

LC-MS/MS法测定人血浆中佐米曲普坦浓度

李鹏飞^{1,2}, 顾景凯^{2*}, 潘志恒¹, 王静¹, 刘丽宏¹

(1. 第二炮兵总医院药剂科, 北京 100088 2. 吉林大学药物代谢研究中心, 长春 130023)

摘要 目的: 建立高效液相色谱-质谱联用法测定人血浆中佐米曲普坦浓度。方法: 选用 Zorbax Extend-C₁₈ 色谱柱 (5 μm, 150 mm × 4.6 mm), 以甲醇-水-甲酸 (80:20:1 v/v/v) 为流动相, 采用等度洗脱进行分离, 样品用液-液萃取法处理后进样, 流速: 0.8 mL · min⁻¹, 柱温: 室温, 进样量: 20 μL。选用 API 4000 型三重四极杆串联质谱仪的多重反应监测 (MRM) 扫描方式进行检测。结果: 佐米曲普坦的线性范围为 0.10~40.0 ng · mL⁻¹, 定量下限为 0.10 ng · mL⁻¹。准确度与精密度结果显示方法日间、日内变异均小于 15%, 相对偏差 -2.5%~3.3%, 方法提取回收率大于 45%, 稳定性较好。结论: 本研究所建立的方法快速、灵敏, 专属性强、重现性好, 可用于人体血浆中佐米曲普坦浓度的测定和药动力学研究。

关键词: 高效液相色谱-质谱联用法; 佐米曲普坦

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)07-1083-05

LC-MS/MS determination of zolmitriptan in human plasma

LI Peng-fei^{1,2}, GU Jing-kai^{2*}, PAN Zhi-heng¹, WANG Jing¹, LIU Li-hong¹

(1. Pharmacy Department of the Second Artillery General Hospital Beijing 100088, China

2. Research Center for Drug Metabolism, Jilin University, Changchun 130023, China)

Abstract Objective To develop an LC-MS/MS method for the determination of zolmitriptan in human plasma. **Methods** Zolmitriptan and the internal standard were extracted from plasma with liquid-liquid extraction and then separated on a Zorbax Extend-C₁₈ column (5 μm, 150 mm × 4.6 mm). The mobile phase consisted of methanol-water-formic acid (80:20:1, v/v/v) maintained at room temperature. The flow rate was 0.8 mL · min⁻¹ and 20 μL aliquot of residues were injected into the LC-MS/MS system. Detection was carried out by multiple reaction monitoring on an API 4000 LC-MS/MS system. **Results** The assay was linear over the range 0.10~40.0 ng · mL⁻¹ with a lower limit of quantitation of 0.10 ng · mL⁻¹. Intra- and inter-day precision were both less than 15%, respectively. The relative deviation was in the range -2.5%~3.3%. The recoveries of zolmitriptan were more than 45% and stabilities were good. **Conclusion** It is a rapid, sensitive, selective and reliable method for the determination of zolmitriptan in human plasma. The assay can be applied for the determination of zolmitriptan in human plasma and the study on pharmacokinetics.

Key words LC-MS/MS; zolmitriptan

佐米曲普坦 (zolmitriptan) 为选择性 5-HT_{1B/1D} 受体激动剂, 通过对颅部血管扩张和三叉神经系统感觉神经的 5-HT_{1B/1D} 受体的激动作用, 促进颅部血管收缩, 抑制炎症后神经肽的释放, 临床用于治疗偏头痛^[1]。由于本品给药剂量较小, 血中浓度低 (ng 级), 体内血药浓度检测较为困难, 已成为近年研究的热点。国内外有关佐米曲普坦的药代动力学研究^[2~6]和血药浓度测定方法^[7~20]研究较多, 主

要的体内定量方法有 HPLC-UV、HPLC-FLD 和 LC-MS/MS 等。HPLC-UV 专属性差、灵敏度低, 要使用较为复杂的缓冲盐系统进行色谱分离, 分析时间较长; HPLC-FLD 虽然有较高的专属性和灵敏度, 但前处理过程需要进行衍生化反应, 检测也需要较长时间; 采用 LC-MS/MS 法测定血药浓度, 具有选择性好, 灵敏度高, 分析时间短等优点, 已普遍地应用于药物动力学研究。本实验拟结合

