

人血浆中非那雄胺的 HPLC-MS 法测定

李向阳^{1*}, 丁黎², 李丽敏³, 郝歆愚², 张正行²

(1. 青海医学院 药理教研室, 青海 西宁 810001; 2. 中国药科大学 药物分析教研室, 江苏 南京 210009;
3. 南京医科大学 药理教研室, 江苏 南京 210008)

摘要: 目的 建立人血浆中非那雄胺的 HPLC-MS 测定法, 以测定志愿者口服非那雄胺片剂后的血药浓度, 并对供试制剂和参比制剂的生物等效性进行评价。方法 血样经 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 碱化后用重蒸乙酸乙酯提取, 进行 HPLC-MS 分析, 色谱柱为 Hypersil ODS ($5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$), 流动相为甲醇-水 (85:15), 内标为甲地孕酮, 检测离子为 m/z 395 (非那雄胺)、 m/z 407 (内标), 裂解电压为 120 V。20 名健康志愿者交叉口服供试片和参比片, 计算主要药代动力学参数及相对生物利用度, 以判断生物等效性。在 $1 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 非那雄胺与内标峰面积比值与浓度线性关系良好 ($r = 0.9986$), 检测限为 $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 回收率为 $85.9\% \sim 98.7\%$ 。以 AUC_{0-24} 计算的非那雄胺片剂的相对生物利用度为 $(100 \pm 13)\%$ 。结论 建立的分析方法灵敏、准确、简便。统计学结果表明两种制剂生物等效。

关键词: 非那雄胺; HPLC-MS; 生物等效性; 血浆

中图分类号: R917.101; R945.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2003)06-0455-03

Determination of finasteride in human plasma by HPLC-MS

LI Xiang-yang^{1*}, DING Li², LI Li-min³, HAO Xin-yu², ZHANG Zheng-xing²

(1. Department of Pharmacology, Qinghai Medical College, Xining 810001, China; 2. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 3. Department of Pharmacology, Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China)

Abstract: **Aim** To develop an HPLC-MS assay for determination of finasteride in human plasma and to investigate the bioequivalence in healthy volunteers. **Methods** After alkalization with sodium hydroxide, plasma was extracted with ethyl acetate and separated using a C_{18} column with a mobile phase of methanol-water (85:15). LC-ESI-MS was performed in the selected ion monitoring (SIM) mode using target ions at m/z 395 for finasteride and m/z 407 for the IS. The fragmentor voltage was 120 V. A randomized crossover design was performed in 20 healthy volunteers. In the two study periods, a single 10 mg dose of each tablet was administered to each volunteer. **Results** Calibration curves were linear over the range $1 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r = 0.9986$). The limit of determination for finasteride in plasma was $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. The recovery of finasteride from plasma was in the range of $85.9\% \sim 98.7\%$. The results of variance analysis and two one-side t -test showed that there was no significant difference between the two formulations in the AUC and C_{max} . **Conclusion** The assay was proved to be sensitive, accurate and convenient. The two formulations were bioequivalent.

Key words: finasteride; HPLC-MS; bioequivalence; plasma

非那雄胺 (finasteride) 为特异性的 II 型 5α -还原酶抑制剂, 具有抑制睾酮代谢的作用, 临床用于治疗男子伴有前列腺肥大的良性前列腺增生症。Constanzerd 等^[1]建立了血浆中非那雄胺的 HPLC-MS

测定方法, 最低定量浓度为 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 但用固相萃取处理血浆样品, 操作较繁琐。目前国内还没有血浆中非那雄胺测定方法的相关报道, 本文建立的 HPLC-ESI-MS 测定法, 简便、灵敏、准确, 回收率高, 适用于该药品的临床监控、药代动力学和生物利用度研究。

收稿日期: 2002-08-24.

* 通讯作者 Tel: 86-971-6104046, E-mail: qhmclxy@163.com

材料与amp;方法

仪器 Agilent 1100 型液相色谱-质谱联用仪和 Agilent Chem Station(安捷伦公司); 80-2 离心机(上海手术器械厂); 旋涡振荡器(上海医科大学仪器厂)。

药品和试剂 非那雄胺对照品(杭州仙璐制药有限公司); 甲地孕酮(内标, 中国药品生物制品检定所); 受试制剂: 非那雄胺片(杭州仙璐制药有限公司, 批号: 010701, 规格: 5 mg/片); 参比制剂: 保列治片(杭州默沙东有限公司, 批号: 213064, 规格: 5 mg/片); 甲醇(美国 Tedia 公司); 乙酸乙酯(南京化学试剂厂); 水为乐百氏纯净水。

色谱与质谱条件 色谱柱: Hypersil ODS(5 μm, 250 mm × 4.6 mm ID, JONES Chromatography, US); 流动相: 甲醇-水(85:15); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 25 °C; 离子极性: 正离子; 离子化方式: 气动辅助电喷雾离子化(ESI); 离子检测方式: 选择性离子检测(SIM); 检测对象: 非那雄胺([M+Na]⁺, m/z 395), 内标([M+Na]⁺, m/z 407); 传输区电压: 120 V; 干燥气流速: 10 L·min⁻¹; 干燥气温度: 350 °C。

