

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定血浆中氨氯地平

LCMSMS-133

摘要： 本文建立并验证了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8080 联用测定血浆中氨氯地平的方法。方法采用同位素内标法定量，方法定量限 50 pg/mL，线性范围为 50~10000 pg/mL，相关系数在 0.9992。方法选择性实验表明空白血浆中不存在明显干扰；方法的日内精密度的 2.32~7.43%，日间精密度 2.44~8.99%，各浓度水平质控样品的准确度 85.6~115.4%，能够很好地满足血浆中药物浓度准确定量的要求；各浓度水平质控样品氨氯地平的回收率均大于 85%，基质效应因子均大于 95%，内标归一化基质效应因子均在 97% 左右；另外，系统残留率考察结果表明高浓度样品分析后在系统中的残留量不影响低浓度样品的定量准确性。方法具有分析速度快、灵敏高、重复性好的特点，适合血浆中氨氯地平含量的快速检测，可用于人体氨氯地平血药浓度的测定及其制剂的人体药代动力学研究。

关键词： 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 血浆 氨氯地平 药代动力学

氨氯地平是一种 1,4-二氢吡啶类的钙离子拮抗剂，阻滞心肌和血管平滑肌细胞外钙离子细胞膜的钙离子通道进入细胞，直接舒张血管平滑肌，临床主要用于治疗高血压和心绞痛。该药具有服药剂量低、药效维持时间长等特点。

目前文献报道生物样品中氨氯地平浓度测定的方法，主要有气相色谱法 (GC)、高效液相色谱法 (HPLC)，液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS)，酶联吸附免疫

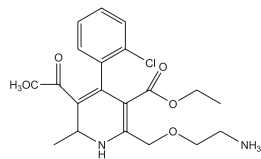
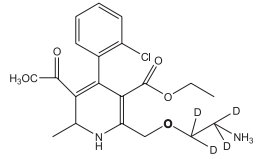
分析 (ELISA) 法等。针对以往检测方法检测限低，样品前处理过程复杂、费时等特点，本实验建立了一种灵敏度更高、样品前处理过程简单的 LC-MS/MS 方法，用于准确测定人血浆中氨氯地平含量。

实验部分

1.1 化合物信息

目标化合物及内标化合物信息见表 1

表1 化合物信息

化合物名称	英文名CAS No.	分子式	结构式
氨氯地平Amlodipine	88150-42-9	$C_{20}H_{25}ClN_2O_5$	
氨氯地平D4 (IS)	Amlodipine-D4 88150-42-9	$C_{20}H_{21}D_4ClN_2O_5$	

1.2 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8080 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8080 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.53 SP2 色谱工作站。

1.3 分析条件

液相条件

色谱柱：Inertsil Sustain C18 (2.0 mm I.D. × 50 mm L., 2 μm)

流动相：A 相 - 2 mM 醋酸铵，0.1% 甲酸水溶液
B 相 - 乙腈

流速：0.3 mL/min

柱温：40°C

进样量：15 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20%，洗脱程序见表 2。

表2 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	100
2.50	Pumps	Pump B Conc.	100
2.70	Pumps	Pump B Conc.	20
4.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8080

离子源: ESI, 正离子模式分析

Probe 温度: 250°C

HSID 温度: 200°C

雾化气流速: 1.5 L/min

加热气流速: 12.0 L/min

雾帘气: 3.0 L/min

离子源电压: 2.0 kV

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

MRM 参数: 见表 3

表3 MRM参数

名称	前体离子	产物离子	驻留时间 (ms)	EV (V)	CE(V)	CCL4(V)
氨氯地平	409.05	238.05	150	20.0	-19.0	-15.0
氨氯地平 -D4 (内标)	413.20	238.10	150	20.0	-19.0	-15.0

