

LC-MS/MS를 이용한 혈장 중 레르카니디핀의 분석

장문선¹ · 나숙희¹ · 장규영¹ · 강승우^{1, 2} · 한상범² · 이경률^{1, 3} · 이희주^{1, 3*}

¹바이오코아(주) 신약개발지원사업부,
²중앙대학교 약학대학, ³(재)서울의과학연구소 약물동력학팀
(2007. 10. 8. 접수. 2008. 1. 15. 승인)

Determination of lercanidipine in human plasma by LC-MS/MS

Moon-Sun Jang¹, Sookie La¹, Kyu Young Chang^{1, 2}, Seung Woo Kang^{1, 2},
Sang Beom Han², Kyung Ryul Lee^{1, 3} and Hee Joo Lee^{1, 3*}

¹Drug Development Supporting Service Division, BioCore Co., Ltd., IT Mi-Rae Tower 9F #60-21,
Gasan-dong, Geumcheon-gu, Seoul, 153-023, Korea

²College of Pharmacy, ChungAng University, 221, Heukseok-dong, Dongjak-gu, Seoul, 155-756, Korea

³Dept. of Pharmacokinetics, Seoul Medical Science Institute, Seoul Clinical Laboratory, 7-14,
Dongbinggo-dong, Yongsan-gu, Seoul, 140-809, Korea

(Received October 8, 2007; Accepted January 15, 2008)

요 약: LC-MS/MS를 이용하여 신속하고 정확한 혈장 중 레르카니디핀의 분석법을 개발하고 이 분석법에 대한 검증을 수행하였다. 혈장에 내부표준물질로 사용한 아로디핀을 첨가한 후 아세토니트릴로 단백질을 침전시키고, 그 상층액을 취하여 건조시킨 후 50% 아세토니트릴로 재용해하여 LC-MS/MS로 분석하였다. MS/MS의 MRM (multiple reaction monitoring) 방법을 이용하여 혈장 중 레르카니디핀을 어떠한 분석의 방해물 없이 선택적으로 검출할 수 있었다. 레르카니디핀의 표준 검량선은 0.05-20 ng/mL의 농도 범위에서 우수한 직선성($r = 0.9994$)을 보였으며, 일내, 일간 재현성은 변동계수 11.7% 이하, 정확성은 94.4-114.8%로 레르카니디핀의 약물동력학적 연구에 적용되기에 충분한 감도와 특이성, 직선성, 정밀성 및 정확성을 가지고 있음을 확인하였다.

Abstract: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method has been developed and validated for the quantitative determination of lercanidipine in human plasma. After addition of internal standard (amlodipine), plasma was precipitated with acetonitrile and the supernatant was evaporated. The residues were dissolved in 50% acetonitrile and analyzed by LC-MS/MS. Using MS/MS with multiple reaction monitoring (MRM) mode, lercanidipine were selectively detected without severe interference from human plasma. The standard calibration curve for lercanidipine was linear ($r = 0.9994$) over the concentration range 0.05-20.0 ng/mL in human plasma. The intra- and inter-day precision over the concentration range of lercanidipine was lower than 11.7% (correlation of variance, CV), and accuracy was between 94.4-114.8%. This method has been successfully applied to the pharmacokinetic study of lercanidipine in human plasma.

Key words: lercanidipine, LC-MS/MS, pharmacokinetic study

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-2027-6250 Fax : +82-(0)2-2027-6299

