

非布司他在健康受试者体内的尿药排泄特征

周颖¹, 黎^{2*}, 刘筱雪², 黄瑶², 马鹏程³, 冷晔², 王聪² (1. 江苏万邦生化医药股份有限公司, 江苏 徐州 221004; 2. 中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009; 3. 中国医学科学院皮肤病医院国家药品临床研究机构, 南京 210042)

摘要:目的 建立人尿样中非布司他浓度的液相色谱-质谱联用(LC-MS)测定法,并研究健康中国受试者口服非布司他片后非布司他的尿药排泄特征。方法 尿液样品酸化后用乙酸乙酯提取,进行LC-MS分析。色谱柱为Hedera ODS-2,流动相为甲醇-10 mmol·L⁻¹的醋酸铵水溶液(含0.05%甲酸)(70:30)。12名健康受试者分别单次口服非布司他片80 mg(规格:80 mg)后,测定尿药浓度,计算尿药排泄参数,并进行统计分析。结果 12名健康受试者口服80 mg非布司他后,48 h内的尿药累积排泄量为(2.684 ± 0.838) mg,累积排泄率为(3.4 ± 1.0)%。男性与女性受试者间的累积排泄量和最大排泄速率无显著性差异。结论 非布司他在健康中国受试者体内的尿药排泄参数与已有文献报道的结果基本一致,且不存在性别差异。

关键词:非布司他;液相色谱-质谱联用;药动学;尿药排泄;累积排泄量;累积排泄率

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)19-1513-04

Study on Urinary Excretion Characteristics of Febuxostat in Healthy Chinese Volunteers

ZHOU Ying¹, DING Li^{2*}, LIU Xiaoxue², HUANG Yao², MA Pengcheng³, LENG Ye², WANG Cong² (1. Wanbang Biopharmaceuticals, Xuzhou 221004, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 3. Organization for State Drug Clinical Trials of Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Nanjing 210042, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an LC-MS method for the determination of febuxostat in human urine sample, and to investigate the urinary excretion characteristics of febuxostat in healthy Chinese volunteers. **METHODS** After acidification, the urine sample was extracted with ethyl acetate and separated on a Hanbon Hedera ODS-2-C₁₈ column, with a mobile phase of 10 mmol·L⁻¹ ammonium acetate buffer solution containing 0.05% formic acid-methanol (30:70). Twelve healthy volunteers were given single oral dose of 80 mg febuxostat. The concentrations of febuxostat in urine were determined, and the pharmacokinetic parameters of febuxostat were calculated and compared between male and female volunteers by statistical analysis. **RESULTS** The accumulated amount of febuxostat excreted in urine in 48 h was (2.684 ± 0.838) mg. The accumulated excretion rate was (3.4 ± 1.0)%. The urinary excretion characteristics of febuxostat had no significant difference between the male and the female volunteers. **CONCLUSION** The urinary excretion characteristics of febuxostat in healthy Chinese volunteers is consistent with those reported in literature. There is no significant difference between the male and the female volunteers.

KEY WORDS: febuxostat; LC-MS; pharmacokinetics; urinary excretion; accumulated urine excreted amounts; accumulated excretion rate

非布司他(febuxostat)是新型的非嘌呤类黄嘌呤氧化酶抑制剂,临床上用于预防和治疗高尿酸血症及其引发的痛风。它是新一代安全有效的抗痛风药^[1]。非布司他在健康受试者体内的尿药排泄研究国内尚未有文献报道,国外有文献报道了尿液中非布司他的LC-MS测定法,但灵敏度不高,最低定量限为20 ng·mL⁻¹^[2]。本试验建立了测定人尿液中非布司他浓度的液相色谱-质谱联用(LC-MS)法,最低定量限为1 ng·mL⁻¹,并对健康受试者口服80 mg非布司他片后

的尿药排泄特征进行了研究。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

非布司他片(江苏万邦生化医药股份有限公司,批号:090913,80 mg·片⁻¹);非布司他对照品(重庆医药工业研究院有限责任公司,批号:080701,纯度为99.7%);苯扎贝特对照品(中国药品生物制品检定所,批号:100732-200501,纯度为

作者简介:周颖,女,学士,高级工程师 研究方向:临床药学 * 通讯作者:丁黎,男,博士,教授,博士生导师 研究方向:体内药物分析及药代动力学 Tel: (025) 83271289 E-mail: dinglihg@sina.com

