

HPLC-MS/MS 法同时测定人血浆中地尔硫革和代谢物浓度及其在药动学研究中的应用

彭雅茹, 杨乐婷, 李蓉, 蒋学华, 王凌*

(四川大学华西药学院, 成都, 610041)

摘要 目的: 建立在人血浆中同时测定地尔硫革 (DTZ) 及其活性代谢物去乙酰地尔硫革 (M1) 和 *N*-去甲地尔硫革 (MA) 浓度的 HPLC-MS/MS 方法, 并应用于健康志愿者口服盐酸地尔硫革片的药动学研究。方法: 以 DTZ-d4、MA-d4 和 M1-d6 为内标, 经乙腈沉淀蛋白后, 采用 CAPCELL PAK ADME (50 mm × 2.1 mm, 3 μm) 色谱柱, 流动相为含 0.1% 甲酸水和乙腈, 进行梯度洗脱分离。采用 AB SCIEX API 4000 质谱仪, 电喷雾离子源 (ESI), 正离子扫描, 多反应监测模式 (MRM) 进行检测。24 名健康受试者单剂量空腹口服 DTZ 片 30 mg 后采集血浆样品, 以 HPLC-MS/MS 法测定血浆中 DTZ 及其代谢物的浓度, 计算药动学参数并进行统计分析。结果: DTZ、M1 和 MA 质量浓度分别在 0.197 8~40.16、0.251 1~5.017 和 0.214 9~20.02 ng · mL⁻¹ 范围内线性关系良好 ($r > 0.998 6$)。方法学各项指标均符合要求。健康中国受试者单剂量空腹口服 DTZ 片 30 mg 后, DTZ、MA 和 M1 的主要药动学参数依次为 $C_{\max}$ (22.2 ± 6.34) ng · mL⁻¹、(8.38 ± 2.96) ng · mL⁻¹、(1.52 ± 0.70) ng · mL⁻¹, $T_{\max}$ (3.19 ± 1.73) h、(4.25 ± 1.93) h、(7.06 ± 1.97) h, $AUC_{0-\infty}$ (197.99 ± 56.38) ng · h · mL⁻¹、(115.78 ± 29.07) ng · h · mL⁻¹、(27.22 ± 15.49) ng · h · mL⁻¹。结论: 所建方法简便、快捷、灵敏, 适用于地尔硫革及其代谢物的药动学研究。DTZ 和 MA 的血药浓度-时间曲线显示双峰, 提示二者在体内可能存在肝肠循环过程。

关键词: 钙离子通道阻滞剂; 地尔硫革; *N*-去甲基-地尔硫革; 去乙酰地尔硫革; 药动学; 液相色谱-质谱联用

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2019) 08-1409-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.08.10

HPLC-MS/MS method to simultaneously determine diltiazem and its metabolites in human plasma and its application in pharmacokinetic studies

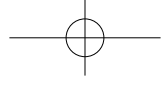
PENG Ya-ru, YANG Le-ting, LI Rong, JIANG Xue-hua, WANG Ling*

(West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC-MS/MS method for simultaneous determination the concentration of diltiazem (DTZ) and its active metabolites, such as desacetyl-diltiazem (M1) and *N*-desmethyl-diltiazem

