

HPLC-MS/MS 法测定大鼠血浆中兰索拉唑及其代谢产物的浓度

刘东 向道春 任秀华 (华中科技大学同济医学院附属同济医院药学部 武汉 430030)

摘要 目的: 建立大鼠血浆中兰索拉唑及其代谢产物 5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑磺的 HPLC-MS/MS 测定方法。方法: 色谱条件: 色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱 (150 mm × 2.1 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (含 0.01% 甲酸及 2 mmol·L⁻¹ 的醋酸铵 (43:57, V/V)); 流速: 0.3 ml·min⁻¹; 柱温: 40 °C; 进样量 10 μl。质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI), 以多反应监测离子方式测定兰索拉唑及其代谢产物, 选择性监测质荷比 (*m/z*) 为 368.0/163.9 (兰索拉唑), 384.1/179.9 (5-羟基兰索拉唑), 383.9/115.9 (兰索拉唑磺), 326.0/280.1 (内标奥美拉唑)。样品用乙腈沉淀蛋白处理。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 11.40 ~ 4560.00, 1.26 ~ 504.00, 1.24 ~ 496.00 ng·ml⁻¹; 定量下限分别为 11.40, 1.26, 1.24 ng·ml⁻¹; 批内、批间精密度 RSD 均 < 15%。结论: 该方法灵敏、准确、快速、专属性好, 适用于兰索拉唑及其代谢产物在大鼠体内的药代动力学研究。

关键词 兰索拉唑; 代谢产物; LC-MS/MS; 药动学

中图分类号: R969.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-049X(2011)02-0176-04

Determination of Lansoprazole and its Metabolites in Rat Plasma by HPLC-MS/MS

Liu Dong, Xiang Daochun, Ren Xiuhua (Department of Pharmacy, Tongji Hospital Affiliated with Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT **Objective:** To establish a liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS)-based method for determining lansoprazole and its metabolites 5-hydroxy lansoprazole and lansoprazole sulphone in rat plasma. **Method:** The determination was performed under the following LC and MS conditions: LC: Diamonsil C₁₈ column (150 mm × 2.1 mm, 5 μm); the mobile phase consisted of acetonitrile-2 mmol·L⁻¹ ammonium acetate solution including 0.01% formic acid (43:57, V/V); the flow rate was 0.3 ml·min⁻¹; column temperature was 40 °C. MS: electrospray ionization source in the triple quadrupole tandem mass spectrometer (ESI), and the selected ion mass monitoring (*m/z*) 368.0/163.9 for lansoprazole, 384.1/179.9 for 5-hydroxy lansoprazole, 383.9/115.9 for lansoprazole sulphone and 326.0/280.1 for the internal standard omeprazole. The plasma was pretreated with acetonitrile. **Result:** The linear range of lansoprazole, 5-hydroxy lansoprazole and lansoprazole sulphone in rat plasma was 11.40-4560.00, 1.26-504.00 and 1.24-496.00 ng·ml⁻¹, respectively. The lower quantitative limit was 11.4, 1.26 and 1.24 ng·ml⁻¹, respectively, with intra-day and inter-day precision RSD below 15%. **Conclusion:** The method is sensitive, accurate, specific and well applicable in pharmacokinetic study on lansoprazole and its metabolites in rat.

KEY WORDS Lansoprazole; Metabolite; LC-MS/MS; Pharmacokinetics

兰索拉唑 (lansoprazole) 是第一代质子泵抑制剂, 通过对胃内 H⁺/K⁺-ATP 酶活性的抑制发挥强大的抑制胃酸分泌、增强胃壁细胞防御、促进溃疡愈合作用。同时, 兰索拉唑对胃部幽门螺杆菌感染也有很好的杀灭作用^[1]。