99.3%)。甲醇为色谱纯;实验用水为去离子水;其余试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

Agilent 1100 LC-MS: 双高压泵、自动进样器、柱温箱、电喷雾离子化接口、四极杆质谱检测器等;色谱工作站: Agilent ChemStation(A 10.02)。

1.3 分析条件

色谱条件: 色谱柱为 Hadera ODS-2(2.1 mm × 150 mm, 5 μm, 江苏汉邦科技有限公司); 流动相为甲醇-10 mmol·L⁻¹的醋酸铵水溶液(含 0.05% 甲酸)(70:30); 流速为 0.25 mL·min⁻¹; 柱温为 38 °C。质谱条件: 选择性离子检测(SIM); 电喷雾离子化(ESI); 离子极性为负离子(Negative); 检测离子选择: 非布司他, [M-H]⁻离子, m/z 315.1; 内标(苯扎贝特), [M-H]⁻离子, m/z 360.1; 传输区电压为 70 V; 干燥气流量为 9 L·min⁻¹; 雾化压力为 308.93 kPa; 干燥气温度为 350 °C。

1.4 尿液样品的处理

于 10 mL 玻璃离心管中精密加入尿液样品 1 mL, 内标溶液(苯扎贝特, 51.10 μg·mL⁻¹) 100 μL, 涡旋混匀。加入 1 mol·L⁻¹的盐酸溶液 100 μL 酸化, 涡旋 1 min, 加入 5 mL 乙酸乙酯提取溶剂, 涡旋 3 min, 于 4 000 r·min⁻¹离心 10 min。取上层有机相于另一干净离心管中, 水浴 30 °C 中以氮气流吹干。残渣用 150 μL 流动相溶液溶解, 涡旋 2 min, 于 16 000 r·min⁻¹离心 3 min, 吸取上清液转移至自动进样器样品瓶中, 进样量 4 μL, 进行 LC-MS 分析。

1.5 临床试验方案

12 名健康受试者, 男、女各半, 其中 6 名男性健康受试者年龄(22 ± 2) 岁, 体重(64 ± 6) kg; 6 名女性健康受试者年龄为(22 ± 1) 岁, 体重(56 ± 6) kg。经体检证明肝、肾功能正常, 心电图正常, 均符合受试者入选条件。所有受试者自愿参加试验并签署知情同意书, 试验方案经中国医学科学院皮肤病医院国家药物临床试验机构伦理委员会批准。受试者于试验前 1 周和试验期间禁止吸烟、饮酒或含药物、酒精的饮料, 在试验前两周及试验期间未服用其他任何药物, 试验期间统一饮食。入选受试者于试验前 1 d 进入 期临床试验监护病房, 禁食 10 h。于次日早晨空腹口服受试制剂, 用 200 mL 温开水送服, 4 h 后进统一标准餐(低脂肪饮食)。收集给药前及给药后 0~2、2~4、4~8、8~12、12~24、24~36、36~48 h 各时间段的所有尿液并记录尿量, 然后各取 5 mL 于 -20 °C 保存。

用 LC-MS 测定尿液中非布司他的浓度, 并计算药动学参数。数据和统计学分析采用 DAS2.0 药动学软件计算药动学参数, 主要参数包括最大排泄速率(Max rate), 尿排泄速率达峰时间($t_{max\ rate}$), 累积排泄量(A_e)(0~48 h) 和排泄率(ER), 对主要药动学参数采用 SPSS11.5 软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 非布司他的方法学评价

2.1.1 特异性考察 在本试验所采用的色谱条件下, 非布司他的保留时间约为 4.8 min, 内标苯扎贝特的保留时间约为 3.9 min, 本方法具有较高的特异性, 见图 1。

2.1.2 线性范围 取 10 mL 玻璃离心管数支, 分别精密加入不同浓度的非布司他标准溶液, 以氮气流吹干后加入空白尿液 1 mL, 配成含非布司他分别为 0.001 020、0.005 100、0.020 40、0.102 0、0.306 0、1.020、3.060、6.120、12.24 μg·mL⁻¹ 的标准含药尿液样品, 按“1.4”项下操作并测定, 计算非布司他峰面积 A_s 和内标峰面积 A_i 的比值 f ($f = A_s/A_i$)。以 f 对非布司他尿药浓度 ρ 作权重回归计算, 典型的非布司他回归方程为 $f = 0.200 1\rho + 0.000 157 8$, $r = 0.999 0$, 权重系数 $w = 1/\rho^2$ 。结果表明, 尿液中非布司他在 0.001 020~12.24 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好, 本方法的最低定量限为 0.001 μg·mL⁻¹。

