

固相萃取结合 HPLC-MS 测定人血浆中奥曲肽的浓度及相对生物利用度

丁劲松^{1*}, 彭文兴¹, 张祖华¹, 李焕德¹, 蒋学华²

(1. 中南大学 湘雅二医院, 湖南 长沙 410011; 2. 四川大学 华西药学院, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 建立人血浆中奥曲肽浓度的 HPLC-MS 测定法, 研究国产奥曲肽注射剂的人体生物利用度。方法 血浆样品用 HPLC 固相萃取小柱萃取, 经 Waters Xettra C₁₈ MS 分离后测定。18 名健康志愿受试者采用随机交叉试验设计, 分别 im 奥曲肽试验制剂和参比制剂 200 μg, 不同时间点采血, 比较两者的生物利用度。结果 线性范围 0.540 μg·L⁻¹, 方法回收率为 97.1%~100.5%。日内、日间 RSD 分别为 1.1%~1.6%, 2.9%~4.8%。单剂量 im 奥曲肽 200 μg 后两种制剂的 C_{max} 分别为 (19 ± 10) μg·L⁻¹ 和 (19 ± 11) μg·L⁻¹, T_{max} 分别为 (0.50 ± 0.15) h 和 (0.52 ± 0.20) h; AUC_{0-7h} 分别为 (50 ± 25) h·μg·L⁻¹ 和 (50 ± 25) h·μg·L⁻¹, T_{1/2} 分别为 (1.5 ± 0.8) h 和 (1.5 ± 0.8) h。二者之间均无显著性差异, 以进口奥曲肽为参比制剂, 国产奥曲肽注射液的相对生物利用度为 101% ± 10%。结论 该方法灵敏、准确度高, 可用于奥曲肽体内过程研究。两注射剂为生物等效性制剂。

关键词: 奥曲肽; 固相萃取; 高效液相色谱质谱联用; 生物利用度

中图分类号: R917.101 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2004)07-0542-04

Determination of octreotide in human plasma by HPLC-MS with solid-phase extraction and study on the relative bioavailability of domestic and imported octreotide injections

DING Jin-song^{1*}, PENG Wen-xing¹, ZHANG Zu-hua¹, LI Huan-de¹, JIANG Xue-hua²

(1. The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China;

2. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: **Aim** To establish an HPLC-MS method for determination of octreotide in plasma and study the relative bioavailability of domestic and imported octreotide injections. **Methods** Octreotide in plasma samples were extracted with a Waters solid-phase extraction mini column. HPLC-MS was carried out using a Waters Xettra C₁₈ column and a mobile phase consisting of CH₃OH:1% HAc (80:20), the flow rate was 0.2 mL·min⁻¹, and the internal standard was 6,7,4'-OH-isoflavone, the SIR ions for quantification were m/z 1014.4 for octreotide and m/z 317.6 for internal standard. A single dose of 200 μg of domestic or imported preparations was intramuscularly given to 18 healthy volunteers in a randomized crossover study. Octreotide concentration in plasma was determined by LC-MS method. The pharmacokinetics and bioavailability were studied. **Results** The regressive curve was linear (r = 0.9997) within the range of 0.5 - 40 μg·L⁻¹ for octreotide. The pharmacokinetics parameters of domestic and imported injection were reply to one compartment model. The mean C_{max} were (19 ± 10) μg·L⁻¹ and (19 ± 11) μg·L⁻¹, T_{max} were (0.50 ± 0.15) h and (0.52 ± 0.20) h, T_{1/2} were (1.5 ± 0.8) h and (1.5 ± 0.8) h, AUC_{0-7h} were (50 ± 25) h·μg·L⁻¹ and (50 ± 25) h·μg·L⁻¹, respectively. The relative bioavailability of domestic to imported injection was 101% ± 10%. **Conclusion** The

method is accurate and sensible for assay of plasma octreotide concentration. The results of statistics showed the two preparations were bioequivalent.

