

超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用技术测定人血浆中奥美拉唑含量

LCMSMS-386

摘要： 本文建立并验证了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定人血浆中奥美拉唑的方法。人血浆样品经乙腈沉淀，离心后取得的上清液进样分析，可在 5 min 内快速、准确地检测血浆中奥美拉唑含量。本实验对方法选择性、线性范围、定量下限、精密密度、回收率、基质效应、残留等项目均进行考察。结果表明该方法满足生物样品方法学验证要求，具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的特点，适合人血浆中奥美拉唑含量的快速准确检测，可用于人体内奥美拉唑浓度的测定及其人体药代动力学研究。

关键词： 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 人血浆 奥美拉唑

奥美拉唑 (Omeprazole) 是第一代苯并咪唑类质子泵抑制剂，是一种脂溶弱碱性药物，对基础胃酸、组胺、五肽胃泌素、刺激迷走神经以及二丁基环腺苷酸等引起的胃酸分泌均有强而持久的抑制作用，用药后可迅速提高胃内 pH 值，快速缓解胃灼热与疼痛感，明显改善消化性溃疡和反流性食管炎的症状，且对十二指肠溃疡的治愈率亦较高，而复发率较低。临床常用于十二指肠溃疡、胃溃疡与反流性食管炎等疾病。

由于奥美拉唑具有良好的治疗效果，临床应用较为

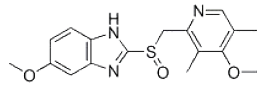
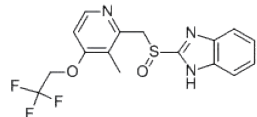
广泛，因此国内制药企业开展较多有关奥美拉唑仿制药的研制工作。为满足仿制药一致性评价的法规要求，奥美拉唑仿制药研制过程中，需进行 I 期临床等实验研究，分析奥美拉唑仿制药的体内变化情况。因此，需对奥美拉唑药物建立一种准确、高效、灵敏的检测方法，用于人血浆中奥美拉唑含量的测定，满足仿制药一致性评价生物样本定量的检测要求。

本实验使用 LCMS-8060 建立更为灵敏、高效的人血浆中奥美拉唑含量的检测方法，供相关人员参考。

实验部分

1.1 化合物信息

表1 化合物信息

化合物名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
奥美拉唑	Omeprazole	73590-58-6	$C_{17}H_{19}N_3O_3S$	
兰索拉唑 (IS)	Lansoprazole	103577-45-3	$C_{16}H_{14}F_3N_3O_2S$	

1.2 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A_{5R} 在线脱气机，SIL-30ACMP 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.89 色谱工作站。

1.3 分析条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack GIST C18(2.1 mm I.D.
×50 mm L.,2.0 μm)

流动相: A相 -2 mM 醋酸铵; B相 - 乙腈

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 5 μL

洗针方式: Rinse pump → Rinse port

外置洗针液: 甲醇: 乙腈: 异丙醇: 水 (含 0.5%
甲酸) 为 1:1:1:1

洗脱方式: 梯度洗脱, B相初始浓度为 20%, 洗
脱程序见表 2。

表2 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	20
3.00	Pumps	Pump B Conc.	80
3.50	Pumps	Pump B Conc.	80
3.60	Pumps	Pump B Conc.	20
5.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8060

离子化模式: ESI(+)

离子源接口电压: 4.0 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

加热气: 空气 10.0 L/min

干燥气: 氮气 10.0 L/min

碰撞气: 氩气

接口温度: 300°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 47 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 3

表3 MRM优化参数

化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
奥美拉唑	346.20	198.15*	-10.0	-13.0	-30.0
	346.20	136.10	-17.0	-31.0	-12.0
兰索拉唑	370.10	252.15	-18.0	-14.0	-10.0

注: *表示定量离子

1.4 标准品与质控样品的配制

分别精密称取两份奥美拉唑适量, 用纯乙腈溶解配制两份 1.0 mg/mL 奥美拉唑储备液。取其中一份储备液用 50% 乙腈溶液逐级稀释成浓度为 1.5、5、15、50、150、500、1500、2500 ng/mL 的标准工作曲线; 另一份储备液用 50% 乙腈溶液分别稀释成浓度为 6、62.5、2000 ng/mL 的质控溶液。分别取标准工作曲线中各浓度点 20 μL 加入 980 μL 人空白血浆中, 依次配制成标准曲线 0.03、0.1、0.3、1、3、10、30、50 ng/mL; 分别取三个不同浓度质控溶液 20 μL 加入 980 μL 人空白血浆中, 依次配制成 0.12、1.25、40 ng/mL 质控样品。