E-mail : heejoolee0@yahoo.co.kr

1. 서 론

염산레르카니디핀 ((±)2-[(3,3-diphenylpropyl)methylamino]-1,1-dimethylethyl methyl(4RS)-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate monohydrochloride)은 고혈압의 치료에 사용되는 dihydropyridine계 칼슘 통로 차단제(Ca²⁺-channel blocker)이다.¹⁻⁵ 레르카니디핀은 매우 우수한 지질 친화성을 가지고 있어 칼슘 통로 수용체의 인접 지질 이중층에 강하게 결합하여 이로부터 서서히 방출된다.^{2,7} 이러한 작용기전으로 인해 레르카니디핀은 24 시간 이상의 긴 작용지속 시간을 가지며⁵ 또한, 다른 칼슘 통로 차단제보다 10-100배 더 큰 혈관 선택성⁶을 가지고 있어 강압효과 뿐만 아니라 단시간에 작용하는 dihydropyridine 계열의 칼슘 통로 차단제에 비하여 현저히 낮은 부작용을 나타낸다.^{6,9} 강력한 항산화 작용을 가지고 있어 죽상동맥경화증(atherosclerosis)에 대한 예방 및 치료효과를 가지고 있으며,^{5,10-11} 1일 1회 복용으로 환자의 순응도를 높임으로써 고혈압 치료에 있어서 많은 기대를 받는 제3세대 칼슘 통로 차단제이다.^{2,3,5,11-12}

염산레르카니디핀의 라세메이트 정제 형태로 복용된 레르카니디핀은 거의 대부분 장내에서 흡수되며, 1.5 내지 3 시간 후 혈장 내 최대 농도에 도달하고, 소실반감기는 2-5 시간이다.^{6,9} 염산레르카니디핀 10, 20, 40 mg을 사람에게 투여하였을 때, 비선형 약물동력학적 특성을 나타내며, 20 mg 경구 투여시에 이미 최고 혈중 농도에 도달한다고 보고되어 있다.²

지금까지 보고된 생체시료 중의 레르카니디핀의 분석은 주로 질량분석기를 이용한 것으로 고성능 액체 크로마토그래프-탠덤 질량분석기(HPLC-MS/MS),¹³⁻¹⁵ 초고성능 액체 크로마토그래프-탠덤 질량분석기(Ultra performance liquid chromatograph-MS/MS, UPLC-MS/MS),¹⁶ 키랄 칼럼을 사용하여 레르카니디핀의 광학이성질체를 분리한 HPLC-MS/MS 분석법¹⁷⁻¹⁸ 등이 보고되어 있다. HPLC-MS/MS를 이용하여 레르카니디핀 및 다른 칼슘 채널 차단제를 동시 분석한 논문의 경우,^{13,14} 정량한계(limit of Quantitation, LOQ)가 너무 높아 경구투여 후 36시간까지 혈중모니터링이 필요한 생물학적동등성시험 등의 임상시료를 분석하는 데는 부적합하였다.

키랄 칼럼을 사용하여 레르카니디핀의 광학이성질체를 분리한 HPLC-MS/MS 분석법의 경우, 정량한계를 0.025 ng/mL까지 낮추어 정량하기 위해, 1 mL의 혈장을 50 µL로 농축하고 이 중 20 µL를 분석기기에

주입하였다. 따라서 단백질 침전법으로는 완전히 제거되지 않은 혈장 내 많은 매트릭스 성분들이 농축된 상태로 칼럼에 다량 주입되게 되어, 칼럼의 오염으로 인한 시스템의 불안정성이 초래될 가능성이 높았다.

이온포집 질량분석기(ion-trap mass spectrometer)를 사용하여 혈장 중의 레르카니디핀을 분석한 Salem 등의 논문¹⁵에서는, 정량한계를 낮추기 위하여 1 mL의 혈장을 사용하여 100 µL로 농축하고 이 중 60 µL를 분석기기에 주입하였다. 4 단계의 액체-액체 추출법(liquid-liquid extraction, LLE)을 사용하여 혈장 내 매트릭스 성분들은 효과적으로 제거하였으나, 전처리 과정이 너무 복잡하여 수백-수천 개의 생체시료 분석을 수행해야 하는 약물동력학 연구의 고효율 분석법(high-throughput analysis)으로는 적합하지 않았다.

UPLC-MS/MS의 경우, 짧은 분석 시간과 높은 분리능으로 최근 생체시료 중의 약물 분석에 많이 적용되고 있으나, 아직까지는 보급률이 낮고 사용할 수 있는 칼럼에 제한성이 있어, 많은 실험실에서 일상적인 분석법으로 이용하기에는 한계가 있다.

