

## LC-MS/MS 法测定人血浆中硝苯地平 and 去氢硝苯地平

陈雪飞<sup>1,2</sup>, 侯翔宇<sup>2</sup>, 陈笑艳<sup>2</sup>, 钟大放<sup>1,2\*</sup>

(1. 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

**摘要:** 硝苯地平是一种二氢吡啶类钙拮抗剂, 通过 CYP3A4 代谢生成主要代谢物去氢硝苯地平。本文建立了液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 法同时测定人血浆中的硝苯地平及其代谢物去氢硝苯地平。采用  $d_6$ -硝苯地平/ $d_6$ -去氢硝苯地平作为内标, 血浆样品经乙腈沉淀蛋白后, 通过 Hypersil Gold C<sub>18</sub> (50 mm×2.1 mm, 1.9 μm) 色谱柱分离, 以甲醇-0.1% 甲酸的 5 mmol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵水溶液作为流动相。采用电喷雾离子源 (ESI 源), 以多反应监测正离子模式检测, 用于定量分析的硝苯地平 and 去氢硝苯地平的离子对分别为  $m/z$  347.3→254.1 和  $m/z$  345.2→283.9, 内标的离子对分别为  $m/z$  353.3→257.1 和  $m/z$  351.2→286.9。线性范围硝苯地平为 0.10~80.0 ng·mL<sup>-1</sup>, 去氢硝苯地平为 0.050~40.0 ng·mL<sup>-1</sup>。与文献报道方法相比, 色谱分离得到改善, 检测灵敏度显著提高。本方法经验证后, 成功应用于人血浆中硝苯地平 (CYP3A4 底物) 与阿帕替尼 (CYP3A4 抑制剂) 的相互作用研究。本文临床试验经伦理委员会批准, 并在中国医科大学第一附属医院进行。

**关键词:** 液相色谱-串联质谱; 硝苯地平; 去氢硝苯地平

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)02-0360-06

## Rapid and simultaneous determination of nifedipine and dehydronifedipine in human plasma

CHEN Xue-fei<sup>1,2</sup>, HOU Xiang-yu<sup>2</sup>, CHEN Xiao-yan<sup>2</sup>, ZHONG Da-fang<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China;

2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** Nifedipine, a calcium channel antagonist, is metabolized mainly by CYP3A4 to dehydronifedipine. A rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed to simultaneously determine nifedipine and dehydronifedipine in human plasma using  $d_6$ -nifedipine/ $d_6$ -dehydronifedipine as internal standards. After extraction from the plasma by protein precipitation, the analytes and internal standard were separated on a Hypersil Gold C<sub>18</sub> (50 mm×2.1 mm, 1.9 μm). The mobile phase consisted of methanol and 5 mmol·L<sup>-1</sup> ammonium acetate aqueous solution (0.1% formic acid). Positive electrospray ionization was performed using multiple reaction monitoring (MRM) with transitions of  $m/z$  347.3→254.1 for nifedipine,  $m/z$  345.2→283.9 for dehydronifedipine,  $m/z$  353.3→257.1 for  $d_6$ -nifedipine,  $m/z$  351.2→286.9 for  $d_6$ -dehydronifedipine. The method had a linear calibration curves over the concentrations of 0.10-80.0 ng·mL<sup>-1</sup> for nifedipine and 0.050-40.0 ng·mL<sup>-1</sup> for dehydronifedipine. The validated LC-MS/MS method has been successfully used study pharmacokinetic interactions of apatinib (CYP3A4 inhibitor) and nifedipine (CYP3A4 substrate) in human. This clinical trial was approved by the society of ethics and conducted in the first hospital of China medical university.

**Key words:** LC-MS/MS; nifedipine; dehydronifedipine

收稿日期: 2018-08-20; 修回日期: 2018-10-15.

