

# 一种快速检测依达拉奉血浆浓度方法的建立及其应用

豆大海,李浩,陈安九,唐茜,张宏文,方云茜,王永庆\*

(南京医科大学第一附属医院临床药理研究室,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:建立一种快速测定人血浆中依达拉奉浓度的 HPLC-UV 方法,并将其应用于依达拉奉静脉输注后的药动学研究。方法:色谱条件:色谱柱为 Thermo Synchronis C18 column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm USA),柱温为 30℃;流动相为 0.05%醋酸铵-甲醇(55:45, V/V),流速为 1.0 ml/min;检测波长为 240 nm。结果:在线性范围 30.1~6 017.2 ng/ml 内,检测方法回收率高、稳定可靠。10 例健康志愿者静脉输注单剂量依达拉奉 30 mg 后 C<sub>max</sub> 为(2.38 ± 0.32)μg/ml 及 AUC<sub>0-τ</sub> 为(5.17 ± 0.93)mg·h/L, t<sub>1/2</sub> 为(2.25 ± 0.42)hr。结论:本研究建立的 HPLC-UV 法稳定可靠,可用于依达拉奉的人体药动学研究。

**[关键词]** 依达拉奉;高效液相色谱法;药动学

**[中图分类号]** R969.1

**[文献标志码]** B

**[文章编号]** 1007-4368(2013)12-1786-03

doi:10.7655/NYDXBNS20131240

游离自由基被认为是最具伤害性的因素之一,能够引起心血管疾病,癌症及神经退化性疾病等。游离自由基清除剂指的是能够清除游离自由基的化学物质,如维生素,矿物质或酶。尽管临床上有许多游离自由基清除剂,但是只有很少(包括 NXY-059,替拉扎特和依达拉奉)用于治疗缺血性中风<sup>[1]</sup>。其中仅依达拉奉在临床上被广泛用于保护组织在急性缺血性中风后免受缺血性再灌注伤害<sup>[2-3]</sup>。

文献报道有多种方法用于检测依达拉奉血浆浓度,如 LC-MS/MS 及 GC-MS<sup>[4]</sup>,这 2 种方法可行但都有其局限性,如 LC-MS/MS 法的线性范围较窄,当浓度 > 500 ng/ml 时则不成线性相关<sup>[4]</sup>;而 GC-MS 法对大部分实验室而言不常用,其使用受到仪器条件的限制。而且依达拉奉遇空气很不稳定,因此建立一种快速、稳定的测定人血浆中依达拉奉浓度的方法非常必要。本课题旨在建立一种新的、快速测定血浆中依达拉奉浓度的 HPLC-UV 法,并将其应用于依达拉奉在健康受试者体内药动学研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81273274;81273593);科技重大专项“呼吸病新药临床评价研究技术平台建设”项目(2011ZX09302-003-02);江苏省药物与医疗器械临床评价研究服务中心提升项目(BM2011017)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail:wyqjsh@hotmail.com

依达拉奉对照品(批号:100620-200401;规格:100 mg,中国药品生物制品检定所);保存条件:遮光,密闭保存。试验用水:去离子水;甲醇、乙腈:为色谱纯(Merck Company)。

岛津高效液相色谱仪(2010)(含:四元泵、自动进样器、柱温箱、紫外检测器、低温样品池);色谱工作站:LC Solution;超纯水器(Milli-Q Gradient A10, Millipore Inc, 美国)。pH 计(Delta 320-S 型,上海梅特勒-托多利仪器有限公司);低温高速离心机(TGL-16G 型,上海安亭科学研究所);电子天平[Storius BP-211D, Max = 210 g, d = 0.01 mg (80 g), d = 0.1 mg (210 g)];低温冷冻冰箱:SANYO Ultra Low (MDF-382E)。

### 1.2 方法

色谱柱为 Thermo Synchronis C18 column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm USA),柱温为 30℃;流动相为 0.05%醋酸铵-甲醇(55:45, V/V),流速为 1.0 ml/min;检测波长为 240 nm。