兰索拉唑主要在体内经由细胞色素 P450 酶 2C19 (CYP2C19) 及 3A4 (CYP3A4) 代谢, 其代谢产物分别为 5-羟基兰索拉唑 (5-hydroxylansoprazole) 及兰索拉唑磺 (lansoprazole sulfone)^[2,3]。国内外对于兰索拉唑在大鼠体内的药动学研究, 多考虑原药在体内的代谢, 而对代谢产物 5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑磺一起进行药动学分析的报道少见。本实验在以前研究基础上^[4], 建立了高效液相-串联质谱 (HPLC-MS/MS) 同时检测大鼠血浆中兰索拉唑及其两个代谢产物药物浓度的方法, 该法简便快捷, 特异

性强, 可用于兰索拉唑及其代谢产物在大鼠体内的药动学研究。

1 材料

LCMS-2010A 高效液相色谱-质谱联用仪 (日本岛津); SCL-10Avp 系统控制器; 万分之一电子天平 (OHAUS 公司); TGL-16G-A 型冷冻离心机 (上海安亭科学仪器厂); WH-1 微型旋涡混合仪 (上海沪西分析仪器厂)。

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 1020-097A2); 奥美拉唑 (四川珍珠制药有限公司, 批号 070509); 乙腈为色谱纯, 甲酸及醋酸铵均为分析纯, 所有用水均为注射用水。

通讯作者: 刘东 Tel: (027) 83663643 E-mail: ld_2069@yahoo. cn

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[4]

色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱(150 mm × 2.1 mm, 5 μm), 柱温: 40 ℃, 流动相: 乙腈-水(含 0.01% 甲酸及 2 mmol·L⁻¹ 的醋酸铵)(43: 57, V: V), 流速: 0.3 ml·min⁻¹, 进样量 10 μl。

2.2 质谱条件

电喷雾离子化(ESI); 扫描方式为多反应离子监测(MRM); IS 电压: -4 500 V; 离子源温度: 500 ℃, 气帘气: 20 L·min⁻¹; CAD = 5 L·min⁻¹; Gas1 = 40 L·min⁻¹; Gas2 = 20 L·min⁻¹; 驻留时间(Dwell time) = 200 ms。负离子模式检测, 检测条件: 兰索拉唑离子对 m/z: 368.0/163.9, DP: -41 V, EP: -5 V, CE: -30 V, CXP: -11 V; 5-羟基兰索拉唑离子对 m/z: 384.1/179.9; 兰索拉唑砒 m/z: 383.9/115.9; 内标奥美拉唑 m/z: 326.0/280.1。

2.3 溶液配制

2.3.1 兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒标准溶液配制 分别精密称取兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒适量, 以甲醇为溶剂溶解、稀释, 定量配制成含兰索拉唑 45 600.00, 22 800.00, 11 400.00, 2 850.00, 1 140.00, 285.00, 114.00 ng·ml⁻¹, 5-羟基兰索拉唑 5 040.00, 2 520.00, 1 260.00, 315.00, 126.00, 31.50, 12.60 ng·ml⁻¹, 兰索拉唑砒 4 960.00, 2 480.00, 1 240.00, 310.00, 124.00, 31.00, 12.40 ng·ml⁻¹ 的标准溶液。

2.3.2 奥美拉唑(内标)标准溶液的配制 取奥美拉唑对照品适量, 以甲醇为溶剂, 配制成含奥美拉唑浓度为 930.00 ng·ml⁻¹ 的标准溶液, 作为内标溶液。上述标准溶液均置于 4 ℃ 冰箱保存。

