

## LC-MS/MS 法测定人血浆中伊伐布雷定浓度及药动学\*

金鑫 鹿成韬 冯彦来 丁莉坤 关月 孙薇 周伦 文爱东<sup>△</sup>

(第四军医大学西京医院药剂科 陕西 西安 710032)

**摘要** 目的 建立人血浆中伊伐布雷定的液相色谱-质谱-质谱联用测定方法,研究健康人体药代动力学。方法 以地西泮为内标物,采用液相色谱-质谱-质谱联用法,电喷雾电离源选择性正离子峰检测。测 30 名健康志愿者单剂量口服盐酸伊伐布雷定片的体内血药浓度,获得药动学参数。结果 伊伐布雷定在 0.101-101 ng·mL<sup>-1</sup> 浓度范围内呈良好的线性关系( $r=0.998$ ),最低检测浓度为 0.101 ng·mL<sup>-1</sup>。高、中、低浓度的方法提取回收率分别为 93.2%、86.6%、87.5%,日内、日间精密度 RSD 均小于 15%。结论: LC-MS/MS 方法灵敏度高,专属性强,准确,简便,适用于盐酸伊伐布雷定片的人体药代动力学研究。

**关键词** 伊伐布雷定 药代动力学 液相色谱-质谱-质谱

**中图分类号** R969.1 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273 (2011) 14-2605-04

## Determination of Ivabradine in Human Plasma by LC-MS/MS and Study of Pharmacokinetics\*

JIN Xin, LU Cheng-tao, FENG Yan-lai, DING Li-kun, GUAN Yue, SUN Wei, ZHOU Lun, WEN Ai-dong<sup>△</sup>

(Department of Pharmacy, Xijing Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi China)

**ABSTRACT Objective:** To determine ivabradine in human plasma by a LC/MS/MS method, and to investigate its pharmacokinetics.

**Methods:** Ivabradine concentrations in plasma were determined by LC-MS/MS. The test and reference formulations of ivabradine were given to 30 healthy male volunteers. **Results:** The linear range for rosvastatin was 0.101-101 ng·mL<sup>-1</sup> ( $r = 0.998$ ). The quantitation limit for rosvastatin was 0.101 ng·mL<sup>-1</sup>. The draw recovery rates were 93.2%, 86.6% and 87.5%, and RSD for intra-day and inter-day was both less than 15%. **Conclusion:** LC-MS/MS method is sensitive, accurate and simple, and suitable for the study on pharmacokinetic of ivabradine in human.

**Key words:** Ivabradine; Pharmacokinetics; LC-MS/MS

**Chinese Library Classification(CLC):** R969.1 **Document code:** A

**Article ID** :1673-6273(2011)14-2605-04

## 前言

伊伐布雷定是法国 Servier 公司首先研制开发的抗心绞痛新药,2005 年 11 月经欧洲药审局批准在欧洲 27 个国家上市,用于治疗对 $\beta$ 受体阻断剂禁忌或不能耐受的慢性稳定性心绞痛<sup>[1-3]</sup>。该药是首个选择特异性心脏起搏电流(I<sub>f</sub>)抑制剂,起到减缓窦房结起搏点活动速度的作用<sup>[4-6]</sup>,与传统药物相比,其不影响血压<sup>[7]</sup>、血流动力学<sup>[8-9]</sup>、心肌收缩力<sup>[10]</sup>、房室传导或心室复极<sup>[11-13]</sup>,是一种有效预防心肌缺血、治疗慢性稳定性心绞痛的药物<sup>[14-16]</sup>。伊伐布雷定的化学名为 3-{3-[[{(7S)-3,4-二甲氧基双环[4.2.0]辛-1,3,5-三烯-7-基]-甲基}(甲基氨基)丙基]-7,8-二甲氧基-1,3,4,5-四氢-2H-3-苯并氮杂卓-2-酮盐,分子式为 C<sub>27</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>,相对分子质量为 468.6,结构见图 1。有关伊伐布雷定在西方不同种族人群中的药代动力学特点已有报道<sup>[17-18]</sup>,但未见其在中国人药代动力学特点的报道。目前国外已报道检测方法主要为 HPLC 荧光检测法测定血浆中伊伐布雷定的浓度<sup>[17-19]</sup>,本研究的目的是建立灵敏度高、专属性强、简便、准确