取血浆 0.18 ml 于 1.5 ml 离心管中,加入 20 μl 依达拉奉甲醇对照品溶液,涡旋 5 s,边涡旋边加入 40 μl 高氯酸溶液(30%),继续涡旋 40 s,16 000 r/min 离心 6 min(4℃),取上清液置进样瓶中,进样 20 μl。

## 2 结果

### 2.1 样品的色谱行为(特异性)

在本试验所采用的色谱条件下,依达拉奉具有较高的特异性,灵敏度较高,峰形良好,内源性干扰

不影响色谱峰。依达拉奉的保留时间为 7.3 min, 典型色谱图见图 1。

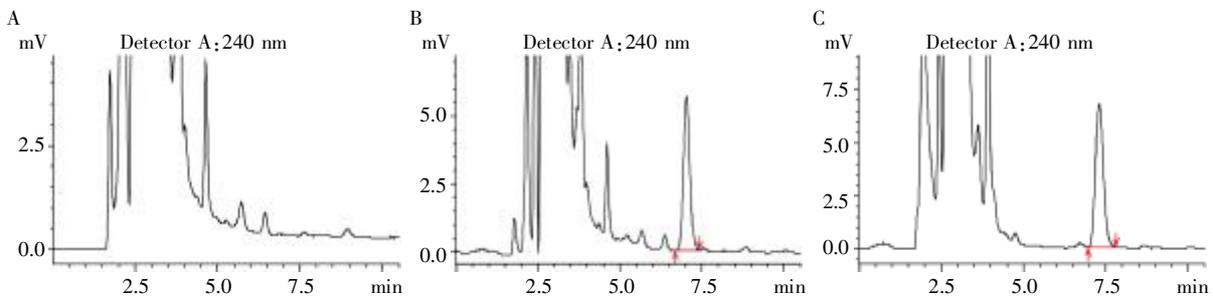
### 2.2 血浆中依达拉奉定量下限的确定

取 1.5 ml 离心管数支, 分别精密加入 20  $\mu$ l 不同浓度的依达拉奉对照品溶液, 旋涡混匀, 配成含依达拉奉浓度分别为 30.1、75.2、150.4、376.1、752.2、1 504.3、3 008.6、6 017.2 ng/ml 的标准含药血浆, 按“血浆样品的处理”项下操作, 制备标准曲线, 并同时制备空白血浆样品, 进行 HPLC-UV 分析, 记录色谱图, 以依达拉奉峰面积  $A_s$  对血药浓度  $C$  作权重回归计算, 结果以平均峰面积对血药浓度  $C$  作权重回归计算, 得回归方程:  $f = 25.194 + 50.545 \times C, r = 1.0$  (权重系数:  $w=1/y$ )。

本方法测定血浆中依达拉奉的定量下限为 30.1 ng/ml, 定量下限准确度在 90%~110% 范围内, 相对标准差 (RSD) < 15%。

### 2.3 准确度和精密度试验

取 1.5 ml 离心管数支, 按“血浆中依达拉奉标准曲线制备方法”制备含依达拉奉浓度分别为 75.2、1 504.3、5 716.4 ng/ml 的标准含药血浆, 每个浓度各配制 5 份样品, 按“血浆样品的处理”项下操作。共做 3 个分析批, 每批每个浓度做 5 份样品, 记录色谱图, 计算依达拉奉面积  $A_s$ , 代入标准曲线求得实测浓度及实测浓度准确度, 计算批内和批间精密度 (表 1), 批内和批间质控样品的 RSD 均 < 15%, 精密度符合要求。



A: 空白血浆样品; B: 空白血浆加入依达拉奉 (1 500 ng/mL); C: 受试者静脉给依达拉奉注射液 (30 mg) 后 30 min 血浆中依达拉奉色谱图。

图 1 依达拉奉典型色谱图

表 1 血浆中依达拉奉的批内和批间精密度

( $n = 5$ )

加入浓度 (ng/ml)	批内		批间	
	测得浓度 (ng/ml)	RSD (%)	测得浓度 (ng/ml)	RSD (%)
75.2	76.5	6.9	70.3	12.9
1 504.3	1 496.1	5.4	1 448.0	6.3
5 716.4	5 533.8	8.9	5 701.9	7.9