* 通信作者 Tel: (028) 85501370; E-mail: rebeccawang312@gmail.com

第一作者 Tel: 13258399267; E-mail: 1044469255@qq.com



(MA) in human plasma, and carry out pharmacokinetic study in Chinese healthy volunteers orally administrated DTZ. **Methods:** DTZ-d4, MA-d4 and M1-d6 were used as internal standard. After precipitation by acetonitrile, the sample was separated on the CAPCELL PAK ADME (including 50 mm × 2.1 mm, 3 μm) chromatographic column through gradient elution by 0.1% formic acid and acetonitrile. Then the analytes were detected by the AB SCIEX API 4000 mass spectrometer with the electrospray ionization (ESI) source in multiple reaction monitoring (MRM) mode. Plasma samples were collected from 24 healthy subjects after single oral administration 30 mg DTZ tablets. The concentrations of DTZ and its metabolites in plasma were determined by HPLC-MS/MS. The pharmacokinetic parameters were calculated and statistically analyzed. **Results:** DTZ, M1 and MA were all in good linear relationships in the range of 0.200 0–40.00 ng · mL⁻¹, 0.250 0–5.000 ng · mL⁻¹ and 0.200 0–20.00 ng · mL⁻¹, respectively ($r > 0.998\ 6$). All methodological indicators were in line with requirements. The main pharmacokinetic parameters of DTZ, MA and M1 in healthy Chinese volunteers after single oral administration of 30 mg DTZ tablets in fasting condition were as follows: $C_{\max}$ (22.2 ± 6.34) ng · mL⁻¹, (8.38 ± 2.96) ng · mL⁻¹, (1.52 ± 0.70) ng · mL⁻¹; $T_{\max}$ (3.19 ± 1.73) h, (4.25 ± 1.93) h, (7.06 ± 1.97) h; $AUC_{0-\infty}$ (197.99 ± 56.38) ng · h · mL⁻¹, (115.78 ± 29.07) ng · h · mL⁻¹, (27.22 ± 15.49) ng · h · mL⁻¹. **Conclusion:** This method is simple, rapid, sensitive and suitable for clinical pharmacokinetic study of DTZ and its metabolites. The concentration–time curve of DTZ and MA shows double peaks, indicating that they all pass through enterohepatic circulation.

Keywords: calcium channel blocker; diltiazem; *N*-desmethyl-diltiazem; desacetyl-diltiazem; pharmacokinetic; HPLC-MS/MS

盐酸地尔硫草 (diltiazem hydrochloride, DTZ) 化学名为顺-(+)-5-[(2-二甲氨基)乙基]-2-(4-甲氧基苯基)-3-乙酰氧基-2,3-二氢-1,5-苯丙硫氮杂草-4(5*H*)-酮盐酸盐, 分子式为 C₂₂H₂₆N₂O₄S · HCl。DTZ 属于苯二氮草类钙离子通道阻滞剂, 能够降低周围的血管阻力, 减缓心率, 降低心肌耗氧量, 主要应用于冠心病、高血压、稳定型心绞痛、室上性快速心律失常和阻塞性肥厚性心脏病^[1-5]。DTZ 口服吸收迅速、完全, 经胆汁和肾脏排泄, 但个体间生物利用度变异大 (24%~74%), 这可能与肝脏首过消除和肝肠循环有关^[6-9]。在体内 DTZ 经肝药酶 CYP2D6、CYP3A4/5 等广泛代谢, 主要活性代谢产物为 *N*-去甲基地尔硫草 (*N*-desmethyl-diltiazem, MA) 和去乙酰地尔硫草 (desacetyl-diltiazem, M1), 其活性分别相当于 DTZ 的 1/5 和 1/2; DTZ 既是 CYP3A4 底物, 也是 CYP3A4 的中等强度抑制剂, 而 MA 对 CYP3A4 的抑制作用更强, 所以 MA 和 M1 可能影响 DTZ 在体内的药动学过程和药效学反应^[10-14]。因此有必要建立人血浆中同时检测 DTZ 及其活性代谢物的检测方法, 用于临床药动学研究。目前国内外可同时测定 DTZ 及其 2 个活性代谢物的方法报道很少^[15-17], 主