Key words: octreotide; solid phase extraction; HPLC-MS; bioavailability

奥曲肽(octreotide, SMS 201-995)是一种人工合成的人体生长激素的八肽衍生物,有类似生长激素抑制剂的作用,显著抑制胃肠胰内分泌系统的肽及生长激素的分泌。临床上主要用于治疗消化道出血,肢端肥大症及胃肠胰内分泌肿瘤^[1]。研究奥曲肽的体内变化规律,评价国产奥曲肽的生物有效性,需要建立灵敏的血药浓度测定方法。本品结构特殊,给药剂量低(通常小于 200 μg),常规方法不能满足要求。目前,文献^[2,3]报道生物样品中奥曲肽的测定方法仅有放射性免疫法(RIA),但此法存在放射性污染和不能区分药物原形和代谢物等缺点。本文建立了奥曲肽血药浓度测定的 HPLC-MS 法,该法灵敏、准确,回收率高,适用于奥曲肽临床血药浓度的监测、药代动力学和生物利用度研究。

材料与方 法

仪器与试药 Waters 2690 高效液相色谱仪(Waters 美国);ZQ 质谱检测器(Micromass 英国);MassLynx V3.5 工作软件(Waters 美国);HPL 1 cc 固相萃取小柱(Waters Oasis);spe-12G 固相萃取系统(天津市琛航科技有限公司);奥曲肽标准品由四川标新医药科技有限公司提供;内标为 6,7,4'-三羟基异黄酮(Sigma, 美国);醋酸奥曲肽注射液(四川标新医药科技有限公司,50 μg/支);善宁注射液(每支含奥曲肽 50 μg,Novartis 公司)。

色(质)谱条件 Waters Xetra C₁₈ MS 质谱专用色谱柱(150 mm×2.1 mm ID, 3.5 μm);柱温:40 ℃;流动相:甲醇-1%醋酸(8020);流速:0.2 mL·min⁻¹。电喷雾电离离子源(ESI),毛细管电压:3.0 kV;取样锥孔电压:31 V;萃取锥孔电压:1.6 V;射频透镜电压:0.5 V;倍增器电压:1200 V;脱溶剂温度:250 ℃;源温度:120 ℃;离子能量:0.5 V;氮气流量:400 L·h⁻¹。收集 m/z 1014.4(奥曲肽准分子离子)和 m/z 317.6(6,7,4'-三羟基异黄酮准分子离子)的离子,以奥曲肽和内标的峰面积比定量。

样品处理 取血浆 1.0 mL 于离心管中,加入内标溶液 20 μL(122 μg·L⁻¹),振荡 1 min,待用。用甲醇 1 mL 活化固相萃取小柱,用水 1 mL 平衡。将上述血浆样品上柱,用 5%甲醇溶液 1 mL 洗脱杂质,

再加入流动相 1 mL,收集滤液。在 50 ℃ N₂ 吹干,加入流动相 100 μL 溶解,进样 20 μL。

给药与血样采集 18 名健康志愿者随机分成 2 组,分别 im 国产或进口醋酸奥曲肽注射液 200 μg,于给药前和给药后 10,15,20,25,30,45,60,120,240,330 和 420 min 取静脉血 4 mL,血样立即离心,分离出血浆,保存于 -70 ℃。一周后交叉给药,同时间点采血。血浆样品用建立的方法测定。

数据处理与统计分析 受试者肌肉注射试验药物和对照药物后, C_{max} 及 T_{max} 由血药数据直接读取。 AUC_{0-7h} 以梯形面积法计算,消除速率常数 k 以血药浓度-时间曲线尾部数据回归计算。 $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-7h} + C_{7h}/k$, AUC 和 C_{max} 经对数转换后,进行方差分析。以双单侧 t 检验进行生物等效性判定。

结 果

1 色谱行为

在选定的色谱质谱条件下,奥曲肽标准溶液的峰形良好,奥曲肽的保留时间约为 3.9 min,内标的保留时间约为 8.4 min,两峰均无拖尾现象,血浆中的杂质不干扰奥曲肽和内标的分离测定。结果见图 1。

