

HPLC法测定人血浆中恩他卡朋的浓度

胡松^{1*}, 刘宝礼², 张耕^{1#}(1. 武汉市第一医院, 武汉 430030; 2. 武汉市石化医院, 武汉 430082)

中图分类号 R969.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)02-0134-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.02.13

摘要 目的: 建立测定人血浆中恩他卡朋浓度的方法。方法: 血样采用正己烷处理后, 以高效液相色谱法测定。色谱柱为 Thermo C₁₈, 流动相为 20 mmol/L 磷酸二氢钠 (pH 2.9)-乙腈 (66:34), 流速为 1 ml/min; 柱温为 30 ℃。结果: 恩他卡朋血药浓度在 19.60~1 960 ng/ml 范围内线性关系良好 ($r=0.999\ 3$)。低、中、高 3 种浓度相对回收率分别为 98.50%、98.23%、100.71%, 日内、日间 RSD < 10%。结论: 本方法快速、简便、灵敏准确, 可用于恩他卡朋血浆中浓度的测定以及药动学研究。

关键词 高效液相色谱; 恩他卡朋; 血药浓度; 帕金森病

Determination of the Concentration of Entacapone in Human Plasma by HPLC

HU Song¹, LIU Bao-li², ZHANG Geng¹(1. Wuhan Municipal First Hospital, Wuhan 430030, China; 2. Wuhan Petrochemical Hospital, Wuhan 430082, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To determine the concentration of entacapone in human plasma. METHODS: Blood samples were treated with n-hexane. HPLC method was adopted. The determination was performed on Thermo C₁₈ column with mobile phase consisted of 20 mmol/L monometallic sodium orthophosphate (pH 2.9)-acetonitrile (66:34) at the flow rate of 1 ml/min. The column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear range of entacapone was 19.60-1 960 ng/ml ($r=0.999\ 3$). The average recoveries were 98.50%, 98.23% and 100.71% for low, medium and high concentrations, and RSD of intra-day and inter-day were all lower than 10%. CONCLUSIONS: The method is rapid, simple, sensitive and accurate for the determination of plasma concentration and pharmacokinetic study of entacapone.

KEYWORDS HPLC; Entacapone; Plasma concentration; Parkinson's disease

恩他卡朋属于儿茶酚-O-甲基转移酶 (COMT) 抑制剂, 它是一种可逆的、特异性的、主要作用于外周的 COMT 抑制剂。其通过抑制 COMT 酶减少左旋多巴代谢为 3-氧位-甲基多巴 (3-OMD), 可使左旋多巴的生物利用度增加, 并增加脑内可利用的左旋多巴总量。恩他卡朋可作为左旋多巴/苄丝肼或左旋多巴/卡比多巴的辅助用药, 用于治疗以上药物不能控制的帕金森病及剂末现象 (症状波动)。笔者建立了人体血浆中恩他卡朋的高效液相色谱 (HPLC) 法, 可用于恩他卡朋片的人体药动学和生物等效性研究。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A 高效液相色谱仪, 包括 SPD-M20A 检测器、

CBM-20A 工作站 (日本岛津公司); AB204-N 型万分之一电子天平 (瑞士梅特勒公司); LG-80 型离心机 (上海安亭医学仪器有限公司); SK-1 型快速混匀器 (上海沪西分析仪器有限公司);

1.2 药品与试剂

盐酸恩他卡朋对照品 (美国 Sigma 公司, 批号: 15u0765, 含量: 99.9%); 内标: 塞来昔布对照品 (中国药品生物制品检定研究院, 批号: 110982-000516, 含量: 100%); 甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂为分析纯。空白人血浆由本院血库提供。

2 方法^[1-2]与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 20 mmol/L 磷酸二氢钠 (pH 2.9)-乙腈 (66:34); 流速: 1 ml/min; 柱

度的 LC-MS/MS 法, 该法血浆处理方法操作简便, 流动相采用乙腈-水系统梯度洗脱, 减少了配制流动相的烦琐, 并保证了灵敏度和重复性, 可满足临床药动学大样本分析的要求。

血药浓度数据经 DAS2.1.1 等软件统计分析显示, 受试制剂与参比制剂在健康人体内的过程基本相似, 血浆中的氟氯西林的主要药动学参数和文献^[1]所报道的结果基本一致, 而与文献^[2-4]所报道的结果不一致, 笔者认为可能与地区人群差异等因素有关。