精密称取兰索拉唑适量, 用纯乙腈溶液溶解配制成 1.0 mg/mL 储备液。将配制好的兰索拉唑储备液用 50% 乙腈溶液稀释为 12.5 ng/mL 内标溶液, 待用。

1.5 人血浆样品前处理方法

取人血浆样品 100 μL, 依次加入 12.5 ng/mL 内标溶液 10 μL、乙腈 300 μL, 涡旋混合 3 min, 13000 rpm/min 离心 10 min, 吸取上清液进样分析, 进样体积 5 μL。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图与产物离子扫描质谱图

奥美拉唑在一级质谱扫描下主要生成 $[M+H]^+$ 准分子离子峰 m/z 346.20, 对准分子离子峰进行产物离子扫描, 生成主要碎片离子为 m/z 198.15、 m/z 136.10; 兰索拉唑在一级质谱扫描下主要生成 $[M+H]^+$ 准分子离子峰 m/z 370.10, 对准分子离子峰进行产物离子扫描, 生成主要碎片离子为 m/z 252.15, 其一级质谱图与产物离子扫描图分别见图 1-4。

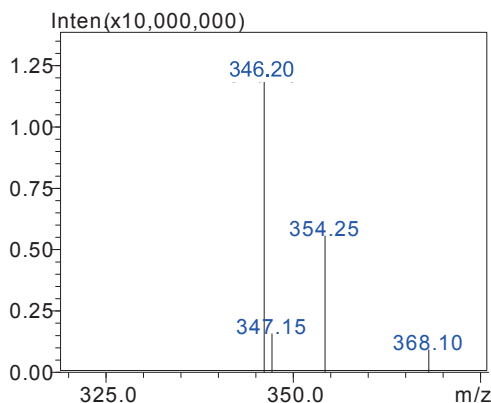


图1 奥美拉唑一级质谱图

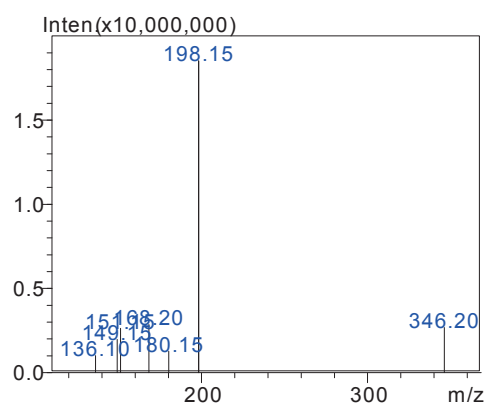


图2 奥美拉唑产物离子扫描图 (CE值-13V)

