

HPLC法测定人血清中左乙拉西坦的浓度^Δ

李惠芬^{1*}, 张玉琴¹, 刘彦²(1.天津市儿童医院, 天津 300074; 2.天津市人民医院, 天津 300121)

中图分类号 R969.1; R971⁺.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)14-1272-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.14.09

摘要 目的:建立测定人血清中左乙拉西坦浓度的方法。方法:血样经甲醇去蛋白处理后,采用高效液相色谱法进行测定。色谱柱为SunFire C₁₈,流动相为50 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 4.5)-乙腈(93.5:6.5),流速为1.0 ml/min,检测波长为205 nm。结果:左乙拉西坦血药浓度在2.0~60.0 mg/L范围内线性关系良好($r=0.9997$),最低检测限为0.5 mg/L;低、中、高3种质量浓度血样平均回收率为97.72%、97.67%、97.82%,日内RSD为2.74%、1.86%、1.63%,日间RSD为4.21%、1.88%、2.24%。18例患儿[给药量:左乙拉西坦片30~60 mg/(kg·d)]血药浓度测得值为2.8~20.1 mg/L,平均为(9.53±6.12)mg/L,个体差异大。结论:本方法精密、准确、特异性强、回收率高。

关键词 左乙拉西坦;高效液相色谱法;血药浓度

Determination of Levetiracetam Concentration in Human Serum by HPLC

LI Hui-fen¹, ZHANG Yu-qin¹, LIU Yan²(1. Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300074, China; 2. Tianjin People's Hospital, Tianjin 300121, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of levetiracetam concentrations in human serum. METHODS: Serum samples were deproteinized with methanol. HPLC method was adopted. SunFire C₁₈ column was used with mobile phase consisted of 50 mmol/L phosphate buffer (pH 4.5)-acetonitrile (93.5:6.5) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 205 nm. RESULTS: The linear range of levetiracetam was 2.0-60.0 mg/L ($r=0.9997$), and the lowest limit of detection was 0.5 mg/L; at three concentrations, the average recoveries were 97.72%, 97.67% and 97.82%, respectively; RSD of intra-day were 2.74%, 1.84% and 1.62%; RSD of inter-day were 4.21%, 1.89 and 2.24% respectively. Serum concentrations of levetiracetam were 2.8-20.1 mg/L in 18 children [Levetiracetam tablets 30-60 mg/(kg·d)] with average concentration of (9.53±6.12) mg/L, showing significant individual difference. CONCLUSIONS: The method is precise, accurate and specific with sound recovery.

KEY WORDS Levetiracetam; HPLC; Serum concentration

- [4] 葛绳德.探讨合理应用抗菌药物对于烧伤感染防治的意义[J].中华损伤与修复杂志,2009,4(6):631.
- [5] 郭澄,张剑萍,华雪蔚,等.从处方分析探讨“全国抗菌药物临床应用专项整治活动”的必要性[J].中国药房,2012,23(2):97.
- [6] 王明媚,马建丽,周亮.烧伤的临床用药概述[J].现代中西医结合杂志,2009,18(15):1812.
- [7] Ma YG, Zhao EQ, Ren XH, et al. Distribution of pathogenic bacteria from burn wounds and drug resistance analysis of 531 cases [J]. *Clinical Misdiagnosis & Mistherapy*, 2010, 23(3): 201.
- [8] Mahandaru D, Wardhana A. Nosocomial infection in burn unit of cipto mangunkusumo hospital, Jakarta [J]. *Jurnal Plastik Rekonstruksi*, 2012, 1(3): 352.
- [9] 高玉红,郑瑞,李丰良.我院2004—2011年金黄色葡萄球菌对甲氧西林耐药性的动态变化特征分析[J].中国药房,2012,23(46):4353.
- [10] 蔡倩,刘蕾,艾效曼.我院2007—2011年抗菌药物使用量与细菌耐药性相关性分析[J].中国药房,2012,23(42):3970.
- [11] 缪建春,王辉,钟华.156株铜绿假单胞菌的院内感染分布及耐药性调查[J].中国药房,2006,17(7):524.
- [12] Savas L, Duran N, Savas N, et al. The prevalence and resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units in a university hospital [J]. *Turk J Med Sci*, 2005, 35(5): 317.
- [13] Khosravi AD, Mihani F. Detection of metallo- β -lactamase-producing *pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Ahwaz, Iran [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008, 60(1): 125.
- [14] Beheshti S, Zia M. Bacteriology of burns and antibiogram in an Iranian burn care center [J]. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2011, 5(4): 538.
- [15] 钱兰成,王萍,王江流.整治前后我院住院患者抗菌药物使用强度分析[J].中国药房,2012,23(34):3190.
- [16] 熊丽蓉,刘耀,谢林利,等.我院2006—2011年鲍曼不动杆菌临床分布及耐药性分析[J].中国药房,2012,23(46):4369.
- [17] Yoon J, Urban C, Terzian C, et al. In vitro double and triple synergistic activities of polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(3): 753.

