DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00226

·短篇论著·

LC-MS法评价两种硫普罗宁片的人体生物等效性

Evaluation of bioequivalence of 2 kinds of tiopronin tablets by LC-MS method

张 红,徐文炜,胡 晓,李艳艳
南昌大学医学院临床药理研究所,南昌 330006

[摘要] **目的**:建立LC-MS法测定人血中硫普罗宁的药物浓度,并对2种制剂进行生物等效性评价。**方法**:20例健康受试者单剂量交叉口服400 mg硫普罗宁供试制剂或参比制剂后,采用LC-MS测定人血中不同时间点硫普罗宁的浓度,计算其药代动力学参数和相对生物利用度,评价两制剂的生物等效性。**结果**:硫普罗宁供试制剂和参比制剂主要药代动力学参数如下:C_{max}分别为(2.31±0.64)、(2.33±0.83) μg/ml,$AUC_{0\text{-}15}$分别为(6.70±1.57)、(6.68±1.53) μg·h·ml^{-1},T_{max}分别为(3.1±0.7)、(3.7±0.6) h,$t_{1/2}$分别为(3.08±0.86)、(2.90±0.84) h。本方法在0.04~10.0 μg/ml浓度范围内线性关系良好。最低定量浓度为0.04 μg/ml,两制剂主要药动学参数经统计学检验无显著性差异。**结论**:本方法简单、快速、准确,2种制剂具有生物等效性。

[关键词] 硫普罗宁;高压液相色谱-质谱法;药代动力学;生物等效性
[中图分类号] R 969.1 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2009)02-0226-03

硫普罗宁(tiopronin,TP)是一种新型含游离巯基的甘氨酸衍生物,具有降低肝细胞线粒体ATP酶的活性,提高细胞内ATP含量,改善肝细胞结构和功能;抑制肝细胞线粒体过氧化脂质体形成,保护肝细胞膜,促进肝细胞的修复和再生,临床主要用于恢复肝脏功能以及慢性肝炎的辅助治疗。由于硫普罗宁血样样品浓度较低,一般的高效液相色谱法难以准确测定其体内的药物浓度,本试验建立一种灵敏、准确、操作简便的LC-MS检测方法,通过测定人血中不同时间的硫普罗宁浓度对受试制剂与参比制剂进行生物等效性评价。

1 材料和方法

1.1 仪器和药品 日本岛津公司LCMS-2010A高效液相色谱-质谱联用仪:SCL-10Avp系统控制器,LC-10ADvp双泵,SIL-HTc自动进样器,CTO-10Avp柱温箱;硫普罗宁对照品江西红星药业有限公司提供(纯度为99.9%);硫普罗宁片由江西红星药业有限公司研制(规格:100 mg/片,批号:050502);凯西莱由河南省新谊药业股份有限公司提供(规格:100 mg/片,批号:060707)。

1.2 试验设计 20名男性健康志愿者,年龄(22±1)岁,体质量(63±3) kg,身高(171±3) cm。受试者均无药物过敏史,无肝、肾疾病史,精神状态良好,受试前全面体格检查均正常(其中包括心电图、心率、血压、肾功能、肝功能、血常规及尿常规等),受试前2周内未服过任何药物,试验期间忌烟、酒。试验前均签署知情同意书。本试验已通过南昌大学第一附属医院伦理委员会审核通过。采用双周期、自身交叉对照设计,将20名健康男性志愿者随机分为2组,每组10人,禁食12 h后分别空腹口服供试制剂或参比制剂400 mg,分别于服药前(0 h)及服药后2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0、8.0、10.0、12.0、15.0 h采集上肢静脉血3.0 ml至普通试管中,在0.4 ml Tris缓冲液中加入0.2 ml全血,再加入7%丙烯酸甲酯(MA) 0.1 ml,振荡5min,室温放置30 min后置－20℃冷冻保存。整个试验在临床医生、护士的监护下进行。

1.3 色谱和质谱条件 色谱柱:Zorbax C_8(4.6 mm×150 mm,5 μm);柱温:40℃;流动相:A相为含0.000 4%三乙胺和0.5 mmol/L醋酸铵水溶液,B相为甲醇;梯度洗脱(0~1.0 min,0%B;1.0~5.5 min 0%~56%B;5.5~7.5 min,56%~0%B;7.5~14 min,0% B);流速为0.25 ml/min。离子化方式:电喷雾离子化(ESI);检测离子:丙烯酸甲酯化硫普罗宁(TP-MA):248.00(m/z),内标水杨酸:137.00(m/z);雾化气流速1.5 L/min;干燥气流速2.0 L/min。

1.4 样品含量测定 在已做前处理的血样样品中精密加入20 μl内标(5.0 μg/ml),混匀后加1 ml丙酮,振荡5 min,20 000×g,离心5 min,取上清液0.8 ml,置50℃真空浓缩装置中挥干,以200 μl甲醇溶解,取5 μl进样。

