

# 沉淀蛋白法结合 HPLC-MS/MS 测定右佐匹克隆 在人体血浆中的含量及药物动力学应用

刘瑞琛, 刘冬科

(山东大学药学院, 山东 济南 250100)

**摘要:** 失眠症是一种持续性的身体疾病, 睡眠质量或数量都不令人满意。右佐匹克隆(E-ZOP) 是一种人工合成的治疗失眠的药物, 能有效地维持睡眠质量。本研究建立了一种高效、快速的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)测定人血浆中 E-ZOP 的方法, 并应用于药代动力学研究。该方法避开了常用的液-液萃取法或固相萃取法, 而是用甲醇和二甲基亚砷一步沉淀法进行样品制备。高效液相色谱-质谱/质谱联用技术已完全用于人血浆中 E-ZOP 的测定, 并成功应用于人体药代动力学研究。口服 E-ZOP 后, 峰值时间( $T_{max}$ )为 0.924 h, 半衰期( $T_{1/2}$ )为 4.902 h, 在人体内表现为快速吸收、缓慢消除, 动力学呈线性变化。本研究首次提供了一种高效的 E-ZOP 蛋白沉淀提取方法, 在人体药代动力学研究中显示出明显的优越性。

**关键词:** 高效液相色谱-质谱联用;艾司唑匹克隆;蛋白沉淀;药代动力学

## 1 简介

失眠已被强调为主要的公共卫生问题<sup>[1,2]</sup>。睡眠问题的高发生率和广泛的对精神和身体健康的影响<sup>[3]</sup>和身体健康<sup>[4]</sup>, 以及功能受损<sup>[5]</sup>, 使得人们越来越意识到获得足够高质量睡眠的重要性<sup>[6]</sup>。E-ZOP 用于治疗不同类型的睡眠障碍<sup>[7,8]</sup>, 研究表明, 它是由其 GABA 受体复合物与苯二氮卓受体<sup>[9]</sup>耦合而成, 通过激活 GABA 受体增加神经抑制, 具有明显的镇静作用<sup>[10]</sup>。E-ZOP (化学名为 (S) - (+) -6- (5-氯-2-吡啶基) -7-氧代-6, 7-二氢-5H-吡咯[3,4-b]吡嗪-5-基-4-甲基-1-哌嗪羧酸盐, 是一种非苯二氮卓类催眠剂, 属于环吡咯啉类<sup>[11]</sup>, 微溶于水/乙醇, 溶于磷酸盐缓冲液 (pH 3.2) <sup>[12,13]</sup>。Gary K Zammit<sup>[14]</sup>评估了 E-ZOP 的药代动力学, 结果表明, R, S-佐匹克隆的清除率是立体选择性的, 与活性较低的 R-对映体相比, E-ZOP 的清除率更低,  $T_{1/2}$  更长。在这几十年中, 研究发现, 受试者在夜间服用 3 mg 的 E-ZOP, 第二天早上他们的精神运动功能不同程度地降低, 这可能导致诸如驾驶、记忆和协调等不可察觉的活动的减少<sup>[15]</sup>。为了更好地了解 E-ZOP 的药代动力学, 需要一种灵敏、特异、准确的测定人血浆中 E-ZOP 的方法, 以观察 E-ZOP 的量效关系。

关于使用高效液相色谱-紫外光谱法 (HPLC-UV)、气相色谱法 (GC)、LC-MS/MS 和高效薄层色谱法 (HPTLC) 对生物液中 E-ZOP 进行定量的论文已经发表<sup>[12,16]</sup>。N Sharma 等人<sup>[17]</sup>报道 2013 年采用 LC-UV 方法在 13 分钟内定量 E-ZOP, 曲线范围为 0.02-7.2  $\mu\text{g/mL}$ , 但分析时间太长, 无法实现高通量<sup>[18,17,19-22]</sup>。Van Bocklaer 等人<sup>[23]</sup>报道了首次采用气相色谱-串联质谱 (GC-MS) 测定血液和胃内容物中 E-ZOP 的方法, 方法检测 E-ZOP 的最低定量限 (LLOQ) 为 2  $\text{ng/mL}$ <sup>[24]</sup>, 与 LC-MS/MS 相比, 该方法的灵敏度较低。Gebauer MG 等人<sup>[22]</sup>报道开发了液-液萃取 (LLE) 相结合的液-液萃取 (LLE) LC-MS/MS 方法<sup>[22,25,26-29]</sup>, 该方法仅使用 50  $\mu\text{L}$  样品体积, E-ZOP 的 LLOQ 为 0.1  $\text{ng/mL}$ 。Meng 等人报道了<sup>[15]</sup>LC-MS/MS 法与固相萃取法 (SPE) 联用测定人血浆中 E-ZOP 的方法, 曲线范围为 1.00-100  $\text{ng/mL}$ , 使用 50  $\mu\text{L}$  样品体积是该方法的亮点。在这些技术中, LC-MS/MS 的灵敏度最高, 这是由于其具有较高的选择性。然而, 包括 LLE 和 SPE 在内的样品预处理过程相对复杂, 例如, 用温和的氮气流分离离心后的有机层并在 40  $^{\circ}\text{C}$  下蒸发干燥<sup>[30-36]</sup>。这种预处理不仅增加了操作的复杂性, 降低了处理量, 而且还导致了不良的有机污染, 这是临床实验室难以接受的。因此, 在药代动力学研究中, E-ZOP 含量测定中存在的样品制备问题亟待解决, 本文提出了一种新的蛋白质沉淀法-高效液相色谱-质谱/质谱联用技术, 从特异性、线性、灵敏度、准确度、精密度、基质效应等方面对 E-ZOP 在人血浆中的测定进行了充分验证, 回收率和稳定性, 最终应用于口服给药的人体药动学研究, 并用 DAS 3.0 软件通过无室模型计算药动学参数。结果表明, E-ZOP 在人体内吸收快, 消除慢, 动力学呈线性。定量下限 (LLOQ) 为 0.1  $\text{ng/mL}$ ,  $R^2 > 0.99$  为线性曲线。在 0.1~30  $\text{ng/mL}$  范围内测定, 日内和日间精密度分别小于 9.99 和 8.71 %, 平均准确度为 95.53 %~109.18 %。该方法回收率高, 基质效应可忽略。E-ZOP 的药代动力学参数包括  $C_{\text{max}} = 13.273 \pm 2.717 \text{ ng/mL}$ ,  $T_{\text{max}} = 0.924 \pm 0.446 \text{ h}$ ,  $\text{AUC}_{0-t} = 69.308 \pm 14.895 \text{ ng/mL}\cdot\text{h}$ ,  $T_{1/2} = 4.902 \pm 0.819 \text{ h}$ 。本研究用氘化 E-ZOP 代替卡马西平作为稳定同位素标记内标 (SIL-IS) 来定量 E-ZOP。本文介绍了一种优化的高效液相色谱-质谱/质谱法测定人血浆中 E-ZOP 的方法, 并成功应用于 E-ZOP 片的临床药代动力学试验。

