

艾司奥美拉唑 UPLC-MS/MS 测定方法建立及其在健康中国人中的生物等效性研究

张 静, 熊 雯*, 袁宇琳, 岳 娇, 郑 萍

成都市药品检验研究院, 四川 成都 610000

摘要: **目的** 建立 UPLC-MS/MS 法测定人血浆中艾司奥美拉唑浓度, 并应用于人体生物等效性研究。**方法** 采用 UPLC-MS/MS 法, 以艾司奥美拉唑-d3 为内标, ACE 3 C₁₈-AR (50 mm×2.1 mm, 3 μm) 为分析柱, 流动相 A 为 5 mmol·L⁻¹ 乙酸铵水溶液, 流动相 B 为乙腈, 体积流量为 0.6 mL·min⁻¹ 进行梯度洗脱; 采用电喷雾离子源, 以多反应监测 (MRM) 正离子模式进行检测, 用于定量分析的离子对为 m/z 346.1→198.1 (艾司奥美拉唑)、 m/z 349.1→198.1 (艾司奥美拉唑-d3)。应用建立的方法测定人血浆中艾司奥美拉唑浓度, 并计算生物等效性。**结果** 艾司奥美拉唑在 3~3 000 ng·mL⁻¹ 范围线性关系良好 ($r \geq 0.999 4$), 批内、批间精密度和准确度、回收率、基质效应及稳定性均符合生物样品测定要求。应用该方法进行人体生物等效性样品测定, 证明受试制剂和参比制剂生物等效。**结论** 建立的人血浆中艾司奥美拉唑浓度测定方法准确、灵敏、选择性好、重现性高, 可用于受试者单次口服 40 mg 艾司奥美拉唑镁肠溶干混悬剂的生物等效性研究, 受试制剂和参比制剂生物等效。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 艾司奥美拉唑; 生物等效性; 消化性溃疡; 生物样品

中图分类号: R969.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2024) 03-0573-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.03.015

Determination of esomeprazole in human plasma by UPLC-MS/MS and its bioequivalence study in healthy Chinese subjects

ZHANG Jing, XIONG Wen, YUAN Yulin, YUE Jiao, ZHENG Ping

Chengdu Institute for Drug Control, Chengdu 610000, China

Abstract: Objective To establish and validate a UPLC-MS/MS method for the determination of esomeprazole in human plasma, which was applied to bioequivalence study. **Methods** UPLC-MS/MS method using esomeprazole-d3 as the internal standard (IS) was used to determine esomeprazole in human plasma. The determination was performed on ACE 3 C₁₈-AR (50 mm × 2.1 mm, 3 μm) with a linear gradient, the flow rate was 0.6 mL·min⁻¹. The mobile phase A consisted of water containing 5 mmol·L⁻¹ ammonium acetate, the mobile phase B consisted of acetonitrile. The ion transitions under multiple reaction monitoring (MRM) mode by ESI⁺ ionization were performed at m/z 346.1→198.1 and m/z 349.1→198.1 for carbamazepin and esomeprazole-d3. The established method was used to determine the concentration of esomeprazole in human plasma in the bioequivalence study. **Results** The linear range of esomeprazole were 3—3 000 ng·mL⁻¹ ($r \geq 0.999 4$). The intra-day and inter-day accuracies and precisions, the recoveries and matrix effects, and the sample stability were all suitable to the biological samples determination. The method was applied to determine human plasma samples of bioequivalence study, and it was proved that the test preparation and the reference preparation were bioequivalent. **Conclusion** The method was proved to be highly accurate, sensitive, selective, and suitable for the bioequivalence study of esomeprazole in healthy Chinese volunteers after a single oral dose of 40 mg esomeprazole suspension. The test preparation and the reference preparation were bioequivalent.