* 通讯作者 Tel: (0431) 85619955 E-mail: gujk@mail.jlu.edu.cn

文献报道,建立更为快速、灵敏的 LC-MS/MS 检测方法,并将其用于中国成年健康志愿者人体药代动力学研究。

1 仪器与试剂

API 4000 型三重四极杆串联质谱仪,配有离子喷雾离子化源以及 Analyst 1.3.2 数据处理软件,美国 Applied Biosystem 公司; Agilent 1100 高效液相色谱系统,包括二元输液泵,自动进样器,切换阀,美国 Agilent 公司。

佐米曲普坦对照品(纯度 > 99%):沈阳赛捷医药咨询科技开发有限公司提供;苯海拉明对照品(纯度 > 99%):中国药品生物制品检定所提供;甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,空白人血浆由吉林大学第一医院提供。

2 溶液的配制

对照品储备液:精密称取佐米曲普坦对照品 24 mg 置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,配制成 $0.24 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液。对照品系列溶液:取佐米曲普坦储备液适量,分别用甲醇水 (50:50, v/v) 稀释成浓度分别为 0.5, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0, 100.0, 200.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,即得。

内标溶液:精密称取苯海拉明对照品 20 mg 置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,配制成 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液,取适量苯海拉明储备液用甲醇水 (50:50, v/v) 稀释至浓度为 $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,即得。

3 色谱条件及质谱条件

色谱柱:Zorbax Extend- C_{18} 柱 (5 μm , 150 mm $\times$ 4.6 mm, 美国 Agilent 公司);流动相:甲醇-水-甲酸 (80:20:1, v/v/v);流速:0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温:室温;进样量:20 μL 。

离子源:离子喷雾离子化源,正离子方式检测;离子喷射电压:5 kV;温度:550 $^{\circ}\text{C}$;源内气体 1 (GS1, N_2) 压力:448 kPa 气体 2 (GS2, N_2) 压力:379 kPa 气帘气体 (N_2) 压力:138 kPa 碰撞气 (N_2) 压力:21 kPa 扫描方式为多重反应监测 (MRM);解簇电压 (DP):50 V;佐米曲普坦和苯海拉明的碰撞诱导解离 (CID) 电压分别为 44 eV 和 25 eV;用于定量分析的离子反应分别为 m/z 288.4 $\rightarrow$ m/z 58.0 (佐米曲普坦) 和 m/z 256.3 $\rightarrow$ m/z 167.1 (苯海拉明)。

4 血浆样品处理

精密取血浆样品 0.5 mL 置具塞试管中,加入

内标溶液 ($2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 苯海拉明) 100 μL , 加入甲醇-水 (50:50, v/v) 混合溶液 100 μL , 加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 溶液 100 μL 混匀;加入正己烷-二氯甲烷-异丙醇 (300:150:15, v/v/v) 3 mL, 涡流混合 1 min, 往复振荡 10 min (240 次 $\cdot \text{min}^{-1}$), 离心 5 min (3500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$), 取上层有机相于另一试管中, 40 $^{\circ}\text{C}$ 空气流下吹干, 残留物加入 100 μL 流动相溶解, 涡流混合, 取 20 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