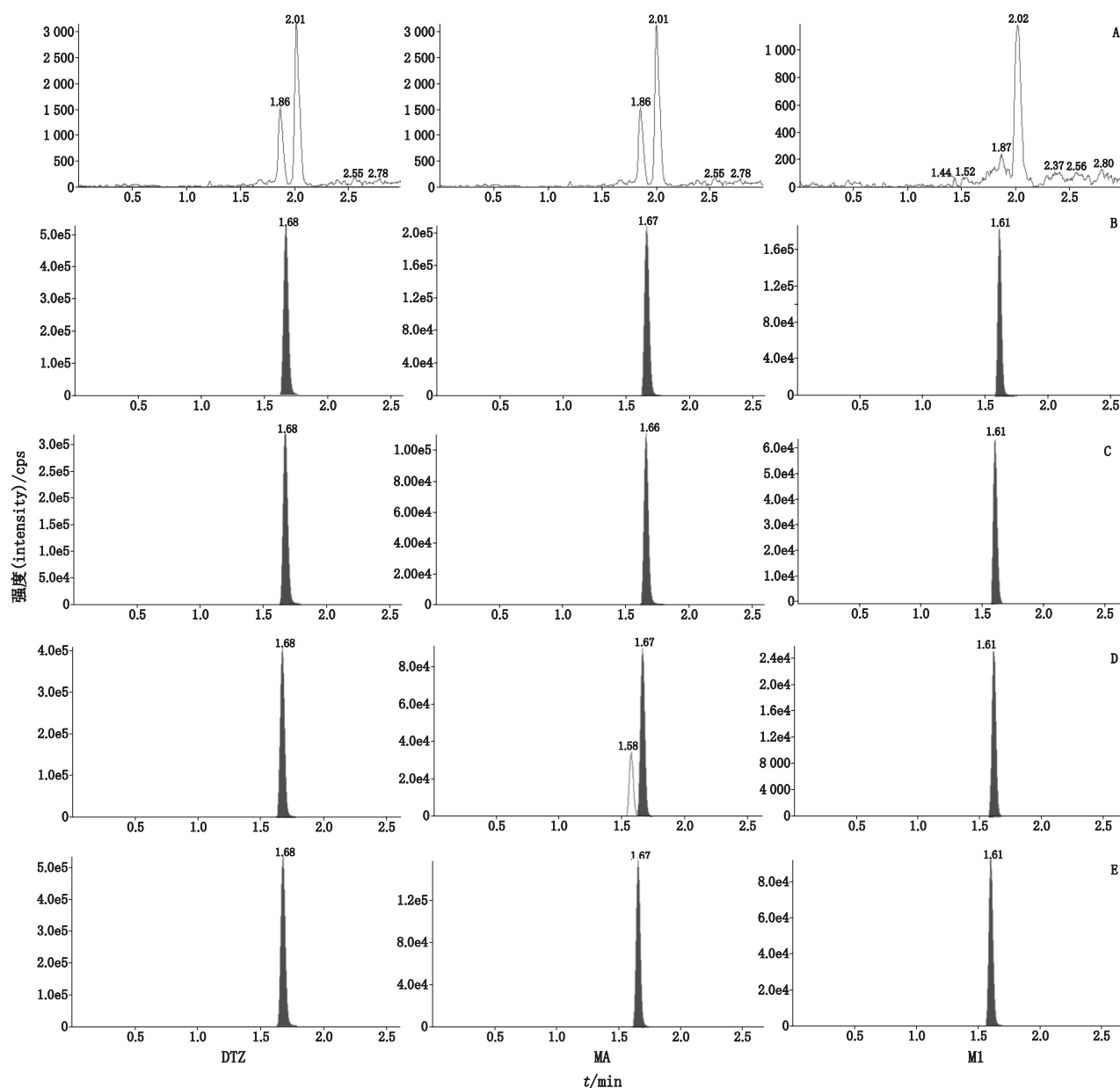
要为 HPLC 方法, 存在灵敏度低, 操作复杂和分析时间长等缺点; 国内外关于 DTZ 的药动学研究不够充分, 对 MA、M1 的药动学特征的研究也鲜有。因此, 本文拟建立高效、灵敏并可同时测定人血浆中 DTZ 及其活性代谢物 M1 和 MA 浓度的 HPLC-MS/MS 方法, 并分析 DTA、MA 和 M1 在健康志愿者体内的药动学特征。