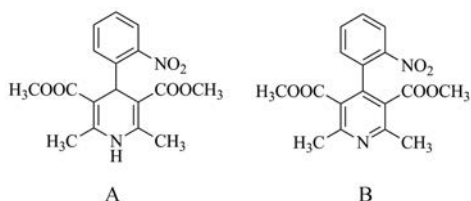
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81521005).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-21-50800738, E-mail: dfzhong@simm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0764

硝苯地平[nifedipine, 1,4-二氢-2,6-二甲基-4-(2-硝基苯)-3,5-吡啶二羧酸二甲酯, 图 1A], 是一种二氢吡啶类钙拮抗剂, 是临床中用于治疗心绞痛和高血压的首选药物之一。硝苯地平具有光敏性, 在可见光下会使硝基还原成亚硝基, 在紫外光下, 会使二氢吡啶环氧化形成吡啶环。在光照下,  $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的硝苯地平的溶液的半衰期为  $13.8 \text{ h}^{[1]}$ 。在人体中, 硝苯地平主要通过 CYP3A4 酶代谢, 形成其代谢物去氢硝苯地平 (dehydronifedipine, 图 1B)<sup>[2]</sup>。CYP3A4 酶是人体 CYP450 酶系中含量最高的酶, 当 CYP3A4 酶被抑制或诱导时, CYP3A4 底物 (如硝苯地平) 的药理学可能会发生明显的改变。葡萄柚汁<sup>[3]</sup>、西咪替丁<sup>[4]</sup>等均能与硝苯地平发生药物-药物相互作用。Balogh 等<sup>[5]</sup>研究发现, 在口服两种避孕药 21 天后, 同时口服硝苯地平 and 单独口服硝苯地平相比, 人血清中硝苯地平的平均  $\text{AUC}_{0-23.5 \text{ h}}$  变化不大, 但其代谢物去氢硝苯地平的平均  $\text{AUC}_{0-23.5 \text{ h}}$  却相应减少了 24% 和 25%, 表明了硝苯地平代谢减慢。所以硝苯地平是评价药物相互作用的常用药物, 测定硝苯地平 and 代谢物去氢硝苯地平的血浆浓度是评价硝苯地平药物相互作用的一个重要指标。

目前, 多种 LC-MS/MS 方法测定了血浆中硝苯地平的浓度<sup>[6-13]</sup>, 其中 3 篇文献同时测定了血浆中硝苯地平和去氢硝苯地平的浓度<sup>[6-8]</sup>。文献<sup>[6]</sup>中报道的方法分析时间长 (15 min), 血浆用量大 ( $0.5 \sim 1.2 \text{ mL}$ )<sup>[6,7]</sup>, 去氢硝苯地平定量下限高 ( $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )<sup>[8]</sup>。本试验 (经伦理委员会批准, 在中国医科大学附属第一医院进行) 旨在建立快速、灵敏、简便的 LC-MS/MS 法测定人血浆中硝苯地平及其代谢物去氢硝苯地平的浓度, 并用于研究阿帕替尼对硝苯地平的相互作用研究。



**Figure 1** The chemical structures of nifedipine (A), dehydronifedipine (B)

## 材料与方法

**药品和试剂** 硝苯地平 (大连美仑生物技术有限公司, 批号: S1222AS, 纯度: 98.42%)、去氢硝苯地平 (大连美仑生物技术有限公司, 批号: 2-IHB-157-1, 纯度: 98%)、 $d_6$ -硝苯地平 (上海赛抑生物科技有限公司, 批号: 1-GRS-72-1, 纯度: 96.0%, 同位素纯度: 99.6%)、 $d_6$ -去氢硝苯地平 (上海甄准生物科技有限公司, 批号:

2-IHB-157-1, 纯度: 99.36%, 同位素纯度: 99.2%); 甲醇、乙腈 (德国 Merck 公司), 甲酸 (日本 TCI 公司), 醋酸铵 (美国 ROE 公司) 均为色谱纯; 去离子水由法国 Millipore 超纯水仪制备;

**仪器** 质谱系统, Triple Quad 5500 型三重四极杆串联质谱仪, 配备电喷雾电离源 (ESI 源), 美国 AB Sciex 公司; 液相色谱系统, 包括 DGU-20A5R 脱气机, LC-30AD 液相色谱泵, SIL-30AC MP 自动进样器, CTO-20A 柱温箱; Analyst 1.6.3 定量处理软件, 美国 AB Sciex 公司。

**色谱条件** 分析柱: Hypersil Gold C<sub>18</sub> ( $50 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$ ,  $1.9 \mu\text{m}$ ), 美国 Thermo 公司; 流动相: A 相 (含 0.1% 甲酸的  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  醋酸铵水溶液), B 相 (甲醇); 采用的梯度洗脱程序如下:  $0 \sim 0.3 \text{ min}$ , 40% B;  $0.3 \sim 1.0 \text{ min}$ , 40%~70% B;  $1.0 \sim 2.0 \text{ min}$ , 70% B;  $2.0 \sim 2.1 \text{ min}$ , 70%~40% B;  $2.1 \sim 3.0 \text{ min}$ , 40% B。流速为  $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 柱温为  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , 进样量为  $5.00 \mu\text{L}$ 。