1.4 标准样品和质控样品的配制

用甲醇配制两份 1.0 mg/mL 氨氯地平储备液。一份储备液用 50% 甲醇溶液逐级稀释成浓度为 2.5 ng/mL、5.0 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL、500 ng/mL 的标准工作曲线；另一份储备液用 50% 甲醇溶液逐级稀释成浓度为 7.5 ng/mL、75 ng/mL、4000 ng/mL 的质控溶液。取 20 μ L 标准工作曲线加入 980 μ L 空白血浆中，依次配制成标准曲线 50 pg/mL、100 pg/mL、200 pg/mL、500 pg/mL、1000 pg/mL、2000 pg/mL、5000 pg/mL、10000 pg/mL；取 20 μ L 质控溶液加入 980 μ L 空白血浆中，依配制成低浓度 (LQC) 150 pg/mL、中浓度 (MQC) 1500 pg/mL、高浓度 (HQC) 8000 pg/mL 质控样。

用甲醇配制 1.0 mg/mL 氨氯地平 -D4 储备液，50% 甲醇溶液进一步稀释成浓度为 50 ng/mL 的内标溶液。

1.5 样品前处理方法

取 100 μ L 血浆样品，加入 20 μ L 内标溶液 (50 ng/mL)，加入 200 μ L 乙腈，涡旋振荡 1 分钟，10000 r/min 离心 5 分钟，取上清液进样分析，进样体积 15 μ L。

1.6 方法验证

考察方法的选择性，对空白基质样品进行样品前处理后进样分析。

最低定量限 (LLOQ) 的考察，分别处理 6 份

LLOQ 样品，分析结果满足 6 次的相对标准偏差不超过 20%，测量误差不得超过理论值的 80~120%，同时目标化合物大于 10 倍信噪比。

线性关系的考察，通过分析空白血浆配制的标准曲线，在三个不同的分析批中对线性关系进行考察，采用浓度与化合物面积和内标面积比值计算回归曲线，权重采用 1/C。

方法精密度和准确度的考察，在方法验证的三个分析批中考察三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (150 pg/mL、1500 pg/mL、8000 pg/mL)，日内精密度通过计算一个分析批中每个质控样品浓度的相对标准偏差，日间精密度通过计算不同天完成的三个分析批中每个质控样品浓度的相对标准偏差；方法准确度通过公式计算：测量浓度 / 理论浓度 \times 100% 计算。准确度在 85~115% 范围内，精密度不超过 15%。

氨氯地平回收率考察三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次)，比较经过样品前处理的质控样品和空白基质后加标样品，两者的目标化合物面积平均值的比值为回收率。

基质效应的考察三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次)，通过比较空白基质后加标样品与浓度一致的标准溶液，两者的目标化合物面积平均值所得比值评价基质效应。

结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

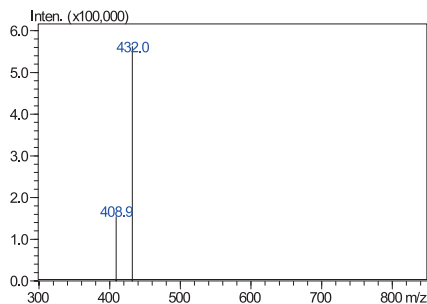


图1 氨氯地平的一级质谱图

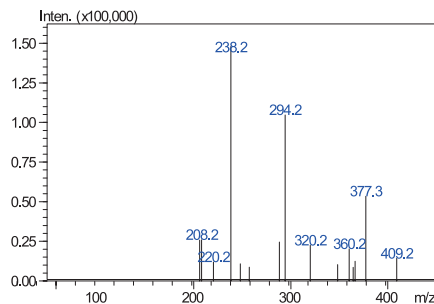


图2 氨氯地平的产物离子扫描图(CE值-25 V)