2.1.3 精密度与准确度试验 按标准曲线的配制方法制备含非布司他质量浓度分别为 0.002 550、

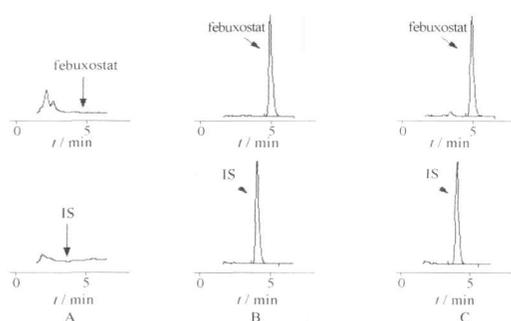


图 1 尿液中非布司他的 LC-MS 色谱图

A - 空白尿液色谱图; B - 空白尿液加入非布司他和内标对照品后的色谱图(非布司他的加入浓度为 3 μg·mL⁻¹); C - 健康受试者口服非布司他 80 mg 后 4~8 h 的尿液样品加内标对照品

Fig.1 LC-MS Chromatograms of februxostat in urine

A - chromatogram of blank urine; B - chromatogram of blank urine spiked with februxostat and the IS (the concentration of februxostat is 3 μg·mL⁻¹); C - chromatogram of urine of volunteer during 4-8 h after oral administration of 80 mg februxostat

0.510 0和 10.20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准含药尿液样品, 每个浓度各配制 5 份样品, 同时配制一条标准曲线, 按“1.4”项下操作, 并进行 LC-MS 分析。共做 3 批样品, 计算精密度和准确度, 结果见表 1。

2.1.4 提取回收率试验 分别配制质量浓度为 0.002 550、0.510 0 和 10.20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的非布司他标准尿液样品及对照样品, 经处理后进样分析, 比较含药血浆样品与对照样品的峰面积。计算求得尿液中非布司他低、中、高 3 个浓度的提取回收率分别为 (84.4 ± 3.8) %、(93.9 ± 1.6) %、(89.4 ± 0.4) %。内标苯扎贝特提取回收率为 (93.2 ± 2.2) %。

2.1.5 介质效应 按文献^[3,4]报道方法考察介质效应 (ME), 结果显示, 非布司他在 0.002 550、0.510 0 和 10.20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3 种质量浓度水平的 ME 平均值分别为 (98.3 ± 5.0) %、(94.8 ± 6.9) % 和 (88.2 ± 1.7) %。内标苯扎贝特的 ME 平均值为 (95.0 ± 4.8) %。该结果表明, 本实验条件下非布司他及其内标的测定不受介质效应干扰。

2.1.6 样本稳定性考察 分别考察了非布司他质量浓度为 0.002 550、0.510 0 和 10.20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准尿液样品于进样器中放置 12 h, 室温下放置 7.5 h, 反复冻融 3 次及冰冻放置 4 周条件下的稳定性。结果表明, 非布司他尿液样品稳定性良好。

2.1.7 残留效应 根据文献^[5]报道方法对残留效应进行评价, 结果表明使用甲醇作为洗针液在进样前对进样针进行冲洗可有效避免残留效应, 结果见图 2。

2.2 药动学研究

2.2.1 80 mg 剂量下非布司他的尿药排泄参数 12 名健康受试者单剂量口服非布司他 80 mg 后的主要尿药排泄参数见表 2。健康受试者单剂量口服非布司他 80 mg 后平均尿药排泄速率-时间曲线见图 3; 不同时间段平均尿药累积排泄百分率-时间曲线见图 4。结果表明, 非布司他在 2~4 h 时间段排泄速率最大, 24 h 后基本排泄完全, 48 h 内有

(3.4 ± 1.0) % 的非布司他从尿中排出。

2.2.2 性别差异对尿排特征的影响 将单剂量给药 80 mg 非布司他后尿液中非布司他的主要尿排参数分别按性别分为 2 组, 进行 *t* 检验。单剂量给药 80 mg 非布司他后男、女受试者各主要尿排参数及其 *t* 检验结果见表 2。检验结果显示, 80 mg 剂量下男女受试者间非布司他的 $t_{1/2}$ 、 $t_{\text{max rate}}$ 、Max rate、 A_e 、ER 均无显著性差异 ($P > 0.05$), 即性别差异对于非布司他尿排特征无显著性影响。