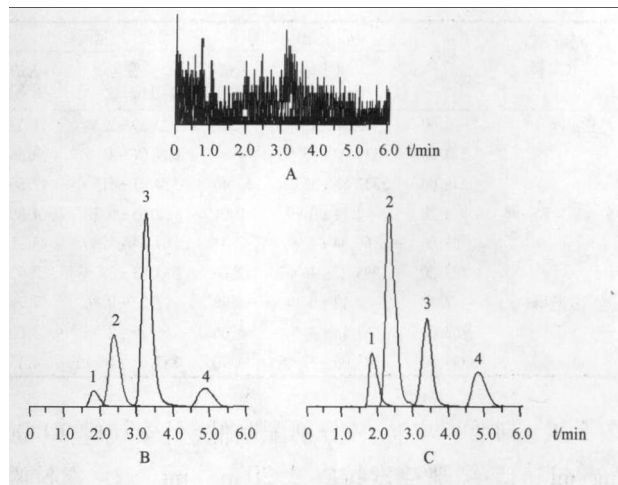
2.4 血浆样品处理方法

取血浆 200 μl, 精密加入内标(930.00 ng·ml⁻¹ 的奥美拉唑甲醇溶液) 20 μl, 再加入 400 μl 乙腈以沉淀蛋白, 涡旋混匀 2 min, 15 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清 200 μl, 进样 10 μl。

2.5 测定方法确证

2.5.1 测定方法的特异性 上述测定方法下测得空白血浆、空白血浆加兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒和内标及十二指肠给药 0.5 h 后血浆样品的典型色谱图见图 1。兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒及内标的出峰时间分别为 3.19、1.77、4.86、2.33 min。结果表明, 空白血浆中内源性物质和相应代谢产物等不干扰待测物及内标的

测定。



A. 空白血浆 B. 空白血浆 + 待测药物
C. 大鼠十二指肠给药 0.5 h 血浆样品 1. 5-羟基兰索拉唑
2. 内标 3. 兰索拉唑 4. 兰索拉唑砒

图 1 LC-MS/MS 色谱图

2.5.2 标准曲线的制备及线性范围 取空白血浆 180 μl, 加待测标准溶液 20 μl, 内标奥美拉唑 20 μl, 配制成相当于兰索拉唑 11.40, 28.50, 114.00, 285.00, 1 140.00, 2 280.00, 4 560.00 ng·ml⁻¹, 5-羟基兰索拉唑 1.26, 3.15, 12.60, 31.50, 126.00, 252.00, 504.00 ng·ml⁻¹, 兰索拉唑砒 1.24, 3.10, 12.40, 31.00, 124.00, 248.00, 496.00 ng·ml⁻¹ 的血浆样品, 按“血浆样品处理方法”处理。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, 用加权(W = 1/X²) 回归最小二乘法运算求得标准曲线。兰索拉唑: Y = 0.003 53X + 0.012 90, r = 0.996 8, 线性范围为 11.40 ~ 4 560.00 ng·ml⁻¹, 定量下限为 11.40 ng·ml⁻¹; 5-羟基兰索拉唑: Y = 0.004 99X + 0.002 26, r = 0.993 3, 线性范围为 1.26 ~ 504.00 ng·ml⁻¹, 定量下限为 1.26 ng·ml⁻¹; 兰索拉唑砒: Y = 0.007 50X + 0.002 62, r = 0.998 2, 线性范围为 1.24 ~ 496.00 ng·ml⁻¹, 定量下限为 1.24 ng·ml⁻¹。

2.5.3 方法精密度 取空白血浆 180 μl, 分别精密加入各标准储备液 20 μl 配制成低(兰索拉唑 20.00 ng·ml⁻¹, 5-羟基兰索拉唑 2.20 ng·ml⁻¹, 兰索拉唑砒 2.17 ng·ml⁻¹)、中(兰索拉唑 570.00 ng·ml⁻¹, 5-羟基兰索拉唑 63.00 ng·ml⁻¹, 兰索拉唑砒 62.00 ng·ml⁻¹)、高(兰索拉唑 3 648.00 ng·ml⁻¹, 5-羟基兰索拉唑 403.20 ng·ml⁻¹, 兰索拉唑砒 396.80 ng·ml⁻¹) 三种浓度的对照品血浆样品, 按“血浆样品处理方法”项下处理后进样, 各 6 份, 1 d 内测定 6 次; 连续测定 3 d, 代入当日的标准曲线求得实测浓度, 计算批内和批间精密度。结果见表 1。

表 1 兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑和兰索拉唑砒的批内、批间精密度 RSD(n=6)

