

• 临床检验研究论著 •

LC-MS/MS 法测定人血浆中非诺贝特酸^{*}张 丹, 刘 曼, 王晓琳, 张丽娜, 赵红娜, 韩 静, 刘会臣[△]

(航天中心医院临床药理室, 北京 100049)

摘要:目的 建立快速、灵敏的测定人血浆中非诺贝特酸的 LC-MS/MS 方法。方法 人血浆样本以甲醇沉淀蛋白后, 选用 Zorbax SB-C18 Narrow-Bore 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 5 μm), 以甲醇 0.1% 甲酸(80:20, v/v) 为流动相, 流速为 0.40 mL/min; 选用 API3200 型三重四极杆串联质谱仪的多重反应监测(MRM)扫描方式进行监测, 电喷雾离子化源(ESI), 负离子方式, 选择监测离子反应分别为 m/z 316.9→ m/z 230.9(非诺贝特酸)和 m/z 355.9→ m/z 312.2(内标吲哚美辛)。结果 非诺贝特酸和吲哚美辛的保留时间分别为 1.99 min 和 2.08 min; 血浆中非诺贝特酸的线性范围为 0.050 0~30.0 μg/mL($r>0.99$), 定量下限为 0.050 0 μg/mL; 批内、批间相对标准偏差(RSD)均小于 3.0%; 相对误差(RE)均不超过±9.0%的范围; 平均提取回收率为(99.0±2.4)%; 稳定性试验中, 在储备液和各种贮存条件下的血浆中, 非诺贝特酸均较稳定。结论 该方法快速、灵敏、准确、专属性强、重现性好, 适用于人血浆中非诺贝特酸浓度的测定, 并成功应用于中国健康受试者口服非诺贝特胶囊后非诺贝特酸的药代动力学研究。

关键词:非诺贝特; 药代动力学; 色谱法, 液相; 吲哚美辛

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.13.024

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)13-1688-03

LC-MS/MS determination of fenofibric acid in human plasma

Zhang Dan, Liu Man, Wang Xiaolin, Zhang Lina, Zhao Hongna, Han Jing, Liu Huichen[△]

(Department of Clinical Pharmacology, Aerospace Center Hospital, Beijing 100049, China)

Abstract: **Objective** To develop a rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) method for the quantitation of fenofibric acid in human plasma. **Methods** After protein precipitation with methanol, the analyte and internal standard (IS) were separated on a Zorbax SB-C18 Narrow-Bore analytical column with the mobile phase of methanol and 0.1% formic acid (80:20, v/v) at a flow rate of 0.40 mL/min. Detection was performed using negative multiple reaction monitoring (MRM) mode by electrospray ionization (ESI) mass spectrometry. The MRM transitions of m/z 316.9→ m/z 230.9 and m/z 355.9→ m/z 312.2 were used to quantify fenofibric acid and indomethacin (IS), respectively. **Results** Fenofibric acid and IS were eluted at 1.99 and 2.08 min, respectively. The calibration curve was linear over the concentration range of 0.050 0–30.0 μg/mL with the lower limit of quantitation (LLOQ) 0.050 0 μg/mL. Intra- and inter-batch relative standard deviations were both less than 3.0%, and the relative errors were within ±9.0%. The mean extract recoveries were (99.0±2.4)%. In the stability studies, fenofibric acid was found to be stable in stock solution and plasma under various storage conditions. **Conclusion** The established method is rapid, sensitive, accurate, selective, reliable and sufficient for the determination of fenofibric acid in human plasma, and is successfully applied to a pilot pharmacokinetic study of fenofibric acid in healthy Chinese subjects after a single oral dose.

Key words: fenofibrate; pharmacokinetics; chromatography, liquid; indomethacin

非诺贝特(fenofibrate)是苯氧芳酸衍生物, 化学名为 2-甲基-2-[4-(4-氯苯甲酰基)苯氧基]丙酸异丙酯, 是临床常用的高效、速效的调血脂药物, 可显著降低血清 TG、TC 和 LDL-C 及升高 HDL-C 水平, 且毒副反应小^[1-2]。非诺贝特还可改善内皮功能、减少炎症反应、增加胰岛素敏感性及减少微量白蛋白尿, 有助于减少糖尿病并发症, 尤其适用于 2 型糖尿病及代谢综合征的患者。与他汀类药物联用可更好地改善致动脉粥样硬化的血脂谱, 并具有较好的耐受性^[3]。非诺贝特在吸收进入体内的同时, 即被组织及血浆酯酶迅速、完全地水解, 形成活性代谢产物非诺贝特酸(fenofibric acid), 血浆中检测不到原型药物, 但可通过检测非诺贝特酸的浓度来反映非诺贝特吸收的速度和程度^[4]。非诺贝特自 1975 年研制成功并上市以来, 已有许多新剂型和以微粒化为基础的口服制剂, 以及降低剂量规格和给药剂量的口服制剂相继在美国上市^[5-8]。而国内非诺贝特