Key words: UPLC-MS/MS; esomeprazole; bioequivalence; peptic ulcer; biological samples

随着人们生活水平的提高, 消化系统疾病的发生率逐年升高, 其中越来越多的人患有消化性溃

疡疾病。随着科学技术的进步, H₂受体拮抗剂、质子泵抑制剂(PPI)类药物相继被研发并应用于临床

收稿日期: 2023-10-19

第一作者: 张 静, 女, 主管药师, 研究方向为药品质量分析和体内药物分析。E-mail: zhangjing@cdfdc.org.cn

*通信作者: 熊 雯, 女, 主任药师, 研究方向为药品质量分析和体内药物分析。E-mail: xiongwen@cdfdc.org.cn

治疗消化性溃疡疾病。其中,PPI广泛用于治疗胃食管反流性疾病(GERD)和消化性溃疡,其不仅抑制胃酸分泌,同时还具有抗氧化、抗炎等作用^[1-2]。艾司奥美拉唑^[3-4]是由阿斯利康制药有限公司开发的经典PPI,是全球首个PPI奥美拉唑的S型光学异构体。奥美拉唑是一种外消旋混合物,由R型和S型2种光学异构体1:1混合组成,而艾司奥美拉唑是单一的S-型异构体^[5],其特点为口服后的首关效应小,生物利用度和血浓度较奥美拉唑更高,因此,药物治疗效果及持续时间优于奥美拉唑^[6]。本研究建立了UPLC-MS/MS法测定人血浆中的艾司奥美拉唑浓度,并应用于艾司奥美拉唑人体生物等效性研究,为其临床应用提供更多相关依据。

1 材料与方法

1.1 试药与试剂

受试制剂:艾司奥美拉唑镁肠溶干混悬剂(规格:每袋40 mg,成都苑东生物制药股份有限公司,批号:P2101012101);参比制剂:艾司奥美拉唑镁肠溶干混悬剂(规格:每袋40 mg,阿斯利康制药有限公司,批号:VANC);艾司奥美拉唑对照品(加拿大TLC,批号:1204-061A1,质量分数:98.8%);艾司奥美拉唑-d3对照品(加拿大TLC,批号:1475-061A3,质量分数:97.4%);乙腈、甲酸为色谱纯级;水为超纯水;空白人血浆来自潍坊高新技术产业开发区人民医院(抗凝剂为EDTA-K₂)。

1.2 仪器

LC-30AD型超高效液相色谱仪(日本岛津公司);Triple Quad 5500质谱仪(美国Applied Biosystems公司);XPE105型电子分析天平(法国METTLER TOLEDO公司);5810R型超速离心机(德国Eppendorf公司);Mixmate型漩涡混合器(德国Eppendorf公司)。

2.1 艾司奥美拉唑UPLC-MS/MS测定方法建立

2.1.1 色谱与质谱条件 (1)色谱条件:色谱柱为菲罗门ACE 3 C₁₈-AR(50 mm×2.1 mm,3 μm),流动相A为5 mmol·L⁻¹乙酸铵水溶液,流动相B为乙腈,梯度洗脱程序:0→0.5 min,70% A;0.5→2.0 min,70%→40% A;2.0→2.2 min,40%→10% A;2.2→2.8 min,10% A;2.8→3.0 min,10%→70% A;3.0→5.0 min,70% A;体积流量:0.6 mL·min⁻¹,柱温40℃。

(2)质谱条件:采用电喷雾离子源(ESI),多反应监测(MRM)正离子模式。离子源温度:500℃,离子喷雾电压:5 500 V,辅助加热气压力:344.75 kPa(50 psi),雾化气压力:344.75 kPa(50 psi),气帘气压力:

137.90 kPa(20 psi),碰撞气:62.06 kPa(9 psi),去簇电压:70 V,碰撞电压:16 V。用于定量分析的离子对分别为: m/z 346.1→198.1(艾司奥美拉唑), m/z 349.1→198.1(艾司奥美拉唑-d3)。

2.1.2 对照品溶液和内标溶液的配制 (1)艾司奥美拉唑对照品溶液制备:精密称取艾司奥美拉唑对照品适量,用甲醇溶解制得质量浓度为100 μg·mL⁻¹的艾司奥美拉唑钠对照品储备液,并用甲醇定量稀释至质量浓度为0.06、0.12、0.60、6.00、15.00、30.00、48.00、60.00 μg·mL⁻¹的标准曲线工作液以及0.18、18.00、24.00、45.00 μg·mL⁻¹的质控工作液。

(2)内标工作液制备:取艾司奥美拉唑-d3对照品适量,用甲醇溶解制得质量浓度为100 μg·mL⁻¹的艾司奥美拉唑-d3储备液,并用甲醇定量稀释至质量浓度为500 ng·mL⁻¹的内标(IS)工作液。溶液配制与保存均在黄光下进行。

2.1.3 血浆样品的处理方法 取血浆样品100 μL,加入20 μL内标工作液,漩涡混合15 s后,再加入500 μL乙腈,漩涡混合5 min后,于3 200×g、4℃离心10 min,吸取上清液50 μL,再加入乙腈-水(25:75)350 μL稀释,漩涡混合1 min,进样2 μL。样品保存及处理过程均在黄光下进行。