5 分析方法确证

5.1 质谱分析 将佐米曲普坦、苯海拉明储备液用甲醇稀释至一定浓度, 采用蠕动泵进样模式, 进行碎片离子分析, 相应的二级全扫描质谱图见图 1。

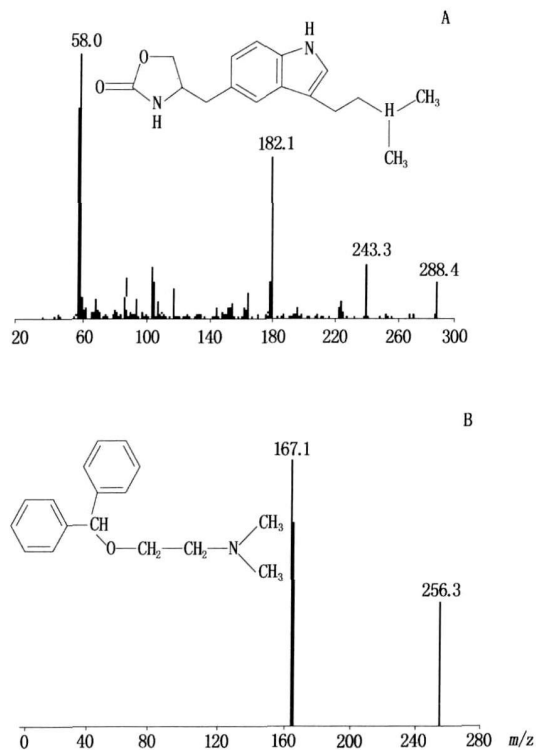


图 1 佐米曲普坦 (A) 和内标苯海拉明 (B) $[\text{M} + \text{H}]^+$ 的二级全扫描质谱图

Fig 1 Full-scan product ion spectra of $[\text{M} + \text{H}]^+$ for zolmitriptan (A) and benzhydramine (internal standard) (B)

5.2 方法的专属性 分别取空白血浆、加入佐米曲普坦对照品溶液和内标溶液的空白血浆、受试者给药后收集的血浆样品 0.5 mL, 按上述血浆样品处理方法及检测条件进行定量分析, 得色谱图 2。结果表明: 内源性物质不干扰佐米曲普坦和内标苯海拉明的测定。

5.3 线性关系考察 取空白血浆 0.5 mL, 加入佐米曲普坦对照品系列溶液 100 μL , 配制成相当于血浆浓度为 0.10, 0.20, 0.60, 2.00, 6.00, 20.0

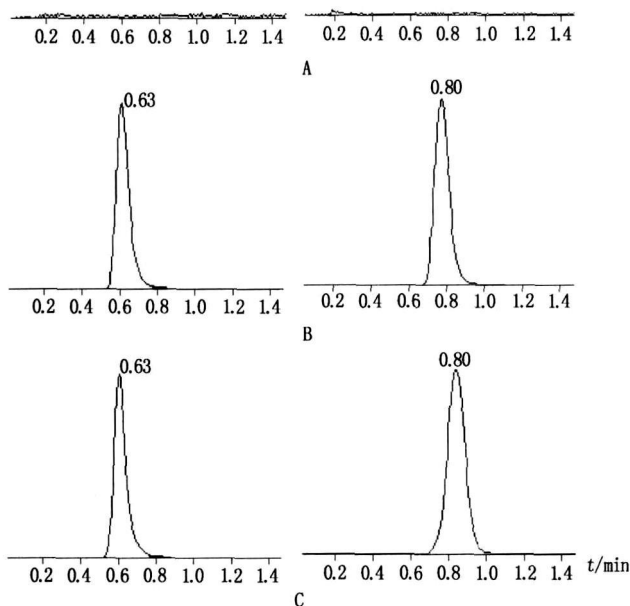


图 2 LC-MS/MS测定人血浆中佐米曲普坦和内标苯海拉明的典型色谱图

Fig 2 Chromatograms of zolmitriptan and benzhydramine (internal standard) in human plasma

A. 空白血浆 (blank plasma) B. 空白血浆加入 $30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 佐米曲普坦 (相当于血浆中佐米曲普坦浓度 $6 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内标苯海拉明 (reference substance added in blank blood plasma) C. 口服给予佐米曲普坦 5 mg 后 3 h 的血浆样品 (plasma sample 3 h after oral administration of zolmitriptan 5 mg to the volunteer)

$40.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品血浆, 按“4”项下方法操作进行处理, 取上清液进样 $20 \mu\text{L}$ 进行 LC-MS/MS 分析。以血浆中待测物浓度为横坐标 X ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标 Y , 用加权 ($W = 1/X^2$) 最小二乘法进行回归运算, 求得直线回归方程为:

$$Y = 0.0266X + 6.65 \times 10^{-4} \quad r = 0.9972$$

根据工作曲线, 佐米曲普坦的线性范围为 $0.10 \sim 40.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 定量下限为 $0.10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (定量下限平行 9 样本精密度考察结果显示 $\text{RSD} \leq 9.7\%$), r 值结果显示线性关系良好。

