

HPLC-MAXPLOT UV 检测法测定血清中 丹那唑及其代谢产物

何怀冰 孙时良 刘德林 郑惠娥*

(上海医科大学仪器分析中心实验室; *上海市第一妇婴保健院)

提要 本文建立了同时测定人体血清中丹那唑(I)及其主要代谢产物 2-羟甲基妊娠素(II)和其它代谢产物妊娠素(III)的高效液相色谱法。方法用 YWG C 18 柱并以甲醇-水(74:26)作为流动相,应用紫外最大吸收作图法(maxplot)检测技术,以 UV 285,240 nm 分别测定 I, II 和 III。使原型药和代谢产物都达到较高检测灵敏度。同时对方法的专一性、准确性和精密密度等方面进行了评价,并应用于临床监测。

关键词 丹那唑; 2-羟甲基妊娠素; 妊娠素; 高效液相色谱法

丹那唑(danazol, I)是一个合成甾体化合物,有抑制垂体促性腺激素的分泌作用⁽¹⁾。用于治疗子宫内膜异位症,疗效显著,是目前临床上的首选药物。丹那唑在体内迅速广泛地代谢。主要代谢产物为 2-羟甲基妊娠素(II),其它代谢产物均为妊娠素(III)及其衍生物。这些代谢产物有激素样的活性⁽²⁾。为进行药物代谢及药代动力学的研究,需有测定丹那唑及其代谢产物的分析方法,绝大多数文献^(3~7)都采用放射免疫法(RIA)进行丹那唑体内药物分析。RIA 具有灵敏度高的优点,但有放射性防护问题而且不能同时测定丹那唑和代谢产物。为此我们建立了能同时测定丹那唑及其代谢产物的 RP-HPLC 法,方法选用 maxplot 检测,达到灵敏、准确、简便。

材料与 方法

一. 试剂和药品

试剂 甲醇、环己烷和异丙醇均为 AR 试剂并经蒸馏;蒸馏水(三次重蒸水)。

pH 10.8 缓冲液 取无水碳酸钠 5.30 g,加水溶解成 1000 ml。另取硼砂 1.91 g,加水溶解成 100 ml。临用时取碳酸钠溶液 97.3 ml 与硼砂溶液 2.7 ml,混合即得。

标准对照品 丹那唑, 2-羟甲基妊娠素和氯地孕酮由上海第十二制药厂提供,妊娠素由美国 Sterling-Winthrop 研究所提供。

标准溶液的配制 精密称取干燥至恒重的丹那唑、2-羟甲基妊娠素、妊娠素和氯地孕酮(内标)各约 10 mg,分别置 100 ml 量瓶中,加甲醇至刻度,浓度约为 0.1 mg/ml,分别取上述溶液 0.5~1.0 ml 置 10 ml 量瓶中,加流动相至刻度,浓度约为 5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

二. 仪器和方法

仪器 Waters 高效溶液相色谱仪(510 型输液泵, 490 型可编程序紫外检测器, 840 型数据处理机)。

色谱条件及数据处理 柱 150 \times 4.6 mm I. D., YWG C₁₈H₃₇, 10 μm ; 流动相: 甲醇—

水(74:26, V/V); 检测: 紫外最大吸收作图法 (maxplot), 检测波长 285, 240 nm, 1.000 AUFS。检测响应值直接输入数据处理系统, 按内标法求校正因子及样品含量。

血清样品的提取 取人体血清 1 ml 置 10 ml 具塞试管中, 精密加内标约 100 ng 及 pH 10.8 缓冲液 0.5 ml, 摇匀, 以环己烷-异丙醇 (98:2) 4 ml × 2 和 (95:5) 4 ml × 1 萃取, 合并三次萃取液用氮气流吹干, 残渣以 50 μ l 甲醇溶解, 取 20 μ l 进样。