血浆样品的处理 取血浆样品 1 mL 置于离心管中, 加入 1 mg·L⁻¹ 内标甲醇溶液 30 μL, 混匀, 加入 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 0.1 mL, 涡旋混匀, 加入重蒸乙酸乙酯 5 mL, 涡旋 3 min, 于 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。分取有机相 4 mL 于另一离心管中, 于 50 °C 水浴中以氮气流吹干。残渣用 100 μL 流动相溶解, 16 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 吸取上清液转移至自动进样器样品管中, 按上述色谱及质谱条件进样分析。

受试者选择 20 名健康男性受试者, 体重(64 ± 6) kg, 年龄 19 ~ 22 岁, 经检查证实肝、肾功能和心电图正常, 精神状态良好。实验前 1 周及实验期间未用其他药物, 禁烟酒, 实验期间统一饮食。

给药方案及血样采集 采用双交叉试验设计方案, 即 20 名受试者, 按体重随机分成 2 组, 一组先 po 受试制剂后 po 参比制剂, 另一组先 po 参比制剂后 po 受试制剂, 剂量均为 10 mg, 两周期间隔 1 周。服药方式: 于早 7 时空腹服药, 用温开水 200 mL 送服, 服药 4 h 后统一进食。于服药前及服药后 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16 和 24 h 采血 3 mL 于肝素试管中, 分离出血浆, -16 °C 保存待测。

数据分析 将所得血药浓度-时间数据经自然对数转换后, 用最小二乘法对尾段相回归计算消除速率常数 k; C_{max} 及 t_{max} 均为实测值; 消除半衰期(T_{1/2})、曲线下面积(AUC)分别按下列各式估算:

$$T_{1/2} = 0.693/k$$

$$AUC_{0-24} = \sum(C_i + C_{i-1})(t_i - t_{i-1})/2$$

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-24} + C_{24}/k$$

式中 C₂₄ 为最后取样点浓度, k 为末端消除速率常数, D 为给药剂量。所得参数(t_{max}, C_{max}, AUC₀₋₂₄, AUC_{0-∞})用交叉试验设计的方差分析, 其中 C_{max}, AUC₀₋₂₄, AUC_{0-∞} 先进行自然对数转换, 再进行分析, 并进行双单侧检验(显著性水平 α = 0.05)。

结果

1 色谱行为

在前述色谱条件下, 非那雄胺和内标峰形良好, 无杂峰干扰测定, 基线平稳。非那雄胺出峰时间在 4.9 min, 内标出峰时间在 6.6 min (图 1)。

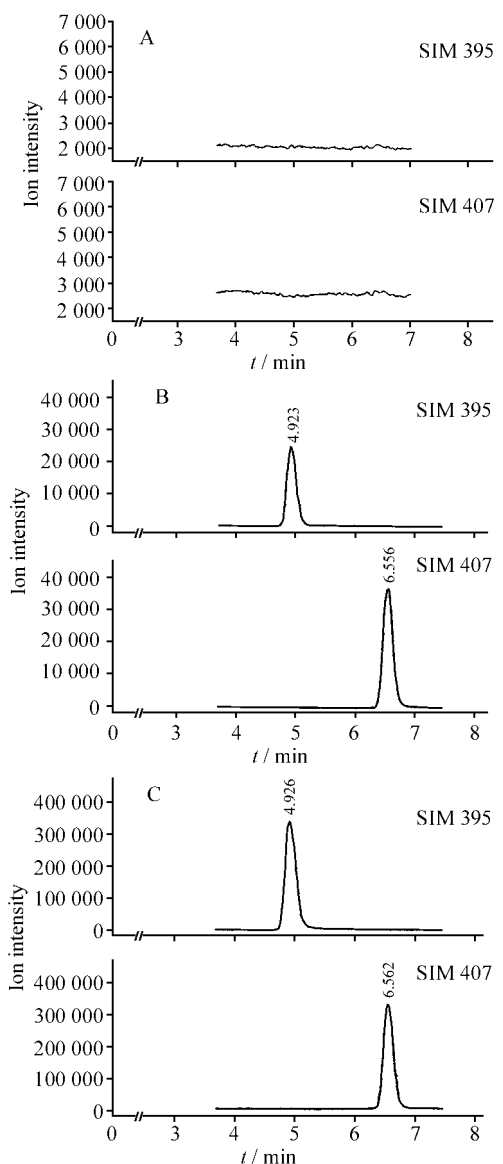


Figure 1 Typical SIM chromatograms blank plasma (A), plasma spiked with finasteride and the megestrol (IS) (B) and plasma obtained from a volunteer (C)

