

液-质联用测定人血浆中兰索拉唑及其代谢产物浓度

任秀华¹, 申玲玲¹, 向道春¹, 刘宇¹, 陈倩¹, 张冬林¹, 施与群², 潘凤², 刘东¹ (1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院药学部, 湖北 武汉 430030; 2. 上海美优制药有限公司, 上海 201400)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱-质谱联用法同时测定人血浆中兰索拉唑及其代谢产物浓度。方法: 以奥美拉唑为内标, 血浆样品经乙腈沉淀后, 经 HPLC-MS/MS 分离分析。采用 Diamonsil C₁₈ 柱(150 mm×2.1 mm, 5 μm), 以甲醇-水(含 0.01% 甲酸)(43.3:56.7) 为流动相; 流速为 0.3 mL·min⁻¹, 采用电喷雾离子源(ESI), 以多离子反应监测方式(MRM) 进行负离子监测, 兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑磺和内标奥美拉唑的定量分析离子对分别为 m/z 368.0⁺163.9, 384.1⁺178.8, 384.1⁺115.9 和 326.2⁺280.1。结果: 兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑磺的线性范围分别为 11.4~4560, 1.26~504, 1.24~496 μg·L⁻¹, $r > 0.99$ 。定量下限分别为 11.4, 1.26, 1.24 μg·L⁻¹, 方法回收率在 85%~115% 之间。日内和日间 RSD 小于 10%。结论: 本方法灵敏、准确、可靠, 适用于兰索拉唑及其代谢产物的人体药动学研究。

[关键词] 高效液相色谱-质谱联用法; 兰索拉唑; 5-羟基兰索拉唑; 兰索拉唑磺; 血药浓度

[中图分类号] R927.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-5213(2010)22-1898-04

Simultaneous determination of lansoprazole and its metabolites in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry

REN Xiuhua¹, SHEN Lingling¹, XIANG Daochun¹, LIU Yu¹, CHEN Qian¹, ZHANG Donglin¹, SHI Yurichun², PAN Feng², LIU Dong¹ (1. Department of Pharmacy, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan 430030, China; 2. Shanghai Meiyou, CO., LTD, Shanghai 201400, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for the determination of lansoprazole and its metabolites 5-hydroxylansoprazole and lansoprazole sulfone in human plasma. **METHODS** Plasma samples were precipitated with acetonitrile and determined by HPLC-MS/MS using omeprazole as internal standard. The separation was carried out on a Diamonsil C₁₈ column(2.1 m×150 mm, 5 μm) with a mobile phase of methanol-water (including 0.01% formic acid) (43.3:56.7) and the flow rate was 0.3 mL·min⁻¹. ESI was performed in the MRM negative mode with using target ions at m/z 368.0⁺163.9 (lansoprazole), 384.1⁺178.8 (5-hydroxylansoprazole), 384.1⁺115.9 (lansoprazole sulfone), and 326.2⁺280.1 (omeprazole), respectively. **RESULTS** The calibration curves of lansoprazole, 5-hydroxylansoprazole and lansoprazole sulfone were obtained in the range of 11.4~4560, 1.26~502 μg·L⁻¹, and 1.24~496 μg·L⁻¹ with good linearity ($r > 0.99$), respectively. The LLOQ of lansoprazole, 5-hydroxylansoprazole and lansoprazole sulfone in plasma were 11.4, 1.26, 1.24 μg·L⁻¹, respectively. The method recovery was more than 85%, the relative recovery was 85%~115%, and the intra- and inter-day RSDs were less than 10%. **CONCLUSION** This method has good sensitivity and precision and is suitable for human pharmacokinetic studies of lansoprazole and its metabolites.

KEY WORDS: liquid chromatography tandem mass spectrometry; lansoprazole; 5-hydroxylansoprazole; lansoprazole sulfone; plasma concentration of drug

兰索拉唑是由日本武田株式会社研制开发的一种质子泵抑制剂, 临床广泛用于十二指肠溃疡、胃溃疡、胃食管返流病、病理性分泌过多如佐艾(Zollinger-Ellison) 综合征等。兰索拉唑还具有抗幽门螺杆菌作用, 其抗菌活性与柠檬酸铋相似, 抗菌力为奥美拉唑的 4 倍。兰索拉唑在肝脏中经 CYP2C19 和 CYP3A4 分别代谢为 5-羟基兰索拉唑和兰索拉唑磺, 二者也具有与母体化合物相同或更