**质谱条件** 离子源为电喷雾电离源 (ESI 源), 正离子方式检测; 源喷射电压为  $5 \text{ 500 V}$ ; 温度为  $500 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 离子源气体 1 ( $\text{N}_2$ ) 压力为  $30 \text{ psi}$  ( $1 \text{ psi} \approx 6.9 \text{ kPa}$ ); 离子源气体 2 ( $\text{N}_2$ )  $30 \text{ psi}$ ; 气帘气体 ( $\text{N}_2$ ) 压力为  $35 \text{ psi}$ , 扫描方式为多反应检测 (MRM), 碰撞气压力为  $6 \text{ psi}$ ; 扫描时间为  $200 \text{ ms}$ 。待测物用于 MRM 检测的定量离子反应为:  $m/z \text{ 347.3} \rightarrow 254.1$  (硝苯地平)、 $m/z \text{ 353.3} \rightarrow 257.1$  ( $d_6$ -硝苯地平)、 $m/z \text{ 345.2} \rightarrow 283.9$  (去氢硝苯地平)、 $m/z \text{ 351.2} \rightarrow 286.9$  ( $d_6$ -去氢硝苯地平)。

**标准系列样品和质控样品的配制** 精密称取硝苯地平和去氢硝苯地平对照品各两份, 用甲醇-水 (50:50, v/v) 溶解并定容, 获得质量浓度为  $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的硝苯地平和去氢硝苯地平的储备液, 分别用于配制标准系列溶液和质控溶液。

取硝苯地平和去氢硝苯地平的储备液和 QC 储备液, 用甲醇-水 (50:50, v/v) 稀释, 获得硝苯地平和去氢硝苯地平的质量浓度为  $2.00/1.00$ 、 $4.00/2.00$ 、 $8.00/4.00$ 、 $40.0/20.0$ 、 $80.0/40.0$ 、 $400/200$ 、 $800/400$ 、 $1 \text{ 600}/800 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准系列溶液和浓度为  $2.00/1.00$ 、 $6.00/3.00$ 、 $60.0/30.0$ 、 $1 \text{ 280}/640 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的质控溶液。精密称取  $d_6$ -硝苯地平和  $d_6$ -去氢硝苯地平对照品各一份, 用甲醇-水 (50:50, v/v) 溶解并定容, 获得质量浓度为  $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的内标储备液。然后用甲醇-水 (50:50, v/v) 稀释, 获得  $d_6$ -硝苯地平和  $d_6$ -去氢硝苯地平的浓度为  $5.00/2.50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的内标工作溶液。

取标准系列溶液和质控溶液  $10.0 \mu\text{L}$ , 加入人空白血浆  $190 \mu\text{L}$ , 获得质量浓度为  $0.100/0.050$ 、 $0.200/0.100$ 、 $0.400/0.200$ 、 $2.00/1.00$ 、 $4.00/2.00$ 、 $20.0/10.0$ 、 $40.0/$

20.0、80.0/40.0 ng·mL<sup>-1</sup>的标准系列样品和0.100/0.050 0、0.300/0.150、3.00/1.50、64.0/32.0 ng·mL<sup>-1</sup>的质控样品。

**血浆样品预处理** 取血浆样品50.0 μL,加入内标溶液(*d*<sub>6</sub>-硝苯地平/*d*<sub>6</sub>-去氢硝苯地平,浓度为5.00/2.50 ng·mL<sup>-1</sup>)50.0 μL,加入乙腈150 μL,涡流1 min,离心5 min。取上清液5.00 μL,进行LC-MS/MS分析。

**方法验证** 对建立的方法进行方法验证,参照中国药典2015年版指导原则<sup>[14]</sup>和欧盟EMA相关指导原则<sup>[15]</sup>,从方法的选择性、标准曲线和定量下限、精密度和准确度、稳定性、回收率、基质效应等方面进行了验证。