的 LC-MS/MS 方法测定人体血浆中的伊伐布雷定浓度,并研究伊伐布雷定在中国健康人体内的药代动力学特征,为临床合理用药提供参考依据。

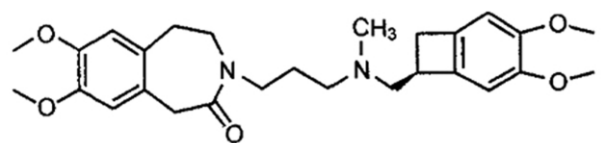


图 1 伊伐布雷定结构式

Fig.1 Molecular structures of ivabradine

## 1 材料与方法

## 1.1 仪器

Agilent 1200 液相色谱仪(二元梯度高压泵,真空脱气机,自动进样器,柱温箱);Agilent 6410A 三重四级杆串联质谱仪(美国安捷伦公司);MassHunter 工作站;分析柱为 Agilent TC-C18 column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm, Agilent)。

\* 基金项目 国家科技重大专项课题 (2008ZX09312-024)

作者简介 金鑫(1982-),男,硕士研究生,讲师,研究方向 药物分析、药物代谢动力学,临床药理学

Email jxum@163.com Tel :13992888744、029-84775031 (办)

<sup>△</sup>通讯作者 文爱东, Tel -13992888744, Email :adwen@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2011-04-05 接受日期 2011-04-28)

## 1.2 药品与试剂

盐酸伊伐布雷定片(常州四药制药有限公司提供,规格:2.5 mg/片,批号 20081101) 盐酸伊伐布雷定对照品(常州四药制药有限公司提供,纯度 99.13 %,批号 YF-D01) 内标地西泮(中国药品生物制品检定所提供,批号 100294-200602) 甲醇(色谱纯,由 Fisher Scientific 公司提供) 醋酸铵(分析纯,天津市百世化工有限公司) 空白人血浆 临床医院提供。

## 1.3 色谱条件

甲醇-水(5 mM 醋酸铵+1 %甲酸(v/v))=80:20(v/v),流速为 0.6 mL·min<sup>-1</sup>,柱温:40 °C。

## 1.4 质谱条件

离子源 ESI 源 检测方式 正离子检测 扫描方式 多反应监测(MRM) 驻留时间(Dwell Time) 150 ms 毛细管电压(Capillary) 4000 V 干燥气温度(Temperature) 325 °C 干燥气流速(Gas Flow) 12 L/min 雾化气压力 50 psi。伊伐布雷定和地西泮在 ESI 源正离子电离方式下,均有较好的质谱响应,主要生成[M+H]<sup>+</sup> 离子峰,分别为 m/z 469.2 和 m/z 285.1。选择性对[M+H]<sup>+</sup> 离子进行产物离子全扫描质谱分析得相应的二级全扫描质谱图(见图 2),伊伐布雷定和地西泮生成的主要碎片离子分别为 m/z 177.1 和 m/z 193.1,将其作为定量分析时监测的产物离子。

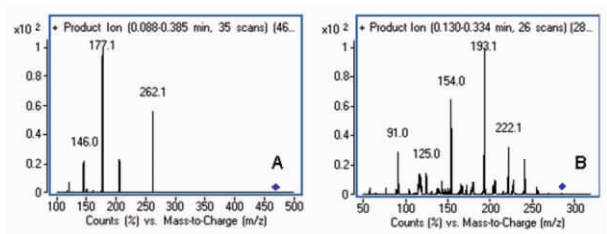


图 2 伊伐布雷定(A)和内标地西泮(B)的产物离子全扫描质谱图

Fig.2 Full scan MS/MS spectra of ivabradine (A) and internal standard of diazepam (B)