5.4 准确度与精密度 按上述线性关系考察项下操作, 制备佐米曲普坦低、中、高 3 个浓度 (分别为 $0.20 \ 2.00 \ 32.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的质量控制样品, 每浓度 6 样本, 连续测定 3 d。根据当日的工作曲线, 计算 QC 样品的测得浓度, 根据结果计算方法的准确度与精密度, 结果见表 1。结果显示, 日间、日内变异均小于 15% , 相对偏差 $-2.5\% \sim 3.3\%$, 表明此方法的精密度和准确度均较高, 重现性较好。

表 1 血浆中佐米曲普坦 LC-MS/MS 测定方法的准确度与精密度 ($n = 18$)

Tab 1 Results of precision and accuracy in human plasma by LC-MS/MS

添加值 (added) / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	测得值 (detected) / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	标准差 (standard deviation) / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	相对偏差 (relative error) / %	RSD /%	
				日内 (intra- day)	日间 (inter- day)
0.20	0.20	0.02	-2.5	10.0	13.6
2.00	2.07	0.10	3.3	1.8	13.9
32.00	32.8	1.42	2.4	3.8	7.3

5.5 提取回收率 取空白血浆 0.5 mL , 按上述线性关系考察项下操作, 制备低、中、高 3 个浓度 (相当于血浆中佐米曲普坦浓度 $0.20 \ 2.00 \ 32.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的样品, 每一浓度进行 3 样本分析。另取空白血浆 0.5 mL , 按“4”项下操作, 向获得的上清液中加入相应浓度的对照品溶液和内标溶液各 $100 \mu\text{L}$, 涡流混合, 40°C 空气流下吹干。残留物以流动相溶解, 进样分析, 获得相应峰面积。以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算提取回收率。高、中、低 3 个浓度的提取回收率分别为 50.5% , 47.1% , 46.6% 。以 0.5 mL 重蒸水代替空白血浆, 按上述线性关系考察项下操作, 制备低、中、高 3 个浓度基质效应样本, 每一浓度进行 3 样本分析, 用于考察佐米曲普坦和内标的基质效应, 结果显示相对偏差 RE 均小于 10% , 表明血浆基质无明显基质效应存在。

5.6 稳定性考察 试验中分别进行了长期稳定性 (冰冻放置 20 d)、3 次冻融和室温放置 12 h 3 种稳定性的考察, 将稳定性放置后和冻融后测定结果与理论浓度进行比较, 结果显示所有稳定性试验中测定值与添加值的 RE 均小于 10% , 表明长期冰冻放置血浆样品, 血浆样品反复冻融, 以及分析测试过程中样品较为稳定, 各种贮存条件不影响本方法对样品浓度进行准确测定。

5.7 方法学应用 22 名中国成年健康志愿者单剂量口服佐米格 (每片含佐米曲普坦 2.5 mg) 2 片, 于服药前 (0 h) 和服药后 $0.50 \ 1.00 \ 1.50 \ 2.00 \ 3.00 \ 4.00 \ 5.00 \ 6.00 \ 8.00 \ 10.0 \ 13.0 \ 24.0 \text{ h}$ 经静脉留置针取前臂静脉血 3.0 mL , 置肝素试管中, $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 分离血浆, -20°C 冰冻保存。应用本研究所建立的方法测定其血药浓度, 血药浓度-时间曲线见图 3 并采用 DAS 2.0 药代动力学

软件计算药代动力学参数。血浆中佐米曲普坦的 $T_{\max}$ 为 $(1.9 \pm 0.6) \text{ h}$, $C_{\max}$ 为 $(7.23 \pm 3.57) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $t_{1/2}$ 为 $(2.90 \pm 0.48) \text{ h}$ 采用梯形法计算, AUC_{0-6} 和 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 分别为 (41.27 ± 15.94) 和 $(43.65 \pm 17.16) \text{ ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。各受试者 24 h 前各取血时间点血药浓度均能被检测, 本方法可以满足健康人体药物动力学研究。