对氟氯西林的主要药动学参数进行对数转换, 方差分析表明, 受试制剂与参比制剂间无显著性差异; 经双向单侧 *t* 检验和

[1-2α] 置信区间检验, 氟氯西林的 C_{max} 、 AUC_{0-24h} 均落在标准置信区间范围内, 表明两制剂在吸收程度上具有生物等效性。

参考文献

- [1] 毕悦, 胡艳玲, 孙璐, 等. 液相色谱-串联质谱法测定人血浆中氟氯西林的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(5): 384.
- [2] 郑恒, 李红梅, 方淑贤. 注射用氟氯西林钠的药动学[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(2): 208.
- [3] 董卫华, 董亚琳, 郑鑫, 等. 氟氯西林钠胶囊在健康人体的生物等效性[J]. 中国临床药理学杂志, 2007, 23(1): 41.
- [4] 阮邹荣, 周权, 袁虹, 等. 氟氯西林钠胶囊在中国人体的药动学和生物等效性评价[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(9): 699.

(收稿日期: 2013-04-13 修回日期: 2013-05-13)

* 副主任药师, 硕士。研究方向: 天然药物研究。电话: 027-85332413。E-mail: huyaoshi@sina.com

通信作者: 主任药师, 硕士。研究方向: 新制剂研究。电话: 027-85332089。E-mail: zhanggen888@126.com

温:30℃;检测波长:315 nm;进样量:40 μl。

2.2 溶液的制备

分别准确称取盐酸恩他卡朋对照品 9.8 mg 和塞来昔布对照品 11.2 mg,各置于 100 ml 量瓶,加甲醇-水(50:50, V/V)溶解并稀释至刻度,振荡摇匀,得到 98 μg/ml 的盐酸恩他卡朋贮备液和 112 μg/ml 的塞来昔布贮备液,置于 4℃ 冰箱保存备用。临用前用 50% 甲醇稀释成标准曲线系列溶液、质控溶液和内标溶液。

2.3 血浆样品的处理

取血浆 1 ml 于 10 ml 离心管中,加 56 ng/ml 的塞来昔布内标溶液 20 μl,涡旋振荡 10 s,加入 0.5 mol/L 醋酸钠缓冲液(pH 4.2) 100 μl,混匀 30 s,加入萃取剂正己烷 3 ml,涡旋振荡 2 min,以离心半径为 8 cm、3 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液至另一洁净离心管中,余液再加入 3 ml 正己烷,重复以上步骤;合并两次上清液,40℃ 水浴用氮气吹干,残渣用流动相 100 μl 溶解后进样 40 μl。

2.4 方法专属性

在选定的色谱条件下,血浆中内源性杂质对测定无干扰,盐酸恩他卡朋与内标峰形良好,分离完全,其保留时间分别为 4.4 min 和 8.1 min。色谱图见图 1。

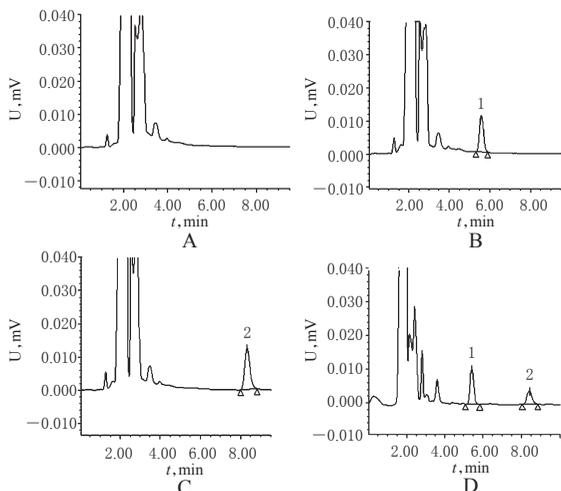


图 1 高效液相色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+恩他卡朋对照品溶液; C. 空白血浆+塞来昔布对照品溶液; D. 服药后 2 h 血浆样品; 1. 恩他卡朋; 2. 塞来昔布

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma+entacapone control; C. blank plasma+celecoxib control; D. plasma sample 2 h after medication; 1. entacapone; 2. celecoxib

2.5 标准曲线与定量下限考察

取空白血浆 980 μl,加入恩他卡朋标准曲线系列溶液 20 μl,配制相当于恩他卡朋血浆浓度为 19.6、58.8、196、490、980、1 960 ng/ml 的样品,按“2.3”项下方法操作,取 40 μl 进样分析,记录色谱图。以恩他卡朋浓度(x)为横坐标、待测物与内标物的峰面积比值(y)为纵坐标绘制标准曲线,求得直线方程为: $y=0.0075x-0.1692$ ($W=1/x^2, r=0.9993$)。结果表明,恩他卡朋血药浓度在 19.6~1 960 ng/ml 范围内线性关系良好。另取空白血浆 980 μl,加入 980 ng/ml 恩他卡朋对照品溶液 20 μl,配制相当于恩他卡朋血浆浓度为 19.6 ng/ml 的样品,在方法确证第 1 天对该浓度样品进行 5 样本分析,并根据当日标准