## 1.5 研究对象与给药方案

选择 30 名健康受试者(男女各半),平行分为三组,每组 10 人,其中低剂量组 10 人,体重 52.5-64.5 kg,年龄 29-38 岁 中剂量组受试者 10 人,体重 57.5-65.0 kg,年龄 30-37 岁 高剂量组受试者 10 人,体重 52.5-68.0 kg,年龄 31-39 岁。于试验前进行全面的体格检查,肝肾功能、心电图、血尿常规均正常。受试者无既往病史和药物过敏史,精神状态良好。受试前 4 周内未服用过其它药物。入选受试者于试验前一日晚 8 时开始禁食,试验当日晨空腹按分组分别服用盐酸伊伐布雷定片 2.5 mg、5.0 mg 和 7.5 mg,而后按设计的采血时间点采血。服药后 4 h 和 10 h 进食统一的饮食。服药后受试者避免剧烈活动,采血期间禁烟酒和含咖啡因类饮料。试验方案经医学伦理委员会批准,受试者签署知情同意书。

## 1.6 样品采集与处理

于给药前(0 h)和给药后 8、15、30、45 min;1、1.5、2、3、4、6、9、12、24、36、48 h 从静脉采血 4 mL。血样取出后移入经肝素处理的离心试管中,离心 10 min (3500 r·min<sup>-1</sup>),分离血浆,于 -20

°C 冰箱中冷冻保存待测。

## 1.7 血浆样品处理

于 10 mL 离心管中精密加入血浆样品 1 mL,内标溶液(2 g·mL<sup>-1</sup>)50 L,旋涡 30s 后混匀。加入 4 mL 乙酸乙酯,涡旋 3 min,于 4000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min。吸取有机层至另一干净离心管中,于 30 °C 水浴中以氮气流吹至近干。残渣以 200 L 流动相复溶,于 16000 r·min<sup>-1</sup> 离心 8 min,吸取上清液转移至自动进样器样品管中,进样量 5 L,进行 LC-MS/MS 分析。

## 1.8 标准曲线的制备

取 10 mL 离心管数支,于离心管中分别精密加入不同量的伊伐布雷定标准溶液,配制含伊伐布雷定浓度分别为 0.1013、0.3039、1.013、3.039、10.13、30.39、101.3 ng/mL 的含药血浆 1 mL,按“血浆样品处理”项下进行操作,复溶后吸取上清液至自动进样瓶中,进样分析,记录色谱图 计算伊伐布雷定峰面积 A<sub>s</sub> 和内标峰面积 A<sub>i</sub> 的比值 f(f= A<sub>s</sub>/A<sub>i</sub>)。以峰面积比值 f 对血药浓度 C 作权重回归计算,求得回归方程为:f=0.003848+0.05728 C,r=0.998。根据标准曲线,伊伐布雷定的线性范围为 0.101~101 ng·mL<sup>-1</sup>。伊伐布雷定的定量下限可达 0.101 ng·mL<sup>-1</sup>。

## 1.9 提取回收率

分别配制含 0.2026、5.065、75.975 ng·mL<sup>-1</sup> 的低、中、高 3 种不同质量浓度的标准含药血浆样品各 5 份。按“2.5”项下操作后进行 LC-MS/MS 分析,测定伊伐布雷定与内标的色谱峰面积,计算峰面积比值 f<sub>x</sub> (f<sub>x</sub> = A<sub>s</sub>/A<sub>i</sub>)。与直接配制的等量对照液的测定结果比较计算,即得提取回收率。结果表明,伊伐布雷定在低、中、高 3 种不同质量浓度组的平均回收率分别为 (93.2±5.9) %, (86.6±6.1) %, (87.5±9.8) %,回收率均符合测定要求。

## 1.10 精密度与准确度

将标准血浆药物低、中、高三浓度(伊伐布雷定血浆浓度分别为 0.2026、5.065、75.975 ng·mL<sup>-1</sup>) 的样品,在日内和日间重复检测,计算日内 RSD 和日间 RSD,评价方法的精密度或重现性,结果日内 RSD 分别为 4.91 %,3.36 %,3.50 %;日间 RSD 分别为 5.84 %,5.49 %,10.65 %。测定计算相对回收率考察其准确度,结果分别为 (102.1±5.0) %, (100.3±3.3) %, (109.1±3.8) %。精密度与准确度均符合测定要求。

