

液相色谱-串联质谱法测定人血浆中劳拉西泮的浓度及其在生物等效性研究中的应用

杨伟峰¹, 马张英², 罗金文¹ (1. 浙江省药品检验所, 浙江 杭州 310004; 2. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院, 浙江 杭州 310016)

摘要:目的 建立 LC/MS/MS 法测定人血浆中劳拉西泮含量的方法, 研究其片剂生物等效性。方法 取血浆样品 0.3 mL, 加入内标地西泮乙腈溶液 0.6 mL, 涡流混合 5 min, 高速离心 15 min, 取上清液 20 μ L 进样, 流动相: 0.04% 甲酸-乙腈 (35:65, V/V); 流速: 0.2 mL/min; ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 3.5 μ m)。采用电喷雾离子源三级四极杆串联质谱, 以选择反应监测 (SRM) 方式进行检测。用于定量分析的离子反应分别为 m/z 321 $\rightarrow$ 275 (劳拉西泮) 和 m/z 285 $\rightarrow$ 193 (内标: 地西泮)。结果 劳拉西泮线性范围为 0.71 ~ 71.33 ng $\cdot$ mL⁻¹, 定量限为 0.71 ng $\cdot$ mL⁻¹, 三种浓度的相对回收率为 108.8% ~ 112.3%, 日内、日间 RSD 均小于 4.1% ($n=5$)。结论 本法专属、灵敏、快速, 适用于劳拉西泮的生物等效性研究。

关键词: 劳拉西泮; 液相色谱-串联质谱法; 生物等效性

中图分类号: R969.11 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2005)04-0318-04

Determination of lorazepam in plasma by LC/MS/MS and its application in the bioequivalence study

YANG Wei-feng¹, MA Zhang-ying², LUO Jin-wen¹ (1. Zhejiang Institute for Drug Control, Hangzhou 310004, China; 2. Affiliated Sir Run Run Shaw Hospital, Medicine College, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a LC/MS/MS method for determination of lorazepam in plasma and to study its bioequivalence. **METHODS** 0.3 mL of the plasma sample was pipetted into a conical tube, 0.6 mL internal standard solution containing diazepam in acetonitrile was added, the mixture was agitated for 5 min using a vortex agitator and centrifuged for 15 min at high speed. Then 20 μ L of supernatant was injected into the chromatograph. The mobile phase consisted of 0.04% formic acid-acetonitrile (35:65), the flow rate was 0.2 mL $\cdot$ min⁻¹, the column was ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 $\times$ 100 mm, 3.5 μ m). Electrospray ionization source was applied and operated in positive ion mode. Selected reaction monitoring (SRM) mode with the transitions of m/z 321 $\rightarrow$ 275 and m/z 285 $\rightarrow$ 193 was used to quantify lorazepam and diazepam respectively. **RESULTS** The linear calibration curve was obtained in the range of 0.71 ~ 71.33 ng $\cdot$ mL⁻¹, The lower limit of quantification was 0.71 ng $\cdot$ mL⁻¹, three level concentration relative recoveries were 108.8% ~ 112.3%, the intra-day and inter-day precision (RSD) were below 4.1%. **CONCLUSION** The method is simple, rapid, accurate and can be used to study bioequivalence of lorazepam.

作者简介: 杨伟峰, 男, 1965 年出生, 1987 年 7 月毕业于浙江医科大学药理学系, 副主任药师, 主要从事药物分析。Tel: (0571) 86459413, E-mail: ywfz@tom.com.