结 果

一. 色谱图

图 1 为服用丹那唑胶囊后病人血清和空白血清色谱图。图中显示了丹那唑、代谢产物和内标能很好地分离。

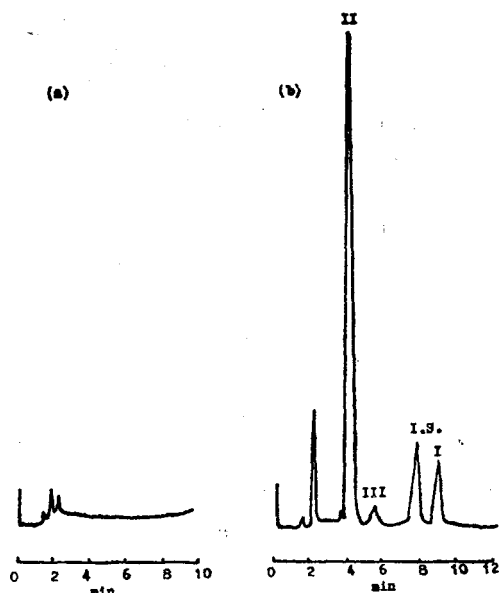


Fig 1. HPLC chromatograms of human serum.

(a) Blank serum; (b) Serum of patient receiving 200 mg of danazol b.i.d. Column: YWG C18, 10 μ m (150 × 4.6 mm id); Mobile phase: methanol-water (74:26); Flow rate: 1 ml/min; Detection wavelengths: 240 nm and 285 nm with maxplot. I. Danazol; II. 2-Hydroxymethyl ethisterone; III. Ethisterone; I S. Chloromadinone.

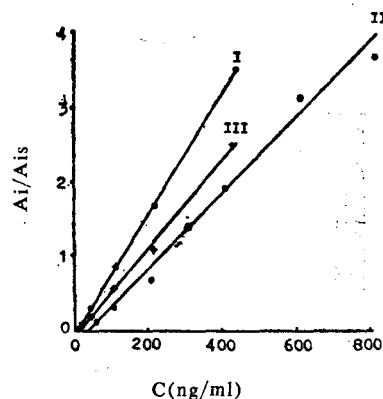


Fig 2. Standard curves of I, II, III in serum.

I. Danazol; II. 2-Hydroxymethylethisterone; III. Ethisterone; I S. Chloromadinone.

二. 专一性试验

(一) 色谱峰的停流扫描 为考察临床血清样品色谱峰纯度, 对主要色谱峰进行停流紫外光谱扫描。结果表明, 血清中丹那唑 ($t_r = 9.42$ min) 和 2-羟甲基妊娠素 ($t_r = 3.77$ min) 与相应的标准品比较具有相同的紫外光谱和 λ_{max} (285 和 240 nm)。

(二) 主要代谢产物 2-羟甲基妊娠素的质谱分析 取服用丹那唑病人的血清按上法分析, 收集 $t_r = 3.77$ min 的色谱峰流份, 在氮气流下吹干, 乙醇溶解残渣, 直接进样进行 EI-MS 分析。与合成标准品的质谱图对照, 二者都有相同的分子离子峰 ($m/z = 342$) 和主要质谱峰。从而证明病人血清中 $t_r = 3.77$ min 的色谱峰为 2-羟甲基妊娠素。

三. 检测限和线性范围

(一) 检测限 I, II 和 III 的最低检测量为 4.0, 10.15 和 4.06 ng; 最低检测血清浓度为 10.0, 25.38 和 11.15 ng/ml。

(二) 标准曲线 取具塞试管 7 支, 各加血清 1 ml, 加内标约 100 ng, 分别加 I 9.855~438.00 ng, II 50.75~812.00 ng 和 III 14.99~428.40 ng, 加缓冲液 0.5 ml 混合后按上述方法测定, 以 A_i/A_{IS} 对浓度 C 作图 (图 2)。测得回归方程和相关系数为: I: $y=8.0481 \times 10^{-3}x - 0.0617$, $r=0.9998$, II: $y=4.9516 \times 10^{-3}x - 0.1636$, $r=0.9928$, III: $y=5.7548 \times 10^{-3}x - 0.0651$, $r=0.9980$ 。

上述实验表明, 本法灵敏度高, 线性范围宽, 线性相关系数均在 0.99 以上。

四. 回收率与精密度

(一) 回收率 分别于 1 ml 空白血清中加入不同量的 I, II, III 和内标标准溶液, 按上述方法提取测定。表 1 显示了三个化合物, 四个浓度五次重复的回收率数据。平均相对回收率为 I: 99.04%, II: 63.17%, III: 96.08%。

