

LC-MS/MS法测定人血浆中西酞普兰及其在制剂生物等效性中的应用

曹雪琴^{1,2}, 陈笑艳¹, 张逸凡¹, 钟大放^{1*}

(1. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203; 2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016)

关键词: 西酞普兰; 液相色谱-串联质谱法; 药代动力学

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2007)04-0450-05

Determination of citalopram in human plasma with LC-MS/MS method and its bioequivalent evaluation

CAO Xue-qin^{1,2}, CHEN Xiao-yan¹, ZHANG Yi-fan¹, ZHONG Da-fang^{1*}

(1. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China;

2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: A sensitive and selective LC-MS/MS method for determination of citalopram in human plasma was established to study the bioequivalence of different formulations containing citalopram. The samples were simply pretreated by protein precipitation using acetonitrile, and then analyzed on a Zorbax Extend C₈ column. The mobile phase consisted of acetonitrile-water-formic acid (60:40:0.2), at a flow-rate of 0.5 mL·min⁻¹. A Thermo Finnigan TSQ Quantum Ultra tandem mass spectrometer equipped with electrospray ionization source was used as detector and was operated in the positive ion mode. Selected reaction monitoring using the precursor to product ion combinations of m/z 325 → m/z 109 and m/z 265 → m/z 167 was performed to quantify citalopram and the internal standard, respectively. The pharmacokinetic parameters of citalopram in different formulations were calculated by non-compartment model. The linear calibration curves were obtained in the concentration range of 0.10 - 100 μg·L⁻¹. The lower limit of quantification was 0.10 μg·L⁻¹. The intra- and inter-day relative standard deviation (RSD) over the entire concentration range was less than 5.2%. Accuracy determined at three concentrations (0.25, 8.00 and 90.0 μg·L⁻¹ for citalopram) ranged from -4.7% to 1.3%. Each plasma sample was chromatographed within 3.0 min. The method was successfully used in bioequivalence study of citalopram in human plasma after oral administration of 20 mg citalopram. Calculated with AUC_{0-120h}, the bioavailability of two formulations was (102.1 ± 10.9)%. The method is rapid, selective, robust and is proved to be suitable for bioequivalence evaluation of different formulations containing citalopram.

Key words: citalopram; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; pharmacokinetics

西酞普兰 (citalopram, CIT) 是一种具有选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂 (selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI), 与其他 SSRI 相比, 具有耐受性好、

副作用少的特点, 临床用于治疗抑郁性精神障碍^[1]。

测定血浆中西酞普兰的方法已有很多报道, 大多数采用液相色谱-荧光法^[2-6], 也有 HPLC-UV^[7]法, 这些分析方法血浆用量较大 (0.50 ~ 1.0 mL), 定量下限 > 1.0 μg·L⁻¹。最近有文献报道采用液

收稿日期: 2006-08-29.

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 21 - 50800738,

E-mail: zhongdf@china.com

相色谱-单四极杆质谱法^[8-10]和液相色谱-串联质谱法^[11]测定西酞普兰血浆浓度,后者具有较高的灵敏度($0.50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),但血浆样品预处理较繁琐。本研究拟建立一种样品预处理简单、快速、灵敏的 LC-MS/MS法,测定健康受试者服用西酞普兰后血浆中的浓度,并用于西酞普兰制剂的生物等效性评价。

材料与方法

药品与试剂 氢溴酸西酞普兰对照品(纯度 99.5%)由东北制药总厂研究院提供;内标盐酸苯海拉明(纯度 99.7%)购自中国药品生物制品检定所;受试制剂:氢溴酸西酞普兰片(东北制药总厂生产,每片含西酞普兰 20 mg,批号 20050401);参比制剂:氢溴酸西酞普兰片(丹麦灵北药厂生产,每片含西酞普兰 20 mg,批号 2033172);乙腈和甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯;空白血浆由临床药理基地提供。

仪器 美国 Thermo Finnigan 公司 TSQ Quantum Ultra 型液相色谱-质谱-质谱联用仪,配有电喷雾电离源(ESI)以及 Xcalibur 1.4 数据处理系统;美国 Agilent 公司 Agilent 1100 液相色谱系统。