口服制剂(片剂、胶囊、缓释片、缓释胶囊及以微粒化为基础的片剂、分散片、咀嚼片、胶囊等)的批准文号和生产厂家也已多达 90 余个。为进行非诺贝特口服制剂的人体药代动力学研究以及人体生物等效性研究, 有必要建立快速、灵敏、准确、专属性强、重现性好的测定人血浆中非诺贝特酸的方法。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 非诺贝特胶囊(商品名:力平之;规格:200 毫克/粒, 法国 Laboratoires Fournier S. A. 生产, 批号:17944)。非诺贝特酸对照品(纯度为 100%, 中国食品药品检定研究院, 批号:101122-201001); 吲哚美辛对照品(内标, 纯度为 100%, 中国食品药品检定研究院, 批号:100258-200403)。甲醇(色谱纯, 美国 Fisher Scientific Inc., 批号:120511); 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。空白人血浆来自健康志愿者。

1.2 仪器 API3200 型三重四极杆串联质谱仪, 配有电喷雾

离子化源以及 Analyst 1. 4. 2 数据处理软件(美国 Applied Biosystems Inc.); Prominence 20A 液相色谱系统, 配有 LC-20AD 型二元泵、DGU-20A3 型脱气机、SIL-20AHT 型自动进样器、CTO-20A 型柱温箱、CBM-20A 系统控制器(日本 Shimadzu Corporation); QB-600 型高速振荡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); Sigma 3-18K 台式高速离心机(德国 Sartorius Stedim Biotech GmbH)。

1. 3 方法

1. 3. 1 色谱条件及质谱条件 保护柱: Phenomenex C18(4 mm×2. 0 mm I. D., 5 μm 粒径, 美国 Phenomenex Inc.); 色谱柱: Zorbax SB-C18(150 mm×2. 1 mm I. D., 5 μm 粒径, 美国 Agilent Technologies Inc.); 流动相: 甲醇-0. 1% 甲酸(80 : 20, v/v); 流速: 0. 4 mL/min; 柱温: 35 °C; 进样量: 2 μL。

离子源: 电喷雾离子化源; 负离子方式检测; 离子喷射电压: -4 500 V; 温度: 450 °C; 源内气体 1(GS1, N₂) 压力: 207 kPa; 气体 2(GS2, N₂) 压力: 345 kPa; 气帘气体(CUR, N₂) 压力: 138 kPa; 碰撞气(CAD, N₂) 压力: 21 kPa; 扫描方式为多重反应监测(MRM); 用于定量分析的离子反应分别为 m/z 316. 9→ m/z 230. 9(非诺贝特酸) 和 m/z 355. 9→ m/z 312. 2(吲哚美辛), 解簇电压(DP) 分别为: -25 V 和 -20 V, 碰撞能量(CE) 分别为: -29 eV 和 -15 eV; Q1 和 Q3 分辨率均为 U-NIT。

1. 3. 2 溶液及标准血浆样本的配制 精密称取非诺贝特酸对照品适量, 置 5 mL 容量瓶中, 以甲醇溶解并定容至刻度, 配制浓度为 3. 00 mg/mL 的非诺贝特酸储备液。精密取该储备液适量, 以空白人血浆稀释得到标准曲线样本(非诺贝特酸浓度分别为 0. 050 0、0. 100、0. 500、2. 00、8. 00、15. 0、24. 0、30. 0 μg/mL)。另精密称取非诺贝特酸对照品适量, 同法配制得到定量下限(LLOQ)、质控(QC)、定量上限(ULOQ) 样本(非诺贝特酸浓度分别为 0. 0500、0. 100、2. 00、24. 0、30. 0 μg/mL)。精确称取吲哚美辛对照品适量, 置 10 mL 容量瓶中, 以甲醇溶解并定容至刻度, 配制浓度为 200 μg/mL 的内标溶液。