Δ 基金项目:天津市卫生局科技基金资助项目(No.2011KZ35)

* 副主任药师。研究方向:治疗药物监测及临床药学。电话:022-58917007。E-mail:674374659@qq.com

(收稿日期:2012-10-25 修回日期:2013-01-30)

左乙拉西坦(Levetiracetam)为第2代乙酰胆碱激动药,吡咯烷酮衍生物,具有选择性治疗局限性和原发全身性癫痫的独特药理作用,是一种具有良好耐受性且药物相互作用小的新型广谱抗癫痫药物。该药已于2000年4月获得美国FDA批准上市,2007年引入国内,用于治疗癫痫的部分发作、原发性或继发性全身发作,也可以作为肌阵挛的添加治疗^[1-2]。目前测定左乙拉西坦血药浓度的方法主要有高效液相色谱法和浓度液-质联用法^[3]。本试验对其加以改进,建立了测定微量血中左乙拉西坦的高效液相色谱法,为临床安全、有效、合理用药奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

600E系列高效液相色谱仪,含486紫外检测器、EC2000工作站(美国Waters公司)。

1.2 药品与试剂

左乙拉西坦标准品[加拿大TRC(Toronto Research Chemicals)公司,批号:12-YM-175-1,纯度:100.00%];左乙拉西坦片[商品名:开浦兰,UCB pharma S.A(比利时)公司,规格:0.25g,批号:H20110409];乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱:SunFire C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温:25℃;流动相:磷酸盐缓冲液(50 mmol/L, pH 4.5)-乙腈(93.5:6.5);流速:1.0 ml/min;紫外检测波长:205 nm;进样量:20 μl。

2.2 血清样品处理

取标准或待测血清0.025 ml,加甲醇0.075 ml,涡旋振荡1 min,10 000 r/min离心5 min,取上清液20 μl进样分析。采用外标法以峰高或峰面积定量。

2.3 标准贮备溶液的配制

准确称取左乙拉西坦标准品10.0 mg,置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制得1.0 mg/ml的标准贮备溶液。于4℃保存,备用。

2.4 标准样品配制及方法学考察

将无药血清作为空白血清,分别加入不同量的左乙拉西坦标准贮备溶液,配制不同浓度的标准血清样品,以标准样品测定考察方法的线性关系、精密度和回收率。

3 结果

3.1 色谱分离效果

将空白血清、标准样品,经上述样品处理方法处理后,在“2.1”项色谱条件下进样分析,记录色谱图(见图1)。结果,左乙拉西坦色谱峰形对称,分离效果好,保留时间为10.6 min。

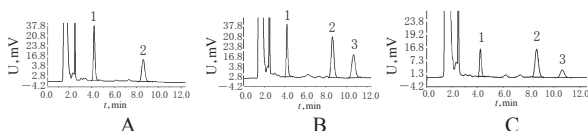


图1 高效液相色谱图

A. 空白血清; B. 空白血清+左乙拉西坦标准品; C. 受试者血清样品; 1、2. 血清中内源性物质; 3. 左乙拉西坦

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank serum; B. blank serum+levetiracetam standard; C. serum samples; 1, 2. serum endogenous substances; 3. levetiracetam

3.2 标准曲线及检测限

配制2.0、6.0、12.0、24.0、36.0、48.0、60.0 mg/L系列质量浓度的标准血清样品,经“2.2”项下方法处理,进样分析,记录色谱。以左乙拉西坦的峰高为应变变量(y),浓度为自变量(x),进行线性回归,得回归方程为 $y=365.3x-157.5(r=0.9997)$ 。结果表明,左乙拉西坦血药浓度在2.0~60.0 mg/L范围内线性关系良好。以信噪比 ≥ 3 考察该药物的最低检出限,结果血清最低检测限为0.5 mg/L。

3.3 精密度试验

配制左乙拉西坦3个质量浓度(12.0、36.0、48.0 mg/L)的血清标准样品5份,当日测定,考察日内精密度;同法,在4℃放置1、2、3、5、7 d测定,考察日间精密度。结果精密度良好,见表1。