3 讨论

本试验样品处理中主要对直接沉淀和液液提取法进行了考察。这两种方法在特异性、介质效应和提取回收率方面都能符合生物样本分析的要求, 但

表 1 非布司他精密度和准确度试验结果 $.n = 5, \bar{x} \pm s$
Tab.1 Precision and accuracy of the method. $n = 5, \bar{x} \pm s$

ρ_{added} / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Intra-batch RSD/%	Inter-batch RSD/%	Accuracy /%
0.002 550	6.4	11.8	105.7 ± 7.0
0.510 0	4.0	8.2	96.8 ± 6.2
10.20	5.4	6.6	99.9 ± 6.7

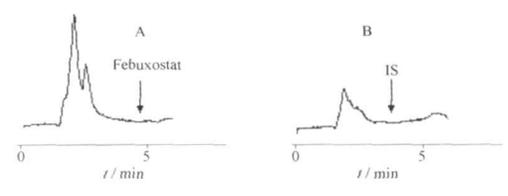


图 2 高浓度 QC 样品 (10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 后的空白血浆样品 LC-MS 色谱图
A - 非布司他; B - 内标; 箭头表示化合物的出峰位置

Fig.2 Representative LC-MS chromatograms of matrix blank samples injected right after the injection of high concentration check sample
A - febuxostat; B - IS; the arrows indicate the peak position of the compounds

表 2 12 名健康受试者口服非布司他 80 mg 后的尿药排泄参数及性别差异统计分析 $\bar{x} \pm s$

Tab.2 Urinary excretion parameter of febuxostat after oral administration of 80 mg febuxostat in 12 healthy volunteers and statistical analysis between male and female volunteers. $\bar{x} \pm s$

Parameter	Data			
	Male and female volunteers (n = 12)	Male volunteers (n = 6)	Female volunteers (n = 6)	P (T test)
$t_{1/2}$ / h	5.3 ± 1.1	4.8 ± 0.7	5.8 ± 1.2	0.091
$t_{\text{max rate}}$ / h	2.5 ± 0.9	2.3 ± 1.0	2.7 ± 0.8	0.549
Max rate / $\text{mg} \cdot \text{h}^{-1}$	0.463 7 ± 0.324 9	0.632 8 ± 0.391 2	0.294 6 ± 0.103 2	0.068
A_e / mg	2.684 ± 0.838	2.936 ± 0.864	2.209 ± 0.815	0.165
ER / %	3.4 ± 1.0	3.7 ± 1.1	2.8 ± 1.0	0.162

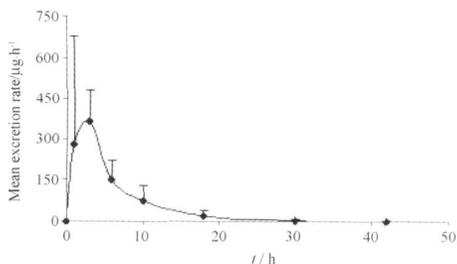


图3 12名健康受试者单剂量口服非布司他80 mg后的平均尿药排泄速率-时间曲线. $n=12, \bar{x} \pm s$

Fig. 3 Mean excretion rate-time curves of febuxostat in human urine after a single oral administration of 80 mg febuxostat in 12 healthy volunteers. $n=12, \bar{x} \pm s$

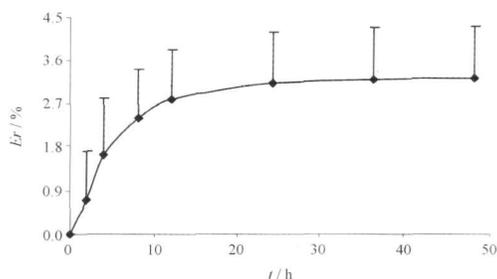


图4 12名健康受试者单剂量口服非布司他80 mg后的不同时间段的平均尿药累积排泄百分率-时间曲线. $n=12, \bar{x} \pm s$

Fig. 4 Mean cumulative excretion rate-time curves of febuxostat in human urine after a single oral administration of 80 mg febuxostat 80 mg in 12 healthy volunteers. $n=12, \bar{x} \pm s$