## 2 实验

### 2.1 材料与试剂

E-ZOP 购自中国食品药品检定研究院 (纯度 > 99.8 %) (图 1), 批号: 19120474。E-ZOP-d8 (纯度: 98.7 %) 从多伦多研究化学公司采购, 批号: 11-PTR-48-1 (图 1)。甲醇 (LC-MS 级) 从 Fisher Chemical 购买, 流动相的所有水溶液均采用 D11951 超纯水机 (德国赛默飞世

尔) 制备。甲酸 (HPLC 级) 从 MREDA 采购, 批号 095224。醋酸铵 (HPLC 级) 从 MREDA 采购, 批号 015966。二甲基亚砜 (分析级) 购自国药集团化学试剂有限公司, 批号 20180622。所有其他化学品和试剂均为分析级。

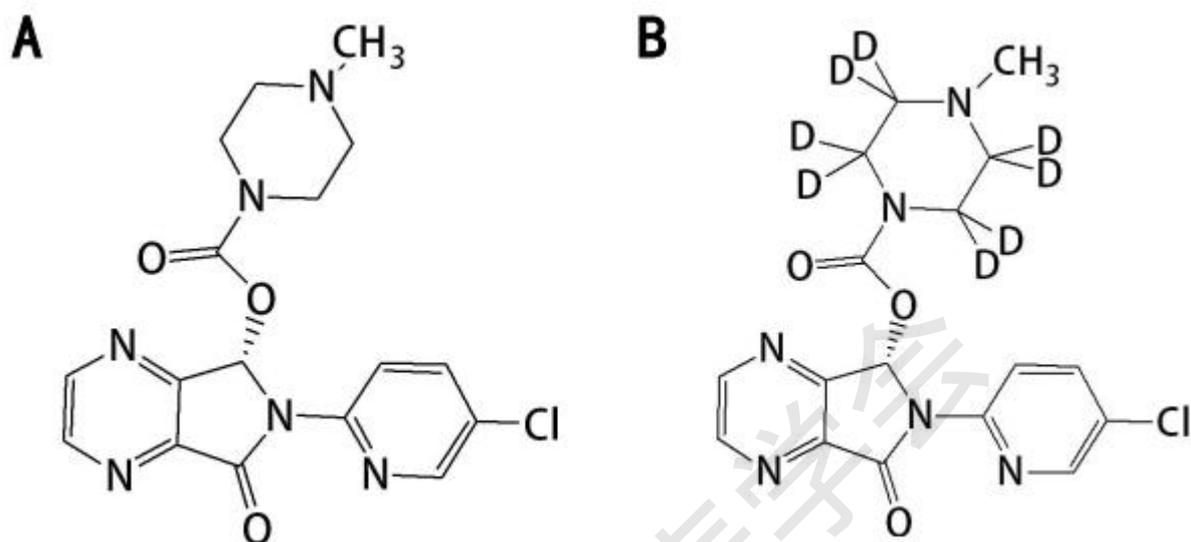


图 1 (A) E-ZOP 和 (B) E-ZOP-d<sub>8</sub> 的结构 (内部标准)

## 2.2 设备和操作条件

### 2.2.1 液相条件

分析采用 HPLC/MS/MS 系统进行, 该系统由资生堂 HPLC 系统 (日本) 和 AB Sciex API 5500 串联质谱仪 (美国应用生物系统公司) 组成。在 C18 柱 (资生堂 CAPCELL PAC MGIII, 2.0×150 mm, 5 $\mu$ m) 上用甲醇 (10 mM 醋酸铵, 0.1%醋酸): 水 (10 mM 醋酸铵, 0.1%醋酸) =55:45 的流动相, 流速为 0.35 mL/min, 实现了 E-ZOP 和 E-ZOP-d<sub>8</sub> 的分离。将样品注入 5  $\mu$ L 等分试样中。

### 2.2.2 质谱条件

采用配有电喷雾电离 (ESI) 源的 API 5500 串联质谱仪 (Applied Biosystems SCIEX, America) 对 HPLC-MS/MS 分析进行多反应监测 (MRM) 检测。每一个前体离子经过碰撞诱导的离解, 以确定产生的产物离子。以高效液相色谱 (HPLC) 为流动相, 通过注射泵, 优化了 E-ZOP 和 E-ZOP-d<sub>8</sub> 溶液的界面无关仪器参数。