表1 精密度及回收率试验结果

Tab 1 Results of precision and recovery tests

质量浓度, mg/L	日内精密度(n=6)		日间精密度(n=6)		加样回收率(n=3)	
	$\bar{x} \pm s, \text{mg/L}$	RSD, %	$\bar{x} \pm s, \text{mg/L}$	RSD, %	$\bar{x} \pm s, \%$	RSD, %
12.0	11.82±0.32	2.70	12.09±0.51	4.21	97.72±2.68	2.73
36.0	36.11±0.67	1.86	36.15±0.68	1.88	97.67±1.92	1.96
48.0	49.18±0.80	1.63	48.58±1.09	2.24	97.82±1.19	1.22

3.4 加样回收率试验

将同一血清标本,分别加入12.0、36.0及48.0 mg/L 3个浓度的标准血清样本3份,做回收率试验,结果见表1。

3.5 干扰试验

在上述色谱条件下,分析多种临床上常与左乙拉西坦合用的抗癫痫药物。结果,拉莫三嗪、卡马西平、奥卡西平、丙戊酸、苯妥英钠、苯巴比妥、地西洋、氯硝安定等均不干扰左乙拉西坦的测定。

3.6 血药浓度测定

临床上口服左乙拉西坦达稳态的患儿[左乙拉西坦片30~60 mg/(kg·d)],于晨服药前取血1.0 ml,进行血药浓度测定。结果,18例患儿血药浓度测定值为2.8~20.1 mg/L,平均为(9.53±6.12) mg/L,个体差异较大。

4 讨论

左乙拉西坦符合理想的抗癫痫药物药动学特点,口服吸收迅速,生物利用度接近100%,与蛋白结合 $<10\%$,可迅速通过血脑屏障,呈线性药动学特点;不经肝脏代谢,不诱导细胞色素P₄₅₀酶,以原型经肾脏排泄,与其他药物无相互作用,安全性好。国外已应用于儿童及成人各种类型的癫痫单药治疗和添加治疗,有很好的疗效和安全性。《国际治疗药物监测抗癫痫药物治疗指南》认为在特殊人群(儿童、老年人、孕妇)服用抗癫痫药物时有必要对所有药物进行治疗药物监测^[4]。

本文建立的以高效液相色谱法测定左乙拉西坦血药浓度的方法,是在参考文献^[9]基础上加以改进的。筛选色谱条件时,对左乙拉西坦溶液在190~400 nm波长范围内进行光谱扫描,左乙拉西坦只有末端吸收,经205、210、214 nm波长处左乙拉西坦色谱峰对比优化,最终选用205 nm为检测波长;流动相选用磷酸盐缓冲液(pH 4.5)和乙腈,调节两者的比例,使保留时间为10 min左右,左乙拉西坦主峰与血清中内源性物质峰有较好的分离度;固定相的选择以SunFire C₁₈柱较Symmetry C₁₈柱色谱行为更优。总之,该方法色谱分离理想、线性关系良好、精密、准确、特异性强、回收率高、操作简便,适用于临床血药浓度监测。本试验为癫痫患儿合理用药、促进个体化药物治疗、提高癫痫的控制率奠定了基础。

参考文献

复方对乙酰氨基酚 II 胶囊溶出度和人体生物等效性研究^Δ

余春梅*, 周成林, 徐洁, 陈兰, 罗宏, 蒲道俊[#](西南药业股份有限公司药物研究所, 重庆 400038)

中图分类号 R969.1; R971*.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)14-1274-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.14.10

摘要 目的: 研究复方对乙酰氨基酚 II 胶囊的溶出度, 并考察其与上市片剂的人体生物等效性。方法: 溶出度测定方法采用 2010 年版《中国药典》(二部)附录 X C 第一法, 以盐酸溶液为溶出介质, 转速 100 r/min, 检测波长 273 nm; 生物等效性采用随机双交叉试验, 18 名健康受试者分别单剂量口服复方对乙酰氨基酚 II 胶囊(受试制剂)与片剂(参比制剂)后, 用高效液相色谱串联质谱电喷雾(HPLC-MS/MS)法测定血药浓度, 计算药动学参数, 评价生物等效性。结果: 受试制剂与参比制剂中对乙酰氨基酚和咖啡因在 15 min 时的累积溶出量 > 85%, 异丙安替比林相似因子(f_2) = 85; 受试制剂相对于参比制剂的生物利用度分别为对乙酰氨基酚(103.2 ± 11.3)%、异丙安替比林(108.0 ± 29.5)%、咖啡因(110.1 ± 48.3)%。结论: 两种制剂的体外溶出行为相似, 体内生物等效。