Tab 1. Recoveries of I, II, and III from serum

Samples	Added (ng/ml)	Recovered (mean \pm SD; n=5) (ng/ml)	Recovery(%)	CV(%)
I	50.75	49.75 \pm 1.82	98.02	3.66
	101.50	99.27 \pm 4.50	97.78	4.53
	203.00	200.93 \pm 6.54	98.98	3.25
	406.00	411.53 \pm 13.30	101.36	3.23
II	101.50	58.30 \pm 5.89	57.44	10.11
	203.00	127.07 \pm 14.70	62.60	11.58
	406.00	260.51 \pm 22.33	64.16	8.57
	812.00	556.08 \pm 24.27	68.48	4.37
III	55.80	50.17 \pm 6.44	89.92	12.84
	111.60	107.34 \pm 8.16	96.18	7.60
	223.20	223.07 \pm 12.13	99.94	5.44
	446.40	438.68 \pm 11.2	98.27	2.55

I. Danazol; II. 2-Hydroxymethylethisterone; III. Ethisterone.

(二) 精密度 配制含 I, II, III 和内标一定量的血清数份, 按方法项下测定。天内和天间的平均值和变异系数见表 2。

五. 丹那唑及其代谢产物的临床监测

选择一名典型的子宫内膜异位症病人, 给予丹那唑胶囊 200 mg, b.i.d. 治疗。在治疗的 d 1, 7, 14 早晨服药后 0.0, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 12.0 和 24.0 h 抽血, 分取血清 1.0 ml, 在 d 21, 28, 56 和 98 早晨服药后 2 h 同样取血清 1 ml, 加内标约 100 ng, 按上法提取测定。测得 I 和 II 的浓度 (见表 3)。结果表明主要代谢产物 2-羟甲基妊娠素(II)在服药后 8 h 即达到较高的浓度, 而且持续稳定, 其浓度大约是丹那唑(I)的 5~9 倍, 在此病人中 III 的浓度低未能检出。

讨 论

一. RP-HPLC 法的选择 丹那唑及其代谢产物均属于甾体化合物, 可供分析用的官能团较少, 光学特性差异不大, 气化过程中丹那唑又易分解, 而且人体内浓度较低, 故不宜作光学分析和气相分析, 又因 RIA 法^(5~7) 不能同时测定原型药和代谢产物, 因此选用 HPLC

Tab 2. Precision of the method (n=5)

	Compound	Sample Added Recovered (ng/ml)		SD	CV(%)
Within-Day	I	50.75	49.75	1.82	3.66
		203.00	200.93	6.54	3.25
		406.00	411.53	13.30	3.23
	II	101.50	58.30	5.89	10.11
		406.00	260.51	22.33	8.57
		812.00	556.08	24.27	4.37
	III	55.80	50.17	6.44	12.84
		223.20	223.07	12.13	5.44
		446.40	438.68	11.10	2.55
Between-Day	I	50.75	45.70	3.48	7.62
		203.00	202.05	5.42	2.68
		406.00	406.86	29.35	7.21
	II	101.50	58.73	2.13	3.62
		406.80	293.97	19.79	6.73
		812.00	599.73	60.66	10.11
	III	55.80	48.66	5.33	10.95
		223.20	240.36	13.82	5.75
		446.40	464.62	46.76	10.06

I, II and III. See Tab 1.

Tab 3. Serum levels(ng/ml) of I and II in a female patient following oral administration of I 200 mg b i d for 3 months

Hours after morning dose	Day 1		Day 7		Day 14	
0	I 0	II 0	I 0	II 373.84	I 0	II 428.89
1	0	0	0	355.20	0	519.58
2	83.97	0	66.63	391.50	51.10	451.60
4	44.62	0	45.57	270.82	68.05	459.08
8	0	92.06	84.33	588.44	67.84	520.24
12	0	170.52	50.48	326.61	0	289.46
24	0	218.18	33.25	317.16	0	279.18
	Day 21		Day 28		Day 56	
2	I —	II 406.59	I 104.29	II 732.18	I 50.50	II 390.49
	Day 98					
2	I 57.62	II 392.27				

I and II. See Tab 1.