따라서, 본 연구에서는 기존 분석법의 단점을 개선하고, 많은 실험실에서 일반적으로 사용할 수 있는 레르카니디핀의 생체시료 분석법을 개발하였다. 이 분석법은 이미 보고된 분석법에 비교하여 시료 전처리가 간단하고, 낮은 정량한계를 가지며, 생체시료 분석법으로서의 양호한 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 나타내었다. 이 분석법을 이용하여 36 명의 건강한 한국인 남성에게 염산레르카니디핀 20 mg을 투여하고, 혈장 중 레르카니디핀의 농도를 구하여 약물동력학 연구에 응용하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

염산레르카니디핀 표준품은 대원제약(Seoul, Korea)으로부터 제공받았으며, 내부표준물질로 사용한 암로디핀은 Sigam사(St. Louis, MO, USA)의 시판품을 구입하였다. 아세트니트릴과 메탄올, 물은 Fisher Scientific사(Springfield, NJ, USA)의 HPLC급을 사용하였고, 아세트산 암모늄, formic acid 등의 기타 시약들은 특급 및 1급 시약들을 사용하였다.

본 연구에 사용한 HPLC 시스템으로 Waters 2795 Alliance HT (Milfold, MA, USA)를, 탠덤 질량분석기(MS/MS)는 Waters Quattro Micro (Milfold, MA, USA)

를 사용하였다. HPLC 칼럼은 Thermo BetaBasic C18 (2.1×150 mm, 5 μ m, San Jose, CA, USA)을 사용하였으며, 데이터 처리장치로는 MassLynx (Ver. 4.1)를 사용하였다. 기타 장비로는 원심분리기(Micro-12, Hanil Science Industrial Co. Ltd., Incheon, Korea), 탁상용 혼합기(Maxi MixII, Thermolyne, Dubuque, IA, USA) 및 질소 증발기(MG-2100, Eyla, Tokyo, Japan) 등을 사용하였다.

2.2. LC-MS/MS 조건 최적화

건강한 성인 혈장 중 레르카니디핀의 분석은 이미 보고된 LC-MS/MS 분석법들을 참고하여 최적의 조건을 확립한 후 수행하였다. 전처리된 혈장 시료는 다음의 조건에서 정량하였다. 이동상으로는 1 mM 아세트산 암모늄 완충액과 아세토니트릴의 혼합용액(40/60, v/v)을 사용하였으며, formic acid를 전체 용액에 0.1%가 되도록 첨가하였다. 칼럼은 Thermo BetaBasic C18 (2.1×150 mm, 5 μ m)을 사용하였으며 유속은 220 μ L/min, 분석칼럼의 오븐 온도는 45 $^{\circ}$ C로 일정하게 하였다.

피크 검출은 triple-quadrupole mass spectrometer를 이용하여 MRM (multiple reaction monitoring) 방법으로 검출하였다. 이온화는 electrospray ionization (ESI)을 이용하여 positive ion mode로 분석하였으며, nebulizing gas는 질소를, collision gas는 아르곤 가스를 사용하였다. 기타 최적화된 MS/MS 분석 파라미터는 Table 1에 요약하였다.

MRM 방법을 이용한 레르카니디핀과 내부표준물질인 암로디핀의 precursor ion은 각각 m/z 612와 409의 수소화된 분자이온([M+H]⁺)을 사용하였으며, 생성된 product ion으로 m/z 280과 238을 각각 모니터링 하였다.

Table 1. Optimum operating mass spectrometric parameters for lercanidipine and amlodipine (IS)

Parameter	Value
Source temperature ($^{\circ}$ C)	120
Desolvation temperature ($^{\circ}$ C)	350
Cone gas flow rate (L/h)	23
Desolvation gas flow rate (L/h)	1000
Transition dwell time (s)	0.5
Capillary voltage (kV)	4
Cone voltage (V)	30 (10 for IS)
Collision energy voltage (eV)	20 (10 for IS)
Collision gas (mbar)	4.0×10^{-3}