强的抗菌活性。本试验在参考文献的基础上建立了同时测定人血浆样品中兰索拉唑及其代谢产物 5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑磺含量的液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS-MS), 对血浆样品的处理方法、内标的选择进行了摸索, 对色谱条件进行了优化。

1 材料

液相色谱系统: 岛津 LC-20AD 型高效液相色谱

[作者简介] 任秀华, 女, 博士, 主管药师, 电话: 027-83663519, E-mail: renxiuhua_rhx@yahoo.com.cn **[通讯作者]** 刘东, 男, 硕士, 副主任药师, 电话: 027-83663641, E-mail: ld_2069@163.com

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

谱仪, SIL-20ACHT 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱。MS/MS 系统[美国 API3200 型质谱仪, 配有电喷雾离子化源(ESI)]; 数据采集: API3200 Analysis 15.0 软件(美国 AB 公司); 兰索拉唑对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 100709-200501); 5-羟基兰索拉唑对照品(TLC Pharmachem 公司, 批号 1034-055B2); 兰索拉唑磺对照品(TLC Pharmachem 公司, 批号 102G-097A2); 内标奥美拉唑(四川珍珠制药有限公司, 批号 060801, 纯度 > 99.5%); 色谱纯甲醇、乙腈购自 Tedia 公司, 实验用水均为注射用水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱(5 μm, 150 mm × 2.1 mm); 流动相: 甲醇水(含 0.01% 甲酸)(43.3: 56.7); 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 自动进样器温度: 4 °C; 柱温: 40 °C; 进样量: 10 μL。采用 ESI-MRM 方式监测; 毛细管电压: -4.5 kV; 源温度: 500 °C; 锥孔气体流速: 40 L·h⁻¹; 去溶剂气体流速: 20 L·h⁻¹; 气帘气流速: 20 L·h⁻¹; EP: 5.0。

2.1.2 兰索拉唑质谱条件 检测离子对 368.0/163.9; DP-41V; EP-5V; CE-30V; CXP-11V; 5-羟基兰索拉唑质谱条件: 检测离子对 384.1/178.8; DP-40V; EP-6V; CE-30V; CXP-13V; 兰索拉唑磺质谱条件: 检测离子对 384.1/115.9; DP-48V; EP-5V; CE-45V; CXP-7V; 奥美拉唑质谱条件: 检测离子对 326.2/280.1; DP-50V; EP-5V; CE-40V; CXP-3V。

兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑磺及内标奥美拉唑的碎片离子质谱图见图 1。

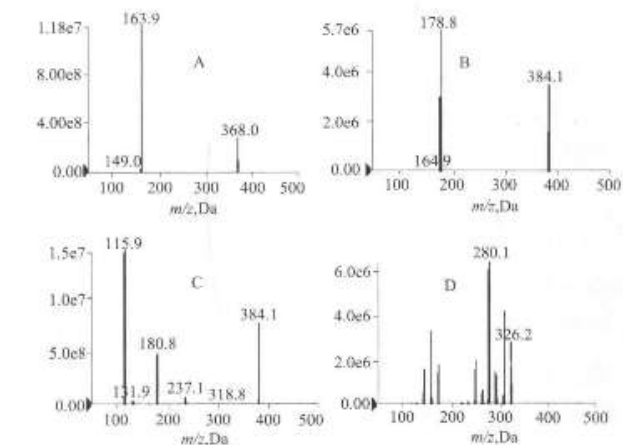


图 1 [M-H]⁺ 的产物离子扫描质谱图
A. 兰索拉唑; B. 5-羟基兰索拉唑; C. 兰索拉唑磺; D. 奥美拉唑
Fig 1 Full-scan product ion spectra
A. lansoprazole; B. 5-hydroxylansoprazole; C. lansoprazole sulfone; D. omeprazole (internal standard)

2.2 对照品溶液和内标溶液的配制及血浆样品的预处理

2.2.1 对照品溶液配制 分别精密称取兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑磺对照品 5.7, 4.2, 3.1 mg, 分别置于 50, 25, 25 mL 量瓶, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 得兰索拉唑(114 mg·L⁻¹) 储备液、5-羟基兰索拉唑(168 mg·L⁻¹) 储备液、兰索拉唑磺(124 mg·L⁻¹) 储备液, 置于 4 °C 冰箱保存备用。

2.2.2 内标溶液配制 精密称取 5.4 mg 奥美拉唑对照品, 置于 50 mL 量瓶中, 配成 108 μg·L⁻¹ 的储备液, 取储备液 4 mL 稀释至 50 mL, 配成 8.64 mg·L⁻¹ 内标工作液。