曲线计算每一样本测得浓度。结果该浓度下恩他卡朋的偏差均小于 ±20%,表明本法测定血浆中恩他卡朋的定量下限可达 19.6 ng/ml。

2.6 方法回收率及精密性

配制 58.8、490、1 568 ng/ml 的血浆样品溶液各 5 份,按“2.3”项下方法处理,连续测定 3 d,考察精密性及回收率试验,结果见表 1。

表 1 精密性及回收率试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Results of precision and recovery test($\bar{x} \pm s, n=5$)

加入量, ng/ml	日内 RSD, %		日间 RSD(%)		相对回收率, %
	测得量, ng/ml	RSD, %	测得量, ng/ml	RSD, %	
58.8	57.92 ± 2.13	5.78	58.14 ± 2.59	4.14	98.50 ± 2.75
490	481.33 ± 16.10	4.87	467.09 ± 12.39	4.21	98.23 ± 2.47
1 568	1 579.07 ± 41.02	3.59	1 521.39 ± 34.69	3.84	100.71 ± 2.54

2.7 样品的稳定性考察

取 58.8、490、1 568 ng/ml 的恩他卡朋血浆样品,分别考察室温放置 6 h、反复冻融 3 次及冷冻 20 d 的稳定性,按“2.3”项下方法操作后进样,分别测定恩他卡朋与内标的峰面积比,再由标准曲线计算出恩他卡朋的血药浓度。结果血浆样品在上述条件下其血药浓度无明显变化。稳定性试验结果见表 2。

表 2 稳定性试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 2 Results of stability test($\bar{x} \pm s, n=5$)

加入量, ng/ml	测得量, ng/ml			
	第 1 天	室温放置 6 h	反复冻融 3 次	冷冻 20 d
58.8	57.92 ± 2.13	56.57 ± 2.61	53.68 ± 2.24	56.49 ± 2.31
490	481.33 ± 16.10	469.36 ± 13.14	470.14 ± 17.58	478.96 ± 15.84
1 568	1 579.07 ± 41.02	1 558.62 ± 37.08	1 560.12 ± 47.39	1 559.56 ± 30.43

2.8 药理学试验设计

本试验经我院伦理委员会批准后进行。受试者了解试验内容后自愿受试,并签署知情同意书。共纳入健康受试者 12 例,男、女各半,年龄 18~28 岁,体质量指数 19~24。受试者经全面体检合格,血尿常规、肝功能检查及心电图检查正常。受试者禁食 10 h,次日晨空腹口服恩他卡朋片 0.2 g,服药后按时间点采血。血样置肝素化的离心管中,离心分离血清,所得血浆于 -20℃ 保存待测。试验期间统一用低脂肪标准餐。受试期间禁止剧烈活动,禁止吸烟、饮酒及含酒精、咖啡因类饮料,试验期间禁用一切非试验药物。

2.9 样品的测定

取样品血浆 0.2 ml 于 EP 管中,按“2.3”项下方法操作,计算恩他卡朋血药浓度,绘制药-时曲线见图 2。以 DAS 2.0 软件进行药动学拟合,主要药动学参数见表 3。

3 讨论

恩他卡朋作为左旋多巴的辅助药物用于治疗帕金森病患者的“剂末现象”,疗效明显而且安全性较高。随着我国人口老龄化,帕金森病患者的人数也呈逐年上升的趋势,恩他卡朋可以显著提升患者的生存质量,为帕金森病的治疗提供了一个新的发展方向。恩他卡朋的专利保护将于 2013 年失效,届时国内将会有仿制品陆续出现。本文结合临床使用情况,建立了人血浆中恩他卡朋的 HPLC 测定法,目前国内尚未见文献报道,可为国内仿制药的研究提供依据。

恩他卡朋由于脂溶性较大,所以虽然体内浓度较高,但无法使用沉淀蛋白的方法处理血样,而是使用正己烷萃取浓缩的方法。为了提高提取率,本文采取多次萃取、最后合并萃取

我院2011—2012年164例次地高辛血药监测浓度回顾性分析

朱春香*, 罗万慰, 夏军, 杨玉亚, 张海燕*(江苏大学附属武进医院药剂科, 江苏常州 213002)

中图分类号 R972;R969.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)02-0136-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.02.14

