

高效液相-质谱法测定人体血浆中吲哒帕胺的浓度及其生物等效性研究

夏春华¹, 王晓华², 熊玉卿¹, 章新晶¹ (1. 江西医学院临床药理研究所, 南昌 330006; 2. 南昌市卫生学校, 南昌 330006)

摘要:目的 建立一种测定人体血浆中吲哒帕胺浓度的 HPLC-MS 检测法, 并对吲哒帕胺供试制剂与参比制剂进行生物等效性评价。方法 血样经乙醚提取后, 采用 HPLC-MS 法进行测定。色谱柱为 Shim-pack ODS 柱 (5 μm , 150 mm $\times$ 2.0 mm), 流动相为含 0.04% 三乙胺和 0.5 mmol $\cdot$ L⁻¹ 醋酸铵的水溶液与甲醇, 检测离子为 m/z 364 (吲哒帕胺) 和 m/z 275 (内标氯磺丙脲), 裂解电压为 25 V。20 名健康志愿者交叉口服 2.5 mg 吲哒帕胺供试制剂和参比制剂, 计算主要药动学参数及相对生物利用度, 评价其生物等效性。结果 在 0.78 ~ 100.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 吲哒帕胺与内标峰面积比值与浓度线性关系良好 ($r=0.9999$), 定量限为 0.78 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 回收率为 84.2% ~ 93.8%。吲哒帕胺供试制剂相对于参比制剂的生物利用度为 $101.0 \pm 16.0\%$ 。结论 该试验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: 吲哒帕胺; 高效液相-质谱; 生物等效性

中图分类号: R969.11 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2007)02-0136-03

Determination of Indapamide in Human Plasma by HPLC-MS and Study on its Pharmacokinetics

XIA Chun-hua¹, WANG Xiao-hua², XIONG Yu-qing¹, ZHANG Xin-jing¹ (1. Institute of Clinical Pharmacology, Jiangxi Medical College, Nanchang 330006, China; 2. Nanchang Nursing School, Nanchang 330006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC-MS assay for determination of indapamide in human plasma and to evaluate the bioavailability in healthy volunteers. **METHODS** Plasma was extracted with diethyl ether and separated by a C₁₈ column with a mobile phase of methanol-water (include 0.04 triethylamine and 0.5 mmol L⁻¹ ammonium acetate). HPLC-MS was performed in the selected ion monitoring mode using target ions at m/z 364 for indapamide and m/z 275 for chlorthalidone (IS). The fragmentor voltage was 25 V. A randomized crossover design was carried in 20 healthy volunteers. In the two study periods, a single dose of 2.5 mg indapamide was administered to each volunteer. **RESULTS** The linear range was 0.78 ~ 100.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $r=0.9999$. The limit of determination was 0.78 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. The recovery was in the range of 84.2% ~ 93.8%. The main pharmacokinetic parameters obtained showed no statistically significant difference between two preparations. **CONCLUSION** The assay was proved to be sensitive, accurate and convenient. Two products were bioequivalent.

KEY WORDS: indapamide; HPLC-MS; bioavailability

吲哒帕胺 (indapamide) 是一种非噻嗪类利尿的衍生物, 为有钙拮抗作用的新型利尿剂, 具有血管扩张和利尿作用。由于该药临床应用剂量较小, 每天给药仅 2.5 mg, 口服后人体血浆中药物浓度较低。有关人体血浆中吲哒帕胺的液质联用测定方法, 国内少见报道。本试验建立了一种 HPLC-MS 检测法, 专属性强, 灵敏度高, 血样经液液萃取, 能较好消除内源性杂峰的干扰, 可用于人体血浆中吲哒帕胺浓度的测定。

1 材料与方法

1.1 仪器

岛津 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, Milli-Q Gradient A10 超纯水器。

1.2 药品与试剂 供试制剂

吲哒帕胺片 (江西汇仁药业有限公司, 批号 20040905, 2.