1. 3. 3 血浆样本处理 精密取血浆样本 50 μL 置于 1. 5 mL EP 管中, 加入内标溶液 10 μL、甲醇沉淀剂 140 μL、甲醇-水(3 : 1, v/v) 400 μL, 涡流 1 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 150 μL 转移至进样瓶中进行 LC-MS/MS 分析。

2 结果

2. 1 方法学验证

2. 1. 1 质谱分析 分别将非诺贝特酸储备液、吲哚美辛内标溶液稀释成浓度为 1. 00 μg/mL 的溶液, 采用蠕动泵以 10 μL/min 的恒定速度泵入 MS/MS 系统, 进行碎片离子分析, 相应的二级全扫描质谱图, 见图 1(见《国际检验医学杂志》网站论文附件)。

2. 1. 2 选择性 分别取 6 例健康受试者的空白血浆(加入等体积甲醇代替内标溶液), LLOQ 样本和健康受试者口服非诺贝特胶囊后的血浆样本, 按“1. 3. 3 血浆样本处理”项处理, 其典型色谱图, 见图 2(见《国际检验医学杂志》网站论文附件)。非诺贝特酸和内标吲哚美辛的保留时间分别约为 1. 99 min 和 2. 08 min, 血浆中内源性物质在非诺贝特酸和内标吲哚美辛出峰处均无杂峰。

2. 1. 3 残留效应 于测定 ULOQ 样本之后测定空白血浆样本, 分别以残留在空白血浆样本中的非诺贝特酸和内标吲哚美辛的峰面积除以测定 LLOQ 样本时非诺贝特酸和内标吲哚美辛的峰面积, 计算测定过程中非诺贝特酸和吲哚美辛的残留效

应因子。非诺贝特酸与内标吲哚美辛的残留效应因子均为 0, 表明测定过程中非诺贝特酸与内标吲哚美辛均无残留。

2. 1. 4 基质效应 按“1. 3. 3 血浆样本处理”项处理 6 个不同来源空白血浆, 得到空白血浆基质后, 再加入低、中、高 3 个 QC 浓度的非诺贝特酸溶液及内标溶液, 以其进样得到的峰面积除以相应浓度的非诺贝特酸溶液及内标溶液直接进样得到的峰面积, 计算血浆中内源性物质对非诺贝特酸和内标吲哚美辛的基质效应因子^[9]。血浆中内源性物质对低、中、高 3 个浓度非诺贝特酸的基质效应因子分别为(99. 3±2. 6)%、(95. 7±2. 3)%、(97. 4±1. 0)%, 平均基质效应因子为(97. 5±2. 5)%, 对内标吲哚美辛的基质效应因子为(92. 6±2. 9)%。

2. 1. 5 线性范围与 LLOQ 按“1. 3. 3 血浆样本处理”项处理标准曲线样本, 以血浆中待测物浓度为横坐标 X(μg/mL), 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标 Y, 用加权(W=1/X²) 最小二乘法进行回归运算, 求得的直线回归方程, 即标准曲线为: Y=0. 129X-0. 000 171(r=0. 998 8), 本方法测定人血浆中非诺贝特酸的线性范围为 0. 050 0~30. 0 μg/mL。

按“1. 3. 3 血浆样本处理”项处理 LLOQ 样本, 进行 6 样本分析, 连续测定 3 个分析批。根据同一分析批的标准曲线计算 LLOQ 样本的浓度。结果列于表 1, 批内、批间相对标准偏差(RSD) 均小于 4. 0%, 相对偏差(RE) 均不超过±11. 0% 的范围, 本方法测定人血浆中非诺贝特酸的定量下限为 0. 050 0 μg/mL。

2. 1. 6 精密性与准确度 按“1. 3. 3 血浆样本处理”项处理低、中、高 3 个浓度的 QC 样本, 每浓度进行 6 样本分析, 连续测定 3 个分析批。根据同一分析批的标准曲线计算 QC 样本的浓度。结果列于表 1, 批内、批间 RSD 均小于 3. 0%, RE 均不超过±9. 0% 的范围。

表 1 人血浆中非诺贝特酸 LC-MS/MS 测定方法 准确度与精密性结果(n=18)

理论浓度 (μg/mL)	测得浓度 (μg/mL)	批内 RSD(%)	批间 RSD(%)	RE (%)
0. 050 0	0. 048 1±0. 001 6	3. 6	1. 3	-10. 8~1. 8
0. 100	0. 105 0±0. 003 0	2. 5	2. 6	-1. 2~9. 0
2. 00	2. 060 0±0. 020 0	0. 8	1. 7	1. 0~5. 0
24. 0	23. 500 0±0. 200 0	0. 8	1. 4	-3. 7~-0. 8