1 仪器与材料

1.1 仪器 AB SCIEX API 4000 三重四极杆质谱 (Applied Biosystem); SHIMADZU LC20ADXR 高效液相色谱仪 (岛津公司); CAPCELL PAK ADME 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 3 μm; 资生堂公司); XS3DU 百万分之一天平 (上海梅特勒-托利多仪器有限公司); VWR Vortexer Multi Tube Model 58816⁻¹15 VX 2500 多管涡旋振荡器 (VWR 公司); D3024 台式高速微量离心机 (北京大龙兴创实验仪器有限公司); MPR-312DCNPC 4 保存箱 (Sanyo 公司); MDF-U548D-C 负 20 °C 低温冰箱 (Panasonic 公司); 905-ULTS 负 80 °C 超低温冰箱 (Thermo Scientific 公司); UPR-I-10T 型超纯水机 (四川优普超纯科技有限公司)。



2.5.1 专属性 按选定的液相色谱-质谱联用条件,检测 6 个不同来源的空白血浆,并得到空白血浆、空白血浆+混合对照品或内标以及受试者血浆样品的代表图谱,如图 2;由图可见,DTZ、MA 和 M1 保留时间分别为 1.68、1.66、1.61 min,血浆中内源性物质不干扰 DTZ、MA 和 M1 与相应内标的测定。



A. 空白血浆 (blank plasma) B. 空白血浆 + 对照品 DTZ (19.71 ng · mL⁻¹), MA (6.732 ng · mL⁻¹), M1 (0.6210 ng · mL⁻¹) (blank plasma spiked with reference substances) C. 空白血浆 + 内标 (1.021 ng · mL⁻¹) [blank plasma spiked with IS (1.021 ng · mL⁻¹)] D、E. 某受试者单次口服 30 mg DTZ 3.5 h 后血浆样品 (volunteer plasma sample 3.5 h after single oral administration of 30 mg DTZ)

图 2 血浆中各对照品和内标色谱图

Fig. 2 Representative chromatograms for each analyte and IS in human plasma

2.5.2 标准曲线与定量下限 取①~⑦号混合对照品系列溶液 30 μL, 加入空白血浆稀释至 600 μL, 涡旋后得混合对照品血浆, 照“2.4”项下处理测定, 以对照品峰面积与内标峰面积的比值 Y 为纵坐标, 质量浓度 C 为横坐标, 进行加权直线回归, 权重为 $1/C^2$, 得 DTZ、MA 和 M1 的回归方程:

$$Y = 0.03813C + 8.684 \times 10^{-4} \quad r = 0.9996$$

$$Y = 0.08982C + 8.198 \times 10^{-4} \quad r = 0.9986$$

$$Y = 0.5524C - 6.551 \times 10^{-3} \quad r = 0.9993$$

线性范围依次为 0.1978~40.16、0.2511~5.017 和 0.2149~20.02 ng · mL⁻¹; 各定量下限分别为 0.1978、0.2511、0.2149 ng · mL⁻¹, 其对照品血浆的精密性 RSD ($n=6$) 为 7.3%、3.1% 和 5.7%, 准确度在 92.1%~103.7%、98.3%~100.6% 和 94.8%~102.5% 之间。

2.5.3 准确度与精密性 精密移取⑧~⑪号混合对照品质控溶液 30 μL, 用空白血浆稀释至 600 μL,

得到混合对照品高、中、低、极低质控样品,照“2.4”项下方法处理后进样分析,计算精密度与准确度($n=6$)。批内测定6次,计算批内RSD;连续测定3批计算批间RSD,结果见表1。4个不同浓度的生物样品测定的精密度RSD均小于10.8%,回收率均在85%~115%范围内,符合生物样品分析要求。

2.5.4 提取回收率 依“2.5.3”项制备低、中、高混合对照品血浆,按“2.4”项下方法处理后分析测定,得提取后各对照品峰面积;另取相同浓度未经提取的低、中、高质控溶液与内标,分析测定得提取前各对照品峰面积。每一浓度均测定6个样本,将提取后的峰面积与未提取的峰面积相比,计算提取回收率。由表1可知,低、中、高3个浓度的样品回收率相近,均在80%左右。