2.2.3 血浆样品预处理 取血浆样品 200 μL, 加入 8.64 mg·L⁻¹ 内标奥美拉唑 20 μL, 混匀, 加入 400 μL 乙腈, 涡旋混合 1 min, 16 600r·min⁻¹ 离心 10 min, 上清液 10 μL 进样。

2.3 色谱质谱行为 图 2A 为空白血浆处理后质谱图, 图 2B 为 285 μg·L⁻¹ 兰索拉唑、31.5 μg·L⁻¹ 5-羟基兰索拉唑、31 μg·L⁻¹ 兰索拉唑磺血浆样品和 8.64 mg·L⁻¹ 内标奥美拉唑血浆样品质谱图, 图 2C 为受试者服药 2 h 后血浆样品的代表性色谱图。从色谱图中可以看出, 血浆中内源性物质不干扰测定。

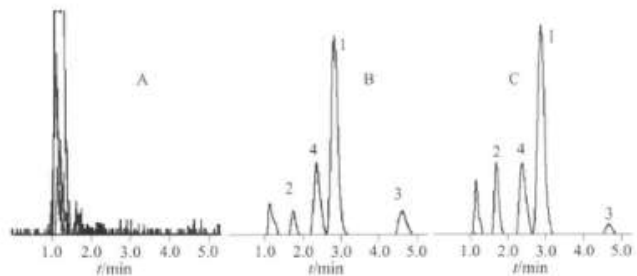


图 2 兰索拉唑及其代谢物的人血浆高效液相色谱-质谱-质谱图
A. 空白血浆; B. 空白血浆+对照品; C. 血浆样品图; 1 兰索拉唑; 2 5-羟基兰索拉唑; 3 兰索拉唑磺; 4 奥美拉唑
Fig 2 Representative HPLC-MS/MS chromatograms lansoprazole and its metabolites in human plasma
A. blank plasma; B. blank plasma + reference substance; C. sample; 1 lansoprazole; 2 5-hydroxylansoprazole; 3 lansoprazole sulfone; 4 omeprazole

2.4 标准曲线及定量限 取空白血浆 180 μL, 分别加入兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑和兰索拉唑磺标准系列溶液 20 μL, 配制成相当于兰索拉唑血浆质量浓度为 11.4, 28.5, 114, 285, 1 140, 2 280, 4 560 μg·L⁻¹; 5-羟基兰索拉唑血浆质量浓度为 1.26, 3.15, 12.6, 31.5, 126, 252, 504 μg·L⁻¹; 兰索拉唑磺血浆质量浓度为 1.24, 3.1, 12.4, 31, 124, 248, 496 μg·L⁻¹ 的样品。按“2.3”项下操作, 以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,

表 1 回收率和精密度测定结果

Tab 1 Determination of precision and accuracy

样品	加入量 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	日内($n=5$)			日间($n=15$)		
		测得量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%	回收率/%	测得量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%	回收率/%
兰索拉唑	28.5	27.4±1.8	6.55	96.28	29.3±1.9	6.54	102.74
	285	287.6±14.3	4.98	100.91	289.5±16.2	5.59	101.57
	2 280	2 212.0±58.5	2.64	97.02	2 144.0±99.8	4.65	94.01
5-羟基兰索拉唑	3.15	3.01±0.20	6.80	108.27	3.27±0.25	7.71	108.27
	31.5	31.3±1.1	3.56	100.09	31.8±1.9	5.99	101.57
	252	242.2±12.6	5.19	93.84	240.2±10.6	4.43	93.84
兰索拉唑砒	3.1	3.14±0.24	7.76	101.29	3.22±0.16	4.89	104.93
	31	30.5±1.3	4.22	98.45	30.6±1.6	5.40	96.91
	248	240.8±7.6	3.14	97.10	235.1±9.3	3.94	92.61

用加权($W=1/CC$)最小二乘法进行回归运算,绘制标准曲线,得到兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒直线回归方程分别为: $Y=0.00909X+0.0224$, $r=0.9991$; $Y=0.00856X+0.00605$, $r=0.9984$; $Y=0.014X+0.00354$, $r=0.9985$;三者血浆中最低定量下限分别可达11.4, 1.26, 1.24 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $S/N>10$ 。

2.5 回收率与精密度试验 配制兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒低、中、高3种浓度的血浆对照品各5份,按“2.3”项下操作,求得兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒和内标的面积,并与相应浓度的兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒对照品溶液直接进样的面积分别比较,计算绝对回收率。以测得血浆样本浓度与相应标准溶液的浓度比值计算相对回收率。将低、中、高浓度血浆样本1d内测定5份,连续测定3d,分别考察方法的日内和日间精密度,结果RSD均小于8%,精密度良好,见表1。