2.3. 표준검량선 작성 및 분석법 검증

염산레르카니디핀 표준품을 메탄올에 녹여 농도를 레르카니디핀으로서 1,000 μ g/mL로 만들어 냉장 보관시키고, 이 용액을 냉동 보관하였던 공혈장으로 희석하여 레르카니디핀의 혈장 중 농도가 각각 0.05, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 및 20 ng/mL 농도가 되도록 표준혈장을 만들었다. 또한 내부표준물질인 암로디핀은 메탄올에 녹여 1,000 μ g/mL가 되도록 한 후 50% 아세토니트릴로 희석하여 2 μ g/mL가 되도록 제조하여 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 각각의 표준혈장 300 μ L를 1.5 mL 튜브에 넣고 여기에 내부표준물질 용액 20 μ L(암로디핀, 2 μ g/mL)와 아세토니트릴 600 μ L를 가하여 60 초간 잘 섞었다. 잘 섞인 시료를 13,000 rpm에서 5 분간 원심분리 한 후, 상정액을 깨끗한 튜브에 옮기고, 40 질소기류로 완전히 건조시켰다. 여기에 50% 아세토니트릴 200 μ L를 가하여 재용해 시키고, 이 중 20 μ L를 취하여 LC-MS/MS에 주입하였다. 여기에서 얻은 내부표준물질의 피크 면적에 대한 레르카니디핀의 피크 면적비를 가지고 검량선을 작성하였다. 하루에 실험을 5 번 시행하여 일내 재현성과 정확성을 구하였고, 5 일간 실험을 반복 수행하여 일간 재현성과 정확성을 구하였다.

2.4. 혈장 시료의 처리 및 생체이용률 파라미터 계산

19-30세 사이의 건강한 남자 지원자 36 명에게 20 mg의 염산레르카니디핀을 240 mL의 물과 함께 경구 투약하였다. 채혈시간은 반감기의 3 배 이상인 36 시간 동안으로 하였고, 채혈 횟수는 약물투약 직전과 투약 후 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24 및 36 시간에서 채혈하여 영하 70 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

각 피험자의 혈장 중 레르카니디핀의 정량을 위하여, 시간별로 채취하여 영하 70 $^{\circ}$ C에 보관했던 혈장시료를 실온에 방치하여 녹인 후, 3 초간 진탕한 다음 이 혈장 300 μ L를 취하고, 위 검량선 작성시와 동일한 방법으로 처리하였다. 얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크 면적에 대한 레르카니디핀의 피크 면적비를 구하여 미리 작성한 검량선으로부터 혈장 중 레르카니디핀의 농도를 구하였다.

약물동력학적 파라미터는 LC-MS/MS 분석방법에 의하여 얻은 혈장 중 약물농도-시간 곡선으로부터 구하였다. 최고혈장중농도(C_{max})와 최고혈장중농도 도달 시간(T_{max})은 실측치로부터 직접 구하였고, 투약 후 마지막 채혈시간인 36 시간까지의 혈장중농도-시간곡선