## 1.11 稳定性考察

配制浓度分别为 0.2026、75.975 ng·mL<sup>-1</sup> 的伊伐布雷定标准含药血浆,分别测定室温立即分析,室温放置 20 h,反复冻融 3 次,长期冰冻 30、60、90 d 稳定性,测定伊伐布雷定浓度,RSD 分别为 5.80 %、8.11 %。实验结果表明,伊伐布雷定在冰冻条件下稳定性良好。

## 2 结果

### 2.1 方法的特异性

在本试验所采用的色谱条件下,测得来自 6 个不同样本的空白血浆,伊伐布雷定,内标,空白血浆添加伊伐布雷定和内标,及受试者服药后血浆样品的典型色谱分别如图 3 所示。由图可见伊伐布雷定的保留时间约为 2.57 min,内标的保留时间约为 5.33 min。本方法具有较高的特异性,能准确测定尿液中伊伐布雷定的浓度,灵敏度较高。

2.2 药代动力学

药物动力学计算和统计在实验室用 EXCEL 自编的程序上进行。数据处理以 EXCEL 形式输入。AUC0-t 值和 AUC0-∞ 值采用梯形法计算,Tmax 和 Cmax 值采用实测值;t1/2 和 ke 值

以半对数作图法,由消除相的浓度点计算, $CL/F = D/AUC_{0-\infty}$  (D 为给药剂量), $V_d/F = (CL/F) / k_e$ 。对受试者单次服药的药动学参数进行配对 t 检验 (AUC 和 Cmax 经对数转换),Tmax 采用非参数法检验。

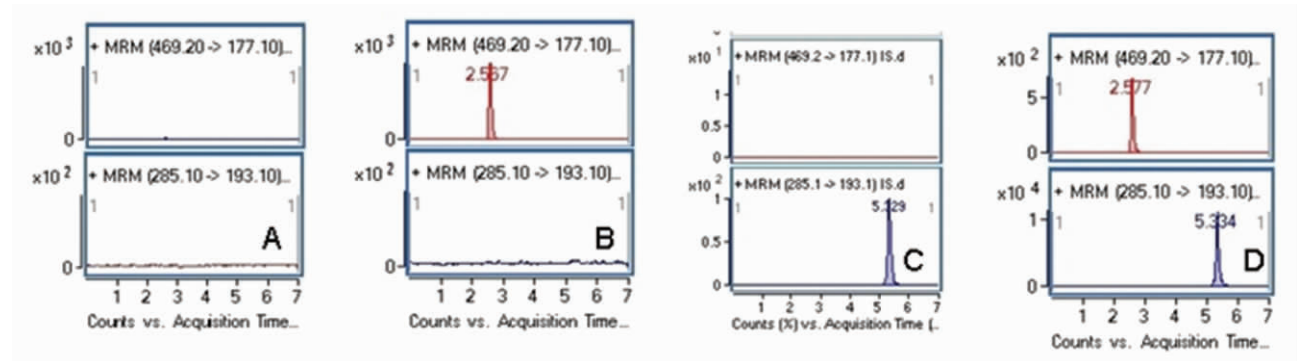


图 3 测定血浆中伊伐布雷定和内标地西洋的典型 MRM 色谱图:A:空白血浆色谱图; B:伊伐布雷定色谱图; C:内标色谱图;D:空白血浆加样品色谱图

Fig.3 Determination the typical Chromatograms of ivabradine and I.S. (diazepam) by MRM scan mode in human plasma samples:  
A:Chromatogram of blank plasma;B:Chromatogram of ivabradine;  
C:Chromatogram of I.S.;D:Chromatogram of plasma spiked with ivabradine and I.S

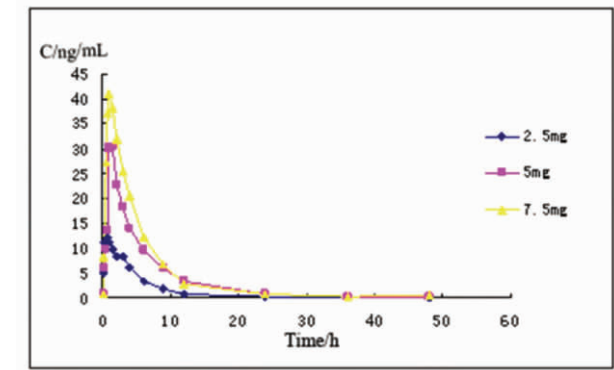


图 4 30 名健康志愿者单剂量口服盐酸伊伐布雷定片 2.5 mg、5.0 mg 和 7.5 mg 的平均血药浓度 - 时间曲线

Fig.4 Average plasma concentration-time curves of ivabradine tablets after a single oral does of 2.5 mg, 5.0 mg and 7.5 mg in 30 volunteers