5 mg); 参比制剂: 吲哒帕胺片 (Les Laboratoires Servier France, 批号 3M1581, 2.5 mg)。吲哒帕胺对照品及内标氯磺丙脲对照品均购自中国药品生物制品检定所, 其含量分别为 99.8% 和 99.6%; 甲醇为色谱纯 (Merck 公司)。

1.3 色谱条件

色谱柱为 Shim-pack ODS 柱 (5 μm , 150 mm $\times$ 2.0 mm, 岛津公司), 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ 。采用梯度洗脱方式: 流动相 A 为含 0.04% 三乙胺和 0.5 mmol $\cdot$ L⁻¹ 醋酸铵的水溶液, 流动相 B 为甲醇; 流速为 0.2 L $\cdot$ min⁻¹。梯度洗脱程序如下: 0.1 ~ 4.5 min, B: 35% ~ 80%; 4.5 ~ 6.0 min, B: 80%; 6.0 ~ 6.5 min, B: 80% ~ 35%; 6.5 ~ 10.5 min, B: 35%。

1.4 质谱条件

离子化方式: 电喷雾离子化 (ESI); 选择性离子监测 (SIM); 曲型脱溶剂装置 (CDL) 温度 250 $^{\circ}\text{C}$; 加热块 (block) 温度 200 $^{\circ}\text{C}$; CDL 电压: 25 V; 检测电压: +1.50 kV; 检测离子

[M+H]⁺: 吡啶帕胺 (*m/z* = 364), 内标 (*m/z* = 275); 雾化气流速 1.5 L/min; 干燥气流速 2.0 L/min。

1.5 血浆样品的处理

取血浆 0.1 mL, 精密加入 10 μL 内标 (1.0 μg·mL⁻¹ 氯磺丙脲甲醇溶液), 混匀后加 1 mL 乙醚, 振荡 5 min, 15 000 r/min 离心 5 min。取上清液 0.8 mL, 置 40℃ 恒温水浴, 用 N₂ 吹干。以 0.2 mL 流动相溶解残渣, 再经 18 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后, 取 5 μL 进样, 用峰面积进行定量分析。

1.6 人体药动学试验设计

采用随机交叉自身对照设计方法, 将 20 名男性健康志愿受试者, 随机分成 2 组, 交叉口服吡啶帕胺供试制剂或参比制剂 2.5 mg。并分别于服药前和服药后 0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、6、8、12、24、48、72 h 于肘静脉取血 4 mL 置肝素处理的试管中, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 分离出血浆置 -20℃ 冷冻保存待测。间隔 2 周后, 交叉给药重复上述过程。

2 结果

2.1 色谱行为

在上述色谱条件下, 吡啶帕胺有较大的质谱峰和较好的分离度, 血浆中杂质不干扰样品峰, 基线噪音小, 吡啶帕胺和内标的保留时间分别为 7.1 min 和 5.7 min。

2.2 线性关系和灵敏度

取空白血浆 0.1 mL, 加入不同量的对照品, 使其浓度分别为 0.078、1.56、3.13、6.25、12.50、25.00、50.00 和 100.00 μg·L⁻¹, 按“血浆样品的处理”项下操作, 记录样品和内标峰面积, 利用样品浓度 C 对样品与内标峰面积比 R 作直线回归, 得回归方程 $r = 0.0515C - 0.0060$, $r = 0.9999$ ($n = 5$), 线性范围为 0.78~100.00 μg·L⁻¹, 定量限为 0.78 μg·L⁻¹, $S/N \geq 3$ 。

2.3 精密度

取空白血浆 0.1 mL, 加入不同量的对照品, 使其浓度分别为 1.56、6.25 和 50.00 μg·L⁻¹, 按“血浆样品的处理”项下操作, 记录样品与内标峰面积比值, 代入同一条工作曲线, 求算其浓度。批内各浓度测定 5 次, 每日测定一批, 连续测定 3 批。结果表明 3 种浓度的结果表明 3 种浓度标准血样的回收率分别 87.2%、89.6%、91.8%。批间 RSD 分别为 7.63%、3.75%、2.69%。

2.4 回收率

取空白血浆 0.1 mL, 加入不同量对照品, 使其浓度分别为 1.56、6.25 和 50.00 μg·L⁻¹, 按“血浆样品的处理”项下操作, 记录样品峰面积, 另配置相应浓度的流动相对照品溶液进样, 以血样峰面积除以流动相峰面积得吡啶帕胺回收率, 结果表明 3 种浓度标准血样的回收率分别 87.2%、89.6%、91.8%。

2.5 稳定性

取空白血浆 0.1 mL, 加入不同量对照品, 使其浓度分别为 1.56、6.25 和 50.00 μg·L⁻¹, 放置 -20℃ 冰箱冷藏一周, 用 37℃ 恒温水浴解冻后, 按“血浆样品的处理”项下操作, 测定血浆中药物浓度。结果表明 3 种浓度标准血样冷冻保存 1