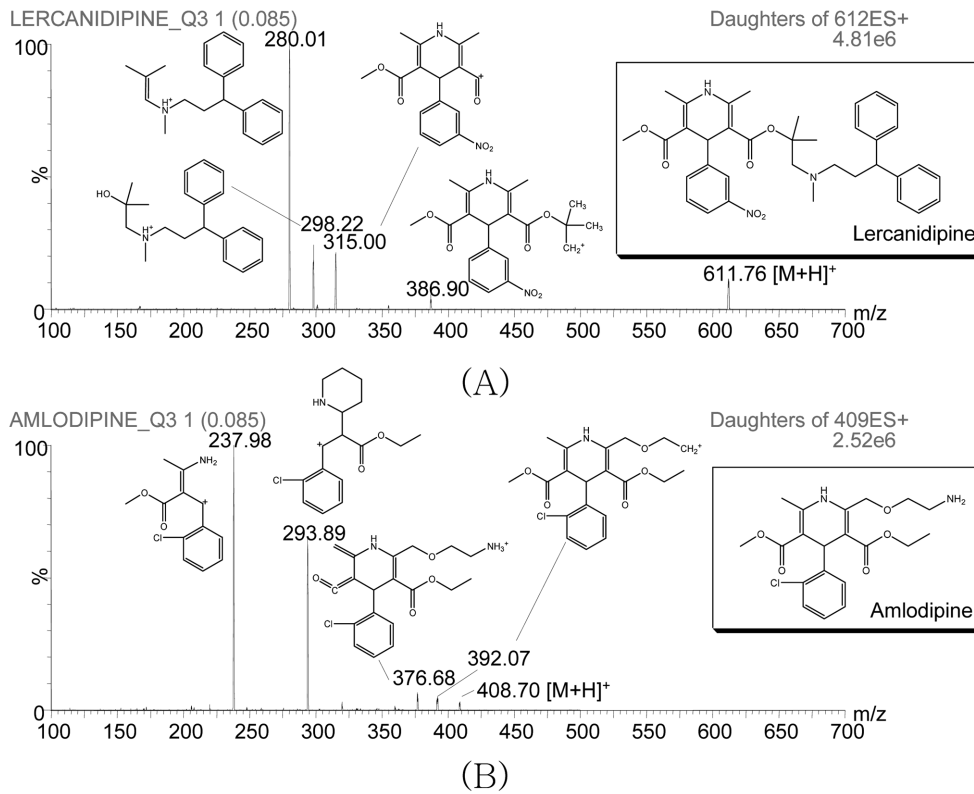


Fig. 1. Product ion mass spectra of [M+H]⁺ ions of (A) lercanidipine and (B) amlodipine (IS).

하 면적(AUC_t)은 사다리꼴 공식에 의하여 BA Calc 2002 (Ver. 1.1.1, KFDA, Seoul, Korea) 프로그램을 이용하여 산출하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 혈장 중 레르카니디핀의 분석법 개발 및 검증

레르카니디핀과 내부표준물질인 암로디핀의 product ion mass spectrum과 각각의 fragment ion에 대한 가능한 분자구조를 Fig. 1에 나타내었다. 레르카니디핀은 positive ion mode에서 precursor ion으로 [M+H]⁺, m/z 612로 검출되었으며 collision cell에서 충돌에 의해 ester bond가 끊어져 m/z 315와 m/z 298로 분해되고, 이 중 m/z 298 ion은 물 분자를 잃어 (-H₂O, 18 amu) m/z 280 ion을 형성한다.¹⁵ m/z 612의 fragment ion m/z 387은 N-dealkylation 반응에 의해 alkylamine 부분(-CH₃-NH-CH₂CH₂CH(Ar)₂, -225 amu)을 잃어 형성된 것으로 추정된다. 암로디핀은 positive

mode에서 precursor ion으로 [M+H]⁺, m/z 409로 검출되며 collision cell에서 충돌에 의해 m/z 392, 377, 294 및 238을 생성한다. [M+H]⁺ ion과 17 amu의 질량 차이를 보이는 m/z 392는 암모니아 분자 (-NH₃)를 잃어 형성되며, m/z 377은 [M+H]⁺ ion과 32 amu 차이를 보이는데 이는 메탄올 분자 (-CH₃OH)를 잃는 경우에 나타나는 특징적인 질량차이이다.¹⁹ m/z 238과 294의 생성에 대해서 Gibbons 등¹⁹⁻²⁰은 수소화된 암로디핀 ion의 molecular rearrangement mechanism이나 retro-Diels-Alder 반응에 의하여 형성된다고 제안하였다. 각각의 product ion scan을 통해, MRM mode에서의 정량을 위한 레르카니디핀과 암로디핀의 product ion으로 가장 감도가 큰 m/z 280과 238을 각각 선정하였다.

건강한 성인의 공혈장과 공혈장에 레르카니디핀과 내부표준물질을 함께 가한 것 및 레르카니디핀 제제 20 mg을 투여한 후 1.5 시간 후에 채혈한 혈장을 본 시험방법에 따라 전처리한 후, LC-MS/MS로 분석하여 얻은 크로마토그램을 Fig. 2에 나타내었다. 레르카

