

照品溶液及上述处理好的供试品溶液,各进样 10 μ L,以外标一点法测定,结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 ($n=3$)

Tab 2 Result of sample determination ($n=3$)

| 样品批号 | 含量 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | RSD (%) |
|--------|---|---------|
| 021105 | 3.68 | 1.42 |
| 030122 | 4.75 | 1.55 |
| 030811 | 3.92 | 1.02 |

3 讨论

3.1 何首乌能滋补肝肾、益精血、强筋骨,为本方中君药,2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷为何首乌中主要有效成分,因此,本实验参照有关文献^[1],采用醋酸乙酯作为提取溶剂,能很好地避免该口服液其他成分的干扰,样品

测定结果重现性好,准确度高。

3.2 本实验还对同一批样品进行了 4,5,6 次提取,结果证明萃取次数超过 4 次后对含量测定结果无显著影响,故选定提取次数为 4 次。

3.3 采用反相高效液相色谱法测定复方参仲口服液中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷的含量,被测组分的分离较好,方法操作简便,灵敏度高,结果准确,可作为该口服液实际生产中质量控制的标准。

参考文献

- [1] 蒋琴,鞠建明,鲁静.养血生发胶囊中何首乌羟芪衍生物的含量测定[J].时珍国医国药,2001,12(9):786

收稿日期:2004-02-11

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,加入内标地西洋- β 烯溶液 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- β 烯 (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 321-275 (劳拉西泮) 和 m/z 285-193 (内标:地西洋)。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 321-275 and m/z 285-193 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物浓度较低,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试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 (TED A), 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 (2.1mm × 100mm, 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 000V, 毛细管温度 300 °C, 喷雾气 N₂, 2.5 mL/min。碰撞气氩气, 碰撞能量 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 °C) 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。