色谱条件 Zorbax XDB C₈ 柱(150 mm × 4.6 mm ID, 5 μm),美国 Agilent 公司;流动相为乙腈-水-甲酸(60:40:0.2);流速为 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;进样量为 20 μL;柱温为 25 °C。

质谱条件 电喷雾电离源(ESI源),源电压 3.8 kV;加热毛细管温度 320 °C;鞘气(N₂)压力 241.5 kPa;辅助气(N₂)压力为 34.5 kPa;碰撞气(Ar)压力 0.16 Pa。碰撞诱导解离(CID)电压均为 25 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 325 → m/z 109(西酞普兰)和 m/z 256 → m/z 167(苯海拉明);扫描时间为 0.3 s。

血浆样品处理 取血浆 0.10 mL 置于 10 mL 带塞试管中,依次加入甲醇-水(50:50) 50 μL,内标溶液($100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯海拉明) 50 μL 和乙腈 300 μL,涡流混合 1 min,离心 5 min($2\,000 \times g$),分取上层有机相 100 μL 于另一试管中,40 °C 空气流下吹干,残留物加入 150 μL 流动相,涡流溶解,取 20 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

未知血浆样品测定按“血浆样品处理”项下操作,每天建立一条标准曲线,同时分析低、中、高(双样本)的质量控制(QC)样品,根据当日标准曲线推算未知样品浓度和 QC 样品浓度。

结果

1 质谱分析

西酞普兰与苯海拉明在 (+) ESI 电离方式下, Q1 全扫描质谱图获得准分子离子峰,分别为 m/z 325 和 m/z 256,未见其他溶剂或金属加合离子。选择性对 $[M+H]^+$ 进行产物离子全扫描质谱分析(图 1),西酞普兰与内标苯海拉明生成的主要碎片离子分别为 m/z 109 和 m/z 167,将二者作为定量分析时监测的产物离子。

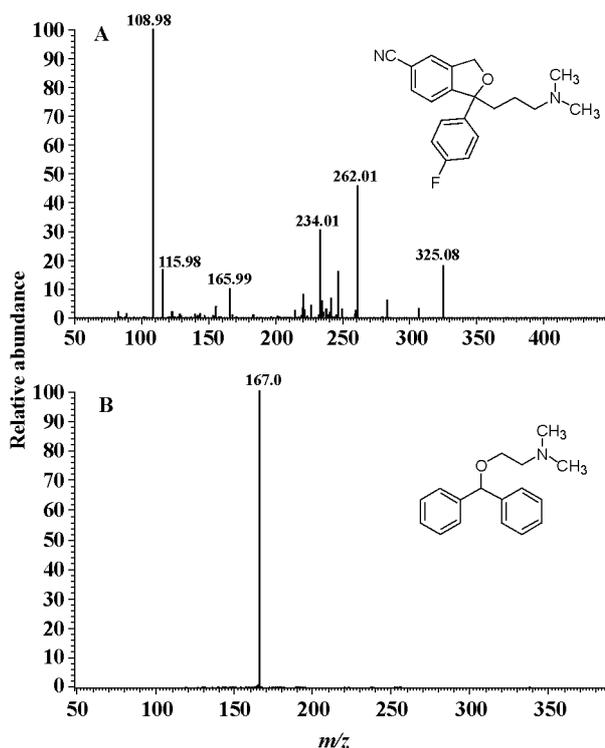


Figure 1 Full scan product ion spectra of $[M+H]^+$ of citalopram (A) and diphenhydramine (B)

2 方法的选择性

分别取 6 名受试者空白血浆 0.10 mL,按“血浆样品处理”项下操作(不加内标溶液),进样 20 μL,得色谱图,如图 2A;将一定浓度的西酞普兰对照溶液和内标溶液加入空白血浆中,依同法操作,得色谱图,如图 2B,西酞普兰和内标的保留时间分别为 2.62 min 和 2.68 min;取受试者口服给药后的血浆样品,依同法操作,得色谱图,如图 2C。结果表明,空白血浆中的内源性物质不干扰西酞普兰和内标的测定。