## 2.3 储备溶液和工作溶液的制备

储备液用甲醇溶解精确称量的标准对照品, E-ZOP 的最终浓度为 1000  $\mu$ g/mL。将精确体积的 0.10 mL E-ZOP 标准溶液移入 10 mL 容量瓶中, 并用甲醇稀释至一定体积, 以进一步稀释 E-ZOP 储备液取 10  $\mu$ g/mL 的工作液, 用甲醇稀释, 得到 2、4、10、20、100、200、

400 和 600 ng/mL 的工作液。同时，将精确重量的 10.00 mg E-ZOP-d8 原料药转移到 10 mL 容量瓶中，然后溶解并用纯品稀释至一定体积甲醇制备 1000 $\mu$ g/mL 的储备液。E-ZOP-d8 的工作液浓度为 50 ng/mL。所有药物的储备液在 4 °C 的避光容器中储存至少 60 天，无变化。

## 2.4 校准标准和质量控制 (QC) 样品的制备

在 0.1、0.2、0.25、0.5、1.0、2.5、5.0、10、20、25、30 ng/mL 血浆中制备 E-ZOP 校准标准。根据 FDA 关于选择 QCs 的指南[36]，为了进行准确度和精密度研究，QCs 在 4 个浓度水平下制备为 6 个重复品，包括定量下限 (LLOQ)、低 (L: 定义为 LLOQ 的三倍)、中 (M: 定义为中范围) 和高 (H: 定义为高范围)。而对于其他试验 (在志愿者样品分析期间)，只使用了 3 种浓度水平 (LQC、MQC 和 HQC) 的复制品。对于 E-ZOP，分别在 0.1、0.25、2.5 和 25 ng/mL 下制备 LLOQ、LQC、MQC 和 HQC。

## 2.5 样品准备

将 190  $\mu$ L 对照人血浆置于 2.0 mL 离心管中，加入精确体积的 10  $\mu$ L 2-600 ng/mL 工作溶液，以获得 E-ZOP 的 0.1-30 ng/mL 血浆浓度。添加以下 25  $\mu$ L 的 IS (50 ng/mL)。然后加入 300  $\mu$ L 沉淀蛋白溶剂 (MeOH:DMSO=7:3, 0.1%甲酸) 振荡 10 min 提取 E-ZOP 和 E-ZOP-d8，在 4 °C 下以 14000 rpm 离心 15 min 分离上部有机相和下部水相。将 100  $\mu$ L 上清液溶解于 200  $\mu$ L 水相中，并涡旋混合 2 分钟。将 5  $\mu$ L 等分溶液注入 LC-MS/MS 系统进行分析。

## 2.6 方法验证

### 2.6.1 专属性

通过比较六个人的空白血浆样品、在最后给药后 0.5 小时从其中一名受试者获得的临床血浆样品、以 30 ng/mL 的剂量加入 E-ZOP 的血浆样品和以 0.1 ng/mL 的剂量加入 E-ZOP 的血浆样品的色谱图来评估特异性和内源性干扰。通过比较 50 % 甲醇和添加 E-ZOP 的三蒸馏水 (0.1 ng/mL) 的 LLOQ 和 Esopiclone-d8 (50 ng/mL) 的色谱图来评估特异性和外源性干扰。制备并分析所有空白血浆样品，以确保没有干扰峰。

### 2.6.2 最低定量限 (LLOQ)

采用 1/X<sup>2</sup> 加权线性最小二乘回归模型，以 E-ZOP/E-ZOP-d8 与血浆浓度的峰面积比构建校准曲线。LLOQ 表示线性范围内分析物的最低浓度，可以用可接受的精度和准确度进行测定。

### 2.6.3 精密度和准确度

在同一天对四种浓度 (0.1、0.25、2.5 和 25 ng/mL) 的六个重复的 LLOQ 和 QC 样品进行分析，以评估日内精密度和准确度。通过连续三天分析 LLOQ 和 QC 样本来评估日间精

密度和准确度。方法的精密度和准确度分别用相对标准偏差 (RSD) 和相对误差 (RE) 表示。RSD 和 RE 均不得超过 15%。然而, 在 LLOQ, RE 和 RSD $\leq$ ±20%是可以接受的。

#### 2.6.4 基质效应与提取回收率

提取回收率是通过比较在 6 个不同批次血浆中制备的三个水平的 QC 样品中提取的分析物与 IS 比的绝对峰面积与空白血浆、高溶血性血浆和高脂肪血浆提取后用相同浓度的分析物纯溶液进行强化 LQC、MQC、HQC。通过比较六批样品在 LQC、MQC、HQC 水平下强化的空白血浆提取物与相同浓度水平分析物强化的空白水提取物中分析物绝对峰面积与 IS 比值的比较, 来评估基质效应。

#### 2.6.5 稳定性试验

对三种不同浓度的 QC 样品在不同条件下的稳定性进行了分析: (1) 连续三次冻融循环 (从-20 °C到 23 °C); (2) 室温 (23 °C) 制备前 3h; (3) 冰箱温度 (4 °C) 制备后 20 小时, 室温 (23 °C) 制备后 6 小时; (4) 自动进样器 10 °C制备后 24 小时; (5) 冰箱温度 (-20 °C) 制备前 3、8、31 天。通过比较储存的 QC 样品和新制备的样品的平均浓度来评估溶液的稳定性。样品被认为是稳定的, 与标称浓度的偏差在±15.0%以内。所有稳定性试验样品在 6 个重复中进行分析, 并根据新制备的样品确定偏差。