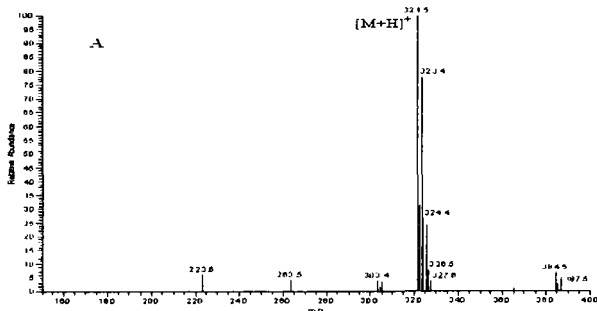


图 1 劳拉西泮一级质谱图

Fig 1 The first grade mass spectra of lorazepam

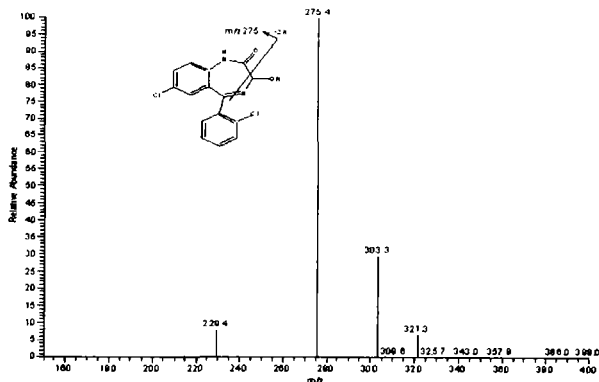


图 2 劳拉西泮二级质谱图

Fig 2 The second grade mass spectra of lorazepam

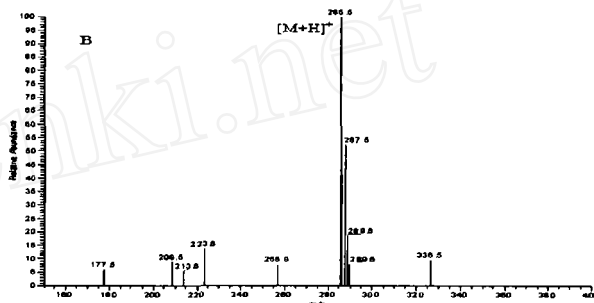


图 3 地西泮一级质谱图

Fig 3 The first grade mass spectra of diazepam

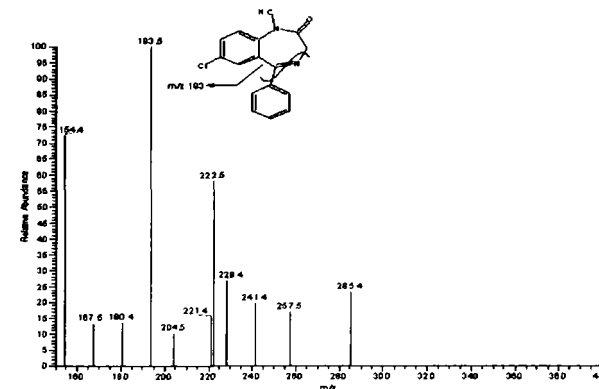


图 4 地西泮二级质谱图

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,

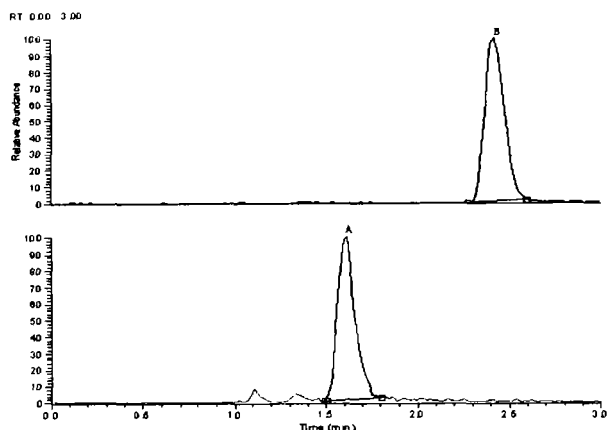


图5 对照品血浆色谱图(劳拉西洋+地西洋+空白血浆, A:劳拉西洋 B:地西洋)

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

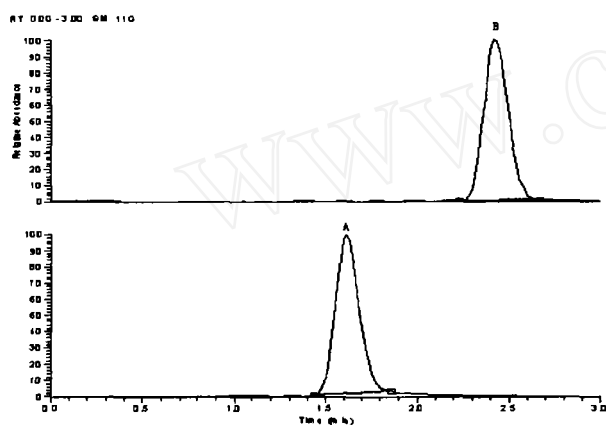


图6 血浆中劳拉西洋色谱图(血浆样品+内标 A:劳拉西洋 B:地西洋)

Fig 6 The chromatograms of lorazepam in plasma (plasma sample + ISID, 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 取地西洋约 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中含劳拉西洋约 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)峰面积与内标子离子 (*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洋 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 劳拉西洋测定方法精密度和方法回收率 ($n = 5, \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)

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洋低、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:劳拉西洋血浆样品在冰冻 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,分别口服劳拉西洋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洋的浓度。

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。

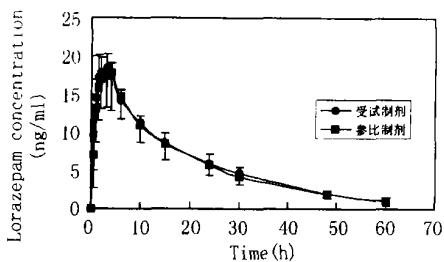


图 7 20例健康志愿者口服两种片剂后的平均血药浓度-时间曲线

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 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 · mL ⁻¹) | $t_{1/2}$ (h) | Ke (h ⁻¹) | AUC_0 (ng · h · 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 | |

收稿日期: 2005-01-12

紫外褶合光谱法测定安痛定复方成分

丁立新, 高金波, 沈德凤 (佳木斯大学化学与药学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要:目的 不经分离同时测定安痛定复方成分的含量。方法 以紫外褶合光谱为基础,结合 PLS法,利用计算机信息处理技术的褶合曲线分析法。结果 安痛定复方成分中非那西丁、氨基比林和苯巴比妥三组分的平均回收率及相对标准偏差 (RSD)分别为 99.73%, 0.84; 99.35%, 0.73%; 100.3%, 1.85%。结论 该方法操作简便,可用于安痛定复方成分的质量监控。

关键词:紫外褶合光谱法;安痛定;非那西丁;氨基比林;苯巴比妥

中图分类号: R917.7.2; R927.2

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2005)04-0321-03

Determination of compounded components in antongding by UV convolution spectrum

DING Li-xin, GAO Jin-bo, SHEN De-feng (School of Chemistry and Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE Without any separation, simultaneous determination of compounded components in Antongding. **METHODS** Based on UV convolution spectrum with PLS method, we used convolution spectrometry of computer information process technology. **RESULTS** Compounded components in Antongding are phenacetin, aminophenazone and phenobarbital. Their average recoveries and RSD were 99.73%, 0.84; 99.35%, 0.73%; 100.3%, 1.85%, respectively. **CONCLUSION** The method is simple and can be used for qualitative control of compounded components in Antongding.

KEY WORDS: UV convolution spectrum; Antongding; phenacetin; aminophenazone; phenobarbital

安痛定复方制剂是由苯巴比妥、非那西丁、氨基比林组成的,具有解热、镇痛作用,主要用于治疗头痛、神经痛、牙

作者简介:丁立新,女,高级工程师,从事药物分析研究。电话:0454-861266