30 名受试者单剂量口服盐酸伊伐布雷定片 2.5 mg、5.0 mg 和 7.5 mg 后药 - 时曲线结果见图 4。主要药动学参数见表 1。用 SPSS 软件对单次给药低中高 3 个剂量组主要药动学参数进行方差和线性相关性分析,结果显示剂量组间 t1/2、Tmax、CL 无显著差异,剂量对 AUC0-t、AUC0-∞、Vd、Cmax 具有显著性影响;AUC0-t、AUC0-∞、Cmax 与剂量成明显线性正相关。

3 讨论

国外文献中,Klippert P 等运用 HPLC 荧光检测的方法对血浆中伊伐布雷定进行定量分析,样品需经固相萃取后由 Nova-Pak C8 柱进行分离,最低定量限为 0.5 ng/ml,伊伐布雷定保留时间为 8.7 min<sup>[19]</sup>。Maryse FB 等运用 LC-MS/MS 法对血浆中伊伐布雷定进行测定,样品需经固相萃取后由 C18 柱进行分离,最低定量限为 0.1 ng/ml,伊伐布雷定保留时间为 13.3 min<sup>[20]</sup>。

表 1 受试者单剂量口服盐酸伊伐布雷定片 2.5 mg、5.0 mg 和 7.5 mg 的主要药动学参数

Tab.1 The main pharmacokinetics parameters of ivabradine tablets after a single oral does of 2.5 mg, 5.0 mg and 7.5 mg in healthy volunteers ( $\bar{x} \pm s$ , n=30)

| Parameter                     | Group        |               |               |
|-------------------------------|--------------|---------------|---------------|
|                               | 2.5mg        | 5.0mg         | 7.5mg         |
| Cmax/ng·mL <sup>-1</sup>      | 14.92± 4.05  | 35.98± 8.68   | 48.62± 9.62   |
| Tmax/h                        | 0.85± 0.43   | 1.15± 0.24    | 1.00± 0.46    |
| AUC0-t/ng·h·mL <sup>-1</sup>  | 64.23± 13.87 | 169.60± 33.09 | 215.92± 57.21 |
| AUC0-∞ /ng·h·mL <sup>-1</sup> | 64.88± 13.97 | 171.19± 33.45 | 217.95± 56.42 |
| t1/2/h                        | 3.87± 1.30   | 5.03± 1.19    | 5.00± 1.84    |
| CL/F/L·h <sup>-1</sup>        | 0.04± 0.01   | 0.03± 0.01    | 0.04± 0.01    |
| Vd/F/L                        | 0.23± 0.09   | 0.21± 0.03    | 0.26± 0.10q   |

本试验直接采用乙酸乙酯作为萃取液对样品进行预处理,伊伐 布雷定保留时间仅为 2.5 min,与上述两方法相比,省去了固相



萃取的步骤,简化了操作程序,大大降低了样品预处理的成本。与 HPLC 荧光检测法相比,将定量下限由 0.5 ng/ml 降低到 0.1 ng/ml,提高了检测的准确度;与 Bouchard 等的 LC-MS/MS 法相比,保留时间明显缩短,提高了检测的效率。该方法可满足体内伊伐布雷定药物浓度的测定,药动力学研究的需要。

目前盐酸伊伐布雷定片在我国尚没有上市品种,本试验测定伊伐布雷定的  $t_{1/2}$ 、 $C_{max}$  和 AUC 等药动力学参数与国外文献<sup>[17-18]</sup>报道基本一致,没有明显差异。药动力学研究结果表明,受试者口服盐酸伊伐布雷定片后,主要药动力学参数  $C_{max}$  和 AUC 均与剂量呈线性关系。各剂量组伊伐布雷定  $t_{1/2}$  均很短,说明该药在体内消除较快,不易在各组织中蓄积。本试验结果为中国健康成人合理应用盐酸伊伐布雷定片提供了药动力学依据。