劳拉西泮 (lorazepam) 临床上作为催眠、镇静和抗癫痫药物, 由于治疗剂量较小, 口服该药后其血液中药浓度较低, 因此对其检测较为困难。有文献报道衍生化气相色谱-氮磷检测器法测定尿中的劳拉西泮^[1]。本实验用专属性较强的 LC/MS/MS 法测定血浆中劳拉西泮的含量。结果表明该法专属、灵敏、快速, 适用于劳拉西泮的生物等效性研究。

1 仪器与试剂

美国 Finnigan 公司 Surveyor 高效液相色谱仪, TSQ Quantum discovery 三级四极杆串联质谱检测器, 配大气压电喷雾离子源, Xcalibur 数据工作站。XW-80A 旋涡混合器 (上海医科大学仪器厂); SIGMA 1-15K 高速冷冻离心机 (德国)。

劳拉西泮对照品及受试片剂由浙江万马药业有限公司提供, 参比制剂由泰国大西洋制药厂有限公司生产 (商品名: 罗拉); 内标地西泮由中国生物制品检定所提供。甲酸为色谱纯 (TEDIA), 甲醇与乙腈为色谱纯 (德国 Merck 公司生产), 水为 Milli-Q 水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及质谱检测器参数

采用 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm) 流动相为 0.04% 甲酸-乙腈 (35:65); 流速: 0.2 mL/min; 进样量: 20 μL。

离子源为大气压电喷雾源 (ESI), 喷雾电压 3 000 V, 毛细管温度 300℃, 喷雾气 N₂, 25 mL/min。碰撞气氩气, 碰撞诱能量 20 eV; 正离子方式检测, 扫描方式为选择反应监测 (SRM), 用于定量分析的离子反应分别为 m/z 321⁺ → 275 (劳拉西泮) 和 m/z 285⁺ → 193 (内标地西泮)。

2.2 血浆样品处理

取血浆 0.3 mL, 置与具塞离心管中, 加内标地西泮乙腈溶液 (40 ng · mL⁻¹) 0.6 mL, 涡旋混合 5 min, 14 000 r/min 冷冻 (4℃) 离心 15 min, 取上清液 20 μL 进样。

2.3 质谱分析

劳拉西泮和内标地西泮的 ESI 一级全扫描质谱主要生成准分子离子峰, 分别为 m/z 321 和 m/z 285。选择性对准分子离子峰进行二级质谱分析, 生成的主要碎片离子分别为 m/z 275 (劳拉西泮) 和 m/z 193 (内标地西泮), 将其作为定量分析时监测的产物离子, 其质谱图见图 1~4。