### 2.7 药代动力学研究的应用

对 12 名健康男性受试者进行了药代动力学研究。伦理委员会批准了方案, 志愿者得到了知情的书面同意。给药前禁食 12 小时, 给药后禁食 3 小时。口服给药后, 在给药前和 0 时从颈静脉抽取 2 mL 的血样。后分别于 0.083, 0.167, 0.333, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.75, 2, 2.5、3、4、5、6、8、12 和 24 小时取血。实验期间, 可以自由饮水。随后在 14000×g 转速下离心 10 分钟制备血浆, 并在-80 °C下立即冷冻。

### 2.8 数据分析

药代动力学分析采用 DAS2 非房室模型软件程序 (中国数学药理学专业委员会, 中国上海) 计算 AUC、C<sub>max</sub>、T<sub>max</sub>、T<sub>1/2</sub> 和 CL<sub>z</sub>/F。数据以平均值±SD 表示。

## 3 结果与讨论

### 3.1 方法优化

#### 3.1.1 色谱条件优化

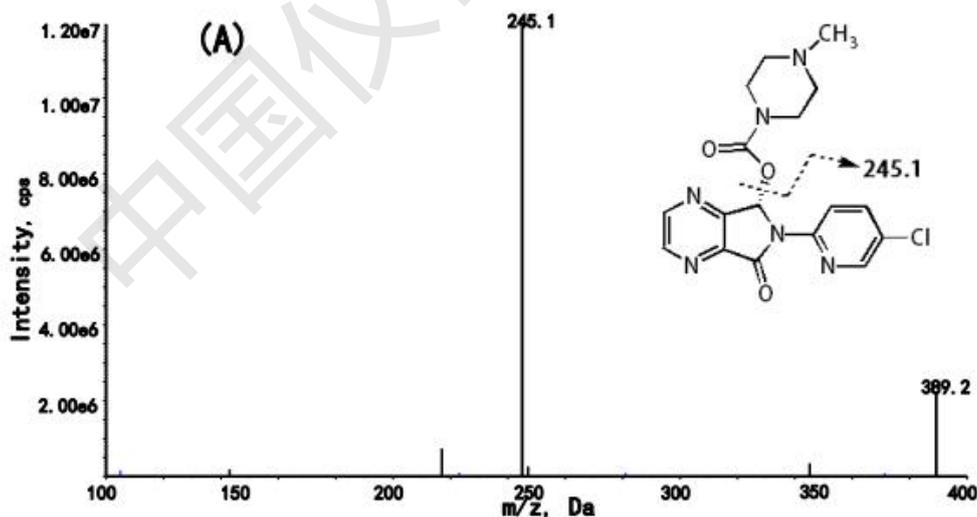
为了获得满意的色谱行为和最大限度地提高 E-ZOP 和 IS 的电离响应, 我们在流动相体系上进行了几次尝试。由于 E-ZOP 具有酸性, 故采用醋酸溶液作为流动相, 以提高响应速

度。考虑到流动相 pH 范围的稳定性和消除色谱峰的分裂,在流动相中加入了 10mM 乙酸铵。以不同比例的甲醇-水和乙腈-水对 E-ZOP 进行洗脱实验,发现甲醇比乙腈具有更低的背景噪声和更好的分辨率。根据峰形、保留时间、稳定性和灵敏度,甲醇(10 mM 醋酸铵, 0.1% 乙酸)-水(10 mM 醋酸铵, 以 0.1 % 乙酸(55:45, v/v)为流动相。资生堂 CAPCELL PAC-MGIIIIC18 柱对 E-ZOP 有较好的保留作用, 10 mM 乙酸铵对 E-ZOP 的反应显著增强。在优化的高效液相色谱条件下,检测到 E-ZOP 和 E-ZOP-d8 (IS) 在保留时间为 1.97 和 1.90 分钟。总运行时间是 4.5 分钟。

结合 E-ZOP 在水和乙醇中微溶、在磷酸盐缓冲液 (pH 3.2) 中微溶的特点, Shaikh K<sup>[16]</sup> 利用 0.05 M 一元磷酸钠缓冲液组成的流动相, 建立了一种灵敏的 E-ZOP 定量方法。N Sharma<sup>[15]</sup>提出了一种使用 0.01 M 磷酸盐缓冲液和正磷酸的 UPLC 方法。在 PKa=6.89 的条件下, 我们设计了一种 pH=4.0 的流动相, 添加了 10 mM 乙酸铵和 0.1% 乙酸。

### 3.1.2 质谱条件优化

利用 ESI-MS 分析和 MS 参数优化正离子模式, 提高了 MRM 测量对 ESI 源的响应。对于 E-ZOP (图 2), MRM 的碎片化转变为 m/z 389.2 到 245.1 (图 2), 对于 E-ZOP-d8 (图 2) 为 m/z 397.2 到 245.1, 每个转变的停留时间为 300 ms。每个化合物的碰撞能为 22ev。分离电位保持在 40 V。适用于所有分析物的源参数为 15 psi 的幕气、介质的碰撞气体 (CAD)、温度为 650°C、离子喷射电压为 5000 V、离子源气体为 60 psi。