2.6 基质效应的考察 取空白血浆180 μL ,加入400 μL 乙腈,涡旋振荡1 min, 16 600 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,转移上清780 μL 至另一Ep管中,再加入8.64 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 内标奥美拉唑20 μL ,以及兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒低、中、高浓度各20 μL 后混匀(每个浓度各5管),10 μL 进样,得峰面积(A_1),并与相应浓度的对照品溶液直接进样的面积比较,计算基质效应。兰索拉唑低、中、高浓度平均基质效应分别为93.77%, 94.61%, 93.93%; 5-羟基兰索拉唑低、中、高3个浓度平均基质效应分别为110.40%, 102.84%, 100.83%; 兰索拉唑砒低、中、高3个浓度平均基质效应分别为104.13%, 93.75%, 97.68%;内标奥美拉唑的平均基质效应为99.92%;表明基质基本不干扰检测。

2.7 稳定性考察

2.7.1 冻融条件下的稳定性 配制低、中、高不同浓度兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒对照品血浆各5份,在24 h内25 $^{\circ}\text{C}$ 与-80 $^{\circ}\text{C}$ 之间反复融冻4次,按“2.3”项下进行处理测定,计算三者浓度。

结果低、中、高3个种浓度的RSD均小于10%,说明兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒在冷冻条件下稳定。

2.7.2 HPLC-MS-MS 稳定性 配制低、中、高不同浓度兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒对照品血浆各5份,按“2.3”项下进行处理,置于自动进样器中放置8 h后测定。结果显示,低、中、高3种浓度的RSD均小于5%,表明兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒血浆样品处理8 h后稳定。

2.7.3 长期稳定性 配制低、中、高不同浓度兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒对照品血浆各5份,置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存一个月后,取出按“2.3”项下处理。结果显示,低、中、高3种浓度的RSD均小于7%,表明兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒血浆样品-80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存一个月后稳定。

2.8 质量控制样本 配制低、中、高不同浓度兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒的质控样本;在志愿者样品测定过程中,随行测定质控样品,使其均匀分布在志愿者样品测试顺序中。结果RSD均在 $\pm 10\%$ 之内,说明测定结果可靠。

2.9 血样采集 12名受试者在试验前1天19:00后开始禁食,次日晨空腹口服受试制剂30 mg, 200 mL温水送下,给药2 h后可饮水,4 h后统一进标准餐,采血期间不得离开,避免剧烈运动,禁烟酒和含咖啡因类饮料。服药前(0 h)及服药后0.33, 0.67, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 6.0, 9.0, 12, 15 h,肘静脉采血3 mL于肝素化试管中,离心分离血浆,-80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻贮存待分析。兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒平均药时曲线见图3。12名志愿者兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒血药浓度-时间数据经DAS 2.1拟合,其主要药动学参数见表2。

3 讨论

有文献报道采用HPLC-UV法测定人血浆中兰索拉唑的浓度,血浆样本的处理多采用有机溶剂提取法,对于临床大量且复杂的生物样本来说,比较费时费力^[1,3]。同时测定兰索拉唑及其代谢产物5-

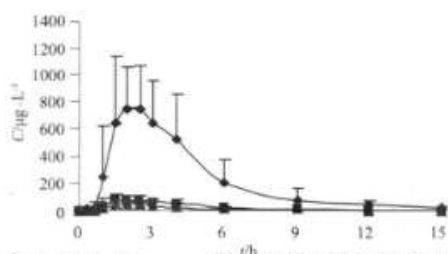


图 3 12 名志愿者口服 30 mg 兰索拉唑肠溶胶囊后兰索拉唑及其代谢产物平均血药浓度-时间曲线

—◆—兰索拉唑; —■—5-羟基兰索拉唑; —▲—兰索拉唑砒

Fig 3 Mean plasma concentration versus time profiles of lansoprazole and its metabolites after administration of 30 mg lansoprazole tablets