2.1.4 方法学考察 (1)专属性考察:取6个批次的空白血浆,分别进行不加内标的空白样品测定和加入分析物对照品溶液和内标溶液的添加实验,按“2.1.3”项下方法进行处理,进样测定。结果显示,分析物和内标峰形良好,出峰时间均为0.96 min,内源性物质不干扰分析物和内标测定,分析物和内标相互间也无干扰,表明该方法专属性良好,典型色谱图见图1。

(2)标准曲线及定量下限:空白血浆加5%体积艾司奥美拉唑对照品标准工作液制得到质量浓度为3、6、30、300、750、1 500、2 400、3 000 ng·mL⁻¹的血浆标准曲线样品,按“2.1.3”项下方法处理,进样分析。以艾司奥美拉唑质量浓度为横坐标(x),艾司奥美拉唑与内标峰面积的比值为纵坐标(y),采用加权($1/x^2$)最小二乘法进行线性回归,不同日期艾司奥美拉唑的3条标准曲线回归方程见表1。结果表明,艾司奥美拉唑在3~3 000 ng·mL⁻¹线性关系良好, r 为0.999 4~0.999 6。

配制定量下限血浆样品(3 ng·mL⁻¹)6份,按“2.1.3”项下方法处理,进样分析,测定3 d。结果批内精密度假RSD为2.09%~4.13%,批内准确度为102.61%~103.61%,批间精密度假RSD为2.84%,批

艾司奥美拉唑

IS

A



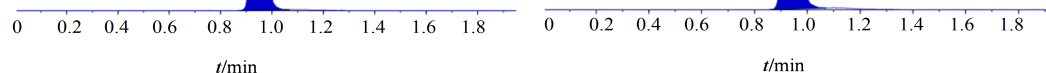
B



C



D



A-空白血浆样品;B-内标空白血浆样品;C-待测物加内标空白血浆样品;D-受试者餐后口服 40 mg 艾司奥美拉唑干混悬剂后 3 h 的血浆样品。
A-blank plasma sample;B-blank plasma sample within IS; C-blank plasma sample within esomeprazole and IS; D-plasma sample of subject 3 h after 40 mg oral administration of Esomeprazole Dry Suspension after meal.

图 1 人血浆中艾司奥美拉唑的 LC-MS/MS 图

Fig. 1 LC-MS/MS chromatograms of esomeprazole in human plasma

间准确度为 103.20%。

(3) 残留效应: 在定量上限 ($3\ 000\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 血浆样品进样后, 再进样空白样品以评价残留效应。测

定结果表明待测物与内标残留效应小, 残留对测定无影响。

(4) 准确度和精密度考察: 配制 4 个质量浓

表1 线性回归方程
Table 1 Regression equations

分析批次	线性方程	<i>r</i>
1	$y=0.009\ 74\ x+0.005\ 05$	0.999 4
2	$y=0.009\ 76\ x-0.001\ 02$	0.999 6
3	$y=0.009\ 84\ x+0.003\ 81$	0.999 6

度(9、90、1 200、2 250 ng·mL⁻¹)的质控血浆样品,按“2.1.3”项下方法处理,每个浓度重复6次,测定3 d,计算批内、批间准确度和精密度,见表2。结果表明,该方法批内和批间准确度和精密度良好。

(5)基质效应:取6批正常血浆、2批溶血血浆(由正常空白血浆加2%体积的溶血红细胞制得)及2批脂血血浆(由正常空白血浆加5%体积的20%中/长链脂肪乳制得)共10个批次血浆,按“2.1.3”项下方法进行处理,获得空白上清液,分别加入对照品溶液配得低、中、高质量浓度(9、1 200、2 250 ng·mL⁻¹)血浆样品进样质量浓度一致的基质样品,每个质量浓度重复3次,进样分析,记录峰面积为 A_M 。用水

代替血浆加入对照品溶液配得相应质量浓度的溶液样品,进样分析,记录峰面积为 A_W 。基质效应= A_M/A_W ,内标归一化基质效应=艾司奥美拉唑基质效应/内标基质效应。结果见表3,10个批次的血浆艾司奥美拉唑和内标基质效应均较小,表明该方法基质效应小,血浆基质不干扰测定。