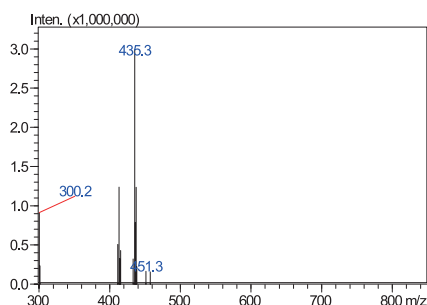


图3 氨氯地平-D4的一级质谱图

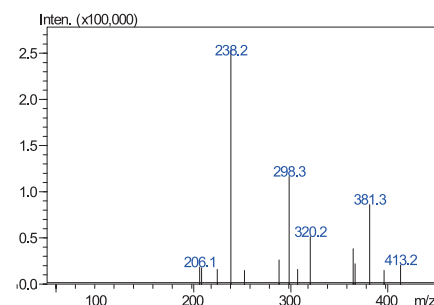


图4 氨氯地平-D4的产物离子扫描图(CE值-25 V)

2.2 方法选择性

考察空白基质和 50 pg/mL 血浆基质加标样品，结果如图 5、6 所示，氨氯地平及其内标的检测通道中目标化合物的干扰均不对最低定量限造成干扰。

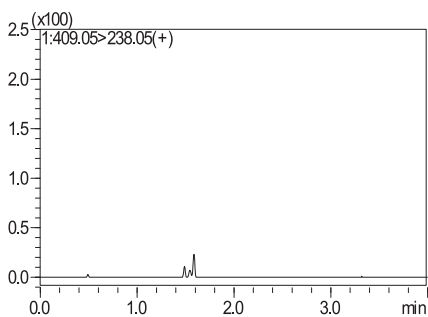


图5 空白血浆样品的MRM色谱图

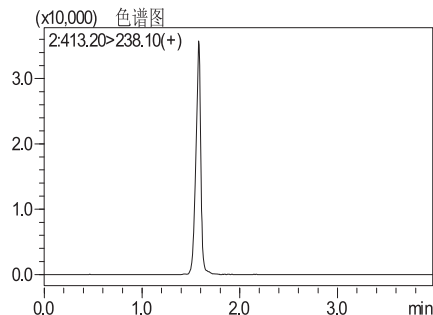
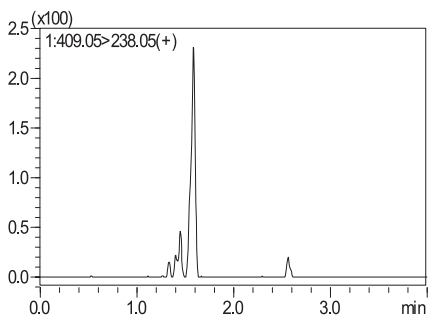
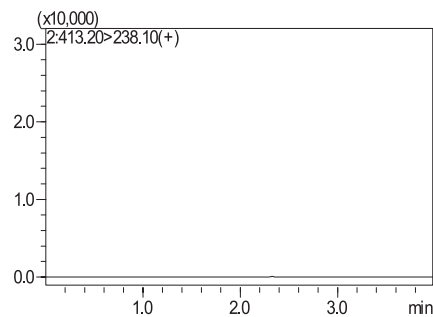


图6 50 pg/mL血浆基质加标样品的MRM色谱图

2.3 线性范围和最低定量限

按照 1.4 中的条件制备 50 pg/mL、100 pg/mL、200 pg/mL、500 pg/mL、1000 pg/mL、2000 pg/mL、5000 pg/mL、10000 ng/mL 的血浆加标样品，按 1.5 中的前处理条件处理样品，按照 1.3 中的仪器条件进行测定，同位素内标法进行定量。所得校准曲线如图 7 所示，线性方程及相关系数见表 4，其中 y 值代表氨氯地平峰面积与氨氯地平 -D4 峰面积的比值，x 值代表血浆中氨氯地平浓度与内标浓度（以 1 计）的比值。方法检出限确定为 50 pg/mL，在此浓度水平，精密度和准确度均在接受标准内，6 次重复分析 RSD 为 5.92%，准确度为 95.5~110.6%，S/N 平均值为 28.3。