—◆—lansoprazole; —■—5-hydroxylansoprazole; —▲—lansoprazole sulfone

表 2 药动学参数结果

Tab 2 Parameters of pharmacokinetics

参数	兰索拉唑	5-羟基兰索拉唑	兰索拉唑砒
AUC ₀₋₁₅ /µg·L ⁻¹ ·h	3 224.4±1 575.7	332.0±67.2	142.8±111.2
AUC _{0-∞} /µg·L ⁻¹ ·h	3 271.2±1 589.4	336.8±68.0	145.9±111.9
MRT ₀₋₁₅ /h	3.5±1.0	3.5±0.9	2.7±0.8
MRT _{0-∞} /h	3.6±1.0	3.7±0.9	2.9±0.9
t _{1/2α} /h	1.4±0.5	1.7±0.5	0.9±0.4
t _{max} /h	2.1±0.8	2.1±0.8	2.0±0.8
CL ₀₋₁₅ /L·h ⁻¹	10.7±3.5	92.0±15.8	293.8±140.9
V _d /L	19.9±4.4	213.2±59.7	346.6±146.2
C _{max} /µg·L ⁻¹	1028.5±287.2	114.0±34.5	83.8±50.3

羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒的文献报道较少。储楠

楠等^[4]曾以吡啶帕胺为内标,采用 LC-MS/MS 法测定了人血浆中兰索拉唑及其代谢产物的浓度。本实验参照有关文献,建立了以兰索拉唑的同系物奥美拉唑为内标,液相色谱-质谱-质谱联用的方法测定兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒的血药浓度。在 3 种物质方法学考察中,重复性好。在本实验条件下,样品和内标的保留时间均较短,且完全分离,除样品峰外,没有其他杂质峰干扰。本实验血浆样品预处理简单,进样量少,检测限低,适合大批血浆样品的处理,保证了样品的稳定性及准确性,为人体兰索拉唑及其代谢产物 5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒血浆样本的分析提供了简便、快速、可靠的测定方法,适用于兰索拉唑及其代谢产物的药动学研究。

参考文献:

[1] 鲁月娥,秦玉花,赵红卫,等.兰索拉唑片人体药动学和生物等效性研究[J].中国药师,2007,10(1):24-26.
 [2] 孙忠民,崔一民,孙培红,等.国产兰索拉唑胶囊人体药动学及相对生物利用度研究[J].中国临床药理学杂志,1998,14(2):104-108.
 [3] 兰聪贤,刘倩,周燕文.兰索拉唑肠溶片健康人体药动学研究[J].中国药房,2007,18(8):588-590.
 [4] 储楠楠,陈伟力,徐红蓉,等.LC-MS/MS 法测定人血浆中兰索拉唑及其代谢产物的浓度[J].药物分析杂志,2006,26(1):35-39.

[收稿日期] 2010-03-08

高效液相色谱法研究大鼠灌胃黄芩素的药动学

何秀琼,裴利霞,王一涛,郑颖 (澳门大学中华医药研究院,澳门 211198)

[摘要] 目的:建立黄芩素在血浆中的高效液相色谱法检测方法,并研究大鼠灌胃黄芩素后的体内药动学。方法:采用 Agilent 1200 高效液相色谱系统,Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 µm),流动相 0.1% pH 2.0 甲酸-乙腈溶液(60:40),流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 20 µL,检测波长 276 nm,室温检测。大鼠按黄芩素 75 mg·kg⁻¹ 灌胃给药后,测定给药后不同时间的原型药物和酶解后药物在血浆中的浓度,并用 WinNolin 软件计算药动学参数。结果:大鼠灌胃给药后,血浆中酶解后黄芩素总量的 AUC₀₋₂₄ 和 C_{max} 均显著高于黄芩素原型,前者分别是后者的 2.67 倍和 2.59 倍,且黄芩素总量的达峰时间 t_{max} 明显迟于黄芩素原型。结果说明,大鼠灌胃给药黄芩素后首过效应严重,大部分在体内被代谢成葡萄糖醛酸、硫酸结合物。无论原型还是 II 相代谢结合物在体内的消除过程都比较缓慢。结论:此方法简便、稳定、准确,可用于黄芩素的体内药动学研究。

[关键词] 黄芩素;药动学;高效液相色谱;首过效应

[中图分类号] R969.1 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2010)22-1901-05

Study on pharmacokinetics of baicalein by HPLC UV after intragastric administration in rats

HE Xiurqiong, PEI Lixia, WANG Yitao, ZHENG Ying (Institute of Chinese Medical Sciences, University of Macau, Macao 211198, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a HPLC-UV method for the determination of baicalein in blood samples, and to study

[基金项目] 澳门科学技术发展基金(编号:008/2007/A1);澳门大学科研基金(编号:U L016/09-YZ/MS/WYT01/ICMS) [作者简介] 何秀琼,女,硕士研究生,电话:00853-83974694, E-mail: ma86939@umac.mo [通讯作者] 郑颖,女,助理教授,电话:00853-3974687, E-mail: yzheng@umac.mo