

· 药物分析 ·

LC-MS-MS 法测定犬体内血浆中埃索美拉唑药物浓度

杨小英^{a,b}, 马启珍^a (宁夏医科大学总医院 a. 药剂科; b. 临床药理研究室, 宁夏 银川 750004)

[摘要] 目的 建立液相色谱联用质谱法(LC-MS-MS)测定犬体内血浆中埃索美拉唑(esomeprazole, EMZ)药物浓度。方法 以地西洋为内标,血浆采用蛋白沉淀处理,色谱柱为 Shim-pack XR-ODS 柱(2 mm × 100 mm, 5 μm);流动相为乙腈:2 mmol/L 乙酸铵(含 0.1% 甲酸);流速 0.3 ml/min;质谱条件:电喷雾离子化电离源 ESI, 正离子多反应检测,检测离子分别为 346.2 → 198.2 m/z(埃索美拉唑)和 285.2 → 193.2 m/z(地西洋)。结果 埃索美拉唑在 0.5 ~ 1 200 μg/L 检测浓度范围内呈良好线性关系($r > 0.99$),最低定量限(LLOQ)为 0.5 μg/L,平均绝对回收率在(101.0 ± 6.5)% ,低、中、高 3 种浓度的日内、日间 RSD ≤ 15%。结论 该方法操作简便、灵敏、准确,适用于埃索美拉唑血药浓度测定及药动学研究。

[关键词] 埃索美拉唑;液相色谱联用质谱;血药浓度

[中图分类号] R927

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2013)01-0061-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.01.018

Determination of Esomeprazole in dog plasma by LC-MS-MS

YANG Xiao-ying^{a,b}, MA Qi-zhen^a (General Hospital of Ningxia Medical University a. Department of Pharmacy; b. Division of Clinical Pharmacology, Yinchuan 750004, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for determining Esomeprazole in dog plasma by LC-MS-MS. **Methods** Diazepam was used as the internal standard, the samples were precipitated with acetonitril. Analytical column was Shim-pack XR-ODS (2 mm × 100 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile: 2 mmol/L ammonium acetate (containing 0.1% formic acid) at a flow rate of 0.3 ml/min. Mass spectrum conditions was ESI performing in positive ion MRM mode using target ions 346.2 → 198.2 m/z (esomeprazole) and 285.2 → 193.2 m/z (diazepam). **Results** The calibration curve was linear over the range of 0.5 ~ 1 200 μg/L. The LLOQ of Esomeprazole in plasma was 0.5 μg/L. The average extracted recovery was (101.0 ± 6.5)%. The RSDs of intra- and inter-day were less than 15%. **Conclusion** The method was sensitive, simple and accurate to determinate Esomeprazole plasma concentration and suitable to the pharmacokinetics study.

[Key words] Esomeprazole; LC-MS-MS; plasma concentration

埃索美拉唑(esomeprazole, EMZ)为奥美拉唑的 S-异构体,其口服肝代谢率较低,血药浓度和生物利用度比奥美拉唑高,且抑酸作用更强^[1]。为进行 EMZ 在动物体内药物相互作用的研究,本研究建立了犬体内 EMZ 血浆浓度的 LC-MS-MS 测定法,本法专属性强、灵敏度高,血浆样品处理方法简捷,分析时间短,大大提高了样品的分析速度。

1 仪器与材料

1.1 仪器 质谱仪: API4000 型液相色谱-三重四极杆质谱联用仪,配有电喷雾离子化源(ESI 源), Analyst 1.5.1 分析操作软件;岛津公司 LC-30A 高效液相色谱仪,配有 SIL-30AC 自动进样器、CTO-30A 柱温箱、LC-30AD 注液泵。5804R 台式高速低温冷冻离心

机(美国 effendorf 公司);XH-B 型涡旋混合仪(姜堰市康健医疗器具有限公司);梅特勒 AE240 电子天平(Mettler 托利多仪器上海有限公司)。

1.2 材料 埃索美拉唑对照品(美国 Sigma 公司);地西洋对照品(115-9302,中国药品生物制品检定所)。乙腈(美国 Fisher 公司)为色谱纯;醋酸铵、甲酸为色谱纯;分析用水为蒸馏水经 Milli-Q Advantage A10 型超纯水系统纯化。

2 方法与结果

2.1 实验条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Shim-pack XR-ODS 柱(2 mm × 100 mm, 5 μm);流动相为乙腈:2 mmol/L 乙酸铵(含 0.1% 甲酸);流速 0.3 ml/min,梯度洗脱见表 1,进样量 5 μl,柱温为 30 °C。

2.1.2 质谱条件 离子源为电喷雾电离源(ESI),正离子模式,扫描方式为多反应监测,喷雾

[作者简介] 杨小英(1970-)女,学士,副主任药师。Tel: (0951) 6743031, E-mail: yxy-1970@163.com.