化合物	浓度 (ng·ml ⁻¹)	批内		批间	
		测定值 (ng·ml ⁻¹)	RSD (%)	测定值 (ng·ml ⁻¹)	RSD (%)
兰索拉唑	20.00	18.98±1.98	10.43	20.29±2.34	11.53
	570.00	639.00±28.56	4.47	639.64±21.5	3.36
	3648.00	3332.83±380.03	11.40	3320.03±415.05	12.50
5-羟基兰索拉唑	2.20	2.11±0.19	9.01	2.05±0.10	4.89
	63.00	66.34±4.94	7.44	64.44±3.80	5.91
	403.20	395.27±46.67	12.06	385.83±29.83	7.73
兰索拉唑砒	2.17	2.12±0.19	8.96	2.22±0.16	7.26
	62.00	67.14±3.40	5.06	66.26±2.38	3.60
	396.80	393.25±31.56	4.70	387.95±16.10	4.15

2.5.4 回收率实验 分别配制低(兰索拉唑 20.00 ng·ml⁻¹,5-羟基兰索拉唑 2.20 ng·ml⁻¹,兰索拉唑砒 2.17 ng·ml⁻¹)、中(兰索拉唑 570.00 ng·ml⁻¹,5-羟基兰索拉唑 63.00 ng·ml⁻¹,兰索拉唑砒 62.00 ng·ml⁻¹)、高(兰索拉唑 3 648.00 ng·ml⁻¹,5-羟基兰索拉唑 403.20 ng·ml⁻¹,兰索拉唑砒 396.80 ng·ml⁻¹)三种浓度的对照品血浆供试品,按上述“血浆样品处理”方法及 LC-MS/MS 条件进行处理、分析,计算相对回收率。同法配制低、中、高三种浓度的血浆对照品,按上述“血浆样品处理”方法及 LC-MS/MS 条件进行处理,以提取后进样的色谱峰面积与未经处理直接以相应浓度的标准品进样所得的色谱峰面积相比,得绝对回收率。结果见表 2。

表 2 兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑和兰索拉唑砒的回收率(n=6)

化合物	浓度 (ng·ml ⁻¹)	相对回收率(%)		绝对回收率(%)	
		平均值±SD	RSD	平均值±SD	RSD
兰索拉唑	20.0	98.30±10.39	10.57	92.50±5.06	5.47
	570.00	102.75±4.12	4.01	96.02±8.81	9.17
	3648.00	94.17±6.50	6.91	92.69±5.03	5.43
5-羟基兰索拉唑	2.20	99.42±9.87	9.92	90.35±8.46	9.37
	63.00	100.42±8.87	8.84	92.70±4.81	5.19
	403.20	96.84±9.86	10.18	89.77±8.29	9.23
兰索拉唑砒	2.17	97.26±7.51	7.72	93.34±6.53	6.99
	62.00	102.42±6.58	6.43	90.94±3.16	3.48
	396.80	96.71±5.24	5.42	94.63±5.90	6.23

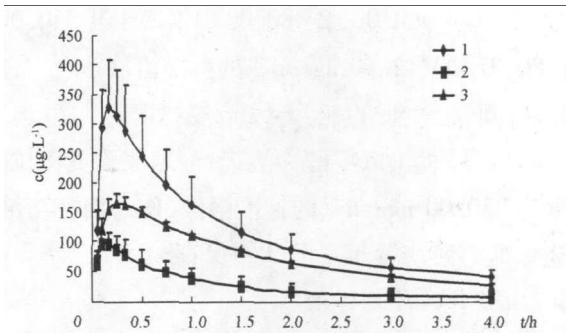
2.5.5 基质效应 取空白血浆 180 μl,加乙腈 400 μl,涡旋混匀,15 000 r·min⁻¹离心 10 min,取尽上清,合并备用。取前述上清 580 μl,分别加入低、中、高三个浓度的储备液,再各加入内标溶液 20 μl,涡旋 2 min 混匀,10 μl 进样,得兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒及内标的峰面积(A1)。另取纯净水 180 μl,加乙腈 400 μl,涡旋混匀,分别加入低、中、高三个浓度的储备液,再各加入内标溶液 20 μl,涡旋 2 min 混匀,10 μl 进样,得兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑、兰索拉唑砒及内标的峰面积(A2)。以面积