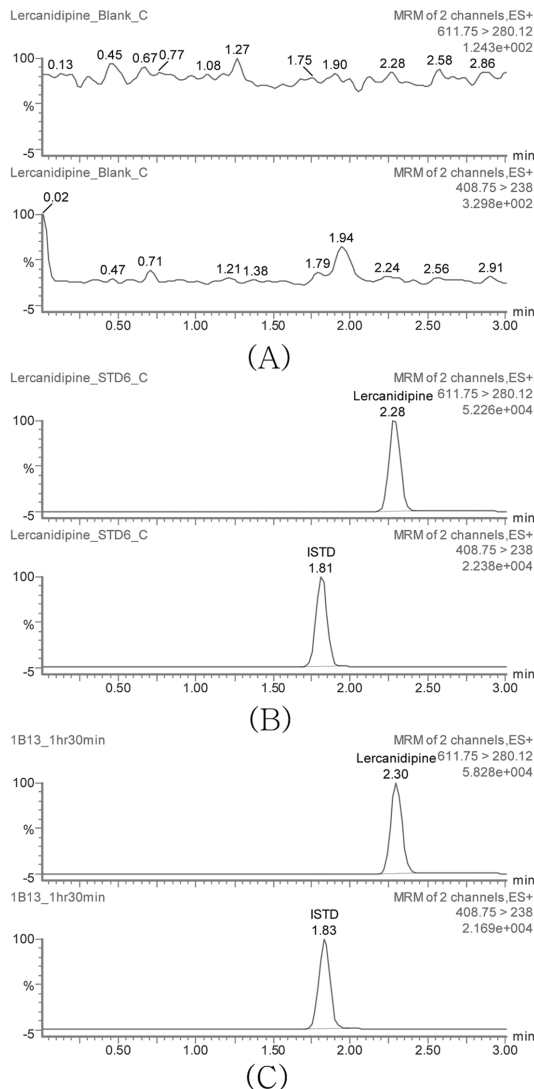


Fig. 2. Chromatograms of (A) blank human plasma, (B) blank human plasma spiked with lercanidipine (10 ng/mL) and internal standard (IS, amlodipine) and (C) plasma sample at 1.5 hr after oral administration of 20 mg lercanidipine tablets.

니디핀 피크의 유지시간은 약 2.3 분, 내부표준물질 암로디핀의 피크의 유지시간은 약 1.8 분이었으며, MS/MS의 높은 선택성 때문에 분석물질에 방해되는 물질은 나타나지 않았다.

공혈장 시료, 내부표준물질만 가한 혈장시료 및 0.05, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 및 20 ng/mL의 검량선용 표준혈장 시료를 각각 전처리한 후 LC-MS/MS 로 분석하였을 때, 혈장시료로부터 구한 레르카니디핀 검량선의 계산식은 $Y(\text{레르카니디핀/내부표준물질 피크 면적의 비율}) = 0.220425 \times (\text{레르카니디핀 농도, ng/mL}) + 0.00186629$ ($r = 0.9994$)로 0.05-20 ng/mL 범위에서 양호한 직선성을 나타내었다

혈장 중 레르카니디핀의 최저정량한계는 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(S/N ratio)를 10 이상으로 하고 정밀성이 20%(CV)이하이고, 정확성이 80-120%인 조건을 만족하는 0.05 ng/mL로 하였다. 최저정량한계를 포함한 검량선 농도 범위에서 레르카니디핀의 일내 및 일간 변동계수(CV)는 11.7% 이하로 나타났고, 정확성은 94.4-114.8%이었다(Table 2). 이로부터 혈장 중 레르카니디핀에 대한 본 LC-MS/MS 분석법은 인체에 대한 생체이용률 시험에 이용될 수 있는 충분한 감도와 특이성, 직선성, 정밀성 및 정확성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

3.2. 분석감도 비교

생체시료 중 레르카니디핀의 분석에 관한 많은 연구에서 2000년도 이전에는 HPLC에 자외선 검출기(UVD)를 사용하거나, TLC-radiometer를 사용하여 분석하였다. 이러한 고전적인 방법은 간섭물질과 피크가 겹치면 정량이 불가능하였으므로, 복잡한 시료 매트릭스에서 정량할 경우에는 이동상의 조성을 조절하여 최대한의 분리도가 유지되도록 하였다. 그 결과 1개의 시료당 분석시간이 10-20분 이상이 되어야 분석의 정확성과 정밀성을 확보할 수 있었다. 전임상 또는 임상 시험에서 의약품의 생체이용률 연구와 약물동력학 연