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	2 mmol/L 乙酸铵(%)	乙腈(%)
0.5	70	30
1.5	25	75
3	25	75
3.5	70	30
4	70	30

电压: 4 500 V; 温度: 550 °C; 源内气体压力(GS1): 40 psi; 气体压力(GS2): 45 psi; 气帘气体压力: 20 psi; 埃索美拉唑 m/z 346. 2→198. 2, 去簇电压: 50 V; 碰撞电压: 16 V; 地西洋 m/z 285. 2→193. 2, 去簇电压: 57 V; 碰撞电压: 38 V; Q1、Q3 分辨率均为 LOW; 进样量: 5 μ l。

2.2 标准溶液的配制

2.2.1 埃索美拉唑标准液 精密称取埃索美拉唑对照品 3.00 mg, 置 25 ml 棕色容量瓶中, 用甲醇-水(1 : 1) 溶解并定容至刻度, 得浓度为 120 mg/L 储备液 4 °C 冰箱内保存备用, 临用前用甲醇-水(1 : 1) 稀释成所需浓度。

2.2.2 地西洋标准液 精密称取地西洋对照品 10.01 mg, 置 10 ml 棕色量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 配成浓度为 1 g/L 的地西洋储备液 4 °C 冰箱内保存备用, 临用前用甲醇稀释成浓度为 200 μ g/L 的内标溶液。

2.3 血浆样本的预处理 精密量取血浆样品 100 μ l 置于 1.5 ml 离心管中, 加甲醇-水(1: 1) 10 μ l, 加 100 μ l 内标(地西洋溶液, 400 μ g/L) 涡旋 30 s, 再加 0.3 ml 乙腈, 在涡旋混合器上涡流振荡 2 min, 14 000 r/min 低温离心 10 min, 取上清液 5 μ l 进样检测。

2.4 标准曲线和定量下限 分别精密量取埃索美拉唑系列标准溶液, 质量浓度为 12 000、6 000、3 000、1 000、500、100、20、5 μ g/L 的甲醇-水(1 : 1) 溶液 10 μ l, 加入 100 μ l 空白血浆配制成相当于 1 200、600、300、100、50、10、2、0.5 μ g/L 的血浆样品, 涡旋 30 s。按“血浆样品的预处理”依法操作, 将不同浓度系列标准样品测得的埃索美拉唑与内标峰面积比值为纵坐标, 埃索美拉唑浓度为横坐标, 用加权最小二乘法进行回归运算, 求得直线回归方程为 $Y=0.0799X+0.00356$ ($r=0.9991$)。埃索美拉唑线性范围为 0.5 ~ 1 200 μ g/L。方法的定量下限为 0.5 μ g/L, 其 RSD 值为 8.67%。

2.5 特异性考察 在本实验所采用的色谱与质谱条件下, 6 只 Beagle 犬空白混合血浆; 空白血浆 + 埃索美拉唑标准样品 + 内标; 犬口服埃索美拉唑镁肠溶片后的血浆样品质量色谱图, 见图 1。埃索美拉唑与地西洋分别在 2.37 和 3.10 min 出峰, 由图可