**选择性** 取6个不同来源的人空白血浆以及相应人空白血浆配制的LLOQ样品进行LC-MS/MS分析,考察是否有干扰测定。

根据文献<sup>[16]</sup>报道,M1-1、M1-2、M1-6以及M9-2为阿帕替尼在人体内的主要代谢物,而且在口服甲磺酸阿帕替尼750 mg达到稳态后,肿瘤患者血浆中阿帕替尼及其代谢物M1-1、M1-2、M1-6、M9-2的达峰浓度分别为3 935、1470、571、786和2 843 nmoL·L<sup>-1</sup>。采用人空白血浆配制阿帕替尼/M1-1/M1-2/M1-6/M9-2/硝苯地平/去氢硝苯地平质量浓度分别为4 000/2 000/2 000/4 000/0.100/0.050 0 ng·mL<sup>-1</sup>的血浆样品,按“血浆样品预处理”项下操作,进行6样本分析,并根据当日标准曲线计算硝苯地平 and 去氢硝苯地平的测得浓度,计算该浓度的精密度和准确度,评价阿帕替尼及其代谢物对硝苯地平 and 去氢硝苯地平测定的影响。

**标准曲线** 样品处理按照“血浆样品预处理”项下操作,以每个待测物浓度为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标,用加权( $W = 1/x^2$ )最小二乘法进行回归运算,求得的标准曲线的相关系数( $r^2$ )均大于0.99。

**定量下限** 取LLOQ血浆样品,进行6样本分析,连续测定3天,并根据当日标准曲线计算每一样本的测得浓度,计算该浓度的日内和日间精密度和准确度。

**精密度和准确度** 取硝苯地平/去氢硝苯地平低、中、高浓度QC样品,按“血浆样品预处理”项下操作,每个浓度进行6样本分析,分别在3日内测试测定日内、日间的精密度和准确度。

**基质效应** 分别取6份不同来源的空白人血浆60.0 μL,加入乙腈180 μL,涡流1 min,离心5 min。取上清液190 μL于另一试管中,加入硝苯地平/去氢硝苯地平对照质控溶液(硝苯地平/去氢硝苯地平溶液质量浓度分别为1.50/0.750、15.0/7.50、320/160 ng·mL<sup>-1</sup>)10.0 μL和内标溶液50.0 μL,涡流混匀,取5.00 μL进行

LC-MS/MS分析,分别获得相应的待测物和内标的峰面积。同时另取水60.0 μL代替空白血浆,按上述处理,分别获得相应的待测物和内标的峰面积。以两种处理方法的峰面积比值分别计算分析物和内标的基质效应,计算公式为处理后的空白基质加入待测物获得的峰面积/待测物相同浓度标准溶液获得的平均峰面积×100%,并以分析物和内标的基质效应比值计算内标归一化的基质效应。

取一份溶血血浆和高脂血浆,分别配制低、高两浓度的质控样品(硝苯地平/硝苯地平的血浆质量浓度分别为0.300/0.150和64.0/32.0 ng·mL<sup>-1</sup>),按“血浆样品预处理”项下操作,每一浓度进行六样本分析。根据当日标准曲线计算溶血样品和高脂样品的精密度、准确度,评价溶血和高脂血浆样品的基质效应。

**回收率** 采用人空白血浆配制低、中、高三个浓度(硝苯地平/去氢硝苯地平血浆浓度分别为0.300/0.150、3.00/1.50和64.0/32.0 ng·mL<sup>-1</sup>),按“血浆样品预处理”项下操作,每一浓度进行六样本分析(A)。同时另取人空白血浆60.0 μL,加入乙腈180 μL,涡流1 min,离心5 min。取上清液190 μL于另一试管中,加入硝苯地平/去氢硝苯地平对照质控溶液(硝苯地平/去氢硝苯地平溶液浓度分别为1.50/0.750、15.0/7.50、320/160 ng·mL<sup>-1</sup>)10.0 μL和内标溶液50.0 μL,涡流混匀,每一浓度进行六样本分析(B)。取5.00 μL进行LC-MS/MS分析。以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算回收率,计算公式为A/B×100%。

**稳定性** 考察硝苯地平/去氢硝苯地平人血浆样品室温放置24 h、经沉淀蛋白处理后室温放置24 h、血浆样品经历-20℃、-70℃三次冷冻-解冻循环稳定性和-20℃、-70℃长期放置稳定性。

**人体药动学研究和数据分析** 临床试验经伦理委员会批准,在中国医科大学附属第一医院进行。采用自身对照的试验设计,受试者于第1天早晨空腹服用硝苯地平控释片30 mg,并进行药代采血。然后自第9天到第21天连续服用甲磺酸阿帕替尼750 mg,第14天先空腹服用阿帕替尼750 mg后,再加服硝苯地平控释片30 mg,服药后进行药代采血;于第1天和第14天采集口服硝苯地平前(0 h)和服药后1、2、3、4、6、8、12、24、36和48 h的静脉血2 mL至肝素抗凝的试管中,分离血浆于-70℃以下保存。采用LC-MS/MS法测定硝苯地平和去氢硝苯地平的血浆浓度。