表1 血浆中各待测物的准确度、批内和批间精密度、提取回收率($n=6$)

Tab. 1 Accuracy, intra-day and inter-day precision, and extraction recoveries of analyts

待测物 (Analyt)	质量浓度 (mass concentration) / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	准确度 (accuracy) / %	精密度 (precision), RSD/ %		提取 回收率 (extraction recovery) / %, RSD/ %
			批内 (intra- day)	批间 (inter- day)	
DTZ	0.2016	87.6	8.4	8.5	—
	0.4955	104.6	5.3	4.7	78.3, 4.5
	20.07	98.0	6.3	2.6	80.1, 1.5
	30.23	101.3	1.7	3.8	77.1, 2.3
MA	0.2037	97.1	10.8	8.9	—
	0.5014	106.8	8.4	7.5	78.5, 3.3
	9.836	97.4	6.12	2.5	80.0, 2.3
	14.87	101.1	0.73	1.8	77.4, 3.4
M1	0.2508	106.5	4.2	5.0	—
	0.7475	108.0	4.5	4.0	78.9, 1.6
	2.520	99.1	1.9	3.3	77.3, 2.4
	3.810	100.2	3.4	4.0	75.2, 1.3

2.5.5 基质效应与稳定性 将混合对照品低、高浓度质控溶液分别加入含内标的乙腈或经乙腈提取后的空白血浆中,处理后进行检测。计算内标归一化基质效应因子,结果表明各对照品的内标归一化基质效应因子在1.04~1.09之间,基质对于未知样品测定结果准确度的影响可以忽略。另外,评估了 -70°C 下4次冻融后稳定性、样品前处理过程冰上放置6 h稳定

性、含药血浆 -70°C 长期保存51 d稳定性以及储备液 -20°C 下保存35 d稳定性。结果表明在上述各条件下,各质控样品均保持稳定。

2.6 健康受试者中血浆样品的测定

经长沙市第三医院伦理委员会批准,24名健康受试者签署知情同意书,并统一体格检查后参加本试验。禁食过夜后,早晨空腹后以240 mL温开水一次性送服DTZ片30 mg,于0、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、8、10、12、14、24 h,采集受试者静脉血4 mL。依所建方法进行测定,并对血药浓度进行统计分析,血药浓度-时间曲线和相关药动学参数分别见图3和表2。DTZ与MA血药浓度-时间曲线呈现双峰,提示其在体内可能经过肝肠循环,而M1无此过程。

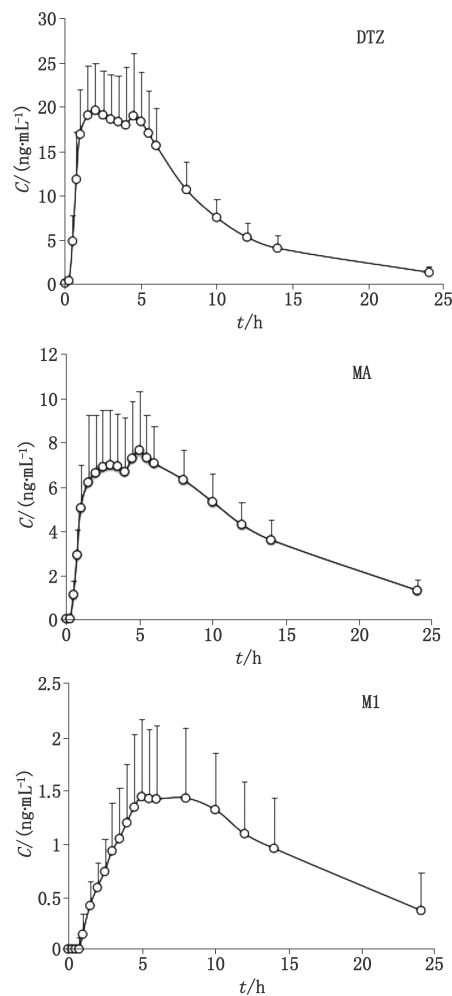


图3 24名健康受试者空腹单剂量口服DTZ片后DTZ、MA、M1的平均药-时曲线图

Fig. 3 Mean plasma concentration-time curves of DTZ, MA and M1 in 24 healthy volunteers after single oral administration of 30 mg DTZ tablets in fasting condition