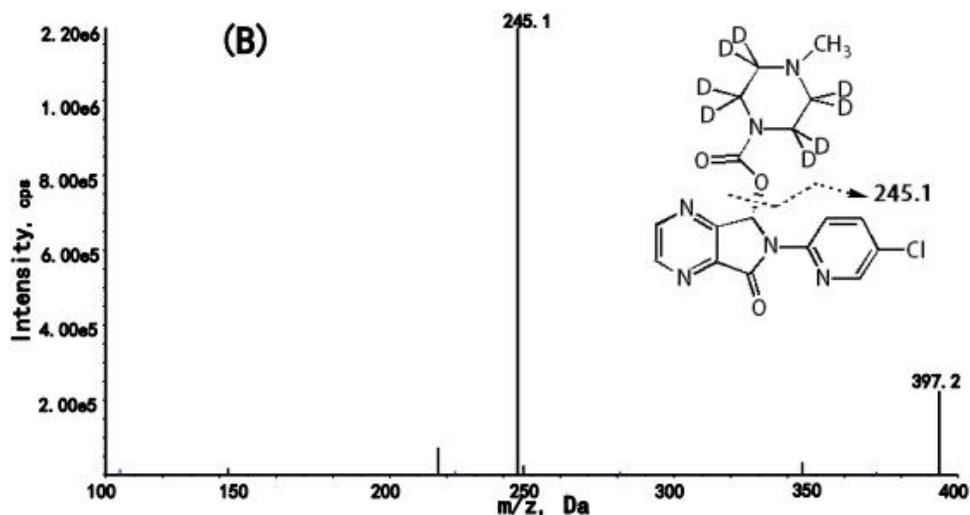


图2 A (E-ZOP) 和 B (E-ZOP-d8) 的[M+H]<sup>+</sup>全扫描产物离子质谱

### 3.1.3 样品处理方法优化

在样品制备的优化方面，与乙酸乙酯液-液萃取法相比，蛋白质沉淀法具有精度高、回收率高、操作简单等优点。样品制备采用蛋白质沉淀法。E-ZOP 的定量限值可用于人血浆样品中药物动力学的定量分析。

最初，沉淀蛋白的溶剂是乙腈和甲醇，但这造成了 E-ZOP 含量的巨大损失，这可能是由于乙腈和甲醇不能有效地将分析员从蛋白质中解吸出来造成的。影响电荷态分布的因素包括溶剂 pH 值和药物溶解度。E-ZOP 在水中的溶解度很低，在纯乙醇和正丙醇中的溶解度最低，这表明 E-ZOP 在醇中的溶解性很低，但在乙酸酯和酮中的溶解度较高<sup>[9]</sup>。因此，一种更易溶解的溶液二甲基亚砜与甲醇和甲酸按 3:7:0.1 的比例混合，成功地解决了这个问题。二甲基亚砜浓度高于此比值将显著降低仪器灵敏度。

## 3.2 方法验证

### 3.2.1 选择性和专属性

空白血浆、以 2 ng/mL 加入 E-ZOP 的空白血浆、以 600 ng/mL 加入 E-ZOP 的空白血浆以及口服 E-ZOP 后获得的临床血浆样本的代表性色谱图如图 3 所示。在所建立的色谱条件下，血浆中没有内源性干扰，表明该方法的选择性是可以接受的。

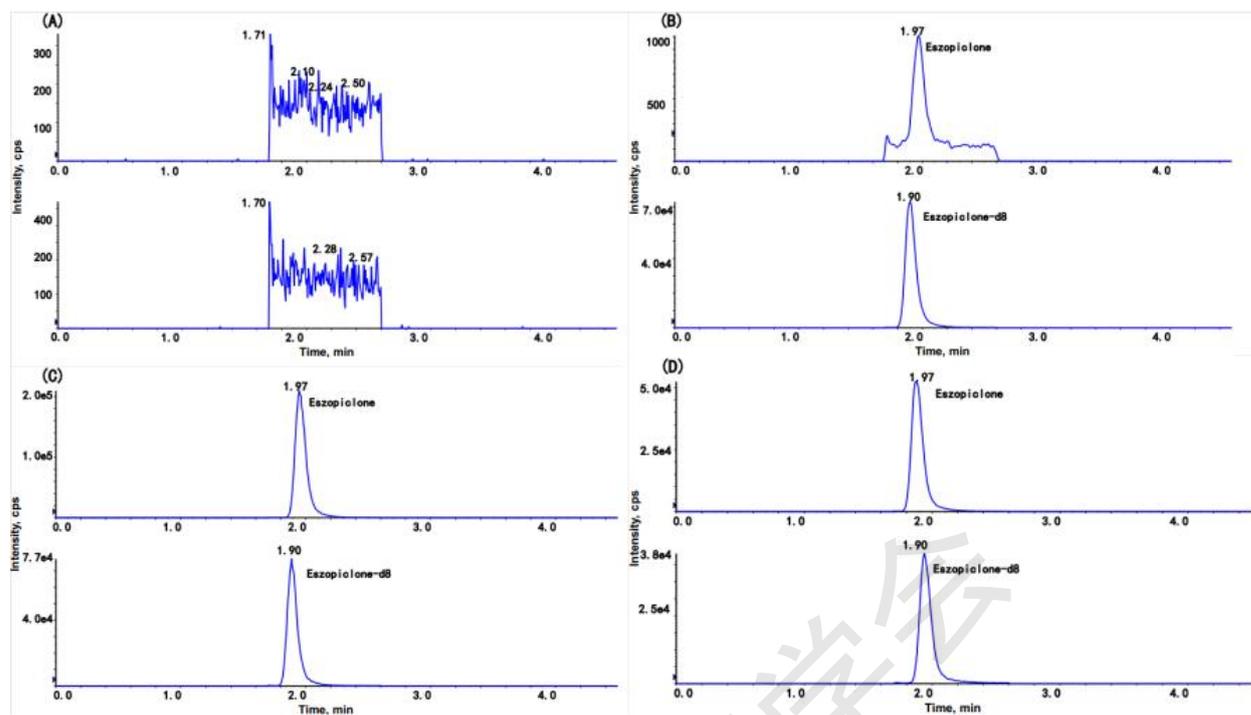


图3 人血浆中 E-ZOP 和 E-ZOP-d8 的代表性 MRM 色谱图。(A) 空白血浆样品；(B) 加入 E-ZOP (2 ng/mL) 和 E-ZOP-d8 的空白血浆；(C) 加入 E-ZOP (600 ng/mL) 和 E-ZOP-d8 的空白血浆；(D) 人体口服 E-ZOP (1 mg) 0.5h 后的血浆样本