## 结果

### 1 质谱分析

在上述质谱条件下,硝苯地平、*d*<sub>6</sub>-硝苯地平、去氢

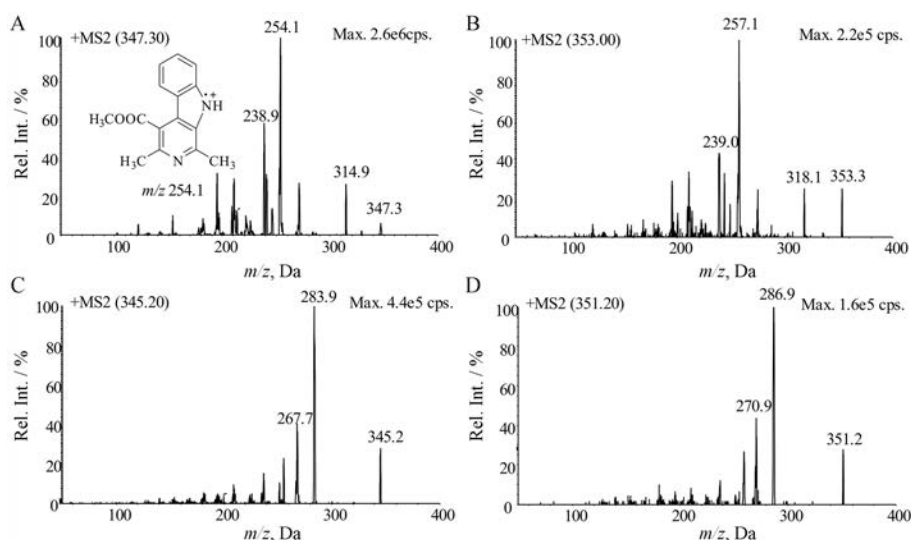
硝苯地平 and  $d_6$ -去氢硝苯地平主要产生  $m/z$  347.3、353.3、345.2 和 351.2 的  $[M+H]^+$  峰。选择性对  $[M+H]^+$  峰进行产物离子扫描, 硝苯地平的主要碎片离子为  $m/z$  315.0 和  $m/z$  254.1, 由于  $m/z$  347.3 $\rightarrow$ 315.0 的离子通道选择性不好, 基线高, 故选择  $m/z$  254.1 作为定量分析检测的产物离子, 同时  $d_6$ -硝苯地平选择  $m/z$  257.1 作为定量分析检测的产物离子。去氢硝苯地平 and  $d_6$ -去氢硝苯地平的主要碎片离子为  $m/z$  283.9 和 286.9。待测物和内标的产物离子扫描质谱图以及产物离子推断见