2 线性关系

用空白血浆配制含奥曲肽分别为 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40 μg·L⁻¹ 的标准血样,按照样品处理方法操作,以血药浓度 C (μg·L⁻¹) 对峰面积比 (X) 进行线性回归,得方程 $C = 24.332 X + 0.0862$, $r = 0.9997$ 。奥曲肽浓度在 0.540 μg·L⁻¹ 与峰面积比线性关系良好。最低检测限为 0.1 μg·L⁻¹ ($S/N > 3$)。

3 萃取回收率

用空白血浆配置浓度为 1, 5, 10, 30 μg·L⁻¹ 的血样各 5 份,按照样品处理方法操作,记录色谱图。另用流动相配置成相同浓度的样品 5 份,进样,记录色谱图,以前后者色谱图峰比计算萃取回收率,萃取回收率分别为 105% ± 5%, 98.3% ± 0.7%, 97.9% ± 1.3%, 97.4% ± 0.7%, 萃取回收率高,方法简便且有富集浓缩样品的作用。

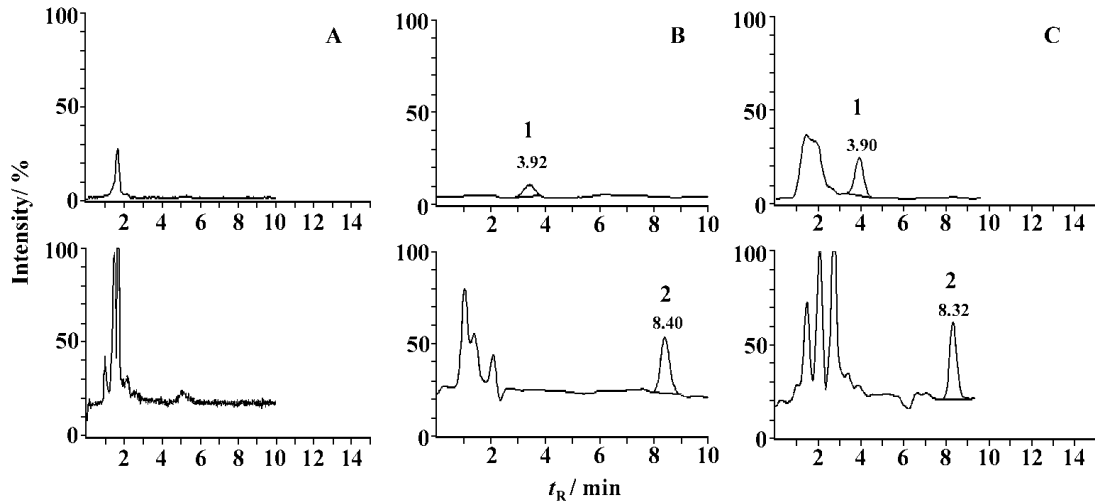


Figure 1 Total chromatograms of blank plasma (A), blank plasma spiked with octreotide (1) and 6,7,4'-OH isoflavone (IS, 2) (B), and plasma samples after an im single dose of 200 µg octreotide

4 方法回收率和精密度

用空白血浆 1 mL, 分别加入奥曲肽 1, 5, 10, 30 ng, 各配制 5 份, 按照样品处理方法操作, 记录色谱图。计算奥曲肽的浓度, 以测得值与加入值之比计算回收率, 并计算日内 RSD, 见表 1。

Table 1 Results of method recovery of octreotide (n = 5)

Added / ng	Detected / ng					Mean recovery / %	RSD / %
	1	2	3	4	5		
1	1.00	1.01	1.03	0.987	0.998	100.5	1.6
5	4.97	4.93	4.99	4.87	4.86	98.5	1.1
10	9.88	9.77	9.76	9.53	9.86	97.6	1.2
30	29.27	29.35	28.36	29.51	29.27	97.1	1.5

用空白血浆配置相当于质量浓度为 1, 5, 10, 30 µg·L⁻¹ 的血样各 2 份, 按照上述方法处理, 进样测定, 连续测定 5 日, 以不同日测得的奥曲肽浓度计算日间 RSD 分别为 4.8%, 4.2%, 3.7%, 2.9%。