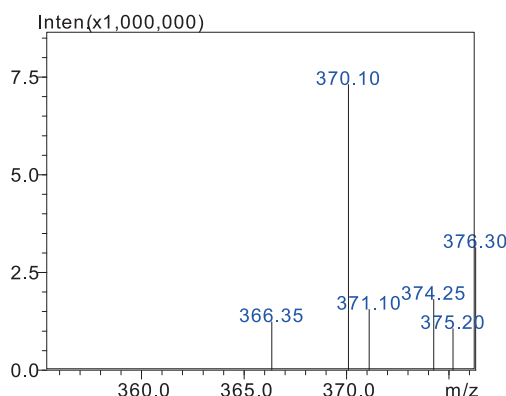


图3 兰索拉唑一级质谱图

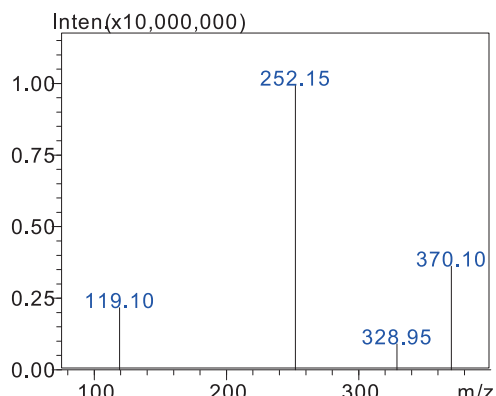
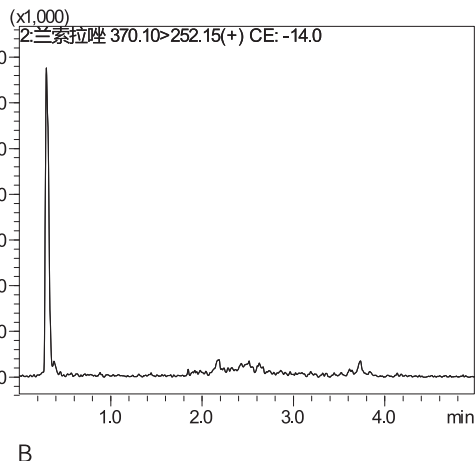
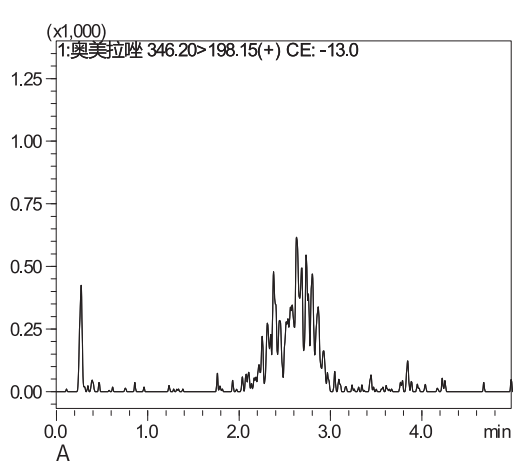


图4 兰索拉唑产物离子扫描图 (CE值-11V)

2.2 方法选择性

取人空白血浆, 按照 1.5 方法和选定的色谱条件处理并测定, 得人空白血浆、0.03 ng/mL 人血浆基质加标样品的 MRM 色谱图, 见图 5。结果表明, 奥美拉唑与内标物的保留时间 t_R 分别为 2.37 min、2.61 min。人空白血浆中的内源物质干扰, 对样品检测无明显影响, 方法具有较强选择性。