Table 2. Intra-day and inter-day precision and accuracy for determination of lercanidipine in human plasma (n=5)

Nominal concentration (ng/mL)	Intra-day		Inter-day	
	Precision (CV, %)	Accuracy (%)	Precision (CV, %)	Accuracy (%)
0.05	3.0	114.8	6.7	111.7
0.3	9.5	101.3	10.3	94.4
3	5.5	107.8	10.6	101.2
20	6.2	98.8	11.7	97.2

구를 수행하기 위해서는 수백-수천 개의 생체시료분석이 이루어져야 하는데, 고전적인 HPLC-UV, TLC 방법으로 분석을 하기에는 낮은 선택성과 긴 분석시간으로 인하여 적용하기가 매우 어려웠다.

이를 해결하기 위하여 2000년대 초반부터 LC-MS 또는 LC-MS/MS를 이용한 생체시료 중의 의약품 분석이 매우 활발하게 진행되었으며, 레르카니디핀 또한 LC-MS, LC-MS/MS (triple quadrupole과 ion trap 방식)에 의한 분석법이 보고되었다. 이 중 Kalovidouris 등¹⁶은 human plasma 시료 0.5 mL에서 LLE로 전처리하고 LC-MS/MS (triple quadrupole)로 분석하여 정량한계 0.05 ng/mL의 결과를 보고하였고, Salem 등¹⁵은 human plasma 시료 1.0 mL에서 복잡한 LLE로 전처리하고 ion trap 방식의 LC-MS/MS로 분석하여 정량한계 0.1 ng/mL를, Jabor 등¹⁷은 human plasma 시료 1.0 mL에서 역시 LLE로 전처리하고 normal phase (NP) LC-MS/MS로 분석하여 정량한계 0.025 ng/mL를 보고하였다. 하지만 본 연구에서 human plasma 시료 0.3 mL를 취하였고, 전처리로는 제단백(protein precipitation, PPT) 방식을 선택하여 LC-MS/MS로 분석한 결과, 정량한계가 0.05 ng/mL이었다. 따라서, 본 분석법은 전처리 방법의 효율성 측면과 시료량에 대한 분석감도면에서 기존에 보고된 방법에 비하여 매우 향상된 결과를 나타내었다.

3.3. 레르카니디핀 제제의 약물동력학적 연구

36 명의 건강한 남성 지원자에게 레르카니디핀 20 mg을 경구투여한 후 일정시간마다 채혈하여 얻은 혈장 중 평균 레르카니디핀의 농도-시간 곡선을 Fig. 3에 나타내었다. 본 분석조건에 의해서 레르카니디핀 20 mg을 경구투여한 후 반감기의 3배 이상인 36 시

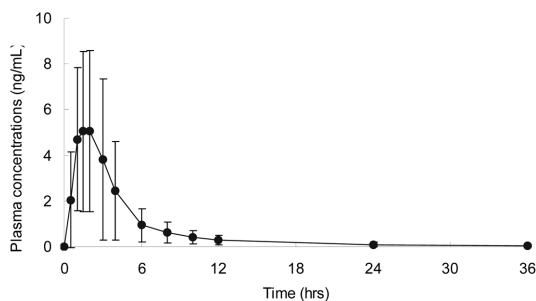


Fig. 3. Mean plasma concentrations of lercanidipine after oral administration of lercanidipine tablet (20 mg) to 36 healthy volunteers. Each point represents the mean±S.D.

간까지 레르카니디핀의 혈장 중 농도를 측정할 수 있었다. 레르카니디핀의 혈장중농도-시간곡선하 면적 (AUC)는 24.3 ± 16.0 ng · hr/mL, 최고혈장중농도(C_{max})는 6.8 ± 3.7 ng/mL, 최고혈장중농도 도달시간(T_{max})는 1.9 ± 1.0 hr이었다.