(6)回收率试验:配制低、中、高质量浓度(9、1 200、2 250 ng·mL⁻¹)的质控血浆样品,按“2.1.3”项下方法进行处理,每个质量浓度重复6次,进样分析,记录峰面积为 A_E 。取空白血浆按“2.1.3”项下方法处理获得空白上清液,分别加入对照品溶液配制相应浓度的基质样品,每个质量浓度重复6次,进样分析,记录峰面积为 A_S 。回收率= A_E/A_S 。结果显示,艾司奥美拉唑低、中、高质量浓度血浆样品的回收率依次为106.72%、103.81%、105.32%,内标(500 ng·mL⁻¹)回收率为104.00%,表明该方法回收率良好。

(7)稀释验证:配制质量浓度为11 250 ng·mL⁻¹的血浆样品,用空白血浆稀释5倍得到与高浓

表2 批内、批间精密度和准确度($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Intra-day and inter-day accuracies and precisions ($\bar{x}\pm s, n=6$)

理论质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	批内			批间		
	测定质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	准确度/%	RSD/%	测定质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	准确度/%	RSD/%
9	9.42±0.21	104.61±2.38	2.27	9.25±0.24	102.73±2.70	2.62
90	91.78±0.92	101.98±1.03	1.01	91.16±1.48	101.28±1.65	1.63
1 200	1 228.33±20.41	102.36±1.70	1.66	1 227.78±23.40	102.31±1.95	1.91
2 250	2 300.00±57.97	102.22±2.58	2.52	2 381.11±84.01	105.83±3.73	3.53

表3 艾司奥美拉唑和内标的基质效应($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Matrix effects of esomeprazole and IS ($\bar{x}\pm s, n=3$)

基质编号	9 ng·mL ⁻¹		1 200 ng·mL ⁻¹		2 250 ng·mL ⁻¹		500 ng·mL ⁻¹
	基质效应/%	内标归一化基质效应因子/%	基质效应/%	内标归一化基质效应因子/%	基质效应/%	内标归一化基质效应因子/%	内标基质效应/%
空白血浆1	99.14±0.18	99.13±1.15	97.28±1.34	97.91±0.49	96.75±1.31	96.85±0.69	99.70±1.33
空白血浆2	97.78±0.82	99.69±1.14	97.91±1.13	99.30±0.84	97.09±0.57	97.73±1.13	98.63±1.20
空白血浆3	94.87±0.89	99.06±0.26	94.32±6.59	99.03±0.97	99.25±2.13	95.82±0.46	98.16±5.25
空白血浆4	97.75±1.37	99.39±0.52	98.96±1.79	100.14±1.67	96.73±0.91	96.12±0.70	99.29±1.42
空白血浆5	98.92±0.37	99.13±0.23	97.34±1.12	98.75±0.98	98.99±2.05	97.00±2.14	100.07±1.89
空白血浆6	96.44±1.18	98.80±1.80	98.40±1.21	100.97±1.65	96.61±0.66	95.24±0.71	98.81±2.11
脂血1	95.89±1.58	97.95±1.63	99.93±2.40	98.75±2.13	97.38±1.21	94.21±1.17	100.71±2.48
脂血2	97.70±1.41	99.65±1.62	97.85±0.94	97.36±1.31	97.43±0.47	97.88±0.69	99.28±1.09
溶血1	97.75±1.71	98.24±0.66	98.28±1.05	99.30±1.68	97.38±1.95	98.17±1.57	99.15±1.26
溶血2	97.68±1.04	99.76±0.51	97.27±2.21	99.30±1.68	95.94±2.76	97.29±0.26	98.14±1.66

度($2\,250\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)质控血浆样品浓度一致的稀释质控血浆样品,按“2.1.3”项下方法进行处理6份,进样分析。稀释质控样品与理论值的准确度偏差为0.15%,RSD为0.72%,表明样品稀释5倍测定不影响该方法的精密度与准确度。

(8)基质稳定性考察:配制低、高质量浓度($9\,1\,200\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的质控血浆样品,每个浓度重复6次,分别考察前处理稳定性、血浆样品冻融稳定性、长期稳定性、制备后稳定性及全血离心前稳定性。通过代入新鲜配制的标准曲线样品得到稳定性样品的测定结果,与理论浓度进行比较,结果见表4。结果表明,血浆样品在室温黄光放置29 h、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反复冻融4次、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置62 d均稳定,处理后的进样溶液 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进样室放置52 h稳定,全血样品于冰浴黄光放置2 h稳定。