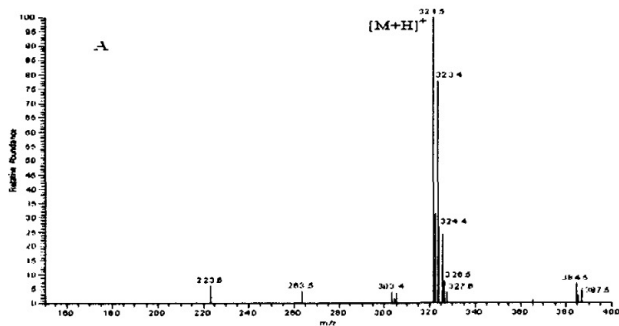


图 1 劳拉西泮一级质谱图

Fig 1 The first grade mass spectra of lorazepam

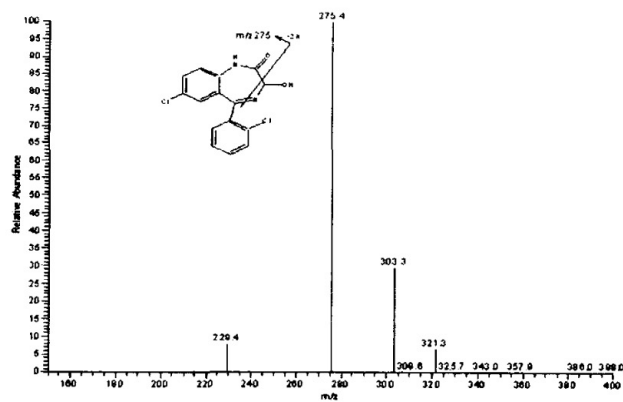


图 2 劳拉西泮二级质谱图

Fig 2 The second grade mass spectra of lorazepam

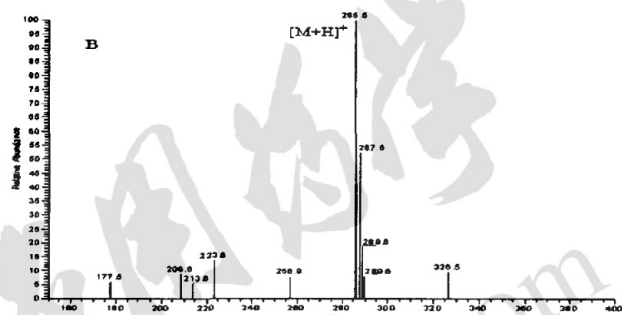


图 3 地西泮一级质谱图

Fig 3 The first grade mass spectra of diazepam

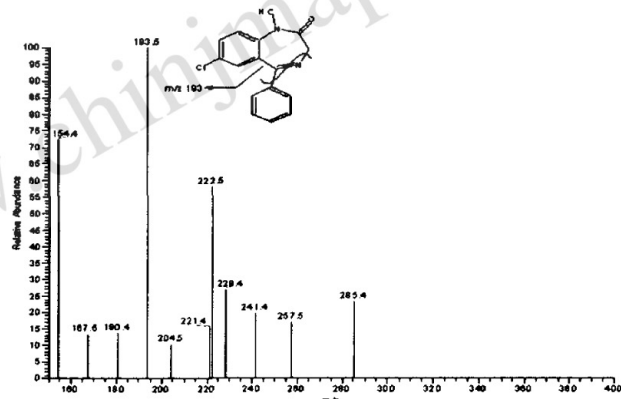


图 4 地西泮二级质谱图

Fig 4 The second grade mass spectra of diazepam

2.4 方法专属性

取空白血浆 0.3 mL, 加乙腈 0.6 mL, 除不加内标外, 按“血浆样品处理”项下操作, 进样 20 μL, 结果表明, 空白血浆中内源性物质不干扰测定。将一定浓度的劳拉西泮标准溶液及地西泮内标溶液加入空白血浆中, 同法操作, 得色谱图 5。待测物劳拉西泮和内标地西泮的保留时间分别为 1.61 min 和 2.39 min。取血浆样品, 同法操作, 得色谱图 6。

2.5 测定方法

2.5.1 对照品储备液配制 取劳拉西泮对照品约 10 mg 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀,

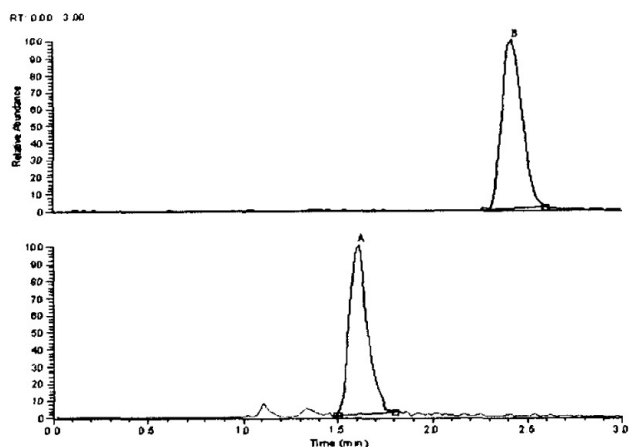


图 5 对照品血浆色谱图 (劳拉西泮 + 地西泮 + 空白血浆, A: 劳拉西泮 B: 地西泮)

Fig 5 The chromatograms of reference (lorazepam + diazepam + blank plasma A: lorazepam B: diazepam)