2. 1. 7 提取回收率 按“1. 3. 3 血浆样本处理”项处理低、中、高 3 个浓度的 QC 样本, 以其进样得到的峰面积除以空白血浆经处理后再加入相应浓度的非诺贝特酸溶液及内标溶液后进样得到的峰面积, 计算血浆中非诺贝特酸和内标吲哚美辛的提取回收率。血浆中低、中、高 3 个浓度的非诺贝特酸的提取回收率分别为(96. 7±2. 8)%、(99. 6±1. 3)%、(100. 7±0. 7)%, 平均提取回收率为(99. 0±2. 4)%, 吲哚美辛的提取回收率为(100. 9±2. 8)%。

2. 1. 8 稳定性 按“1. 3. 3 血浆样本处理”项处理 QC 样本, 每浓度进行 3 样本分析, 考察血浆样本室温放置 8 h、经 3 次冻融、-80 °C 冰冻放置 70 d, 以及血浆样本经处理后于自动进样器中室温放置 24 h 非诺贝特酸的稳定性。测定浓度与理论浓度的 RE 均不超过±9. 0% 的范围, 表明在血浆样本室温放置、反复冻融、长期冰冻放置过程中, 以及处理后分析测定过程中, 非诺贝特酸均较为稳定, 各种贮存条件不影响对样本浓度进行

准确测定。此外,非诺贝特储备液和内标溶液于室温放置 24 h,4 ℃ 放置 70 d 的均稳定。

2.2 方法应用 6 名中国健康男性受试者单次口服非诺贝特胶囊,给药剂量为 200 mg,于受试者用药前和用药后 1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、24、36、48、72、96 h 采集并分离血浆样本,应用已建立的 LC-MS/MS 方法测定血浆中非诺贝特酸的浓度。受试者口服非诺贝特胶囊后非诺贝特酸的平均血药浓度-时间曲线,见图 3。

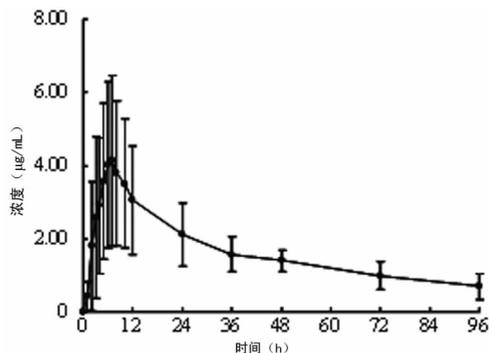


图 3 健康受试者单次口服非诺贝特胶囊后非诺贝特酸的平均血药浓度-时间曲线 (n=6)

3 讨 论

近几年,国内外对人血浆中非诺贝特酸的测定方法有液相色谱法(LC-UV)^[10-17]、液相色谱-串联质谱联用法(LC-MS/MS)^[18-19]等,但都存在一定的局限性,如:分析时间长(>5 min)^[10-16,18],流动相用量大(≥0.8 mL/min)^[10-12,14-17];血浆用量大(≥400 µL)^[12-13,15,18],样本处理过程复杂,采用液-液萃取法^[12,18-19],或比较昂贵的固相萃取法^[11,14],或固相萃取后吹干再复溶^[13],或未采用内标定量^[14-17]等。另外,本研究中 6 名受试者口服非诺贝特胶囊 200 mg 后非诺贝特酸的 C_{max} 为 1.52~7.01 µg/mL,而已有研究数据也表明,服用同一剂量的非诺贝特口服制剂后,体内非诺贝特酸的浓度存在较大差异,如:口服非诺贝特胶囊 200 mg 后非诺贝特酸的 C_{max} 为 (9.51±1.77) µg/mL^[10]、(11.3±2.3) µg/mL^[11]、(10.61±2.79) µg/mL^[12]、(13.59±2.73) µg/mL^[14]、(3.05±1.79) µg/mL^[17]。这可能与非诺贝特的制剂类型、制剂工艺、微粒化程度有一定的关系。因此,为了满足口服各种剂量、各种剂型的非诺贝特制剂后非诺贝特酸的人体药代动力学研究和生物等效性研究,上述部分方法在定量范围方面还存在局限性,如:灵敏度较低(≥0.2 µg/mL)^[10,11,13-15,18],在给药剂量较小的临床试验生物样本的分析时,无法测定 3~5 个消除半衰期时样本中的药物浓度或检测 C_{max} 的 1/10~1/20 的药物浓度;ULOQ 较低(<15 µg/mL)^[17,19],不能直接测定部分高浓度的生物样本,而需要进行稀释复测。本实验建立了快速、灵敏、准确、专属性强、重复性好的 LC-MS/MS 方法,成功应用于 6 例健康受试者单次口服 200 mg 非诺贝特胶囊后非诺贝特酸的药代动力学研究。