见血浆中内源性物质不干扰测定。

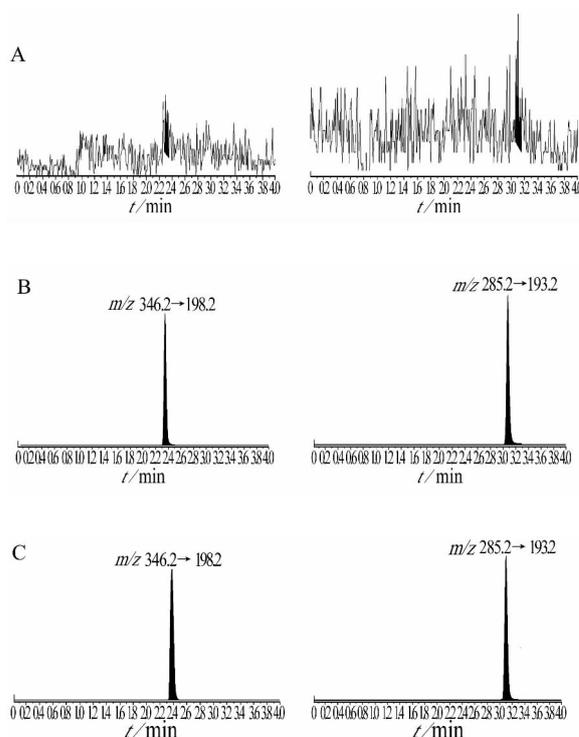


图 1 血浆中埃索美拉唑色谱图

A-犬空白血浆; B-空白血浆 + 埃索美拉唑标准样品 + 内标; C-犬服药后 1 h 的血浆样品

2.6 精密度试验 按埃索美拉唑标准曲线制备方法制备质控样品, 对 1、100、1 000 μ g/L 3 种浓度进行了连续 3 d 的 5 份样本分析, 根据随行标准曲线, 计算实测浓度, 评价方法的日内、日间精密度, 结果见表 2。

表 2 埃索美拉唑日内、日间精密度 (n = 5)

浓度(μ g/L)	精密度(RSD%)	
	日内	日间
1	5.64	8.56
100	2.68	7.05
1 000	2.27	4.34

2.7 基质效应与绝对回收率

S1: 纯标准品溶液

以纯水代替血浆, 取水 100 μ l 15 份, 加埃索美拉唑低、中、高 3 种浓度的标准溶液各 5 份 10 μ l 和 400 μ g/L 的地西洋标准溶液 100 μ l, 涡旋 30 s, 再加 0.3 ml 乙腈, 在涡旋混合器上涡流振荡 2 min, 14 000 r/min 低温离心 10 min, 取上清液 5 μ l 进样检测, 记录峰面积 S1。

S2: 生物样品基质提取后添加

取空白血浆 100 μ l 15 份, 分别加入 0.3 ml 乙腈, 在涡旋混合器上涡流振荡 2 min, 14 000 r/min

低温离心 10 min, 取上清液 200 μl , 加埃索美拉唑低、中、高 3 种浓度的标准溶液各 5 份 5 μl 和 400 $\mu\text{g/L}$ 的地西洋标准溶液 50 μl , 涡旋 30 s, 5 μl 进样检测, 记录峰面积 S2。

S3: 生物样品基质提取前添加

取空白血浆 100 μl 15 份, 加埃索美拉唑低、中、高 3 种浓度的标准溶液各 5 份 10 μl 和 400 $\mu\text{g/L}$ 的地西洋标准溶液 100 μl , 涡旋 30 s, 再加 0.3 ml 乙腈, 在涡旋混合器上涡流振荡 2 min, 14 000 r/min 低温离心 10 min, 取上清液 5 μl 进样检测, 记录峰面积 S3。

以 S2/S1 比值计算基质对埃索美拉唑低、中、高 3 个浓度测定的影响; 以 S3/S2 比值计算埃索美拉唑低、中、高 3 个浓度的绝对回收率, 结果见表 3。

表 3 埃索美拉唑血浆基质效应与绝对回收率 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

浓度 ($\mu\text{g/L}$)	基质效应 (%)	RSD (%)	绝对回收率 (%)	RSD (%)
1	102.5 \pm 8.2	8.0	100.3 \pm 6.0	5.9
100	90.9 \pm 7.7	8.5	101.8 \pm 10.1	9.9
1 000	97.9 \pm 6.0	6.1	101.0 \pm 2.6	2.5

2.8 稳定性试验 将埃索美拉唑标准溶液配制的 1、100、1 000 $\mu\text{g/L}$ 的血浆样品, 按以下操作进行稳定性考察: 血浆样品室温放置 2 h 的稳定性; 血浆样品处理后 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 8 h 的稳定性; 室温与 -70 $^{\circ}\text{C}$ 交替冻融 3 次的稳定性; -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存 30 d 的稳定性。每个浓度点测定 5 份样品, 结果见表 4, 表明埃索美拉唑在以上条件下稳定性良好。