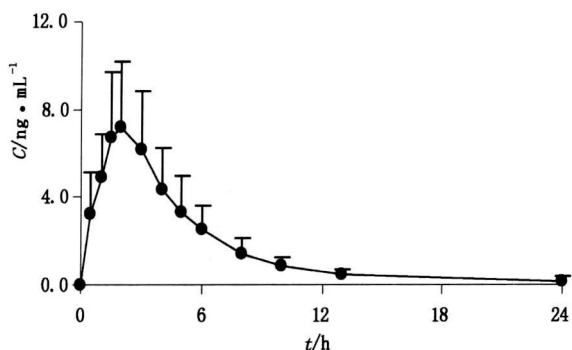


图 3 22 名受试者的平均血药浓度 - 时间曲线

Fig 3 Mean plasma concentration versus time curve in 22 healthy volunteers

6 讨论

本研究建立并验证了 LC-MS/MS 法测定佐米曲普坦的血浆浓度, 与文献报道^[10-19]相比专属性及灵敏度高, 操作简单快速。试验中采用本实验室建立的程序^[20]进样方法, 将每个样品进样时间和峰前部分时间与上个样品形成“套打”模式, 缩小了单个样品分析时间, 样品保留时间小于 1 min, 整个样品分析时间为 1.5 min 左右, 实现了样品的快速分析, 比已有 LC-MS/MS 检测方法^[16-19]缩短 1 倍以上。本研究所选用的色谱柱孔径和内径均较大, 可以达到较高的流速, 在此条件下采用等度方式进行洗脱就可以得到较好的色谱峰, 峰宽仅 0.2 min, 提高了信噪比和灵敏度。流动相加入甲酸, 可以为质谱离子化提供质子, 提高信噪比, 减少基质抑制效应。常见的样品前处理方案有液-液萃取法、固相萃取法和沉淀蛋白法等, 固相萃取法成本较高, 沉淀蛋白法有时对内源性物质的去除不够理想, 本实验采用液-液萃取法, 操作简单快速、经济实用, 并且将萃取液蒸发, 可使组分富集, 增加测定的灵敏度。