2 线性关系及灵敏度

取离心管数支,分别加入不同量的非那雄胺对照品溶液后以氮气流吹干,加入空白血浆 1.00 mL,涡旋 1 min,配成含非那雄胺分别为 1, 3, 10, 30, 100, 150 和 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准血浆,按“血浆处理”项操作,每种浓度做 5 份样品,记录色谱图,以非那雄胺峰面积 A_s 和内标峰面积 A_i 的比值 f 对血药浓度 (C) 作回归计算,得回归方程:

$$f = 0.0124C + 0.00131 \quad r = 0.9986$$

按上述条件测得非那雄胺在血浆中的检测限为 0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3 精密度试验

按“线性关系及灵敏度”项,配制含非那雄胺 1, 30 和 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血浆,按“血浆样品处理”项操作,在日内和日间(5 d)对每种浓度各做 5 份样品,记录色谱图,求算日内和日间相对标准差。结果表明 3 种浓度标准血浆样品的日内 RSD 分别为 8.66%, 5.17% 和 1.15%; 日间 RSD 分别为 9.47%, 5.60% 和 3.16%。

4 回收率

取非那雄胺对照品适量,配成质量浓度分别为 1, 30 和 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照液,每份 1 mL,加内标溶液 30 μL ,混匀,以氮气流吹干后,用流动相 100 μL 溶解残渣,进样分析,记录样品与内标峰面积的比值 f_s 。另配制含非那雄胺 1, 30 和 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血浆,加入 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液 0.1 mL,混匀,加入重蒸乙酸乙酯 5 mL,涡旋 3 min,于 4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,准确分取有机相 4 mL,加入内标溶液 30 μL ,以氮气流吹干后,用流动相 100 μL 溶解残渣,16 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清液进样分析,记录样品与内标峰面积的比值 f_x 。

非那雄胺的回收率按下式计算,回收率(%) = $f_x/f_s \times 5/4 \times 100\%$ 。结果表明 3 种浓度的平均回收率($n=5$)分别为 85.94%, 93.31% 和 98.69%。

5 药代动力学研究

受试制剂和参比制剂给药后的血药浓度-时间曲线见图 2,采用中国药科大学药代中心编写的 BAPP 2.0 软件计算主要药代动力学参数,结果见表 1。以保列治片为对照,算得非那雄胺片的相对生物利用度为 100% \pm 13%。经方差及双单侧 t 检验分析两制剂的 C_{max} , AUC_{0-24} , $\text{AUC}_{0-\infty}$, 结果表明两制剂生物等效。

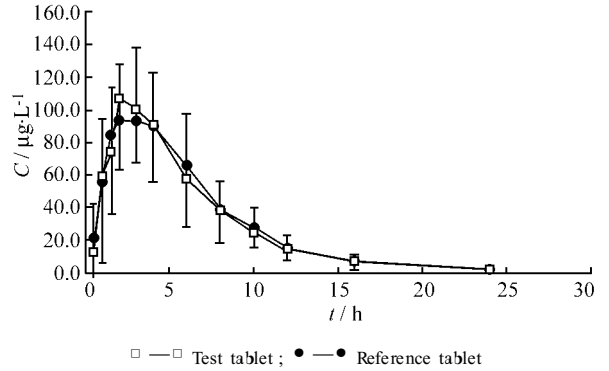


Figure 2 Mean plasma concentration-time relationships of finasteride observed after administration of a single 10 mg dose in 20 volunteers ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters for 20 volunteers after administration of a single dose of finasteride (10 mg)

Parameter	Test tablet	Reference tablet
$T_{1/2}/\text{h}$	3.9 ± 1.2	3.6 ± 1.3
$C_{\text{max}}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	140 ± 32	126 ± 34
t_{max}/h	2.3 ± 0.9	2.8 ± 1.3
$\text{AUC}_{0-24}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	716 ± 209	724 ± 203
$\text{AUC}_{0-\infty}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	741 ± 222	751 ± 214

讨论

与文献^[2]报道比较,本文测得非那雄胺的 $T_{1/2}$ 和 t_{max} 均吻合,但 C_{max} 和 AUC 均较高,这可能与种族差异有关,值得进一步研究。

在血浆样品的提取过程中,对比了乙酸乙酯、乙醚、环己烷和环己烷-乙醚(3:1) 4 种提取溶剂。环己烷及环己烷-乙醚(3:1) 的提取效果不佳,乙醚的回收率尚可,但色谱图中干扰峰较多,灵敏度偏低。乙酸乙酯的回收率最高,但略有干扰,重蒸后干扰消失,故最终选择重蒸乙酸乙酯为提取溶剂。

References:

- [1] Constanzer ML, Chavez CM, Matuszewski BK. Picogram determination of finasteride in human plasma and semen by high-performance liquid chromatography with atmospheric-pressure chemical-ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 1994, **658**(5): 281 - 287.
- [2] De Menezes FG, Ribeiro W, Ifa DR, et al. Bioequivalence study of finasteride [J]. *Sex Horm Inhibit*, 2001, **51**(1): 145 - 150.