(A1)/面积(A2)×100%,得基质效应。兰索拉唑低、中、高三种浓度的基质效应分别为 97.56%、93.71%、95.60%;5-羟基兰索拉唑低、中、高三种浓度的基质效应分别为 94.58%、96.62%、92.58%;兰索拉唑砒低、中、高三种浓度的基质效应分别为 98.35%、94.53%、93.58%,RSD 均小于 15%。

2.5.6 稳定性考察 分别配制低(兰索拉唑 20.00 ng·ml⁻¹,5-羟基兰索拉唑 2.20 ng·ml⁻¹,兰索拉唑砒 2.17 ng·ml⁻¹)、中(兰索拉唑 570.00 ng·ml⁻¹,5-羟基兰索拉唑 63.00 ng·ml⁻¹,兰索拉唑砒 62.00 ng·ml⁻¹)、高(兰索拉唑 3 648.00 ng·ml⁻¹,5-羟基兰索拉唑 403.20 ng·ml⁻¹,兰索拉唑砒 396.80 ng·ml⁻¹)三种浓度的对照品血浆供试品,按上述“血浆样品处理”项处理后,分别在 0、4h 后测定在低、中、高三种浓度下兰索拉唑的 RSD 分别为 4.21%、4.78%、3.94%;5-羟基兰索拉唑的 RSD 分别为 4.10%、5.65%、3.06%;兰索拉唑砒的 RSD 分别为 4.69%、5.04%、3.52%。另同法配制后冻融 3 次及冷冻(-20℃)放置两周,结果 RSD 均<10%,说明样品冻融 3 次及冷冻状态下放置两周稳定。

2.6 血药浓度测定

按“血浆样品处理”方法操作,以当日的标准曲线计算各时间点的血药浓度。测定 6 只大鼠十二指肠给药(8 mg·kg⁻¹)后的血药浓度,得到血药浓度-时间曲线见图 2。



1. 兰索拉唑 2. 5-羟基兰索拉唑 3. 兰索拉唑砒
图 2 大鼠十二指肠给予兰索拉唑(8 mg·kg⁻¹)后兰索拉唑及其代谢产物的血药浓度-时间曲线(n=6)

3 讨论

本文建立了的兰索拉唑及其代谢产物在大鼠体内血药浓度的 HPLC-MS/MS 测定方法,只需一步沉淀蛋白法,操作简便,简化了血浆样品的前处理过程,在所用的检测条件下可以同时分析兰索拉唑、5-羟基兰索拉唑和兰索拉唑砒 3 种化合物,分析过程简便快捷。此方法专属性好,精密度高。在线性范围内灵敏、准确,可适用于大鼠血浆兰索拉唑及其代谢产物药代动力学研究。

胰激肽原酶纯度的质量研究

郑璐侠 史芳亮 吴利红 徐明明 陈钢 (上海市食品药品检验所 上海 201203)

摘要 目的:为修订《中国药典》2005 年版相关质量标准,对国内不同企业的胰激肽原酶的产品纯度进行了质量评价,并制定合理的方法限度。方法:采用 HPLC 和 SDS-PAGE 电泳两种不同的方法测定了胰激肽原酶的纯度。结果:不同企业生产的胰激肽原酶的纯度具有差异,个别企业胰激肽原酶原料药纯度达到 100%。结论:HPLC 和 SDS-PAGE 电泳两种方法均能有效地控制胰激肽原酶的纯度,提高产品的纯度有利于稳定性的增强。
关键词 胰激肽原酶;纯度;高效液相色谱;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳
中图分类号:R917 **文献标识码**:A **文章编号**:1008-049X(2011)02-0179-03