### 3.2.2 线性和标准曲线

结果表明，在 0.1~30 ng/mL 血浆浓度范围内，E-ZOP 的八点校准曲线呈线性关系，相关系数大于 0.999。校准曲线的典型方程为： $y=0.1x+0.00169$ ,  $R^2=0.9996$ ，其中 y 代表 E-ZOP-d8 与 IS 的峰面积比，x 代表 E-ZOP 的血浆浓度。以定量下限 (LLOQ) 作为校准曲线的最低浓度，其 S/N 比值均在 10 以上，精密度和准确度均可接受。

### 3.2.3 精密度和准确度

LLOQ 和 QC 样品中 E-ZOP 的精密度和准确度结果见表 1。E-ZOP 各样品水平的精密度 (RSD) 均小于 9.99%。对 E-ZOP 各样品水平的准确度在 1.48% 到 8.31% 之间。测定值均在可接受范围内。

表 1 人血浆中 E-ZOP 的精密度和准确度。

Concentration(ng/mL)	intra-day(n=6)		inter-day(n=18)	
	Precision(RSD%)	Accuracy(%)	Precision(RSD%)	Accuracy(%)
0.1	4.8	109.2	8.7	104.2
0.25	2.8	108.2	6.7	104.5
2.5	1.6	96.7	3.6	98.4

### 3.2.4 提取回收率和基质效应

在人空白血浆中，E-ZOP 内标物均匀化的平均基质效应为 101.2-106.0%，而高溶血性的平均基质效应为 99.9-101.4%。在高脂血浆中，E-ZOP 的基质效应为 95.5-101.1%。如表 2 所示，所有相对标准偏差值在 0.75% 到 9.17% 之间，这表明血浆基质的影响对于分析来说是可以忽略的。E-ZOP 内标物均匀化后的平均提取回收率为 96.7-103.8%，不同浓度下 E-ZOP 的提取回收率结果准确、重现性好。

表 2 E-ZOP 的提取回收率和基质效应 (n=6)。

Compound	plasma types	Sample Conc.(ng/mL)	Matrix effect		Extraction recovery	
			Mean±SD (%)	RSD %	Mean±SD (%)	RSD %
E-ZOP	blank plasma	0.25	104.2±2.6	2.5	93.6±6.0	6.5
		2.5	101.4±1.8	1.8	93.4±1.8	1.9
		25	94.4±7.0	7.4	108.3±2.9	2.7
	high hemolysis	0.25	100.5±7.3	7.3		
		2.5	100.9±1.8	1.7		
		25	101.0±2.0	2.0		
	high fat plasma	0.25	96.3±3.7	3.9		
		2.5	100.1±1.4	1.4		
		25	101.7±1.5	1.5		

### 3.2.5 稳定性

考察了 E-ZOP 在几种条件下的稳定性。E-ZOP 在时间零点和室温下放置至少 3h 后，E-ZOP 的 CV% (7.35%) 的响应无显著差异 (<15%)，表明 E-ZOP 在此条件下是稳定的。血浆样品在至少三个冷冻/解冻循环中的 CV 值 (11.92%) 稳定。处理后的样品在自动进样器中稳定达 24 小时，在室温托盘中稳定达 3 小时，CV% 值分别至少为 6.88% 和 7.35%。血浆样品在 -20°C 下稳定至少 4 周，无明显损失 (<8.43%)。

表3 E-ZOP 的样品稳定性 (n=6, 以平均值±R.E.% 表示)

Stability test condition	Nominal concentration added(ng/mL)		
	E-ZOP in plasma		
	0.25	2.5	25
Long-term stability			
7 days at -20°C	0.27±0.01	2.56±0.05	24.75±0.45
45 days at -20°C	0.27±0.02	2.48±0.1	24.6±0.45
Short-term stability			
Bench-top-3h	0.23±0.02	2.31±0.03	22.10±0.38
Autosampler-24h	0.26±0.02	2.45±0.03	24.25±0.53
Freeze and thaw stability			
3 cycles at -20 °C	0.27±0.01	2.55±0.06	26.21±1.36

表4 E-ZOP 溶液稳定性 (n=6)。

Sample	E-ZOP-0day		E-ZOP-7day		E-ZOP-45day	
	Mean±SD (%)	RSD%	Mean±SD (%)	RSD%	Mean±SD (%)	RSD%
0.25	0.02±0.00	12.33	0.03±0.00	9.16	0.02±0.00	5.19
25	2.17±0.03	1.4	2.19±0.08	3.46	2.19±0.03	1.57

### 3.3 药动学研究

用完全有效的分析方法定量 E-ZOP 的人血浆 PK 浓度。口服 E-ZOP 后的平均血浆浓度-时间曲线如图 4 所示。药代动力学参数见表 5。服用 E-ZOP (1 mg) 后, 0.92±0.446h (Tmax) 的最大观察血浆浓度 (Cmax) 为 13.27±2.717 ng/mL。从时间零点到最后可测浓度 (AUC0-t) 的血药浓度-时间曲线下面积 (AUC0-∞) 分别为 69.31±14.90 ng/mL·h 和 71.84±16.29 ng/mL·h。CLz/F 为 14.595±3.356l h, Vz/F 为 100.26±13.9l h, T1/2 为 4.90±0.819 h, 所得数据表明 E-ZOP 可快速吸收, 缓慢消除。与 Hotha 等人相比。报道了 E-ZOP (3 mg) 给药后的药代动力学参数, 我们的药代动力学特性与以往文献相似<sup>[4]</sup>。