直接沉淀法不能达到样品测定需要的灵敏度, 因此最终采用加酸后乙酸乙酯液液萃取, 用 LC-MS 测定尿液中非布司他的浓度, 该方法灵敏度高于文献报道的方法。

本试验结果首次阐明了80 mg 剂量下健康中国受试者体内非布司他的尿药排泄特征, 结果表明, 受

试者单次空腹口服非布司他片80 mg 后, 累积排泄量为 (2.684 ± 0.838) mg, 排泄率为 $(3.4 \pm 1.0)\%$ 。该结论与国外文献报道^[2,6]一致。男性受试者与女性受试者间的累积排泄量和最大排泄速率无显著差异。本试验获得的非布司他尿药浓度数据计算得到的尿药排泄速率半衰期($t_{1/2}$)为5.3 h, 尿药排泄速率达峰时间 $t_{\max \text{ rate}}$ 为2.5 h, 其值与文献报道^[7]的由血药浓度数据计算得到的血药浓度半衰期($t_{1/2}$) (4.6 ~ 5.9 h) 和血药浓度达峰时间 t_{\max} (1.8 ~ 2.3 h) 基本一致。

REFERENCES

- [1] JANSEN J L, RICHELLE P, PEREZ-RUIZ F, *et al.* International position paper on febuxostat [J]. *Clin Rheumatol*, 2010, 29(8): 835-840.
- [2] KHOSRAVAN R, GRABOWSKI R A, WU J T, *et al.* Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of febuxostat, a non-purine selective inhibitor of xanthine oxidase, in a dose escalation study in healthy subjects [J]. *Clin Pharmacol*, 2006, 45(8): 821-841.
- [3] GUO X F, DING L, MA P C. Pharmacokinetics and relative bioavailability of compound tranilast tablets [J]. *Pharm Clin Res* (药学与临床研究), 2007, 15(5): 352-356.
- [4] DAI L, DING L K, ZHU T, *et al.* Study on the pharmacokinetics and bioequivalence of vitamin K₁ soft capsules in healthy volunteers [J]. *Pharm Clin Res* (药学与临床研究), 2007, 15(5): 380-383.
- [5] YANG J, DING L, LIU W Y. LC-MS in biomedical analysis: Common issues and counterplan [J]. *Sci Sin (Chimica)* (中国科学: 化学), 2010, 40(6): 611-620.
- [6] BRIAN A, GRABOWSKI B A, REZA KHOSRAVAN, *et al.* Metabolism and excretion of [¹⁴C] Febuxostat, a novel non-purine selective inhibitor of xanthine oxidase, in healthy male subjects [J]. *J Clin Pharmacol*, 2011, 51(2): 189-201.
- [7] KHOSRAVAN R, GRABOWSKI B, WU J T, *et al.* Effect of food or antacid on pharmacokinetics and pharmacodynamics of febuxostat in healthy subjects [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2007, 65(3): 355-363.

(收稿日期: 2010-11-30)

《药学缩略语手册》已出版

由中国药学会编辑工作委员会组织, 韩凤、郑爱莲、刘仁涌等主编的《药学缩略语手册》已经于2010年8月在中国医药科技出版社出版发行, 该书词条来源于我国出版的主要药学、医学刊物和国外著名相关刊物文章, 还适当参考借鉴了药学名词、其他内容相近缩略语词典。

本书收词范围以药学领域为主, 包括药剂学、药物化学、药物分析学、药理学、中药学、生物化学、药物流行病学、药事管理等学科, 兼顾医学、生物学、化学等其他学科。具体词条内容涉及常用药品(精选常用、国家基本用药), 化学试剂(常用氨基酸、糖类、生化试剂), 分析测试仪器及其涉及的方法, 常见疾病名称, 生化检测指标, 生化代谢物质, 常用量符号等。

本书为从事药学研究的大专院校的师生、学生和科研院所、医院、制药企业的科技工作者在论文写作和文献阅读时提供参考。如有需要, 请与中国药学会杂志编辑部联系。免邮寄挂号费用, 定价: 19.00元, 地址: 北京市朝阳区建外大街四号建外SOHO九号楼1803室, 邮编: 100022; 联系人: 蒋奎; 联系电话: 010-58699278-835; E-mail: zgyxzz@cpa.org.cn(请在汇款附言注明您购书的书名、册数、联系电话、发票等)。

[本刊讯]