7 结论

本研究所建立的方法比文献报道的方法灵敏度更低, 前处理过程简单, 分析时间短, 快速、灵敏、专属性强, 本方法可用于佐米曲普坦人体药物动力学试验。

参考文献

- Caroline MS. Zolmitriptan: A review of its use in Migraine. *Drugs* 1999; 58(2): 347
- ZHANG Bin (张斌), WANG Hua-rong (汪华蓉), LI Bai-qun (李柏群), et al. Bioequivalence study of 2 kinds of zolmitriptan preparations in human (2 种佐米曲普坦制剂人体生物等效性研究). *China Pharm* (中国药房), 2006; 17(23): 1792
- Walsh A, Kagedal M, Bergström M, et al. Distribution of zolmitriptan into the CNS in healthy volunteers: a positron emission tomography study. *Drugs Metab Dis* 2005; 6(3): 139
- Seaber EJ, Peck RW, Smith DA, et al. The absolute bioavailability and effect of food on the pharmacokinetics of zolmitriptan in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*, 1998; 46: 433
- WEN Yu-guan (温预关), YU Ling-han (喻凌寒), YANG Yun-yun (杨运云), et al. Pharmacokinetics of zolmitriptan nasal spray in healthy volunteers (佐米曲普坦鼻喷雾剂在健康人体的药动学研究). *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2006; 41(17): 1331
- TANG Xin (唐欣), WEN Quan (温泉), LIN Li-na (林丽娜), et al. Pharmacokinetics and relative bioavailability of zolmitriptan tablet in healthy volunteers (佐米曲普坦片剂在健康人体的药代动力学和相对生物利用度). *Chin J Clin Pharmacol* (中国临床药理学杂志), 2005; 21(5): 371
- CAI Jia (蔡佳), JIANG Xin-guo (蒋新国), CHEN Jun (陈钧), et al. Study on determination of zolmitriptan in rat plasma by HPLC (大鼠血浆佐米曲普坦的 HPLC 测定方法学研究). *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2006; 41(15): 1171
- YE Jin-wei (叶金伟). Determination of zolmitriptan in human plasma with HPLC (反相高效液相色谱法检测测定人血浆佐米曲普坦浓度). *Her Med* (医药导报), 2007; 26(6): 591
- Clement EM, Franklin M. Simultaneous measurement of zolmitriptan and its major metabolites N-desmethylozmilriptan and zolmitriptan N-oxide in human plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection. *J Chromatogr B*, 2002(766): 339
- Zhang Zun-jian, Xu Feng-guo, Tian Yuan, et al. Quantification of zolmitriptan in plasma by high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 2004(813): 227
- Chen Xiao-yan, Liu Dan, Luan Yan, et al. Determination of zolmitriptan in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. Application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B*, 2006(832): 30
- YU Ling-han (喻凌寒), WEN Yu-guan (温预关), SONG Zhi-guang (宋之光), et al. Determination of zolmitriptan and its pharmacokinetics in human plasma after intranasal administration using LC-MS (高效液相色谱-质谱联用技术测定鼻腔给药后人血浆中佐米曲普坦的含量). *J Instrum Anal* (分析测试学报), 2006; 25(6): 67
- HE Hai-xia (何海霞), MENG Hua (蒙华), ZHOU Yuan-da (周远大), et al. Determination of zolmitriptan in human plasma by RP-HPLC with liquid-liquid extraction (液-液萃取 RP-HPLC 法测定人血浆中佐米曲普坦的浓度). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2005; 25(3): 323

- 14 WANG Dan(王丹), OUYANG Dong-sheng(欧阳冬生), TAN Zhi-rong(谭志荣), *et al* HPLC-MS determination of zolmitriptan in human plasma and research of its bioequivalence(液相色谱-质谱联用法测定佐米曲普坦血药浓度及生物等效性研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2007, 27(2): 171
- 15 YAO Jin-cheng QU Yan-hui ZHAO Xu-yuan, *et al* Determination of zolmitriptan in human plasma by high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry and study on its pharmacokinetics *J Chin Pharm Sci* 2005, 14(1): 25
- 16 YAO JC, QU YH, ZHAO XY, *et al* Determination of zolmitriptan in human plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry and study on its pharmacokinetics *Chin Pharm Sci* 2005, 14(1): 25
- 17 ZHANG Z, XU F, TAN Y, *et al* Quantification of zolmitriptan in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomol Life Sci* 2004, 813(1-2): 227
- 18 YATES R, NARIN K, DICKON R, *et al* Pharmacokinetics, dose proportionality, and tolerability of single and repeat doses of a nasal spray formulation of zolmitriptan in healthy volunteers *J Clin Pharm*, 2002, 42(11): 1244
- 19 Karthick V. Determination of anti-epileptic compounds rizatriptan, zolmitriptan, naratriptan and sumatriptan in human serum by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2000, 14(3): 168
- 20 Wang Ying-wu, Zhong Da-fang, Fawcett JP, *et al* Autosampler programming for improved sample throughput in liquid chromatography mass spectrometry. *Clin Chem*, 2005, 51(11): 2216

(本文于 2008 年 7 月 31 日收到)

您的包装能否确保产品的质量安全?

肉眼看得见的问题 您来解决
肉眼看不见的问题 Labthink 来解决

Labthink®

愈了解, 愈信任!

历经生产、运输、仓储、上架销售等各个环节, 如果包装存在任何质量隐患, 都可能导致产品出现霉变、潮解、破损、保质期缩短等严重问题。Labthink 兰光——包装检测国际知名品牌, 为您提供全方位包装质量与安全解决方案。

济南兰光机电技术有限公司
咨询热线: 0531-85953155
E-mail: labthink@labthink.cn
www.labthink.cn