(9)溶液稳定性考察:将不同条件存储的待测物和内标工作溶液与新鲜配制的工作溶液比较考察溶液稳定性。结果表明,对照品储备液室温黄光放置13 h稳定,工作液室温黄光放置14 h稳定;对照品储备液及工作液于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置63 d稳定;内标工作液室温黄光放置13 h稳定。

(10)重进样重现性:将已被接受的验证分析批(包含标准曲线、定量下限、准确度和精密度)的样品在进样室($5\text{ }^{\circ}\text{C}$)放置一段时间后重新进样分析。结果表明,处理后的样品于进样室放置29 h后再次进样重现性良好。

2.2 生物等效性研究

2.2.1 受试者选择 本试验由华北石油管理局总医院药物临床试验机构承担,研究方案经华北石油管理局总医院临床试验伦理专业委员会审查同意,伦理审查批件号:(2021)I期(01)号,临床试验平台备案号:CTR20211139。所有受试者均签署知情同

意书,并严格按试验方案入/排标准进行筛选。

(1)入选标准:①年龄 ≥ 18 岁,健康男性女性均可;②体质量:男性志愿者体质量 $\geq 50\text{ kg}$,女性志愿者体质量 $\geq 45\text{ kg}$,身体质量指数(BMI)在 $19.0\sim 26.0\text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$;③志愿者必须在试验前对本研究知情同意,并自愿签署书面的知情同意书。

(2)排除标准:①生命体征、体格检查、实验室检查、12导联心电图、腹部B超检查等异常且具有临床意义者;②既往病史/手术史或现有疾病(尤其是胃肠道消化系统疾病)可能对药物代谢或安全性产生影响者;③有药物滥用史和对同类药物有过敏史;④首次用药前30 d内使用过任何与艾司奥美拉唑镁有相互作用的药物者;⑤首次用药前14 d内服用了任何处方药、非处方药、任何维生素产品、中草药、保健品等者;⑥试验前3个月内献过血或大量出血(大于 400 mL)者;⑦试验前3个月内参加了其他临床试验者;⑧其他研究者认为不适宜参加临床试验者。

2.2.2 试验设计 空腹试验为单中心、单剂量、随机、开放、两序列、两周期、交叉生物等效性试验,30例受试者中男性18例、女性12例,平均年龄为(31.63 ± 7.31)岁,平均身高为(166.26 ± 7.28)cm,平均空腹体质量为(62.85 ± 7.38)kg,平均BMI为(22.71 ± 1.87) $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$;空腹单次口服艾司奥美拉唑镁肠溶干混悬剂 40 mg ,分别于给药前(0 h)和给药后0.50、1.00、1.33、1.66、2.00、2.33、2.66、3.00、3.50、4.00、4.50、5.00、6.00、7.00、8.00、9.00、10.00、12.00 h采血。餐后试验为单中心、单剂量、随机、开放、四周期、重复交叉生物等效性试验,29例受试者中男性22例、女性7例,平均年龄为(35.41 ± 8.44)岁,平均身高为(167.21 ± 7.04)cm,平均餐后体质量为(64.75 ± 8.55)kg,BMI为(23.09 ± 2.14) $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$;餐

表4 不同条件下艾司奥美拉唑的基质稳定性($n=6$)

Table 4 Stability of ESO in matrix under different conditions($n=6$)

考察项目	条件	$9\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$		$1\,200\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	
		准确度偏差/%	RSD/%	准确度偏差/%	RSD/%
全血离心分离前稳定性	全血冰浴黄光放置2 h	5.43	4.11	2.87	1.55
血浆前处理稳定性	室温黄光放置29 h	3.09	1.20	2.81	1.36
制备后稳定性	$5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进样上清液进样室放置52 h	5.74	1.94	3.19	1.67
血浆冻融稳定性	$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融4次	3.41	2.61	3.85	1.66
	$-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融4次	1.96	1.23	4.37	1.36
血浆长期稳定性	$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置62 d	5.61	1.61	4.15	2.28
	$-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置62 d	4.24	1.75	3.41	1.80