1.5 标准曲线制备 取空白人血0.2 ml,加不同量的标准品,使其浓度分别为0、0.04、0.1、0.2、0.4、1.0、2.0、4.0和10.0 μg/ml并进行前期血样处理后,按1.4项下处理后进样,记录样品和内标峰面积,以样品浓度C对样品与内标峰面积比R作直线回归。

1.6 回收率与精密度测定 硫普罗宁浓度分别为0.1、0.4和4.0 μg/ml的系列血样,按1.4项下方法处理并测定其浓度,血样样品中TP-MA色谱峰面积与相应浓度的标准溶液峰面积之比求出提取回收率,TP-MA色谱峰面积代入标准

[收稿日期] 2008-07-13 [接受日期] 2008-11-05
[作者简介] 张 红,硕士生,讲师. E-mail:zh2003nc@yahoo.com.cn

曲线,通过测得量与加入量的比值求得相对回收率。相同浓度 1 d 内重复进样 5 次求日内精密度,连续测定 5 d 求日间精密度。

1.7　*样品稳定性考察和质控*　0.1、0.4 和 4.0 μg/ml 的系列血样按 1.4 项下方法处理,分别进行冻融实验,－20℃冻存条件下稳定性及样品室温 6 h 稳定性试验。相同浓度血样分析者采用单盲法进行方法学及随行样品的质量控制,每种浓度重复 5 次。

1.8　*统计学处理*　用 DAS2.0 程序计算主要药代动力学参数。C_{max}、T_{max}为试验的实测值;以梯形法计算 AUC。供试制剂相对于参比制剂的生物利用度 $F = AUC_{0\text{-}tn(供试)}/AUC_{0\text{-}tn(参比)}$。对 C_{max}和 AUC 对数转化后,在三因素方差分析的基础上用双单侧 t 检验和计算 90%置信区间方法进行生物等效性评价,T_{max}采用 Wilcoxon 符号秩检验。

2　结　果

2.1　*方法专属性*　色谱图见图 1。结果表明药物及内标峰形良好,血样样品中内源性杂质不干扰药物的测定,基线噪音小,TP-MA 和内标的保留时间分别为 10.8 min 和 10.9 min。

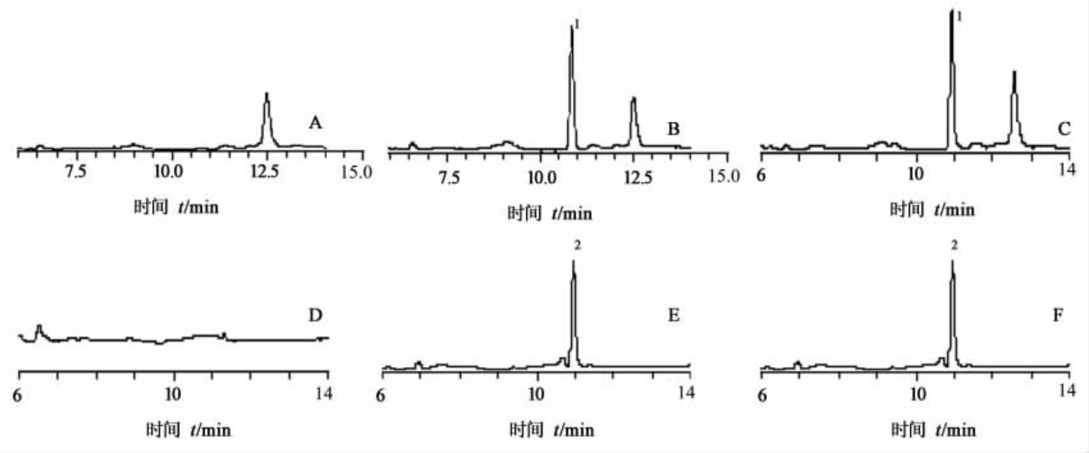

图 1　典型选择离子色谱图

A,D:空白血浆;B:空白血浆＋硫普罗宁(1.0 μg/ml);C:空白血浆＋硫普罗宁(5.0 μg/ml);C,F:健康志愿者口服硫普罗宁 4 h 后血样;1:丙烯酸甲酯化硫普罗宁;2:水杨酸

2.2　*方法学考察*　本方法中硫普罗宁的线性范围为 0.04～10.0 μg/ml,最低定量浓度为 0.04 μg/ml,回归方程 $r = 0.776X + 0.001$,$R^2 = 0.9998$。0.1、0.4 和 4.0 μg/ml TP-MA 的日内精密度 RSD 分别为 5.12%、5.41%、3.44%;日间精密度 RSD 分别为 4.85%、7.60%、1.60%。其方法回收率分别为(94.15±5.09)%、(104.26±0.86)%、(97.84±3.37)%;提取回收率分别为(82.25±2.12)%、(81.32±1.46)%、(88.14±4.52)%。TP-MA 稳定性考察与质控品的准确度 RSD 均<10%。