Study on Purity of Pancreatic Kininogenase

Zheng Luxia, Shi Fangliang, Wu Lihong, Xu Mingming, Chen Gang (Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203)
ABSTRACT Objective: In order to improve the quality standard of pancreatic kininogenase in Chinese Pharmacopoeia 2005 Edition, the purity of pancreatic kininogenase from some domestic factories was determined and an appropriate method limit was established. **Method:** The purity of pancreatic kininogenase was determined by HPLC and SDS-PAGE method, respectively. **Result:** The purity of pancreatic kininogenase from different factories was not the same, and one of them reached 100%. **Conclusion:** Both HPLC and SDS-PAGE method can effectively control the pancreatic kininogenase purity. Purity improvement can lead to more promising stability of the product.
KEY WORDS Pancreatic kininogenase; Purity; HPLC; SDS-PAGE

胰激肽原酶(pancreatic kininogenase, PK), 又称胰激肽释放酶(pancreatic kallikrein), 由 18 种氨基酸和 4 种糖组成, 属于内切蛋白水解酶类, 分子量约为 26 800^[1]。它广泛存在于哺乳动物的组织中, 其中胰腺含量最高, 在体内作用于激肽原而释放出激肽。在生物体内, 胰激肽原酶以酶原形式存在, 可作用于激肽原释放激肽, 在体内具有扩张微血管和减少心肌耗氧量的作用, 并可调节和降低高血压。主要用于微循环障碍症、高血压症、脑动脉硬化等^[2-4]。
近年来, 随着微循环技术的飞速发展, 胰激肽原酶的制剂在临床上的应用得到了极大的拓展, 成为临床上长期使用的药物。因此, 本品药物效价和纯度的高低直接影响用药效果和安全性。因《中国药典》2010 年版药典工作需要, 受国家药典委员会委

托, 本文分别采用 HPLC 法和 SDS-PAGE 电泳两种方法对胰激肽原酶及其制剂(包括肠溶片和注射用粉末)的纯度进行考察, 对国内不同生产企业的同类产品进行了比较, 并根据测定结果制定了合理的纯度限度, 目前已被收载于《中国药典》2010 年版该品种标准中^[5,6]。
1 仪器与试药
Agilent 1200 高效液相色谱仪; 电子分析天平和 320-S 型 pH 计(瑞士 METTLER TOLEDO 公司)。胰激肽原酶对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 140621-200906, 46IU/瓶)。胰激肽原酶原料(共 7 批, 来自 4 个生产企业)、胰激肽原酶肠溶片(共 16 批, 来自 6 个生产企业)和注射用胰激肽原酶样品(共 4 批, 来自 2 个生产企业)均由国内各生产企

通讯作者: 陈钢 Tel: (021)38839900-26101 E-mail: chengang@smda.gov.cn

参 考 文 献

1 陈东燕, 孙艳莉, 乔珊. CYP2C 19 基因多态性对幽门螺杆菌感染酸相关性疾病治愈率的影响[J]. 实用医学杂志, 2006, 22(19): 2324-2326
2 Saito M, Yasui-Funukori N, Uno T, et al. Effects of clarithromycin on lansoprazole pharmacokinetics between CYP2C19 genotypes[J]. Br J Pharmacol, 2005, 59(3): 302-309
3 Michaud V, Turgeon J. Assessment of Competitive and Mechanism-Based Inhibition by Clarithromycin: Use of Domperidone as a CYP3A

Probe-Drug Substrate and Various Enzymatic Sources Including a New Cell-Based Assay with Freshly Isolated Human Hepatocytes[J]. Drug Metab Lett, 2010, 4(2): 69-76
4 Song M, Gao X, Hang T, et al. Simultaneous determination of lansoprazole and its metabolites 5'-hydroxy lansoprazole and lansoprazole sulphone in human plasma by LC-MS/MS: application to a pharmacokinetic study in healthy volunteers[J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 48(4): 1181-1186
(2010-07-27 收稿 2010-09-13 修回)