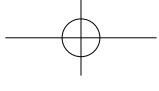


表 2 受试者空腹口服 DTZ 片后 DTZ、
MA、M1 的药动学参数

Tab. 2 Pharmacokinetic parameters of DTZ,
MA and M1 in healthy volunteers after oral administration
of DTZ tablets in fasting condition

参数 (parameter)	DTZ	MA	M1
T_{max}/h	3.19 ± 1.73	4.25 ± 1.93	7.06 ± 1.97
$C_{max}/(ng \cdot mL^{-1})$	22.2 ± 6.34	8.38 ± 2.96	1.52 ± 0.70
$T_{1/2}/h$	5.16 ± 1.54	7.07 ± 1.48	7.66 ± 4.96
K/h^{-1}	0.15 ± 0.05	0.10 ± 0.03	0.19 ± 0.20
$V_z/F/L$	1 159.63 ± 296.86	2 854.32 ± 1 118.13	12 904.93 ± 7 306.27
$Cl/F/(L \cdot h^{-1})$	163.77 ± 50.57		
MRT/h	8.09 ± 1.15	12.12 ± 1.82	15.33 ± 5.46
$AUC_{0-24h}/$ ($ng \cdot h \cdot mL^{-1}$)	188.71 ± 50.97	102.10 ± 25.99	21.46 ± 10.36
$AUC_{0-\infty}/$ ($ng \cdot h \cdot mL^{-1}$)	197.99 ± 56.38	115.78 ± 29.07	27.22 ± 15.49

3 讨论

本试验建立的 HPLC-MS/MS 方法,可同时测定人血浆中 DTZ 及其活性代谢物 MA 和 M1 的血药浓度,经完全方法学验证,符合生物样品分析要求。与施效金^[15]、Molde^[16]和 Quaglia^[17]建立的方法相比,本方法更加灵敏高效,简单快捷,定量下限达到 $0.1978 ng \cdot mL^{-1}$ (DTZ),样品分析时间少于 2.5 min,适用于 DTZ、MA 和 M1 的临床血药浓度检测。

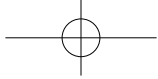
将此方法应用于 24 名健康志愿者空腹口服 DTZ 片的药动学研究,结果发现不同受试者相同取样时间点 DTZ、MA 和 M1 的血药浓度差异较大,个体间生物利用度变异大,与 DTZ 片的说明书描述一致,这可能与其首过代谢有关。由于 DTZ 主要在肝脏中被 CYP2D6 和 CYP3A 代谢,所以不同个体间代谢酶的活性差异可能是导致 DTZ、MA 和 M1 的血药浓度个体差异大的主要原因。DTZ 的血药浓度-时间曲线出现明显双峰,这与 Smith 等^[18]观察到的现象一致;另外首次发现 MA 的血药浓

度-时间曲线也呈现明显的双峰,提示它们均存在肠肝循环过程,但仍需要进一步研究求证。因 DTZ 是 P-gp 的底物,肝脏和肠道中 P-gp 的表达和活性差异也可能影响 DTZ 和 MA 的口服吸收与排泄。鉴于 DTZ 的口服药动学过程复杂,且 DTZ 及其代谢物血药浓度与生物利用度个体变异大,为达到相同的血药浓度,不同个体口服给药量应不同。

本研究为临床 DTZ 相关的药动学与药效学研究提供了同时测定 DTZ 及其活性代谢物的 HPLC-MS/MS 方法,并探讨了 DTZ、MA 和 M1 的药动学特征,为进一步药动学研究打下了基础,具有显著的应用价值。