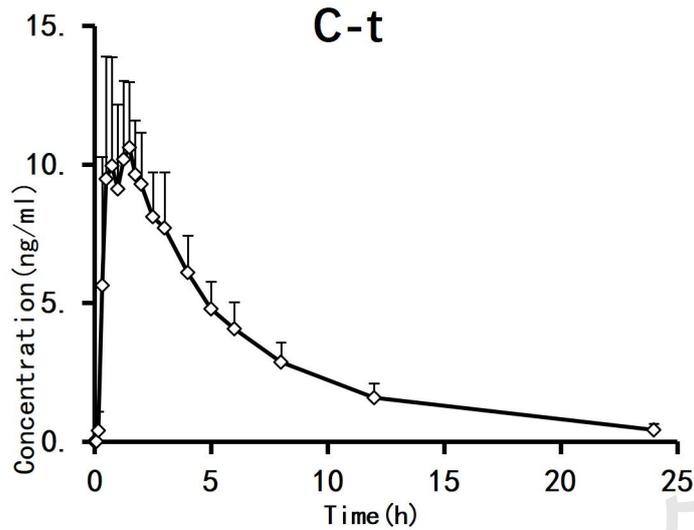


图4 口服 1 mg/kg (n=12) 后 E-ZOP 的平均药代动力学曲线

表5 口服 E-ZOP 后的非房室药代动力学参数 (平均值±标准差, n=12)。

Oral		Parameters					
admin	$T_{1/2}$	$C_{max}$	$T_{max}$	AUC(0-t)	AUC(0-∞)	CLz/F	$V_z/F$
(mg)	(h)	(ng/mL)	(h)	(ng/mL·h)	(ng/mL·h)	(L/h)	(L)
1	4.90±0.819	13.27±2.717	0.92±0.446	69.31±14.90	71.84±16.29	14.595±3.356	100.26 ± 13.9

## 4 结论

建立了一种简便、可靠的 LC-MS/MS 法测定人血浆中 E-ZOP 的生物分析方法, 具有选择性、灵敏、准确、准确等特点。与之前报道的样品制备方法相比, 蛋白质沉淀法在灵敏度和操作简便性方面更为优越; 该方法耗时更少, 且具有高通量测试。用于方法验证, 遵循 FDA 生物液分析规程。对 12 名健康志愿者进行单剂量口服 1 mg E-ZOP 后的药代动力学研究。计算了 E-ZOP 的 PK 数据, 并与报告值进行了比较, 证明了该方法在 PK、生物等效性和生物利用度研究中的成功应用。

### 参考文献:

- [1] Liu, Shiyuan, et al. "Determination and correlation of solubility and thermodynamic properties of E-ZOP in pure and mixed solvents." *Journal of Molecular Liquids* 221 (2016): 1035-1044.

- [2] Barnes, C. M., & Drake, C. L. (2015). Prioritizing sleep health: Public health policy recommendations. *Perspectives on Psychological Science*, 10, 733–737.
- [3] Caldwell, J. A., Knapik, J. J., & Lieberman, H. R. (2017). Trends and factors associated with insomnia and sleep apnea in all United States military service members from 2005 to 2014. *Journal of Sleep Research*, 26, 665–670.
- [4] Derogatis, L. R., Lipman, R. S., Rickels, K., Uhlenhuth, E. H., & Covi, L. (1974). The Hopkins Symptom Checklist (HSCL): A self-report symptom inventory. *Behavioral Science*, 19, 1–15.
- [5] Dykema, J., Stevenson, J., Klein, L., Kim, Y., & Day, B. (2013). Effects of E-mailed versus mailed invitations and incentives on response rates, data quality, and costs in a web survey of university faculty. *Social Science Computer Review*, 31, 359–370.
- [6] Sivertsen B, Vedaa Ø, Harvey A G, et al. Sleep patterns and insomnia in young adults: A national survey of Norwegian university students[J]. *Journal of Sleep Research*, 2018: e12790.
- [7] El-Yazbi AF, Youssef R M. An eco-friendly HPTLC method for assay of E-ZOP in pharmaceutical preparation: investigation of its water-induced degradation kinetics [J]. *Analytical Methods*, 2015, 7(18): 7590-7595.
- [8] Mengcai Z, Songwei P. Bioequivalence of Zopiclone Tablet in Healthy Volunteers [J]. *China Pharmacist*, 2010, 3: 011.
- [9] Marin, Stephanie J., et al. "Sensitive UPLC–MS-MS assay for 21 benzodiazepine drugs and metabolites, zolpidem and zopiclone in serum or plasma." *Journal of analytical toxicology* 36.7 (2012): 472-476.
- [10] Olsen R W. GABA-benzodiazepine-barbiturate receptor interactions [J]. *Journal of neurochemistry*, 1981, 37(1): 1-13.
- [11] Najib J. E-ZOP, a nonbenzodiazepine sedative-hypnotic agent for the treatment of transient and chronic insomnia [J]. *Clinical therapeutics*, 2006, 28(4): 491-516.
- [12] Kumar R N, Rao G N, Naidu P Y. Stability Indicating RP-LC Method for Determination of E-ZOP in Bulk and Pharmaceutical Dosage Forms [J]. *Asian journal of research in chemistry*, 2010, 3(2): 374-379.
- [13] CHEN Q, LIU Y, REN X, et al. Relative Bioavailability and Bioequivalence of Zopiclone Tablets in Healthy Volunteers [J]. *Herald of Medicine*, 2012, 11: 005.