### 参考文献 (References)

- [1] Tardif JC. Clinical efficacy of ivabradine [J]. Heart Drug, 2005, 5(1): 25-28
- [2] DiFrancesco D. Ivabradine - a first-in-its-class treatment for lowering heart rate[J]. Cardiovasc J Afr, 2009, 20(1):96
- [3] Prasad UK, Gray D, Purcell H. Review of the If selective channel inhibitor ivabradine in the treatment of chronic stable angina [J]. Adv Ther, 2009, 26(2):127-137
- [4] Bucchi A, Baruscotti M, DiFrancesco D. Current-dependent block of rabbit sino-atrial node If channel by ivabradine [J]. J Gen Physiol, 2002, 120(1):1-13
- [5] Bois P, Bescond J, Renaudon B, et al. Mode of action of bradycardic agent S 16257, on ionic current in sinoatrial node cells [J]. Br J Pharmacol, 1996, 118:1051-1057
- [6] Wickenden AD, Maher MP, Chaplan SR. HCN pacemaker channels and pain: a drug discovery perspective [J]. Curr Pharm Des, 2009, 15(18):2149-2168
- [7] Joannides R. Comparative effects of inabradine, a selective heart rate-lowering agent, and propranolol on systemic and cardiac haemodynamics at rest and during exercise [J]. Br J Clin Pharma col, 2006, 61:127-137
- [8] Baruscotti M, Barbuti A, Bucchi A. The cardiac pacemaker current[J]. J Mol Cell Cardiol, 2010, 48(1):55-64
- [9] Pathak A, Berdeaux A, Mulder P, et al. Ivabradine in coronary heart disease: experimental and clinical pharmacology [J]. Therapie, 2010, 65(5):483-489
- [10] Manz M, Reute M, Lauck G, et al. A single intravenous dose of ivabradine, a novel If inhibitor, lowers heart rate but does not depress left ventricular function in patients with left ventricular dysfunction [J]. Cardiology, 2003, 100:149-155
- [11] Andrea B, Alessia C, Daniela C, et al. Molecular composition and functional properties of f-channels in murine embryonic stem cell-derived pacemaker cells [J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2009, 46:343-351
- [12] Camm AJ, Lau CP. Electrophysiological effects of a single intravenous administration of ivabradine (S16257) in adult patients with normal baseline electrophysiology[J]. Drugs RD, 2003, 4:83-89
- [13] Rognoni A, Bertolazzi M, Macciò S, et al. Ivabradine: cardiovascular effects[J]. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov, 2009, 4(1):61-66
- [14] Khawaja MZ, Walker DM. Ivabradine - the beauty of a slow heart rate[J]. Int J Clin Pract, 2009, 63(4):542-546
- [15] Tendra M, Borer JS, Tardif JC. Efficacy of I (f) inhibition with ivabradine in different subpopulations with stable angina pectoris[J]. Cardiology, 2009, 114(2):116-125
- [16] Boldt A, Gergs U, P?nicke K, et al. Inotropic effects of ivabradine in the Mammalian heart[J]. Pharmacology, 2010, 86(5-6):249-258
- [17] Dufful SB, Chabaud S, Nony P, et al. A pharmacokinetic simulation model for ivabredine in healthy volunteers [J]. Eur J Pharm Sci, 2000, 10(4):285-294
- [18] Dufful SB, Aarons L. Development of a sequential linked pharmacokinetic and pharmacodynamic Simulation model for ivabradine in healthy volunteers[J]. Eur J Pharm Sci, 2000, 10(4):275-284
- [19] Klippert P, Jeannot JP, Polve S, et al. Determination of ivabradine and its N-demethylated metabolite in human plasma and urine, and in rat and dog plasma by avalidated high-performance liquid chromatographic method with ?uorescence detection [J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1998, 719(1-2):125-133
- [20] Maryse FB, Gilles S, Marie JB, et al. Simultaneous determination of ivabradine and its metabolites in human plasma by liquid hromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B, 2000, 745: 261-269