法。由于甲醇—水价格低廉，故选用甲醇—水作为流动相系统。为保证各组分有良好分离，确定甲醇—水的配比为 74:26(V/V)。

二. 检测方法的选择 丹那唑和氯地孕酮(内标) λ_{max} 为 285 nm，而代谢产物的 λ_{max} 为 240 nm。因此，本法选用紫外最大吸收作图法(maxplot)，设定检测波长为 240 nm 和 285 nm 同时检测，并自动挑选各组分在二个波长下吸收值最大的一个作图。这种检测方法较文献⁽⁸⁾为优，既能达到同时检测原型药和代谢产物，又保证各组分达到最高检测灵敏度。

三. 本法在溶剂提取过程中加入 pH 10.8 缓冲液能排除雌二醇对妊娠素的干扰，选用 maxplot 检测技术可以排除黄体酮对丹那唑的干扰。其它内源性甾体化合物如可的松和睾丸素以及合并用药氨基导眠能和他莫西芬对本法无干扰。

四. 本法同时应用于丹那唑胶囊药代动力学和生物有效度研究，将另文发表。

参 考 文 献

1. Rosi D, et al. Isolation, synthesis and biological activity of five metabolites of danazol. *J Med Chem* 1977; 20:349.
2. Barbieri RL, et al. Danazol: endocrine pharmacology and therapeutic applications. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 141:453.
3. Potts GO, et al. Pharmacology and pharmacokinetics of danazol. *Drugs* 1980, 19:321.
4. Davison C, et al. The absorption, distribution and metabolic fate of danazol in rats, monkeys and human volunteers. *Arch Int Pharmacodyn* 1976; 221:294.
5. Peterson JE, et al. Radioimmunoassay for danazol in human and monkey plasma. *J Pharm Sci* 1978; 67:1425.
6. Williams TA, et al. A Radioimmunoassay for danazol. *Steroids* 1978; 3:205.
7. Creange JE, et al. A competitive radioligand assay for danazol (17-pregn-4-en-20-yno (2,3-d) isoxazol-17-ol) using pregnant guinea pig plasma. *Ibid* 1974; 23:411.
8. Yasuda, et al. Determination of serum levels of danazol by HPLC. *J Kyoto Pref Univ Med* 1983;92: 1605.

ANALYSIS OF DANAZOL AND ITS METABOLITES IN SERUM BY RP-HPLC WITH MAXPLOT UV DETECTOR

HB He, SL Sun, DL Liu and HE Zheng*

(Department of Instrumental Analysis Center. Shanghai Medical University. Shanghai; *Shanghai First Maternity and Infant Health Institute. Shanghai)

ABSTRACT A sensitive, specific and rapid RP-HPLC method was developed for simultaneously determining a synthetic steroid drug danazol (I) and its metabolites 2-hydroxymethylethisterone (II) and ethisterone (III). A column packed with YWG-C18, 10 μ m and mobile phase of methanol-water (74:26, V/V) were used to separate CII, III and chloromadinone (I. S.). In order to get more satisfactory sensitivity of the four compounds, the detection wavelengths were set at 285 nm and 240 nm with maxplotechnique.

The chromatographic peaks of I and II in serum were confirmed by UV spectra and mass spectra. The results showed that the limits of detection using 1 ml serum were 10 ng/ml for I, 25.38 ng/ml for II and 11.15 ng/ml for III. Standard curves were constructed with 1 ml serum containing I (9.855~438.00 ng/ml), II (50.75~812.00 ng/ml) and III (14.99~428.40 ng/ml). The recoveries of I, II and III from 1 ml serum were 99.04%, 63.17% and 96.08% respectively.

The method was used to profile the serum levels of I and II in a female with endometritis receiving 200 mg of danazol b. i. d. The result showed that the concentration of II was 5~9 times higher than that of I.

Key words Danazol; 2-Hydroxymethylethisterone; Ethisterone; HPLC