3 基质效应考察

分别取西酞普兰低、高两个浓度的对照溶液及

内标溶液,直接进样 20 μL ,进行 LC-MS/MS分析;另取 6名受试者空白血浆,按“血浆样品处理”项下依法操作,取全部上层有机相吹干,残留物分别加入相同浓度的对照溶液和内标溶液各 50 μL ,涡流溶解,取 20 μL 进行 LC-MS/MS分析。比较两次获得的西酞普兰和内标峰面积, RSD均小于 10%,表明选定的质谱条件和色谱条件有效地避免了基质效应。

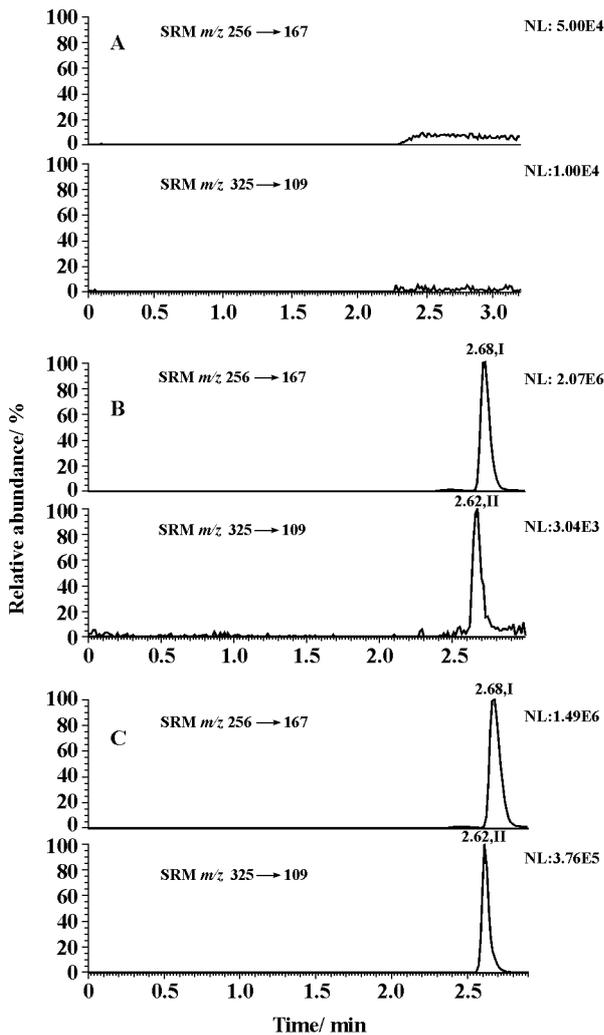


Figure 2 Representative SRM chromatograms of citalopram and diphenhydramine (IS) in human plasma. A: Blank plasma sample; B: Plasma sample spiked with citalopram ($0.10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) and IS ($50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); C: A volunteer plasma sample 6.0 h after oral dose of 20 mg citalopram

4 标准曲线和定量下限

取空白血浆 0.10 mL,加西酞普兰对照系列溶

液 50 μL ,配制相当于西酞普兰血浆浓度为 0.10, 0.25, 0.80, 2.0, 8.0, 20.0, 50.0 和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 样品,除不加甲醇-水 (50:50) 50 μL 外,其余按“血浆样品处理”项下依法操作,建立标准曲线。以待测物浓度为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标,用加权 ($w = 1/x^2$) 最小二乘法进行回归运算,求得的直线回归方程即为标准曲线。典型的回归方程为 $y = 5.130 \times 10^{-3} x + 1.098 \times 10^{-3}$, $r = 0.9987$ 。根据标准曲线,西酞普兰的线性范围为 $0.10 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

取空白血浆 0.10 mL,配制相当于西酞普兰血浆浓度为 $0.10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品,该样品进行 6 样本分析,并根据当日标准曲线计算每一样本测定浓度,求得该浓度下西酞普兰的日内精密度 (RSD) 为 6.6%;准确度 (RE) 为 0.5%。该结果表明 LC-MS/MS 法测定血浆中西酞普兰的定量下限可达 $0.10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ [12]。

5 精密度与准确度

取空白血浆 0.10 mL,按“标准曲线和定量下限”项下的方法制备低、中、高 3 个浓度 (西酞普兰血浆浓度分别为 0.25, 8.00 和 $90.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 QC 样品,每一浓度进行 6 样本分析,测定 3 d,根据当日的标准曲线,计算 QC 样品的测得浓度,将 QC 样品的结果进行方差分析,计算本法的准确度与精密度。在 3 个浓度下,西酞普兰的日内 RSD 小于 4.5%;日间 RSD 小于 5.2%;RE 在 $\pm 4.7\%$ 之内。