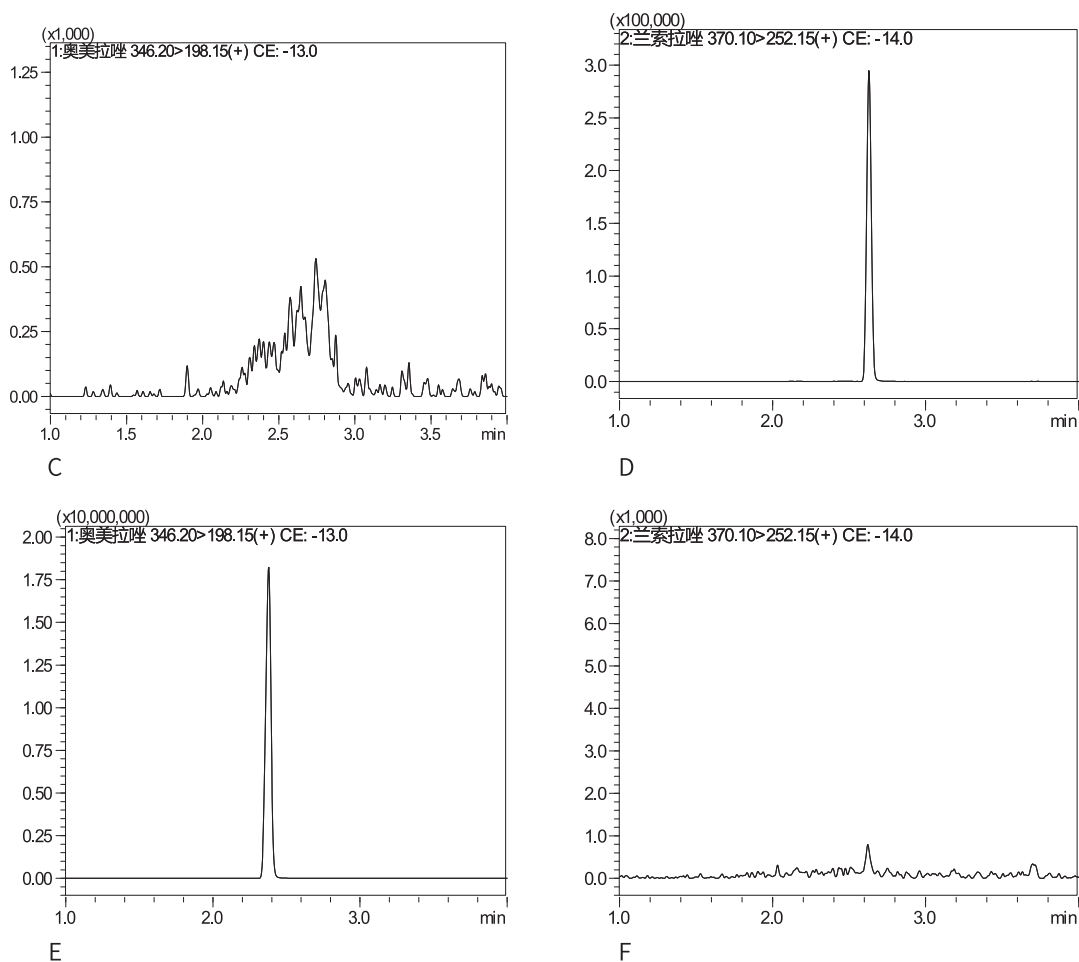


图5 奥美拉唑与兰索拉唑MRM色谱图 (A、B: 人空白血浆; C、D: 空白血浆含12.5 ng/mL内标血浆; E、F: 50 ng/mL奥美拉唑血浆样品不含内标)

2.3 线性范围

按照 1.4 项下人血浆样品配制方法制备 0.03、0.1、0.3、1、3、10、30、50 ng/mL 人血浆标准工作曲线，按照 1.5 项中人血浆样品前处理方法处理人血浆样品，建立标准曲线，并用同位素内标法进行分析测定。以人血浆中奥美拉唑浓度与内标浓度（以 1 计）的比值 X 为横坐标，以奥美拉唑峰面积与兰索拉唑峰面积的比值 Y 为纵坐标，权重系数为 $1/C^2$ ，进行线性回归分析，所得标准曲线见图 6，人血浆中奥美拉唑线性回归方程及相关系数见表 4。结果表明奥美拉唑在 0.03-50 ng/mL 的浓度范围内线性关系良好。

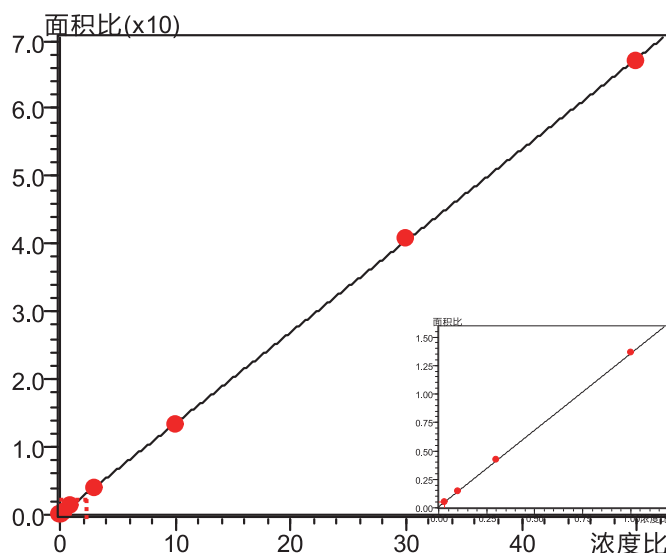


图6 奥美拉唑标准曲线

表4 奥美拉唑标准曲线参数（线性回归，权重系数为 $Y=1/C^2$ ）

化合物	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度(%)	相关系数r
奥美拉唑	$Y = (1.34743)X + (0.00820563)$	0.03-50	96.8~103.3	0.9997

表5 标准曲线各浓度点准确度

级别	标准浓度 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	准确度(%)
1	0.03	0.030	98.8
2	0.1	0.103	103.3
3	0.3	0.306	102.2
4	1	1.005	100.5
5	3	2.903	96.8
6	10	9.849	98.5
7	30	30.179	100.6
8	50	49.693	99.4

2.4 方法精密度与准确度

取已配制好的 0.09、12.5、40 ng/mL 质控样品以及定量下限 0.03 ng/mL 样品，按照 1.5 方法制备，每个浓度的人血浆样品在 1 天内制备 6 份平行样品分析，连续测定 3 天，每日随行标准曲线，用测得质控样品中奥美拉唑峰面积的 RSD% 值计算其日间和日内差异，结果见表 6。其中奥美拉唑最低定量限 S/N 平均值为 95。结果表明，各浓度水平精密度、准确度以及该方法的灵敏度均在接受标准内，并已满足临床检测浓度要求。