图2。其中, 硝苯地平在质谱中裂解形成产物离子  $m/z$  254.1 见文献<sup>[17]</sup>。

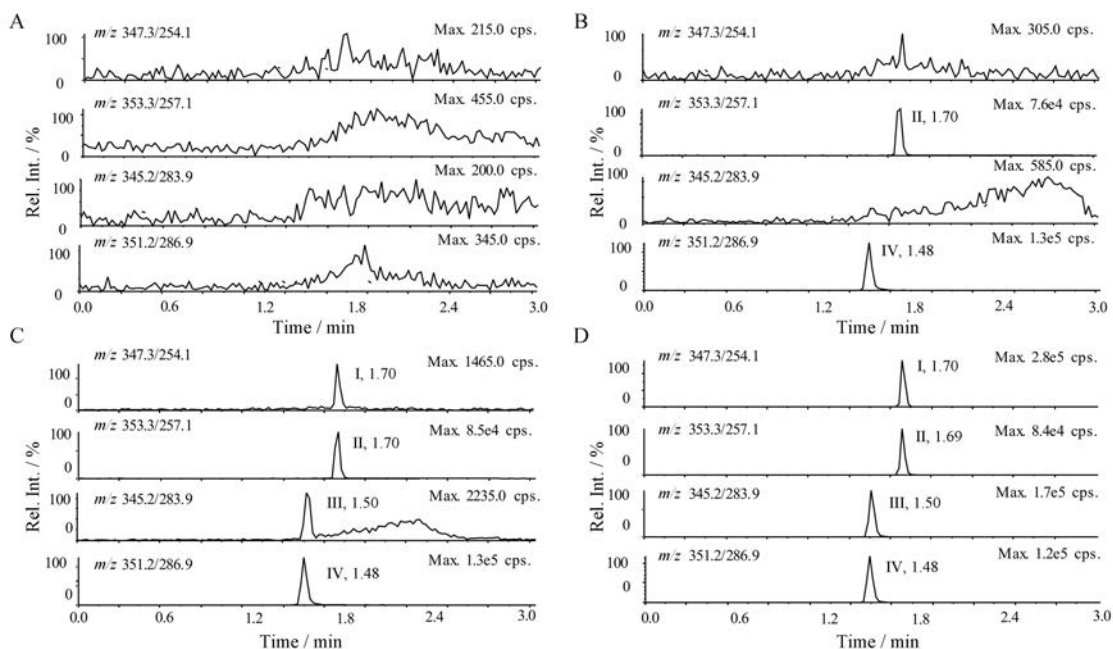
## 2 方法学验证

**2.1 选择性** 结果表明, 空白人血浆中的内源性物质不干扰待测物硝苯地平、去氢硝苯地平及内标  $d_6$ -硝苯地平、 $d_6$ -去氢硝苯地平的测定, 典型色谱图见图3。

在含有阿帕替尼及其代谢物的血浆中, 硝苯地平定量下限的精密度为 14.9%, 准确度为 -4.9%; 去氢硝苯地平定量下限的精密度为 6.4%, 准确度为 0.4%; 阿



**Figure 2** The chemical structures and product mass spectra of  $[M+H]^+$  ions of nifedipine (A),  $d_6$ -nifedipine (B), dehydronifedipine (C) and  $d_6$ -dehydronifedipine (D)



**Figure 3** Typical MRM chromatograms of nifedipine (I),  $d_6$ -nifedipine (II), dehydronifedipine (III),  $d_6$ -dehydronifedipine (IV) in human plasma. A: Blank plasma; B: Blank plasma spiked with  $5.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$   $d_6$ -nifedipine,  $2.50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$   $d_6$ -dehydronifedipine; C: Blank plasma spiked with  $0.10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  nifedipine,  $0.050 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  dehydronifedipine and  $5.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$   $d_6$ -nifedipine,  $2.50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$   $d_6$ -dehydronifedipine; D: 6 h after administrator of nifedipine (30 mg) alone

帕替尼及其代谢物对硝苯地平 and 去氢硝苯地平的测定没有影响。

**2.2 标准曲线** 测定人血浆硝苯地平 and 去氢硝苯地平的线性范围分别为  $0.10 \sim 80.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $0.050 \sim 40.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。典型标准曲线回归方程为: 硝苯地平,  $y = 0.142x + 7.98 \times 10^{-4}$  ( $r = 0.9994$ ); 去氢硝苯地平,  $y = 0.343x + 8.12 \times 10^{-4}$  ( $r = 0.9997$ )。

**2.3 定量下限** 血浆样品 (硝苯地平/去氢硝苯地平血浆质量浓度分别为  $0.100/0.050 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的硝苯地平的日内精密度的为 9.4%, 日间精密度的为 10.2%, 相对误差为 0.14%; 去氢硝苯地平的日内精密度的为 8.5%, 日间精密度的为 7.5%, 相对误差为 0.022%。结果表明 LC-MS/MS 同时测定人血浆中硝苯地平 and 去氢硝苯地平的定量下限分别可达到  $0.10$  和  $0.050 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**2.4 精密度和准确度** 精密度和准确度数据见表 1。每一浓度水平硝苯地平的 QC 样品的日内精密度的 (RSD) 均小于 7.9%, 日间精密度的 (RSD) 均小于 7.3%, 相对误差 (RE) 在 4.4%~7.5% 之间; 每一浓度水平的去氢硝苯地平的 QC 样品的日内精密度的 (RSD) 均小于 4.4%, 日间精密度的 (RSD) 均小于 6.5%, 相对误差 (RE) 在 3.3%~8.2% 之间。待测物低、中、高质控样品的日内和日间的精密度和准确度均符合生物样品测定相关要求。