외국에서 보고된 자료^{6,9,17,21-22}에 의하면, 레르카니디핀 20 mg을 경구투여하였을 때 C_{max} 는 2.44-14.93 ng/ml, AUC_t 는 11.82-28.57 ng · hr/mL, T_{max} 는 1.0-3.0 hr, 그리고 $t_{1/2}$ 은 2.0-5.0 hr인 것으로 되어 있어, 본 연구에서 산출한 약물동력학적 파라미터와 크게 차이가 없음을 확인할 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 LC-MS/MS를 이용하여 보다 시료 전처리가 간편하고, 높은 감도와 짧은 분석시간을 갖는 레르카니디핀의 생체시료 분석법을 확립하였으며, 이 분석법에 대한 검증(validation)을 실시하였다. 본 분석법을 혈장 중의 레르카니디핀 정량 및 한국인을 대상으로 한 약물동력학 연구에 성공적으로 적용하여 약물동력학적 파라미터를 제시하였으며, 향후 임상시험 등의 관련분야에도 적용될 수 있으리라 사료된다.

참고문헌

1. C. Venkata and S. Ram, *Am. J. Cardiol.*, **89**(2), 214-215 (2002).
2. L. G. Herbette, M. Vecchiarelli, A. Sartani and A. Leonardi, *Blood Press Suppl.*, **2**, 10-17(1998).
3. K. J. McClellan and B. Jarvis B, *Drugs*, **60**(5), 1123-1140(2000).
4. M. Epstein, *Heart Dis.*, **3**(6), 398-407(2001).
5. L. M. Bang, T. M. Chapman and K. L. Goa, *Drugs*, **63**(22), 2449-2472(2003).
6. P. A. Meredith, *Expert Opin. Investig. Drugs*, **8**(7), 1043-1062(1999).
7. V. Barrios, C. Escobar, Á. Navarrp, L. Barrios, J. Navarro-Cid and A. Calderón, *Int. J. Clin. Pract.* **60**(11), 1364-1370(2006).
8. A. Cherubini, F. Fabris, E. Ferrari, D. Cucinotta, I. R. Antonelli and U. Senin, *Arch. Gerontol. Geriatr.*, **37**(3), 203-212(2003).
9. S. Omboni and A. Zanchetti, *J. Hypertens.*, **16**(12 Pt 1), 1831-1838(1998).

10. A. Corsini, M. Bonfatti, P. Quarato, M. R. Accomazzo, M. Raiteri, A. Sartani, R. Testa, S. Nicosia, R. Paoletti and R. Fumagalli, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **28**(5), 687-694(1996).
11. S. Bellosta, F. Bernini, *Curr. Atheroscler. Rep.*, **2**(1), 76-81(2000).
12. L. A. De Giorgio, F. Orlandini, P. Malasoma and A. Zappa, *Curr. Ther. Res.*, **60**(10), 511-520(1999).
13. A. B. Baranda, C. A. Mueller, R. M. Alonso, R. M. Jiménez and W. Weinmann, *Ther. Drug Monit.*, **27**(1), 44-52(2005).
14. A. B. Baranda, R. M. Alonso, R. M. Jiménez and W. Weinmann, *Forensic Sci. Int.*, **156**(1), 23-34(2006).
15. I. I. Salem, J. Idrees, J. I. Al Tamimi and P. Farina, *J. Chromatogr. B*, **803**(2), 201-207(2004).
16. M. Kalovidouris, S. Michalea, N. Robola, M. Koutsopoulou and I. Panderi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**(19), 2939-2946(2006).
17. V. A. P. Jabor, E. B. Coelho, D. R. Ifa, P. S. Bonato, N. A. G. dos Santos and V. L. Lanchote, *J. Chromatogr. B*, **796**(2), 429-437(2003).
18. V. A. P. Jabor, E. B. Coelho and V. L. Lanchote, *J. Chromatogr. B*, **813**(1-2), 343-346(2004).
19. J. Gibbons, J. Pugh, G. Dimopoulos-Italiano and R. Pike, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**(11), 1715-1723(2006).
20. T. Yasuda, M. Tanaka and K. Iba, *J. Mass Spectrom.*, **31**(8), 879-884(1996).
21. M. Barchielli, E. Dolfini, P. Farina, B. Leoni, G. Targa, V. Vinaccia and A. Tajana, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **29**(Suppl. 2), S1-S15(1997).
22. Martindale, *The complete drug reference*, 32nd Eds., p. 897(1999).