6 回收率和稳定性考察

考察了西酞普兰 3 种浓度 (分别为 0.25, 8.00 和 $90.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 血浆样品处理回收率 ($n = 6$),分别为 $(91.3 \pm 2.2)\%$, $(96.4 \pm 3.5)\%$ 和 $(92.2 \pm 2.5)\%$ 。内标回收率为 $(96.9 \pm 4.0)\%$ 。

已有文献 [8] 报道,西酞普兰血浆样品于 -20°C 冷冻放置 75 d 稳定,室温放置 6 h 稳定。本研究考察了西酞普兰经沉淀蛋白处理后室温放置 24 h 稳定性,血浆样品经历 3 次冷冻-解冻循环 (-20°C) 的稳定性。取空白血浆 0.10 mL,配制西酞普兰低、高 2 个浓度的血浆样品 (西酞普兰血浆浓度分别为 0.25 和 $90.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),每一浓度进行 3 样本分析,采用 LC-MS/MS 法测定。结果表明西酞普兰血浆样品处理后室温放置 24 h 内稳定 (RE 在 $\pm 5.0\%$ 之内),经过 3 次冷冻 (-20°C) 解冻 (20°C) 循环后稳定 (RE 在 $\pm 4.9\%$ 之内)。

7 制剂生物等效性评价

临床试验在辽宁省人民医院进行。试验采用双

周期交叉试验。试验方案经伦理委员会批准,选择20名健康男性受试者,于试验前签署知情同意后,随机分为甲、乙组,每组10人。受试者于试验前一天晚餐后禁食,试验日清晨空腹口服受试制剂或服参比制剂1片(相当于西酞普兰20 mg)。于服药前和服药后1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96和120 h由前臂静脉取血4 mL,分离血浆, -20℃保存待测。应用本文的分析方法,测定血浆样品中的西酞普兰浓度,获得血药浓度-时间曲线,见图3。

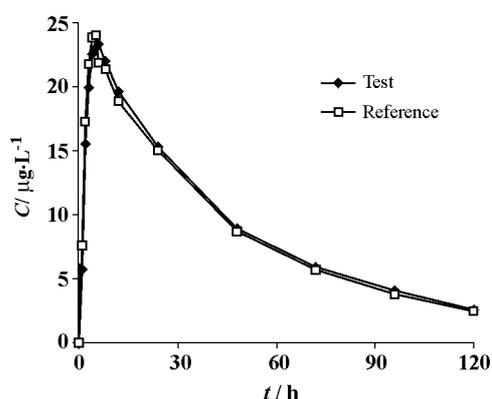


Figure 3 Mean plasma concentration (C) - time (t) curve of citalopram after a single oral dose of 20 mg of either the test or reference formulations of citalopram ($n = 20$)

受试者双周期单剂量口服西酞普兰制剂后,药代动力学分析采用非室模型,以梯形法计算 AUC_{0-t} ,以半对数作图法,由消除相末端浓度点计算 $T_{1/2}$ 和 k_e ,以末端点浓度和 k_e 的比值计算 $AUC_{0-\infty}$,达峰浓度 (C_{max})和达峰时间 (T_{max})为实测值。对主要药代动力学参数对数转换后进行方差分析,并进一步采用双单侧 t 检验和 $(1 - 2\alpha)$ 置信区间法进行生物等效性评价,其中 T_{max} 采用非参数检验法。西酞普兰 C_{max} 的 90% 置信区间为参比制剂相应参数的 91.8% ~ 100.9%, AUC_{0-120h} 的 90% 置信区间为参比制剂相应参数的 97.4% ~ 106.0%。 T_{max} 的非参数法检验结果显示两制剂无显著性差异。根据以上结果,判定两制剂生物等效。

讨论

本研究初期对比了西酞普兰分别在 APC1 和 ESI 电离方式下的响应,发现其在 ESI 电离方式下的响应优于 APC1。尝试分别以甲醇-水系统和乙腈-水系统作为流动相,结果表明以乙腈-水为流动相时