2.3　*人体药代动力学研究*　20 名健康受试者单剂量口服 400 mg 硫普罗宁供试制剂或参比制剂后的平均药-时曲线见图 2,主要动力学参数见表 1。将供试制剂与参比制剂的 C_{max}、$AUC_{0\text{-}15}$、$AUC_{0\text{-}\infty}$药动学参数对数转换,方差分析结果表明无显著差异,说明两制剂具有生物等效性。硫普罗宁片剂的相对生物利用度为(100.8±13.0)%。

C_{max}的 90%置信区间为 88.79%～111.74%,$AUC_{0\text{-}15}$的 90%置信区间 94.95%～105.24%,$AUC_{0\text{-}\infty}$的 90%置信区间 94.52%～104.56%,均符合规定。两制剂 T_{max}经 Wilcoxon符号秩和检验,$S = 39.5 > S_{0.05(15)} = 25$,$P > 0.05$,供试制剂与参比制剂无显著性差异。

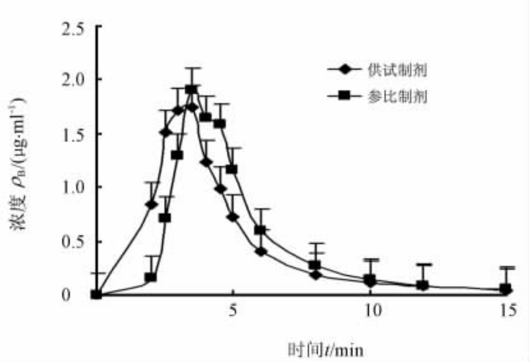

图 2　健康志愿者口服硫普罗宁片后的平均药-时曲线

$n = 20$;$\bar{x} \pm s$

表 1　2 种硫普罗宁制剂的主要药动学参数

($n = 20$,$\bar{x} \pm s$)

指标	供试制剂	参比试剂
$t_{1/2\beta}$ t/h	3.08±0.86	2.90±0.84
T_{max} t/h	3.1 ±0.7	3.7 ±0.6
C_{max} ρ_B/(μg・ml⁻¹)	2.31±0.64	2.33±0.83
$AUC_{0\text{-}15}$(μg・ml⁻¹・h)	6.70±1.57	6.68±1.53
$AUC_{0\text{-}\infty}$(μg・ml⁻¹・h)	6.94±1.54	6.94±1.53

3 讨　论

硫普罗宁是一种含有活性巯基的甘氨酸衍生物，由于含巯基化合物容易氧化成二硫化物，因此需要对巯基进行衍生化处理。本课题通过 4 名受试者预试验发现，采集血样样本后如未进行巯基衍生化处理其稳定性极差，测试结果显示受试者体内血药浓度较低，其平均 C_{max} 为正式试验结果的 1/3 左右。故本试验采用的处理方式为：受试者血样样本采集后立即用丙烯酸甲酯衍生，对巯基进行保护，生成 TP-MA，从而避免巯基被氧化，使血样样本能保存较长时间，血药浓度能较真实的反应人体内的过程。

本试验参考文献[1]报道建立单级质谱 LC-MS 测试法，具有简便灵敏、精确度高的特点，在保证样本测定准确性基础上，而不需采用二级质谱联用[1-2]，可以用于测定体内硫普罗宁的血药浓度。

国内文献[3-4]报道的硫普罗宁测定前血样样品处理方法多采用有机溶剂多步提取或采用固相萃取方法，预处理和测定手段比较复杂，本研究建立的健康人体内血药浓度的 LC-MS 测定方法，尝试采用单一丙酮作为萃取有机相，只需以有机溶剂进行一步萃取，大大简化了血样样品的处理过程，此方法特异性好、无干扰，精密度、灵敏度等均符合人体内血药浓度监测和药动学研究的要求，可以满足体内低浓度药物测定并能很好的进行生物大样本分析。

本方法测得硫普罗宁的相对生物利用度为（100.8±13.0）%，两制剂的主要药动学参数经统计学分析差异无显著性，表明两制剂在吸收速度和吸收程度上具有生物等效性。

[参 考 文 献]

[1] Matsuura K，Murai K，Fukano Y，Takashina H. Simultaneous determination of tiopronin and its metabolites in rat blood by LC-ESI-MS-MS using methyl acrylate for stabilization of thiol group[J]. J Pharm Biomed Anal，2000，22：101-109.

[2] 李见春，韦颖梅，高　署，郑青山，蒋志文. LC-MS/MS 法测定人血清中硫普罗宁的浓度及应用[J]. 中国新药杂志，2007，16：1053-1057.

[3] 赵红卫，秦玉花，高恩民，杨朝宽，丁祖锐. 硫普罗宁肠溶胶囊人体生物等效性研究[J]. 中国药师，2007，10：1183-1185.

[本文编辑]　尹　茶