5 两种奥曲肽制剂的相对生物利用度

18 名健康志愿者的血药浓度时间曲线见图 2, 主要药动学参数见表 2。方差分析结果表明两制剂的 AUC_{0-7h}, C_{max} 经对数转换后无显著性差别。双单侧 t 检验结果表明两者为生物等效性制剂。以进口药物为参比制剂, 国产奥曲肽的生物利用度为 101% ± 10%。

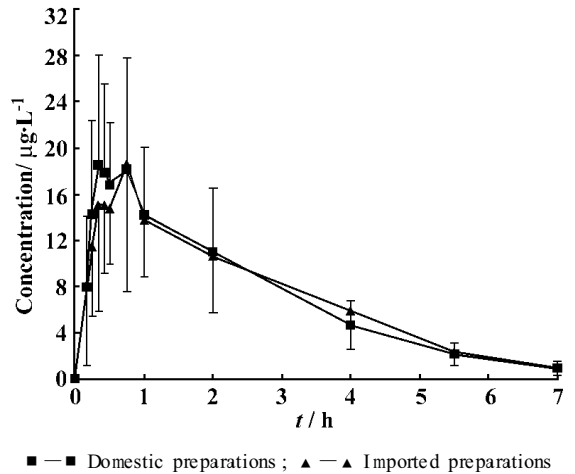


Figure 2 Mean plasma concentration-time curves of octreotide after a single im dose of 200 µg domestic preparations or imported preparations in 18 healthy volunteers

Table 2 Pharmacokinetic parameters of octreotide after a single dose of 200 µg domestic and imported injection (n = 18, $\bar{x} \pm s$)

Parameter	Domestic injection	Imported injection
AUC _{0-7h} / h·µg·L ⁻¹	50 ± 25	50 ± 25
AUC _{0-∞} / h·µg·L ⁻¹	56 ± 25	54 ± 26
C _{max} / µg·L ⁻¹	19 ± 10	19 ± 11
T _{max} / h	0.50 ± 0.15	0.52 ± 0.20
T _{1/2} / h	1.5 ± 0.8	1.5 ± 0.8
F / %	101 ± 10	

讨论

奥曲肽血药浓度的测定方法,国外多采用放射性免疫测定法(RIA)。此方法有较高的灵敏度,但选择性相对较差,易受到代谢产物干扰,且有放射性污染。本法血浆样品经过固相萃取后,采用质谱检测器进行检测,方法简单、干扰少,方法选择性好、回收率高,检测限达到 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本文选择的萃取小柱填料重量为 30 mg,与 10 mg 小柱相比,其萃取回收率高,从而能提高方法灵敏度。

两种制剂在体内均能迅速吸收,代谢过程较快。国内受试者平均血药浓度较国外文献^[2]报道的皮下给药为高,与静脉给药浓度接近,可能与给药途径和人种差异有关。其他药代动力学数据与文献^[3]报道基本相似,国产制剂与进口制剂的 $T_{1/2}$, AUC_{0-7} 经统计学分析均无显著性差异。

18 名志愿者的 C_{max} 和 $\text{AUC}_{0-7 \text{ h}}$ 个体差异较大,但同一名受试者分别 im 试验制剂和参比制剂后的

C_{max} 和 $\text{AUC}_{0-7 \text{ h}}$ 相似。说明奥曲肽 im 应用,其药代动力学参数个体差异较大,临床治疗中应进行治疗药物监测,并制定个体化给药方案^[4]。

备注:本试验由国家药品监督管理局下发临床批件,经四川大学医学伦理委员会批准后进行。

References:

- [1] Siproudhis L, Bellissant E. Octreotide acts on anorectal physiology: a dynamic study in healthy subjects [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1999, **20**(15):475 - 483.
- [2] Nuesch E, Kutz K. Pharmacokinetics of SMS 201-995 in healthy subjects [J]. *Scand J Gastroenterol*, 1986, **21**(suppl 119):65 - 72.
- [3] Shi YF, Zhu XF. Pharmacokinetics of octreotide being administered to patients with acromegalia by subcutaneous [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 1994, **3**(2):45 - 48.
- [4] Comets E, Grass P. Population pharmacodynamic analysis of octreotide in acromegalic patients [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2002, **23**(16):267 - 275.