参考文献

[1] 李满,满世伟,金丽丹. 非诺贝特降脂特点简介[J]. 实用药物与临床, 2005, 8(1): 35-36.
 [2] Milosavljevic D, Griglio S, Le Naour G, et al. Preferential reduction of very low density lipoprotein-1 particle number by fenofibrate in type II B hyperlipidemia: Consequences for lipid accumu-

lation in human monocyte-derived macrophages[J]. Atherosclerosis, 2001, 155(1): 251-260.
 [3] 吴静. 调脂药物的一枝独秀——非诺贝特的独特作用及其临床应用[J]. 实用糖尿病杂志, 2005, 1(5): 59-63.
 [4] Strolin BM, Guichard JP, Vidal R, et al. Kinetics and metabolic fate of ¹⁴C-fenofibrate in human plasma[J]. Acta Pharmacol Toxicol, 1986, 59(Suppl 5): 167-169.
 [5] 钟倩. 非诺贝特微粒制剂在美国上市[J]. 国外医药: 合成药 生化药 制剂分册, 1998, 19(6): 368.
 [6] 黄胜炎. 国外新批准上市的药物新制剂新剂型(88)[J]. 中国制药信息, 2005, 21(2): 19.
 [7] FDA 批准非诺贝特缓释片新剂型用于糖尿病辅助治疗[J]. 药学进展, 2007, 31(10): 477-478.
 [8] US FDA. Orange book: approved drug products with therapeutic equivalence evaluations; Publications (33rd Edition). [EB/OL]. (2012-12-31) [2013-01-09]. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/UCM071436.pdf>.
 [9] Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS[J]. Anal Chem, 2003, 75(13): 3019-3030.
 [10] 余俊先, 杨春秀, 王曼丽, 等. 非诺贝特胶囊人体相对生物利用度[J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(15): 1177-1180.
 [11] Streeb B, Hubert P, Ceccato A. Determination of fenofibric acid in human plasma using automated solid-phase extraction coupled to liquid chromatography[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2000, 742(2): 391-400.
 [12] 赵永红, 黄毅慧, 黄仲义. 非诺贝特胶囊(微粒化)人体生物利用度研究[J]. 中国药房, 2006, 17(14): 1082-1083.
 [13] Mertens B, Cahay B, Klinkenberg R, et al. An automated method for the simultaneous determination of pravastatin, 3-hydroxy isomeric metabolite, pravallactone and fenofibric acid in human plasma by sensitive liquid chromatography combined with diode array and tandem mass spectrometry detection[J]. J Chromatogr A, 2008, 1189(1/2): 493-502.
 [14] 戴敏, 裘福荣, 陈波, 等. 国产微粒化非诺贝特分散片的相对生物利用度研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2002, 18(4): 287-289.
 [15] 范国荣, 林梅, 张正行, 等. 人血浆中非诺贝特活性代谢物非诺贝酸的高效液相色谱法测定[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(4): 231-234.
 [16] 李晓祥, 赵亚男, 周理想. 非诺贝特缓释片人体药代动力学及生物等效性研究[J]. 安徽医药, 2009, 13(7): 732-734.
 [17] Vlase L, Popa A, Muntean D, et al. Pharmacokinetics and comparative bioavailability of two fenofibrate capsule formulations in healthy volunteers[J]. Arzneimittelforschung, 2010, 60(9): 560-563.
 [18] Trivedi RK, Kallem RR, Mullangi R, et al. Simultaneous determination of rosuvastatin and fenofibric acid in human plasma by LC-MS/MS with electrospray ionization; assay development, validation and application to a clinical study[J]. J Pharm Biomed Anal, 2005, 39(3/4): 661-669.
 [19] Bhavesh D, Shah S, Shivprakash. Determination of fenofibric acid in human plasma by ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry; application to a bio-equivalence study[J]. Biomed Chromatogr, 2009, 23(9): 922-928.