溶剂如乙酸乙酯、叔丁基醚、异丙醇、异戊醇及上述各种溶剂的不同比例的混合溶剂作为提取剂,出现血浆空白干扰大,线性不理想,基质效应明显等问题;复溶液也尝试用流动相,流动相加酸和水等,但出现响应偏低,线性不理想等问题,最终采取本文建立的血浆样品处理方法对样品进行处理。

在本文建立的色谱及质谱条件下,奈比洛尔的血药浓度的测定不受血浆中内源性物质的干扰,其回收率及精密度均能达到生物样品测定的要求。采用本实验建立的方法对 12 名健康志愿者进行药代动力学研究,奈比洛尔在中国人体内的主要药代动力学参数:血浆消除半衰期 $t_{1/2}$ 为 (14.4 ± 5.5) h,峰浓度 c_{\max} 为 (1.05 ± 0.35) ng/mL,达峰时间 t_{\max} 为 (1.30 ± 0.70) h,血药浓度曲线下面积 AUC_{0-t} 为 (7.35 ± 2.48) ng·h/mL;国外文献中报道的奈必洛尔在人体内的主要药代动力学参数结果分别为: $t_{1/2}$ 为 11.2 h, c_{\max} 为 1.4 ng/mL, t_{\max} 为 1.2 h, AUC_{0-t} 为 7.76 ng·h/mL。上述数据说明奈必洛尔在中国人体内的药代动力学参数与国外文献报道的快代谢者的药代动力学参数相似^[11-12],提示奈比洛尔在中国人体内的药代动力学行为与外国人相

似,不具有种族差异性,因此奈比洛尔在中国人中的临床治疗方案可借鉴现有的国外治疗方案。

参考文献

- [1] Dars MA, Doevendans PA, Bekkers BC, *et al.* Nebivolol: a third-generation β -blocker that augments vascular nitric oxide release endothelial β_2 Adrenergic receptor-mediated nitric oxide production[J]. *Circulation*, 2000, **102**(2): 677-684.
- [2] Simon G, Johnson ML. Comparison of antihypertensive and β_1 -adrenoreceptor antagonist effect of nebivolol and atenolol in eddential hypertension[J]. *Clin Exp Hypertens*, 1993, **15**(3): 501-509.
- [3] Van Peer A, Snoeck E, Woestenborghs R. Clinical pharmacokinetics of nebivolol. A review[J]. *Drug Invest*, 1991, **3**(Suppl 1): 25-30.
- [4] Himmelmann A, Hedner T, Snoeck E, *et al.* Haemodynamic effects and pharmacokinetics of oral d- and l-nebivolol in hypertensive patients[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 1996, **51**(3/4): 259-264.
- [5] Cheymol G, Woestenborghs R, Snoeck E, *et al.* Pharmacokinetic study and cardiovascular monitoring of nebivolol in normal and obese subjects[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 1997, **5**(6): 493-498.
- [6] Charles L, Stephan O, Andrew S, *et al.* Effects of commonly administered agents and genetics on nebivolol pharmacokinetics: Drug-drug interaction studies[J/OL]. (2010-05-20) [2010-11-23]. <http://jcp.sagepub.com/content/early/2010/05/19/0091270010370846.long>.
- [7] Selvan PS, Gowda KV, Mandal U, *et al.* Simultaneous determination of fixed dose combination of nebivolol and valsartan in human plasma by liquid chromatographic-tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, **858**(1/2): 143-150.
- [8] Lefebvre J, Poirier L, Poirier P, *et al.* The influence of CYP2D6 phenotype on the clinical response of nebivolol in patients with essential hypertension[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2007, **63**(5): 575-582.
- [9] Woestenborghs R, Embrechts L, Heykants J. *Methodological Surveys in Biochemistry and Analysis*: Vol. 18[M]. New York: Plenum Press, 1988: 215-216.
- [10] Maurer HH, Tenberken O, Kratzsch C, *et al.* Screening for library-assisted identification and fully validated quantification of 22 beta-blockers in blood plasma by liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization[J]. *J Chromatogr A*, 2004, **1058**(1/2): 169-181.
- [11] Moen MD, Wagstaff AJ. Nebivolol: a review of its use in the management of hypertension and chronic heart failure[J]. *Drugs*, 2006, **66**(10): 1389-1409.
- [12] Gray CL, Ndefo UA. Nebivolol: a new antihypertensive agent[J]. *Am J Health-Syst Pharm*, 2008, **65**(12): 1125-1133.