后单次口服艾司奥美拉唑镁肠溶干混悬剂 40 mg, 分别于给药前(0 h)和给药后 0.50、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00、3.33、3.66、4.00、4.33、4.66、5.00、5.50、6.00、7.00、8.00、10.00、12.00、14.00、16.00 h 采血。每个时间点采集静脉血 3 mL 至含 EDTA-K₂ 抗凝剂采血管中,于 4 °C、1 700×g 离心 10 min,分离得到的血浆置于-70 °C 保存。空腹和餐后试验两周期清洗期均为 7 d。

2.2.3 统计学处理 根据《中国药典》2020 年版第四部指导原则 9011(药物制剂人体生物利用度和生物等效性试验指导原则)要求,在单剂量给药测定生物等效性试验中,需分析的参数包括达峰浓度($C_{\max}$)、生物利用度($AUC_{0\sim t}$)和 $AUC_{0\sim\infty}$,对于这些参数,参比制剂和受试制剂几何均值比的 90% 置

信区间在 80.00%~125.00% 内视为生物等效。本试验血药浓度数据使用 Phoenix WinNonlin 8.2 软件进行非房室模型药动力学参数的计算,采用 SAS 9.4 软件进行统计分析。主要指标($C_{\max}$ 、 $AUC_{0\sim t}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$)经自然对数转换后进行方差分析(ANOVA)。

2.2.4 生物等效性分析结果 应用建立的方法测定临床试验血浆样品,空腹及餐后组受试者平均血药浓度-时间曲线见图 2。结果显示两制剂 $C_{\max}$ 、 $AUC_{0\sim t}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$ 几何均值比的 90% 置信区间在 80.00%~125.00% 等效区间内(表 5),证明两制剂人体生物等效。同时,按照常见不良事件评价标准(CTCAE V5.0 版),通过生命体征、体格检查结果、不良事件、实验室检查值评价药物安全性,证明 2 种制剂空腹和餐后服用均有良好的安全性。

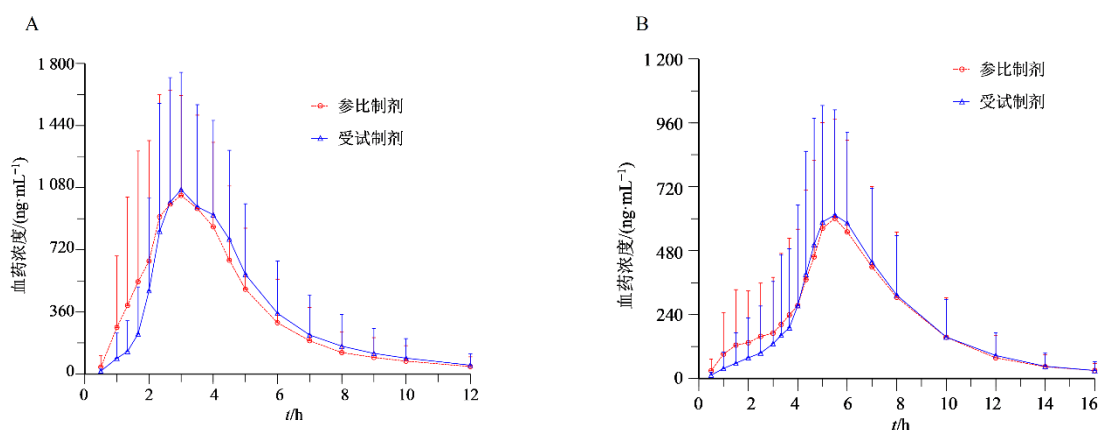


图2 空腹组(A)和餐后组(B)单次口服受试制剂和参比制剂后平均血药浓度-时间曲线

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves of esomeprazole after a single dose of the test and reference preparation in the fasted state (A) and fed state(B)

表5 生物等效性结果

Table 5 Results of bioequivalence

参数	餐后		空腹	
	几何均值比值/%	90%置信区间/%	几何均值比值/%	90%置信区间/%
$C_{\max}$	101.01	93.46~109.18	93.70	87.51~100.34
$AUC_{0\sim t}$	97.65	90.56~105.29	97.23	92.37~102.33
$AUC_{0\sim\infty}$	99.22	92.27~106.68	97.43	92.57~102.55

3 讨论

目前,文献报道的艾司奥美拉唑血浆浓度测定方法主要有高效液相色谱-紫外(HPLC-UV)法^[7-8]和液相色谱联用质谱(LC-MS/MS)法^[9-10]。HPLC-UV法操作简单、应用广泛,但分析物、内标和干扰物质必须完全达到基线分离才能准确定量,分析时间较长;因基质效应的影响,方法开发时内标选择不适当容易导致结果偏差,且检测灵敏度低于LC-MS/