**2.5 基质效应** 硝苯地平在低、中、高浓度经内标校正的基质效应分别为 104.4%、99.6% 和 100.8%, 相对偏差均小于 6.1%; 去氢硝苯地平在低、中、高浓度经内标校正的基质效应分别为 99.0%、97.2% 和 101.0%, 相

对偏差均小于 2.9%。结果表明, 待测物和内标在本实验选择的色谱和质谱条件下, 可忽略基质效应的影响。

溶血血浆配制的每一浓度水平的硝苯地平的质控样品的精密度的 (RSD) 均小于 7.8%, 相对误差 (RE) 在 6.9%~13.3% 之间, 去氢硝苯地平的质控样品的精密度的 (RSD) 均小于 4.1%, 相对误差 (RE) 在 7.5%~12.9% 之间。高脂血浆配制的每一浓度水平的硝苯地平的质控样品的精密度的 (RSD) 均小于 9.1%, 相对误差 (RE) 在 6.1%~6.6% 之间, 去氢硝苯地平的质控样品的精密度的 (RSD) 均小于 3.2%, 相对误差 (RE) 均为 5.1%。结果表明, 待测物在本实验选择的色谱和质谱条件下, 可忽略溶血和高脂基质效应的影响。

**2.6 样品处理回收率** 硝苯地平在低、中、高浓度的回收率分别为 103.0%、104.7% 和 107.6%; 去氢硝苯地平在低、中、高浓度的回收率分别为 100.5%、103.1% 和 102.6%。

**2.7 稳定性** 结果表明, 硝苯地平/去氢硝苯地平低、高两浓度血浆样品在不同储存条件下均稳定。

### 3 药动学研究

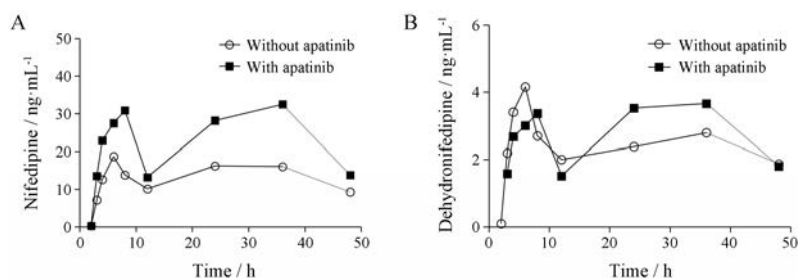
将所建立的并经过验证的此方法应用于硝苯地平 and 阿帕替尼相互作用的药动学研究。图 4 为其中一名受试者的药动学曲线。结果表明, 分析方法的定量下限低于  $C_{\max}$  的  $1/20$ , 满足药动学分析的要求。

### 讨论

由于硝苯地平的光敏性, 实验在钠灯的条件下操作。实验中发现硝苯地平 and 去氢硝苯地平离子通道之

**Table 1** The intra- and inter-day precision and accuracy of the QC samples of nifedipine and dehydronifedipine.  $n = 18$ ,  $\bar{x} \pm s$

Compound	Concentration/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	Mean $\pm$ SD/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	Precision (RSD, %)		Accuracy (RE, %)
			Intra-day	Inter-day	
Nifedipine	0.100	$0.100 \pm 0.010$	9.4	10.2	0.14
	0.300	$0.313 \pm 0.023$	7.9	7.3	4.4
	3.00	$3.23 \pm 0.14$	4.9	4.3	7.5
	64.0	$66.9 \pm 1.5$	2.5	2.2	4.6
Dehydronifedipine	0.0500	$0.0500 \pm 0.0037$	8.5	7.5	0.022
	0.150	$0.155 \pm 0.010$	4.4	6.5	3.3
	1.50	$1.62 \pm 0.05$	3.8	3.2	8.2
	32.0	$33.1 \pm 0.5$	2.0	1.5	3.5



**Figure 4** Plasma concentration-time profiles of (A) nifedipine, (B) dehydronifedipine following oral administration of 30 mg nifedipine tablet with or without apatinib mesylate in human.  $n = 18$ ,  $\bar{x} \pm s$