关键词 复方对乙酰氨基酚 II 胶囊; 咖啡因; 异丙安替比林; 溶出度; 生物等效性

Study on the Dissolution of Compound Paracetamol II Capsules and Bioequivalence in Healthy Volunteers
YU Chun-mei, ZHOU Cheng-lin, XU Jie, CHEN Lan, LUO Hong, PU Dao-jun (Institute of Drug Research, Southwest Pharmaceutical Co., Ltd., Chongqing 400038, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the dissolution of Compound paracetamol II capsules and bioequivalence of it and tablet on the market. METHODS: First method of appendix in 2010 edition of *Chinese Pharmacopoeia* (part II X C) was adopted in the determination of dissolution, which was as follows: hydrochloric acid solution as medium; rotation speed of 100 r/min; detection wavelength of 273 nm. By randomized crossover study of bioequivalence, 18 healthy volunteers were given Compound paracetamol II capsules (test preparation) and Compound paracetamol II tablets (reference preparation). The blood concentration of paracetamol was determined by HPLC-MS/MS. RESULTS: The accumulative dissolution of paracetamol and caffeine in two preparations exceeded 85% in 15 mins; similarity factor (f_2) of propyphenazone was 85; the relative bioavailability of test preparation to reference preparation were (103.2 ± 11.3)% for paracetamol, (108.0 ± 29.5)% for propyphenazone and (110.1 ± 48.3)% for caffeine. CONCLUSIONS: *In vitro* dissolution behavior of two preparations is similar, and two preparations are bioequivalent *in vivo*.
KEY WORDS Compound paracetamol II capsules; Caffeine; Propyphenazone; Dissolution; Bioequivalence

复方对乙酰氨基酚 II 胶囊疗效确切, 退热镇痛作用明显, 不良反应较同类品种小, 广泛应用于解热镇痛。本品处方中含对乙酰氨基酚、异丙安替比林和无水咖啡因 3 种成分: 对乙酰氨基酚和异丙安替比林系通过抑制中枢神经系统的前列腺素合成产生镇痛作用; 无水咖啡因因为中枢兴奋药, 可收缩脑血管、减少脑血管搏动幅度从而增强镇痛效果; 解热作用系通过下视丘体温调节中枢而起作用。国内外主要将其用于治疗各类疼痛症, 如头痛、牙痛、月经痛、神经痛、风湿痛等。笔者根据已经建立的复方对乙酰氨基酚 II 胶囊的溶出度测定方法, 对自制的胶囊和已上市销售的片剂进行了溶出曲线的对比研究, 同时进行了两者的生物等效性研究, 为全面评价研究制剂的科学性、工艺合理性、临床的安全有效性提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

HP1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); API3000 三重四极杆质谱仪, 配有电喷雾离子源(美国 Applied Biosystems 公司); ZRS-8C 智能溶出度仪(天津大学仪器厂); Mettler-AB204 电子天平(瑞士 Mettler 公司)。

1.2 药品与试剂

受试制剂: 复方对乙酰氨基酚 II 胶囊(本课题组开发研制, 规格: 每粒含对乙酰氨基酚 125 mg、异丙安替比林 75 mg、无水咖啡因 25 mg, 批号: 20110701); 参比制剂: 复方对乙酰氨基酚片(II)(西南药业股份有限公司上市销售品种, 规格: 每片含对乙酰氨基酚 250 mg、异丙安替比林 150 mg、无水咖啡因

- [1] 罗湘冀. 左乙拉西坦的合成[J]. 药学进展, 2004, 28(9): 413.
[2] Engel Jr J. IIAE Commission Report. A proposed diagnostic

^Δ 基金项目: 国家重大新药创制专项“大品种技术改造”资助项目(No. 2011ZX09201-101-26)

* 高级工程师, 硕士。研究方向: 新药研究和质量研究。电话: 023-89855604。E-mail: ycm63318505@sina.com

[#] 通信作者: 正高级工程师, 硕士。研究方向: 新药研究。电话: 023-89855225。E-mail: pudaojun@163.net

scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: Report of the ILAE task force on classification and terminology[J]. *Epilepsia*, 2001(42): 796.

- [3] 王颖慧, 魏敏吉, 王云秀, 等. 高效液相色谱法测定左乙拉西坦血药浓度[J]. 儿科药学杂志, 2010, 16(4): 34.
[4] 王颖慧, 王丽. 抗癫痫新药的治疗药物监测进展[J]. 儿科药学杂志, 2010, 16(3): 51.

(收稿日期: 2012-10-30 修回日期: 2013-01-22)