摘要 目的:监测地高辛血药浓度,为临床安全、有效、合理使用地高辛提供参考依据。方法:采用均相酶扩大免疫分析法,对2011—2012年我院164例次地高辛血药浓度进行监测。回顾性分析年龄、性别、病理状态、服药剂量、频次以及联合用药对地高辛血药浓度的影响。结果:监测数据在一般参考治疗浓度范围内占59.1%,平均血药浓度为 (1.22 ± 0.42) ng/ml,达到中毒浓度者占32.9%。年龄的增长、肾功能的减退、日剂量增加均可升高地高辛血药浓度,女性患者的血药浓度比男性患者略高,合并用药与地高辛血药浓度也有一定的相关性。结论:地高辛血药浓度的个体差异性较大,应结合患者生理病理、用药情况、血药浓度监测数据,综合评估地高辛药物浓度与其临床疗效的关系,制订个体化的给药方案,切实保证临床用药的合理性、安全性、有效性。

关键词 地高辛;血药浓度监测;影响因素;个体化给药

Respective Analysis of 164 Cases of Blood Concentration Monitoring of Digoxin in Our Hospital during 2011—2012

ZHU Chun-xiang, LUO Wan-wei, XIA Jun, YANG Yu-ya, ZHANG Hai-yan (Dept. of Pharmacy, Wujin Hospital of Jiangsu University, Jiangsu Changzhou 213002, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To monitor blood concentration of digoxin, and to provide reference for safe, effective and rational use of digoxin in the clinic. **METHODS:** Homogeneous enzyme expand immunoassay was adopted to monitor 164 cases of blood concentration of digoxin in our hospital from 2011 to 2012. The effects of age, gender, pathological conditions, drug dose and frequency, drug combination on blood concentration of digoxin were analyzed. **RESULTS:** The results showed that 59.1% were within the normal referenced concentration range, with average concentration at (1.22 ± 0.42) ng/ml, and 32.9% reached toxic concentration. Age, decreasing of renal function, increasing daily dose could increase blood concentration of digoxin; the blood concentration of digoxin in female patients were slightly higher than in male; drug combination was also associated to blood concentration of digoxin. **CONCLUSIONS:** Due to individual difference of digoxin, we should consider about patients' physiology and pathology, drug use and blood concentration monitoring data, comprehensively evaluate the relationship between digoxin concentration and its clinical efficacy, and finally develop individualized dosing regimen to ensure reasonable, safe and effective clinical drug use.

KEYWORDS Digoxin; Blood concentration monitoring; Influential factors; Individual administration

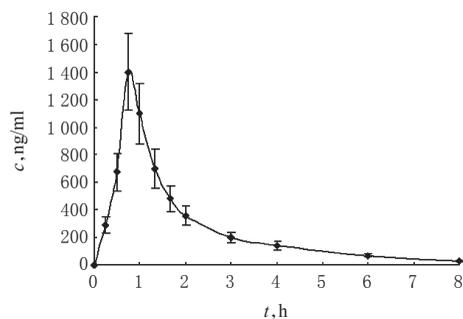


图2 受试者单次口服恩他卡朋片200 mg后恩他卡朋平均药-时曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time curves of entacapone in healthy volunteers after single dose of Entacapone tablet 200 mg

液的方法,虽然过程较为烦琐,但可以获得较满意的结果。恩他卡朋的最大吸收波长在315 nm附近,而且正己烷的极性非常小,所以血浆中杂质比较少,恩他卡朋和内标与血浆杂质之

* 药师,硕士。研究方向:临床药学。电话:0519-85579117。E-mail: baxia_zcx@163.com

通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:临床药学。电话:0519-85579117。E-mail: zhyuan66@hotmail.com

表3 受试者单次口服恩他卡朋片200 mg后恩他卡朋平均药-时动力学参数

Tab 3 Mean pharmacokinetic parameters of entacapone in healthy volunteers after single dose of Entacapone tablet 200 mg

药动学参数	结果
峰浓度(c_{max}), ng/ml	1405.17 ± 191.27
达峰时间(t_{max}), h	0.91 ± 0.26
半衰期($t_{1/2}$), h	0.5
AUC_{0-8h} , $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$	3528.19 ± 899.53
$AUC_{0-\infty}$, $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$	3831.01 ± 689.41

间能良好分离。综上所述,本文测定血浆中恩他卡朋的方法具有灵敏度高、专属性强、对仪器要求较低的特点,回收率及日内、日间精密性均符合人体药理学试验的要求,适用于人体药理学和生物等效性研究。

参考文献

- [1] 袁莉娟, 纪立伟. 抗帕金森病药物恩他卡朋的药理作用与临床评价[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(2): 171.
- [2] Yadava M, Dixit P, Trivedi V, et al. Chromatographic separation of (E)- and (Z)-isomers of entacapone and their simultaneous quantitation in human plasma by LC-ESI- MS/MS[J]. *Journal of Chromatography B*, 2009(877): 533.

(收稿日期:2013-09-09 修回日期:2013-10-10)