MS法;余勤等^[11]建立的高效液相色谱法测定人血浆中艾司奥美拉唑浓度,其线性范围为4~2 500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,单个样品运行时间为9.5 min。LC-MS/MS法较HPLC-UV法更快速、灵敏、准确,张雪宁等^[12]报道的LC-MS/MS法测定大鼠血浆中艾司奥美拉唑浓度,采用的内标为磺胺甲噁唑,其线性范围为0.2~20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。本研究建立的UPLC-MS/MS法线性范围为3~3 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,样品预处

理方法为直接沉淀蛋白,单个样品运行时间为5 min,线性范围宽、操作简便快速、分析时间短;氘代内标可以消除基质效应,排除仪器响应对测定结果的影响,选择性和准确度更高,适用于临床和非临床生物样品的测定。

本研究在方法开发优化色谱条件时,考察了不同流动相包括不同浓度甲酸水溶液和醋酸铵水溶液作为水相,以及甲醇、乙腈作为有机相,最终确定水相为5 mmol·L⁻¹醋酸铵水溶液、有机相为乙腈溶液进行梯度洗脱。选择色谱柱时,考察了Waters Acquity UPLC®BEH (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)和菲罗门ACE 3 C₁₈-AR (50 mm×2.1 mm, 3 μm)两种C₁₈柱,均能到较好的峰形和色谱分离,考虑到生物样品基质复杂,样品分析量大,选择了粒径更大、耐用性更好的菲罗门的色谱柱,防止因色谱柱堵塞引起的柱压升高、保留时间偏离,确保样品分析的一致性。最终优化确定的色谱条件峰形良好,进样残留低,无内源性物质干扰,分析时间短。

目前文献已报道的样品前处理方法有液液萃取法^[11]和直接沉淀蛋白法^[9,12]。由于LC-MS/MS法灵敏度高,选择性好,优先考虑操作简便快捷的直接沉淀蛋白法。本研究考察了甲醇和乙腈为沉淀剂,结果显示乙腈沉淀效果优于甲醇。沉淀后上清液中加入乙腈-水(25:75)进行稀释,可以降低生物基质中内源性物质对质谱响应的干扰,同时进样溶剂接近流动相初始比例改善了色谱峰形。本研究采用艾司奥美拉唑-d₃为内标,与待测物理性质一致,在前处理过程中提取率一致、进样过程中峰面积比稳定,使得该方法精密度好,准确度高,重现性好。

通过建立的UPLC-MS/MS法测定了3 496个人体生物等效性试验血浆样品,21个样品分析批血浆标准曲线和质控样品均100%通过,试验样品再分析(ISR)总共分析284个血浆样品,ISR结果通过率为100%。证明该方法准确度高、重现性好,操作简单快捷,分析时间短,检测灵敏度高,适用于低浓度血浆样品的分析,可应用于人体生物药动学和生物等效性样品测定。

根据艾司奥美拉唑干混悬剂在国外进行的生物等效性试验资料及相关文献报道^[13],其半衰期($t_{1/2}$)约为1.5 h。根据《化学药物制剂人体生物利用度和生物等效性研究技术指导原则》要求,清洗期一般不应短于7个消除半衰期,本试验清洗期设定为7 d,符合相关要求。根据文献资料,受试者空

腹服用本品后的个体内变异度约为20%(餐后60%),空腹试验采用两周期(餐后四周期)设计,以药动学参数(AUC、C_{max})为主要分析指标,假定单侧 $\alpha=0.05$, $\beta=0.1$,Intra-CV=20%(餐后30%),受试制剂和参比制剂均值比值0.95,生物等效区间80.00%~125.00%,采用PASS(version11)软件计算,空腹样本例数为20例(餐后26例)。考虑到志愿者的脱落,空腹和餐后试验均入组30例受试者。最终试验阶段,空腹组有1例受试者退出、29例完成试验,餐后组有2例受试者退出、28例完成试验,数据满足预期设计。

