

## Effect of Ethanol on Pharmacokinetics of Diazepam in Rat by UPLC-MS/MS

Miaomiao ZHANG<sup>1 #</sup>, Liming HU<sup>1 #</sup>, Gaotong LIN<sup>2</sup>, Minle CHEN<sup>3</sup>,  
Jifeng WANG<sup>2</sup>, Yibin PAN<sup>3 \*</sup> & Meifei LU<sup>4 \*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacy, The First People's Hospital of Wenling, Wenling, China.

<sup>2</sup> Department of Pharmacy, Taizhou Cancer Hospital, Wenling, China.

<sup>3</sup> Assisted Reproduction Unit, Department of Obstetrics and Gynecology,  
Sir Run Run Shaw Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, China.

<sup>4</sup> Department of Pharmacy, The Children's Hospital,  
Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, China.

**SUMMARY.** Different degrees of diazepam and ethanol inhibit the central nervous system, ethanol can increase adverse reactions, and diazepam can cause toxicity when used in combination with its synergistic effect causing acute poisoning or death. Given the fact that ethanol consumption is so common and individual drinking habits differ so widely, we investigated the effect of ethanol on the pharmacokinetic parameters of diazepam. In our study, twelve rats were divided into two groups, diazepam group and diazepam combined ethanol group, six rats for each group. After centrifugation, the concentration of diazepam in rat plasma was analyzed with UPLC-MS/MS method. The chromatographic conditions were optimized using a C18 column (2.1 × 50 mm, 1.7 μm), and the mobile phase was made up of water and acetonitrile (containing 0.1% formic acid) with gradient elution. The mass spectrometry conditions were electrospray ionization source and positive ion detection mode. Multiple reactions monitoring (MRM) mode was used for quantification. Calibration curves were linear over the range of 1-500 ng/mL for diazepam in rat plasma. The extract recoveries of diazepam in rat plasma were better than 78.6%. RSD of intra-day and inter-day precision were both less than 9%. The accuracy of the method was between 95.2% and 108.2%. This method was sensitive, repeatable and successfully applied to pharmacokinetic study of diazepam after oral administration in rats. Compared to the diazepam group, the pharmacokinetic parameters diazepam were altered by ethanol administration, AUC and C<sub>max</sub> increased, CL decreased (p < 0.05). It suggested that ethanol could increase adverse reactions, and potentiate diazepam toxicity.

**RESUMEN.** Diferentes grados de diazepam y etanol inhiben el sistema nervioso central; el etanol puede aumentar las reacciones adversas y el diazepam puede causar toxicidad cuando se utiliza en combinación con su efecto sinérgico causando intoxicación aguda o la muerte. Dado el hecho de que el consumo de etanol es tan común y los hábitos de consumo individuales difieren tan ampliamente, investigamos el efecto del etanol sobre la farmacocinética del diazepam. En nuestro estudio, doce ratas se dividieron en dos grupos, grupo diazepam y diazepam grupo de etanol combinado, seis ratas para cada grupo. Después de la centrifugación, se analizó la concentración de diazepam en plasma de rata mediante UPLC-MS/MS. Las condiciones cromatográficas se optimizaron utilizando una columna C18 (2,1 × 50 mm, 1,7 μm) y la fase móvil estuvo compuesta de agua y acetonitrilo (que contenía ácido fórmico al 0,1%) con gradiente de elución. Las condiciones de espectrometría de masas fueron la fuente de ionización por electrospray y el modo de detección de iones positivos. Para la cuantificación se utilizó el modo de monitorización de reacciones múltiples (MRM). Las curvas de calibración fueron lineales en el intervalo de 1-500 ng/mL para diazepam en plasma de rata. El extracto recuperado de diazepam en plasma de rata fue superior al 78,6%. Las RSD de intra-día y precisión inter-día fueron ambos menores del 9%. La exactitud del método estuvo entre 95,2% y 108,2%. El método resultó sensible, repetible y aplicado con éxito al estudio farmacocinético del diazepam después de la administración oral en ratas. En comparación con el grupo diazepam, los parámetros farmacocinéticos del diazepam fueron alterados por la administración de etanol, AUC y C<sub>max</sub> aumentadas, mientras CL disminuyó (p < 0,05). Los resultados sugieren que el etanol podría aumentar las reacciones adversas y potenciar la toxicidad del diazepam.

**KEY WORDS:** diazepam, pharmacokinetics, plasma, UPLC-MS/MS.

\* Authors to whom correspondence should be addressed. E-mail: lumeifei1985@zju.edu.cn (Meifei Lu);  
11018158@zju.edu.cn (Yibin Pan)

# These authors contributed equally to this work.