3 讨论

(上接第 52 页)

著降低血脂症患者 TC、TG 水平, 特别是对 TC 升高患者, 疗效显著, 并对 HDL-C 有一定的升高作用, 没有明显不良反应, 不影响肝肾功能, 对患者的心电异常还有一定治疗作用, 疗效优于脂必妥和洛伐他汀。因而本院自制降脂片疗效肯定, 经济适用, 极具进一步临床研究开发。

【参考文献】

- [1] 张波, 张宁, 金磊, 等. 自拟复方山芪降血脂作用的临床疗效观察[J]. 药学实践杂志, 2010, 28(5): 359.
- [2] 中国成人血脂异常防治指南制订联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(5): 390.
- [3] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 171.
- [4] 李凤娥. 中医药治疗高血脂症的研究进展[J]. 河北中医, 2007, 29(8): 665.

表 4 不同浓度埃索美拉唑血样的稳定性试验 ($n=5$)

浓度 ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)			
	室温放置 2 h	样品处理后 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 8 h	室温与 -70 $^{\circ}\text{C}$ 交替冻融	-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存 30 d
1	2.5	5.7	5.9	3.9
100	2.4	2.1	3.2	2.4
1 000	5.0	5.9	7.0	3.6

本实验采用 LC-MS-MS 测定埃索美拉唑体内药物浓度, 检测限低, 最低检测限仅为 0.5 $\mu\text{g/L}$, 能检测到极微量血药浓度; 采用梯度洗脱^[2], 峰形好, 出峰时间早, 大大节约了时间, 降低了分析成本, 适用于大批量样本测定。

本实验曾考察了乙腈和甲醇蛋白沉淀法, 采用甲醇蛋白沉淀后溶液浑浊, 乙腈沉淀蛋白溶液澄清, 且空白无干扰, 该提取方法简单快捷, 绝对回收率高, 无基质效应影响。

文献报道^[3], 埃索美拉唑在酸性溶液中不稳定, 但光学实验表明其光学性质比较稳定, 在不同温度下稳定性实验表明其稳定, 因此本实验过程仅储备液避光、4 $^{\circ}\text{C}$ 放置, 其余操作未避光和控制温度, 稳定性实验结果良好。

【参考文献】

- [1] 杨丽, 严宝霞. 埃索美拉唑的药理学[J]. 中国新药杂志, 2003, 13(5): 398.
- [2] 戴歌心, 张振南, 王贤亲, 等. HPLC-MS 联用测定人血浆中埃索美拉唑的浓度[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(8): 1875.
- [3] 余勤, 梁茂植, 赵焱, 等. 反相高效液相色谱法测定血浆中埃索美拉唑浓度[J]. 华西医学, 2006, 21(1): 93.

[收稿日期]2012-05-08

[修回日期]2012-09-28

- [5] 石宇, 石昌顺, 齐晓燕, 等. 复方首乌颗粒治疗高脂血症的临床观察[J]. 中成药, 2008, 30(7): 950.
- [6] 马路, 史大卓, 陈可冀, 等. 山楂总三萜酸对大鼠肝细胞合成 14C-胆固醇及肝细胞膜 HDL 受体活性的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(21): 1807.
- [7] 兰鸿, 杜士明. 山楂提取物防治高脂血症实验研究[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(24): 3.
- [8] 柳冬月, 顾施健, 吴娟, 等. 泽泻汤对高脂血症小鼠降血脂作用有效部位的实验研究[J]. 中国药师, 2010, 13(6): 763.
- [9] 宋立人. 现代中药学大辞典[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1421.
- [10] 何菊英, 刘松青, 彭富富, 等. 决明子降血脂作用机制研究[J]. 中国药房, 2003, 14(4): 202.
- [11] 杨赫, 闫平正. 桑钩温胆汤治疗痰浊淤血型高血脂症 42 例[J]. 陕西中医, 2007, 28(6): 673.
- [12] 朱丹萌, 翟所迪. 他汀类的非降脂作用及其不良反应[J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(12): 969.

[收稿日期]2012-04-09

[修回日期]2012-09-28