间会发生干扰, 首先考虑进行色谱的分离。在分离过程中, 分别考察了以甲醇和乙腈作为流动相。甲醇为流动相时, 更容易实现两者的色谱分离。但是当选择甲醇作为流动相时, 硝苯地平  $m/z$  347.3 $\rightarrow$ 315.0 的离子通道选择性不好, 基线高, 最后选择了  $m/z$  347.3 $\rightarrow$ 254.1 的离子通道。本实验同时也考察了阿帕替尼及其代谢物对硝苯地平与去氢硝苯地平测定的干扰, 实验中配制了高于阿帕替尼及其代谢物  $C_{\max}$  的血浆浓度与硝苯地平 and 去氢硝苯地平定量下限浓度的血浆样品, 发现阿帕替尼对硝苯地平 and 去氢硝苯地平的测定不会产生干扰。

本实验建立了灵敏的 LC-MS/MS 法测定人血浆中去氢硝苯地平的方法。本实验血浆样品中去氢硝苯地平的含量低, 而报道的方法中去氢硝苯地平的定量下限不能满足测样要求<sup>[8]</sup>, 血浆用量大<sup>[7]</sup>, 且没有实现硝苯地平 and 去氢硝苯地平的色谱分离<sup>[7,8]</sup>。实验通过新型质谱仪和质谱条件优化, 显著提高了灵敏度, 降低了血浆的用量, 且满足了测样的要求。通过使用稳定的同位素内标, 改善了方法的重现性。通过采用超高效液相色谱柱, 改善了色谱的分离。

## References

- [1] Grigoriev A, Nikitina A, Yaroshenko I, et al. Development of a HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of nifedipine and lidocaine in human plasma [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 131: 13-19.
- [2] Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, et al. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status [J]. *Arch Toxicol*, 2008, 82: 667-715.
- [3] Odou P, Ferrari N, Barthelemy C, et al. Grapefruit juice-nifedipine interaction: possible involvement of several mechanisms [J]. *J Clin Pharma Ther*, 2005, 30: 153-158.
- [4] Smith SR, Kendall MJ, Lobo J, et al. Ranitidine and cimetidine; drug interactions with single dose and steady-state nifedipine administration [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1987, 23: 311-315.
- [5] Balogh A, Gessinger S, Svarovsky U, et al. Can oral contraceptive steroids influence the elimination of nifedipine and its primary pyridine metabolite in humans? [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 1998, 54: 729-734.
- [6] Streeb B, Zimmer C, Sibenaler R, et al. Simultaneous determination of nifedipine and dehydronifedipine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 1998, 720: 119-128.
- [7] Wang XD, Li JL, Lu Y, et al. Rapid and simultaneous determination of nifedipine and dehydronifedipine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to a clinical herb-drug interaction study [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 852: 534-544.
- [8] Hu N, Lu XY, Zhao D, et al. Determination the concentration of nifedipine and its metabolite dehydronifedipine in rat plasma by LC-MS/MS [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2017, 33: 2420-2423.
- [9] Wang D, Jiang K, Yang SY, et al. Determination of nifedipine in human plasma by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B*, 2011, 879: 1827-1832.
- [10] Patel DP, Sharma P, Sanyal M, et al. Highly sensitive and rapid ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of nifedipine in human plasma and its application to a bioequivalence study [J]. *Biomed Chromatogr*, 2012, 26: 1509-1518.
- [11] Reddy S, Ahmad I, Nayak N, et al. Estimation of nifedipine in human plasma by LCMS/MS [J]. *Asian J Pharm Clin Res*, 2013, 83-86.
- [12] Pan XG, Zhou SC, Fu QQ, et al. Determination of nifedipine in dog plasma by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection [J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28: 1036-1040.
- [13] Goswami D, Gurule SJ, Singh P, et al. Method development challenges and regulatory expectation in nifedipine [J]. *Int J Pharmacokinet*, 2017, 2: 21-37.
- [14] Chinese Pharmacopoeia Commission. Guidance for Bioanalytical Method Validation. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2015 ed. Vol 4. pp. 363-368. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 363-368.
- [15] European Medicines Agency. Guideline on Bioanalytical Method Validation [S/OL]. London: European Medicines Agency. 2011 [2015-12-10]. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf).
- [16] Ding JF. Metabolism and Pharmacokinetics of Apatinib, a Novel Antineoplastic Compound, in Humans (抗肿瘤新药阿帕替尼在人体内的代谢和药动学研究) [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2013.
- [17] Yang MH, Zhang F, Hou YT, et al. Screening of illegally adulterated 1,4-dihydropyridine calcium antagonists in traditional Chinese medicines by a high-performance liquid chromatography electrospray ionization in-source collision-induced dissociation triple quadrupole mass spectrometric method [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2018, 32: 672-676.