表6 奥美拉唑日内精密度与日间精密度（3天，每天n=6）

样品类型	理论浓度 (ng/mL)	日内精密度RSD%	日间精密度RSD%	准确度%
LLOQ	0.03	1.86	3.90	91.2-108.20
LOQ	0.09	1.63	1.46	100.8-106.60
MOQ	12.5	0.86	1.27	98.80-104.10
HOQ	40	0.45	2.27	91.70-99.30

2.5 回收率

取浓度为 0.09、12.5、40 ng/mL 质控样品（每个浓度重复 5 次），按照 1.5 方法制备，以人血浆样本制备进样检测后色谱峰面积（A1）与人空白血浆按照 1.5 方法处理后加入标准品溶液进样检测所得色谱峰面积（A2）之比，即 $A1/A2 \times 100\%$ ，考察人血浆样本处理方法的提取回收率。实验结果见表 7，各浓度水平奥美拉唑回收率均大于 81%、RSD 小于 6%。

表7 方法回收率结果(n=5)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	平均回收率%	RSD%
LQC	0.09	88.85	2.45
MQC	12.5	89.67	1.20
HQC	40	81.58	5.20

2.6 基质效应

考察低、中、高三浓度水平质控样品（每个浓度重复 5 次），通过比较人空白血浆后加标样品与浓度一致的标准溶液，两者的目标化合物面积平均值所得比值即为基质效应，并计算内标归一化基质效应。结果见表 8，各浓度水平基质效应因子均大于 83%。

表8 基质效应考察结果(n=5)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	基质效应%	内标基质效应%	A/A_{IS} 基质效应
LQC	0.09	83.94	99.59	84.29
MQC	12.5	83.73	99.33	84.29
HQC	40	84.61	99.64	84.92

2.7 稳定性试验

为评价生物样品在周围环境（如室温、光照）下的稳定性，将低、中、高三浓度水平质控样品（n=6）在室温桌面放置 12 h 以上，按照 1.5 方法制备并进行测定，将测定值浓度与理论值进行比较。结果显示，三个浓度水平的质控样品测定值与理论值的差异均在 $\pm 10\%$ 以内。人血浆中奥美拉唑在室温下放置 12 h 以上具有良好稳定性。

考察生物样品在处理、制备等过程中反复冻融的稳定性，将高、中、低质控样品（n=6）反复冻融三个周期，每一周期大于 12 h，经制备后同法测定，与理论值进行比较。结果显示，测定值与理论值的差异均在 $\pm 8\%$ 以内。说明人血浆中奥美拉唑的浓度在 3 次冻融循环的过程中不会发生显著的改变。

考察生物样品经制备后，在待测环境中的稳定性，将低、中、高三浓度水平质控样品（n=6）在待测环境下放置 96 h，将测定值与理论值进行比较。结果显示，测定值与理论值的差异均在 $\pm 4\%$ 以内。说明人血浆中奥美拉唑的浓度在待测环境中放置后，其含量可保持稳定。

2.8 系统残留考察 (Carryover)

考察系统残留的影响，完成浓度最高点分析后，其后分析空白样品中奥美拉唑的峰面积，空白样品中奥美拉唑及其内标物的通道中均没有明显的目标化合物色谱峰。

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定人血浆中奥美拉唑的方法。该方法在 5 min 内完成人血浆中奥美拉唑的检测，采用内标法定量，方法定量下限 0.03 ng/mL，线性范围 0.03-40 ng/mL，相关系数在 0.9997。选择性考察结果表明人空白血浆中没有对分析造成明显干扰的物质。方法中定量下限日内、日间精密度 1.86% 与 3.90%，S/N 平均值为 95；低中高三水平质控浓度日内精密度 0.45-1.63%，日间精密度 1.27-2.27%，准确度 91.7-106.6%；各浓度水平质控样品中奥美拉唑回收率均大于 81%，RSD 小于 5%，基质效应大于 83%；稳定性实验结果显示样品在室温下放置 12 小时稳定，3 次冻融循环奥美拉唑浓度无显著变化，人血浆样品提取液待测环境下放置 96 h 稳定。方法具有分析方法简单、分析速度快、灵敏度高、重复性好的特点，满足奥美拉唑体内药物分析要求，为奥美拉唑仿制药生物等效性评价提供快速准确的检测方法。