空腹试验30例受试者共有4例受试者发生9例次不良事件,除1例次不良事件严重程度为2级,其余均为1级;餐后试验29例受试者共有8例受试者发生18例次不良事件,不良事件严重程度均为1级。空腹及餐后试验没有发生任何严重不良事件、严重不良反应。发生的不良反应主要有呕吐、腹痛、中性粒细胞计数升高和血胆红素升高,上述不良反应均在参比制剂说明书中有记录。研究结果显示受试制剂和参比制剂均有良好的安全性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 吴建华,陈晓敏.阿莫西林联合奥美拉唑治疗消化性溃疡合并上消化道出血的随机对照研究[J].药物评价研究,2019,42(5):960-962.
Wu J H, Chen X M. Clinical therapeutic effect of omeprazole combined with amoxicillin in treatment of peptic ulcer combined with upper gastrointestinal bleeding [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(5): 960-962.
- [2] 方宝霞,方东菲,陈富超,等.持续静滴奥美拉唑治疗上消化道出血疗效的Meta分析[J].药物评价研究,2018,41(11):2102-2107.
Fang B X, Fang D F, Chen F C, et al. Clinical effectiveness of continuous infusion of omeprazole in treatment of upper gastrointestinal bleeding: A Meta-analysis [J]. Drug Eval Res, 2018, 41(11): 2102-2107.
- [3] 崔岚,袁静,杨惠娣.艾司奥美拉唑[J].中国新药杂志,2001,10(3):170-172.
Cui L, Yuan J, Yang H D. Esomeprazole [J]. Chin N Drugs J, 2001, 10(3): 170-172.
- [4] 朱林文思,薛锦慧,熊华,等.注射用艾司奥美拉唑钠对大鼠胃酸分泌作用的影响[J].中国新药杂志,2018,27(16):1892-1895.
Zhu L, Xue J H, Xiong H, et al. Effect of intravenous esomeprazole on gastric acid secretion in rats [J]. Chin J

- N Drugs, 2018, 27(16): 1892-1895.
- [5] Andersson T, Hassan-Alin M, Hasselgren G, et al. Drug interaction studies with esomeprazole, the (S)-isomer of omeprazole [J]. Clin Pharmacokinet, 2001, 40(7): 523-537.
- [6] 陈刚. 2种埃索美拉唑制剂的人体生物等效性研究 [J]. 中国药房, 2009, 20(2): 116-118.
- Chen G. Bioequivalence of esomeprazole capsules vs. esomeprazole tablets in healthy volunteers [J]. China Pharm, 2009, 20(2): 116-118.
- [7] 侯贻平. 埃索美拉唑肠溶胶囊人体生物等效性分析 [J]. 中外女性健康研究, 2016, 5(10): 53.
- Hou Y P. Analysis of bioequivalence of Esomeprazole Enteric Coated Capsules in human body [J]. Women's Health Res, 2016, 5(10): 53.
- [8] 孙华, 裘福荣, 陈波, 等. 单剂量口服奥美拉唑胶囊的人体药代动力学和相对生物利用度 [J]. 中国临床药理学杂志, 2002, 18(2): 112-115.
- Sun H, Qiu F R, Chen B, et al. Pharmacokinetics and relative bioavailability of omeprazole capsule in healthy volunteers after a single oral administration [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2002, 18(2): 112-115.
- [9] 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): 1875-1877.
- Dai G X, Zhang Z N, Wang X Q, et al. Determination of concentration of esomeprazole in human plasma by HPLC-MS [J]. Chin J Health Lab Technol, 2011, 21(8): 1875-1877.
- [10] 杨小英, 马启珍. LC-MS-MS法测定犬体内血浆中埃索美拉唑药物浓度 [J]. 药学实践杂志, 2013, 31(1): 61-63.
- Yang X Y, Ma Q Z. Determination of esomeprazole in dog plasma by LC-MS-MS [J]. J Pharm Pract, 2013, 31(1): 61-63.
- [11] 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): 93-95.
- Yu Q, Liang M Z, Zhao Y, et al. Determination of esomeprazole in human plasma by RP-HPLC [J]. West China Med J, 2006, 21(1): 93-95.
- [12] 张雪宁, 张利敏, 郭盈杉, 等. 超高效液相色谱串联质谱法测定大鼠血浆中埃索美拉唑质量浓度及药动学研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(24): 2161-2165.
- Zhang X N, Zhang L M, Guo Y S, et al. Determination of esomeprazole in rat plasma by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and study on its pharmacokinetics [J]. Chin J Hosp Pharm, 2016, 36(24): 2161-2165.
- [13] Dent J. Review article: Pharmacology of esomeprazole and comparisons with omeprazole [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2003, 17(Suppl 1): 5-9.

[责任编辑 刘东博]