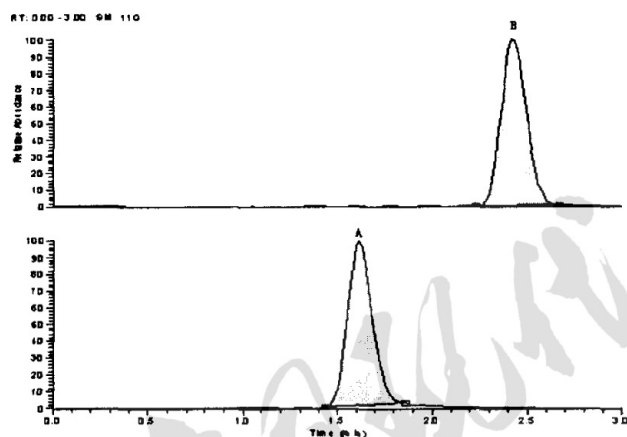


图 6 血浆中劳拉西泮色谱图 (血浆样品 + 内标 A: 劳拉西泮 B: 地西泮)

Fig 6 The chromatograms of lorazepam in plasma (plasma sample + ISTD, A: lorazepam B: diazepam)

精密量取 5.0mL, 置 50mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.5.2 内标溶液配制 取地西泮约 10mg 精密称定, 置 100mL 的量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 取上述溶液适量, 加乙腈定量稀释制成每 1mL 中约含 40ng 的溶液, 作为内标溶液。

2.5.3 标准曲线 取对照品储备液适量, 加甲醇分别稀释制成每 1mL 中含劳拉西泮约 10.7, 21.4, 42.8, 107, 214, 428, 1070ng 的溶液, 分别准确量取 20μL (相对于血浆的浓度分别为 0.71, 1.43, 2.85, 7.13, 14.27, 28.53, 71.33ng·mL⁻¹), 氮气吹干, 精密加入空白血浆 0.3mL, 精密加入内标溶液 0.6mL, 按“血浆样品处理”项下操作。以待测样品离子 (*m/z* 275) 峰面积与内标离子 (*m/z* 193) 峰面积的比值 (*Y*) 对样品浓度 (*X*) 进行线性回归, 得工作方程。在 0.71~71.33ng·mL⁻¹ 浓度内, 峰面积比值与浓度呈良好的线性关系, 回归方程为 $Y = 0.0400X - 0.0005$ ($r = 0.9996$, $n = 7$)。

2.6 精密度及回收率

在同 1d 内分别测定低 (0.71ng·mL⁻¹)、中 (7.13ng·mL⁻¹)、高 (71.33ng·mL⁻¹) 三种浓度的标准血浆溶液, 均测定 5 次, 计算日内精密度及相对回收率。将上述三种浓度的血浆样品冷冻保存, 于 1 周内不同天取出, 解冻后按上述方法处理测定 5 次, 计算日间精密度及相对回收率。结果见表 1。对上述三种浓度的血浆样品各测定 5 次, 将峰面积比值与对照品溶液直接进样所得的峰面积比值比较, 得绝对回收率分别为 98.1%, 97.6%, 97.1%, RSD 分别为 2.3%, 4.1%, 1.8%。

2.7 检测限

于空白血浆中加入一系列低浓度对照品溶液得一组血浆样品, 按上述方法处理测定, 测得最低定量检测限为 0.71ng·mL⁻¹, 最低检出限为 0.23ng·mL⁻¹。

2.8 样品处理后在室温下的稳定性考察

2.8.1 测定溶液的稳定性试验 取干净离心管数支, 按标准曲线配制方法制备含劳拉西泮 0.71, 14.27, 71.33ng·mL⁻¹ 的标准含药血清, 于配制好后按“血浆样品的处理”项立即提取分析, 置室温中分别于 0, 10, 27h 内测定, RSD 分别为 7.4%, 2.7%, 2.0%。结果表明: 样品测定溶液在 27h 内基本稳定。

表 1 劳拉西泮测定方法精密度和方法回收率 ($n = 5$, ng·mL⁻¹)

Tab 1 The precision and recovery of the method for determination of lorazepam

浓度 / ng·mL ⁻¹ 加入量	精密度 RSD / %		相对回收率 / %	
	日内	日间	日内	日间
0.71	2.3	3.34	112.3	113.9
7.13	4.1	1.56	108.8	109.5
71.33	1.8	1.18	110.6	110.8