周后, 浓度无明显变化, 分别为 1.57 ± 0.10、12.09 ± 0.44、49.56 ± 1.18 μg·L⁻¹。

2.6 药动学研究

20 名健康志愿者口服 2.5 mg 吡啶帕胺后的血药浓度-时间曲线见图 1。采用中国药科大学编写的 BAPP 2.0 软件计算主要药动学参数, 结果见表 1。两制剂的 C_{max} 、 $AUC_{0-\infty}$ 进行方差分析及双侧 *t* 检验, t_{max} 采用非参数检验, 结果表明两制剂具有生物等效性。吡啶帕胺供试制剂相对于参比制剂的生物利用度为 (101.0 ± 16.0)%。

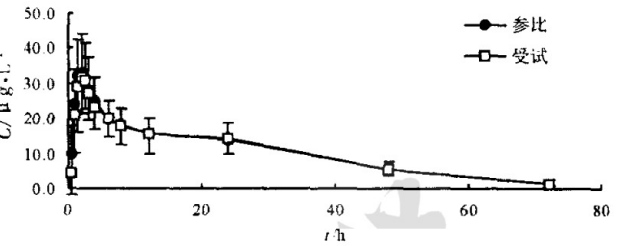


图 1 20 名健康受试者口服 2.5 mg 吡啶帕胺后平均血浆药物浓度时间曲线

Fig 1 Mean plasma concentration-time curve of indapamide in 20 volunteers after a single oral administration of 2.5 mg

表 1 20 名健康受试者口服 2.5 mg 吡啶帕胺后的药动学参数

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of indapamide in 20 volunteers after a single oral administration of 2.5 mg

参数	供试制剂	参比制剂
C_{max} /μg·L ⁻¹	35.01 ± 9.24	36.84 ± 9.49
t_{max} /h	2.0 ± 0.5	1.9 ± 0.5
$t_{1/2}$ /h	18.64 ± 3.88	18.16 ± 3.29
AUC_{0-72h} /μg·h·L ⁻¹	731.02 ± 193.10	774.00 ± 198.73
$AUC_{0-\infty}$ /μg·h·L ⁻¹	735.95 ± 215.26	783.21 ± 242.86

3 讨论

由于吡啶帕胺人体口服剂量小 (2.5 mg), 血药浓度低, 采用普通的 HPLC 紫外检测法很难满足低浓度检测的要求, 有报道^[1-2]其最低定量限仅能达到 10 μg·L⁻¹, 而本试验建立的 HPLC-MS 联用测定方法, 最低定量限可达 0.78 μg·L⁻¹, 灵敏度大大提高。血浆样品经乙醚液-液萃取后, 采用电喷雾离子化, 选择性离子监测方式进行定量分析, 血浆中的内源性物质不干扰待测物的测定, 检测离子为 *m/z* 364 (吡啶帕胺) 和 *m/z* 275 (内标)。另外本试验流动相采用梯度洗脱方式, 既有利于杂质的分离, 亦可以节省进样时间。该方法快速、专属、准确、灵敏, 适合进行吡啶帕胺的人体生物等效性研究。

本试验所得的主要药动学参数 t_{max} 、 $t_{1/2}$ 与文献^[1-5]报道基本一致, 但 C_{max} 、 AUC 与文献^[2-4]报道的有较大差异, 可能与受试者的选择差异及仪器分析精密度有关。两制剂的主要药动学参数经统计学分析差异无显著性, 其相对生物利用度为 (101.0 ± 16.0)%, 表明两制剂具有生物等效性。

参考文献

[1] JNHP, DNGJJ, LIZD, et al. Determination of indapamide

- in human plasma by HPLC method[J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2005, 22 (3): 231-232.
- [2] ZHAO W, HANG T J, LIU J, SONG M, *et al.* Evaluation of pharmacokinetics and bioequivalence of indapamide capsules[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2005, 14 (11) 11: 1332-1335.
- [3] FLORIN A, CRISTINA G, VICTOR D. Andrei Medvedovicib. Liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry method for determination of indapamide in serum for single /multiple dose bioequivalence studies of sustained release formulations [J]. J Chromatogr B, 816 (2005) 35-40.
- [4] LEGORBURU M J, ALONSO R M, JIMENEZ R M, ORTIZ E. Quantitative determination of indapamide in pharmaceutical and urine by high-performance liquid chromatography with amperometric detection[J]. J Chromatogr Sc, 1999, 37(8): 283-287.
- [5] HUTT V, PABST G, DILGER C, *et al.* Bioavailability and pharmacokinetics of a fixed combination of delapril/indapamide following single and multiple dosing in healthy volunteers[J]. Eur J Drug Metab Pharmacokin, 1994, 19(1): 59-69.

收稿日期: 2006-01-17