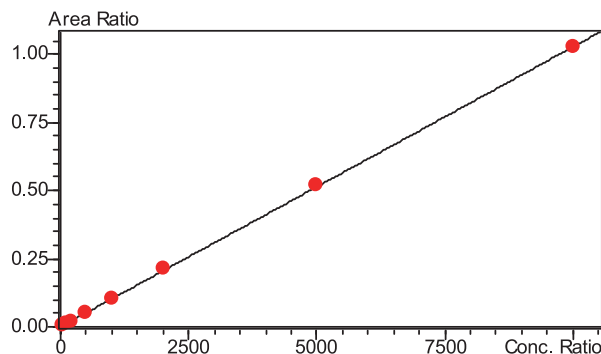


图7 氨氯地平标准曲线

表4 校准曲线参数（线性回归，权重为1/C²）

化合物	校准曲线	线性范围 (pg/mL)	准确度(%)	相关系数 r
氨氯地平	$Y = (1.03 \times 10^{-4})X + (3.06 \times 10^{-4})$	50~10000	93.1~108.1%	0.9999

2.4 方法精密度和准确度考察

考察三个浓度水平质控样品的日间精密度和日内精密度，结果如表 5 所示。方法的日内精密度 2.37~6.06%，日间精密度 2.56~7.52%，各浓度水平质控样品的准确度 88.3~112.3%。

表5 方法日间精密度和日内精密度结果(3天，每天重复6次)

理论浓度 (pg/mL)	日内精密度 RSD%	日间精密度 RSD%	准确度%
150	7.43	8.99	87.5~109.4
1500	2.41	4.37	95.4~112.1
8000	2.32	2.44	95.4~103.1

2.5 方法回收率考察

考察三个质控样品 LQC、MQC、HQC（每个浓度重复 6 次）的回收率，结果如表 6 所示，各浓度水平氨氯地平的回收率均大于 80%。

表6 方法回收率结果(n=6)

浓度水平	浓度 (pg/mL)	平均回收率 %
LQC	150	85.5
MQC	1500	85.6
HQC	8000	88.9

2.6 基质效应考察

基质效应的考察三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC（每个浓度重复 6 次），分别计算各浓度水平的基质效应及内标归一化基质效应，结果见表 7，各浓度水平基质效应因子均大于 85%，内标归一化基质效应因子均大于 105%。

表7 基质效应考察结果(n=6)

浓度水平	理论浓度 (pg/mL)	基质效应因子	内标归一化基质 效应因子
LQC	150	85.6%	96.7%
MQC	1500	85.9%	97.1%
HQC	8000	85.8%	96.7%
内标基质效应因子		88.4%	

2.7 系统残留考察 (Carryover)

考察系统残留的影响，完成浓度最高点分析后，其后分析空白样品中氨氯地平的峰面积，空白样品中氨氯地平及其内标物的通道中均没有明显的目标化合物色谱峰。

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 MS-8080 联用测定血浆中氨氯地平的方法。该方法在 4 min 内完成血浆中氨氯地平的检测，采用同位素内标法定量，方法定量限 50 pg/mL，线性范围为 50~10000 pg/mL，相关系数在 0.9999。选择性考察结果表明空白血浆中对分析造成明显干扰的物质；方法的日内精密度 2.32~7.43%，日间精密度 2.44~8.99%，各浓度水平质控样品的准确度 85.6~115.4%，能够满足血浆中药物浓度准确定量的要求；各浓度水平氨氯地平的回收率均大于 85%，基质效应因子均大于 95%，内标归一化基质效应因子在 97% 左右；系统残留率考察结果表明高浓度样品分析后在系统中的残留量不影响低浓度样品的定量准确性。方法具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的特点，适合血浆中氨氯地平含量的快速准确检测。