2.8.2 冷冻血浆样品的稳定性试验: 取干净离心管数支, 按标准曲线配制方法制备含劳拉西泮低、中、高约 0.71, 14.27, 71.33ng·mL⁻¹ 的标准含药血浆; 配制好后放入冰箱, 分别在 -10℃ 冷冻保存 10, 15d 后取出化冻, 然后同法操作测定, RSD 分别为 7.7%, 1.2%, 0.6%。结果表明: 劳拉西泮血浆样品在冰冻 10d 及 15d 条件下稳定。

2.9 生物等效性试验

20 例健康志愿者, 在服药前禁食 12h, 按标准的 2×2 交叉试验方案设计, 分别口服劳拉西泮参比制剂或受试制剂 2mg 统一饮水 250mL, 服药后 2h 内不喝水, 不吃食物, 至给药后 6h 给予统一低脂标准餐。给药前及给药后 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 10, 15, 24, 30, 48, 60h 各取静脉血 5mL。加入抗凝剂 4000r/min 离心 15min 分离出血浆约 2mL, 用本法测定血浆中劳拉西泮的浓度。

20 例健康志愿者单剂量空腹口服两种制剂后的药时曲线见图 7。两种制剂的主要药动学参数见表 2。

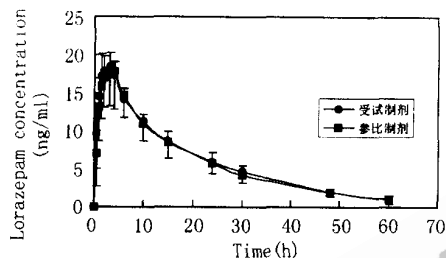


图 7 20例健康志愿者口服两种片剂后的平均血药浓度-时间曲线

Fig 7 Mean drug plasma concentration-time profile of lorazepam in 20 healthy volunteers after oral administration of 2mg lorazepam tablets(test and reference)

两种制剂的主要药动学参数 C_{max} , $AUC_{0-\infty}$ 经对数转换后进行方差分析及双单侧检验,并计算 90%置信区间,表明两种制剂生物等效,受试制剂相对生物利用度为 $(103.33 \pm 12.32)\%$ 。

表 2 20例健康志愿者口服劳拉西泮片 2mg后的药动学参数

Tab 2 The pharmacokinetic parameters of volunteers after single oral administration of 2mg lorazepam tablets

制剂	t_{max} (h)	C_{max} ($ng \cdot mL^{-1}$)	$t_{1/2}$ (h)	Ke (h^{-1})	$AUC_{0-\infty}$ ($ng \cdot h \cdot mL^{-1}$)	F (%)
T	2.825 ± 0.832	20.185 ± 4.560	14.378 ± 3.697	0.05028 ± 0.00933	396.40 ± 103.6	103.33 ± 12.32
R	2.925 ± 1.017	19.642 ± 4.988	14.268 ± 2.790	0.05245 ± 0.02012	379.54 ± 81.02	

3 讨论

采用 LC/MS/MS法测定血浆中劳拉西泮的含量,样品仅需用乙腈沉淀后,即可进样测定,操作简单,可避免反复萃取造成回收率偏低。由于采用二级 MS测定,可消除血浆中其他杂质的干扰,方法灵敏度完全满足实际应用的需要。

参考文献

- [1] 姜兆林,谭家镒,姚丽娟,等.气相色谱-氮磷检测器法检测尿中劳拉西泮[J]. 色谱, 2001, 19(4): 341.
- [2] Pichini S, Pacifici R, Altieri I, *et al*. Determination of lorazepam in plasma and urine as trimethylsilyl derivative using gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 1999, 732: 509-514.
- [3] Kanazawa H, Konishi Y, Matsushima Y, Determination of sedatives and anesthetics in plasma by liquid chromatography-mass spectrometry with a desalting system [J]. J Chromatogr A, 1998, 797: 227-236.