背景噪音较低,所获西酞普兰的质谱响应高。

文献^[2-10]中西酞普兰血浆样品的预处理多采用固相萃取或液-液萃取法,步骤均较繁琐,不适于大批量样品分析。为缩短样品预处理时间,本研究尝试采用沉淀蛋白法对血浆样品进行预处理,但此处理方法不能有效除去内源性离子型化合物,在离子源内易对待测物产生离子抑制。为避免此现象,本研究着重对色谱条件进行优化,考察了西酞普兰在不同色谱柱 (Diamonsil C_{18} , Zorbax C_{18} , Zorbax C_8) 的保留情况,发现西酞普兰和内标在 Zorbax C_8 色谱柱上有较好的保留,且峰形较好。将流动相中乙腈比例适当降低 (由 80% 降至 60%),西酞普兰在 C_8 色谱柱上的容量因子 > 1.2 即可避免离子抑制,而在 C_{18} 色谱柱上的容量因子 > 2 才能有效避免离子抑制,因此本研究选用 Zorbax C_8 色谱柱。在流动相系统中加入少量甲酸,能够提高待测物的离子化效率。血浆样品经乙腈沉淀蛋白处理后,上清液中有有机相的比例与流动相系统相差较大,直接进样引起色谱峰变宽,为了避免峰扩展,取 100 μ L 上层有机相吹干后用流动相溶解进样,可明显改善峰形。

结论

本研究建立的 LC-MS/MS 法测定人血浆中的西酞普兰线性范围宽,同文献方法相比,血浆用量较少,获得较高灵敏度;采用沉淀蛋白法进行样品处理,简单易行;分析速度较快,适用于西酞普兰的药物制剂等效性研究和临床药代动力学研究。

致谢: 本实验的临床部分由辽宁省人民医院李荣琴教授指导完成。

References

- [1] Milne RJ, Goa KL. Citalopram. A review of its pharmacodynamics and pharmacokinetics [J]. *Drugs*, 1991, 41: 450 - 477.
- [2] Macek J, Ptacek P, Klima J. Rapid determination of citalopram in human plasma by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 2001, 755: 279 - 285.
- [3] Mendoza L, Hajduch M, Kekulova H, et al. Bioequivalence of two brands of citalopram 40 mg tablets after single oral administration to healthy volunteers [J]. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2005, 149: 169 - 172.
- [4] Meng QH, Gauthier D. Simultaneous analysis of citalopram and desmethylcitalopram by liquid chromatography with fluorescence detection after solid-phase

- extraction [J]. Clin Biochem, 2005, 38: 282 - 285.
- [5] Liu X, Zhang XL, Li KP, et al. RP-HPLC determination of citalopram in human plasma by fluorescence detector [J]. Clin J Pharm Anal, 2005, 25: 1186 - 1189.
- [6] Zhang YT, Zhang SH, Wang YM, et al. Determination of citalopram in human plasma by HPLC with fluorescence detection [J]. Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 2004, 35: 734 - 736.
- [7] Frahnert C, Rao ML, Gramseder K. Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for the therapeutic drug monitoring [J]. J Chromatogr B, 2003, 794: 35 - 37.
- [8] Pistos C, Panderi I, Atta-Politou J. Liquid chromatography-positive electrospray mass spectrometry method for the quantification of citalopram in human plasma [J]. J Chromatogr B, 2004, 810: 235 - 244.
- [9] Singh SS, Shah H, Gupta S, et al. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry method for the determination of escitaloprom in human plasma and its application in bioequivalence study [J]. J Chromatogr B, 2004, 811: 209 - 215.
- [10] He J, Zhou ZL, Li HD. Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization spectrometry (HPLC-MS/ESI) [J]. J Chromatogr B, 2005, 820: 33 - 39.
- [11] Mendes GD, Borges NC, Pereira Ados S, et al. A bioequivalence of citalopram based on quantification by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry [J]. Int J Clin Pharmacol Ther, 2005, 43: 389 - 398.
- [12] Shah VP, Midha KK, Findlay JW, et al. Bioanalytical method validation - a revisit with a decade of progress [J]. Pharm Res, 2000, 17: 1551 - 1557.