- [14] Greenblatt D J, Zammit G K. Pharmacokinetic evaluation of E-ZOP: clinical and therapeutic implications[J]. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 2012, 8(12): 1609-1618.
- [15] Meng, Min, et al. "Fast chiral chromatographic method development and validation for the quantitation of E-ZOP in human plasma using LC/MS/MS." *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 53.4 (2010): 973-982.
- [16] Paw B, Misztal G. Chromatographic analysis (TLC) of zopiclone and benzodiazepines [J]. *JPC-JOURNAL OF PLANAR CHROMATOGRAPHY-MODERN TLC*, 2000, 13(3): 195-198.
- [17] Sharma N, Rao S S, Kumar N D A, et al. A Novel Validated Ultra-Performance Liquid Chromatography Method for Separation of E-ZOP Impurities and its Degradants in Drug Products [J]. *Journal of AOAC International*, 2013, 96(5): 981-986.
- [18] Dhaneshwar S R, Vidhya K B. Development of a Validated Stability-Indicating HPLC assay method for E-ZOP [J]. *International Journal of ChemTech Research*, 2011, 3(2): 680-689.
- [19] Tracqui A, Kintz P, Manqin P. High-performance liquid chromatographic assay with diode-array detection for toxicological screening of zopiclone, zolpidem, suriclone and alpidem in human plasma. *Journal of Chromatography: Biomedical Applications* 1993; 616: 95–103.
- [20] Paw W and Misztal G. Determination of zopiclone in tablets by HPLC and UV spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2000; 23: 819–823.
- [21] Foster RT, Caille G, Ngoc AH, Lemko CH, Kherani R and Pasutto FM. Stereospecific high-performance liquid chromatographic assay of zopiclone in human plasma. *Journal of Chromatography B* 1994; 658: 161–166.
- [22] Gebauer MG and Alderman CP. Validation of a high-performance liquid chromatographic method for the enantiospecific quantitation of zopiclone in plasma. *Biomedical Chromatography* 2002; 16: 241–246.
- [23] Van Bocxlaer J, Meyer E, Clauwaert K, Lambert W, Piette M and DeLeenheer A. Analysis of zopiclone (Imovane) in postmortem specimens by GC-MS and HPLC with diode-array detection. *Journal of Analytical Toxicology* 1996; 20:52–54.
- [24] Gaillard Y, Gay-Montchamp JP and Ollagnier O. Gas chromatographic determination of zopiclone in plasma after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography* 1993; 619:

310–314.

- [25] Chennaiah M, Veeraiah T, Venkateshwarlu G. Spectrophotometric determination of E-ZOP in pure and pharmaceutical forms [J]. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 2012, 57(4): 1460-1463.
- [26] Oiestad L, Johansen U and Christophersen AS. Drug screening of preserved oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 2007; 53: 300–309.
- [27] Quintela O, Sauvage FL, Charvier F, Gaulier JM, Lachatre G and Marquet P. Liquid Chromatography–tandem mass spectrometry from detection of low concentration of 21 benzodiazepines, metabolites, and analogs in urine: method with forensic application. *Clinical Chemistry* 2006; 52: 1346–1355.
- [28] Laloup M, Ramirez Fernandez M, De Boeck G, Wood M, Maes V and Samyn N. Validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 26 benzodiazepines and metabolites, zolpidem and zopiclone, in blood, urine and hair. *Journal of Analytical Toxicology* 2005; 29: 616–626.
- [29] Kratzsch C, Tenberken O, Peters FT, Weber AA, Kraemer T and Maurer HH. Screening, library-assisted identification and validated quantification of 23 benzodiazepines, flumazenil, zaleplone, zolpidem and zopiclone in plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *Journal of Mass Spectrometry* 2004; 39: 856–872.
- [30] Hotha K K, Vijaya Bharathi D, Jagadeesh B, et al. A rapid LC-MS/MS method for quantitation of E-ZOP in human plasma: application to a human pharmacokinetic study [J]. *Biomedical Chromatography*, 2012, 26(2): 225-231.
- [31] Ravi D, Rao J S, Rajalakshmi D, et al. Development and validation of an RP-HPLC Method for the determination of the E-ZOP in tablet dosage forms [J]. *Inter. j. of res in pharm and Chem*, 2014, 4: 119-130.
- [32] Shaikh K, Patil A, Gite S. Stability-Indicating LC–UV Method for the Determination of E-ZOP and Degradation Impurities in Tablet Dosage Form [J]. *Journal of chromatographic science*, 2013, 52(4): 293-297.
- [33] Anandakumar K, Kumaraswamy G, Ayyappan T, et al. Quantitative Estimation of E-ZOP in Bulk and in Formulation by Simple UV and Difference Spectroscopic Methods[J]. *Research*

Journal of Pharmacy and Technology, 2010, 3(1): 202-205.

- [34] Liu S, Xu S, Du S, et al. Determination and correlation of solubility and thermodynamic properties of E-ZOP in pure and mixed solvents[J]. Journal of Molecular Liquids, 2016, 221: 1035-1044.
- [35] Salama N, Zaazaa H, Abd El Halim L, et al. Thin-layer chromatographic enantioseparation of ofloxacin and zopiclone using hydroxy-propyl-beta-cyclodextrin as chiral selector and thermodynamic studies of complexation[J]. JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC, 2014, 27(3): 166-173.
- [36] Bioanalytical method validation, biopharmaceutics coordinating committee in the Center for Drug Evaluation and Research (CDER) in cooperation with the Center for Veterinary Medicine (CVM) at the Food and Drug Administration. Guidance for Industry, (2001), Accessed date: May 2018.

#### 亮点

- 采用一种新的 LC-MS/MS 方法，通过简化的蛋白质沉淀进行单步预处理。
- 高通量和每次进样 4.5 分钟。
- 开发并验证了特定且灵敏的 LC-MS/MS 方法。
- 根据美国食品和药物管理局的规定，采用可接受的标准对所建立的方法进行了验证。
- 已验证的方法用于测定人血浆中的 E-ZOP。
- 该方法可用于临床试验中 E-ZOP 的定量和监测。
- 选定的同位素内标可有效减少基体效应和误差。