参考文献

- [1] ECHIZEN H, EICHELBAUM M. Clinical pharmacokinetics of verapamil, nifedipine and diltiazem [J]. Clin Pharmacokinet, 1986, 11(6): 425
- [2] CHAFFMAN M, BROGDEN RN. Diltiazem, a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy [J]. Drugs, 1985, 29(5): 387
- [3] SASEEN JJ, CARTER BL, BROWN TE, *et al.* Comparison of nifedipine alone and with diltiazem or verapamil in hypertension [J]. Hypertension, 1996, 28(1): 109
- [4] GARCIA-PEREZ B, AYALA I, CASTELLS MT, *et al.* Effects of nifedipine, verapamil and diltiazem on serum biochemical parameters and aortic composition of atherosclerotic chickens [J]. Biomed Pharmacother, 2005, 59(1-2): 1
- [5] BUCKLEY MM, GRANT SM, GOA KL, *et al.* Diltiazem. A reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use [J]. Drugs, 1990, 39(5): 757
- [6] MURATA K, YAMAHARA H, NODA K. Pharmacokinetics of diltiazem and its metabolites in dogs after oral administration of a multiparticulate sustained-release preparation [J]. Pharm Res, 1993, 10(8): 1165
- [7] PIEPHO RW, BLOEDOW DC, LACZ JP, *et al.* Pharmacokinetics of diltiazem in selected animal species and human beings [J]. Am J Cardiol, 1982, 49(3): 525
- [8] HERMANN P, RODGER SD, REMONES G, *et al.* Pharmacokinetics of diltiazem after intravenous and oral administration [J]. Eur J Clin Pharmacol, 1983, 24(3): 349
- [9] NAKAMURA S, USUKI S, ITO Y, *et al.* Metabolic fate of diltiazem. Distribution, excretion and protein binding in rat and dog [J]. Arzneimittelforschung, 1987, 37(11): 1244



- [10] YABANA H, NAGAO T, SATO M. Cardiovascular effects of the metabolites of diltiazem in dogs [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1985, 7 (1): 152
- [11] GUAN XF, LI DY, YIN WJ, *et al.* Population pharmacokinetic modeling of diltiazem in Chinese renal transplant recipients [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2018, 43 (1): 55
- [12] PATEL CG, LI L, GIRGIS S, *et al.* Two-way pharmacokinetic interaction studies between saxagliptin and cytochrome P450 substrates or inhibitors: simvastatin, diltiazem extended-release, and ketoconazole [J]. *Clin Pharmacol*, 2011, 2 (3): 13
- [13] MOLDEN E, JOHANSEN PW, BOE GH, *et al.* Pharmacokinetics of diltiazem and its metabolites in relation to CYP2D6 genotype [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2002, 72 (3): 333
- [14] MAYHEW BS, JONES DR, HALL SD. An *in vitro* model for predicting *in vivo* inhibition of cytochrome P450 3A4 by metabolic intermediate complex formation [J]. *Drug Metab Dispos*, 2000, 28 (9): 1031
- [15] 施孝金, 钟明康, 王宏图, 等. HPLC 法同时测定人血浆中地尔硫草及其代谢产物 [J]. *药物分析杂志*, 1995, 15 (6): 20
- SHI XJ, ZHONG MK, WANG HT, *et al.* Simultaneous assay for diltiazem and deacetyldiltiazem in human plasma by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal*, 1995, 15 (6): 20
- [16] MOLDE E, HELEN B G, CHRISTENSEN H, *et al.* High-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis of diltiazem and 11 of its phase I metabolites in human plasma [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 33 (2): 275
- [17] QUAGLIA MG, DONATI E, FANALI S, *et al.* Analysis of diltiazem and its related substances by HPLC and HPLC/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 37 (4): 695
- [18] SMITH MS, VERGHESE CP, SHAND DG, *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of diltiazem [J]. *Am J Cardiol*, 1983, 51 (8): 1369
- (本文于 2019 年 4 月 1 日修改回)