### 2.4 回收率实验

根据“血浆样品的处理”项下操作步骤按配制 0.2 ml 浓度分别为 75.2、1 504.3、5 716.2 ng/ml 的依达拉奉含药血浆样品所需的对照品溶液量加入对照品溶液, 每种浓度各做 5 份。记录色谱图, 积分样品峰面积  $A_s$ , 计算各浓度样品的峰面积比值, 求得依达拉奉的回收率 (表 2)。

表 2 血浆中依达拉奉的提取回收率 ( $n = 6$ )

	加入浓度 (ng/ml)		
	75.2	1 504.3	5 716.2
Mean (%)	67.3	73.2	63.3
RSD (%)	13.3	5.3	11.6

### 2.5 样本稳定性考察

#### 2.5.1 待测溶液的稳定性考察

制备由低浓度到高浓度 (75.2、1 504.3、5 716.2 ng/ml) 的 3 个浓度的样品各 3 份, 按“血浆样品的处

理”项下操作, 最后所得上清液作为 0 h 的样品溶液, 立即取 20  $\mu$ l 进样; 将剩余的样品溶液于进样器 (4 $^{\circ}$ C) 中放置约 12 h 后, 各取 20  $\mu$ l 进样。由标准曲线求出各样品的浓度, 计算各样品的测得值与实际值的 RSD (表 3)。

#### 2.5.2 血浆样品的稳定性考察

按标准曲线配制方法配制由低浓度到高浓度 (75.2、1 504.3、5 716.2 ng/ml) 的 3 个浓度的依达拉奉标准含药血浆, 每种浓度分取 3 份。1 份于配制好后按“血浆样品的处理”项下操作立即分析; 1 份于配制好后放在室温条件下保存 0.5 h 后按“血浆样品的处理”项下操作立即分析; 其余 1 份于配制好后放入 -70  $^{\circ}$ C 冰箱中冷冻保存 2 d 后取出化冻, 按“血浆样品的处理”项下操作分析 (表 3)。

依达拉奉血浆样品在 -70  $^{\circ}$ C 冰冻放置 2 d 以及室温放置 0.5 h 条件下稳定性良好; 依达拉奉待测溶液

在自动进样器(4℃)中放置12 h条件下稳定性良好。

## 2.6 健康受试者药动学结果

10例健康受试者,男5例,女5例,年龄(31.2±3.3)岁,体重(62.6±8.0)kg,身高(167.4±7.6)cm,体质指数(22.2±1.4)。静脉输注依达拉奉30 mg,输注时间为30 min,采血时间点为:给药前及给药后5、

10、20、30、45、60、120、180、240、360、480、600、720 min。平均血药浓度-时间曲线见图2,主要的药代动力学参数有 $C_{max}=(2.83 \pm 0.32)\text{ng/ml}$ , $t_{1/2}=(2.25 \pm 0.42)\text{min}$ , $CL_2=(0.10 \pm 0.02)\text{L/min}$ , $V_z=(18.5 \pm 2.6)\text{L}$ , $AUC_{0-1}=(5.17 \pm 0.93)\mu\text{g}\cdot\text{min/L}$ , $AUC_{0-\infty}=(5.29 \pm 0.98)(\mu\text{g}\cdot\text{min/L})$ 。

表3 依达拉奉样品稳定性考察结果

(n=5)

时 间	75.2 ng/ml		1 504.3 ng/ml		5 716.2 ng/ml	
	测定浓度	RE (%)	测定浓度	RE (%)	测定浓度	RE (%)
0 h	67.9 ± 3.2		1 616.8 ± 9.5		5 643.5 ± 618.8	
进样器放置 12 h	66.4 ± 6.2	-2.2	1 593.7 ± 6.7	-1.4	5 630.0 ± 288.8	-0.2
冰冻 2 d	64.9 ± 2.3	-4.4	1 556.0 ± 35.8	-3.8	5 447.8 ± 186.2	-3.5
室温放置 0.5 h	64.1 ± 2.9	-5.5	1 464.9 ± 7.6	-9.4	5 270.1 ± 705.9	-6.6

RE: 相对误差。

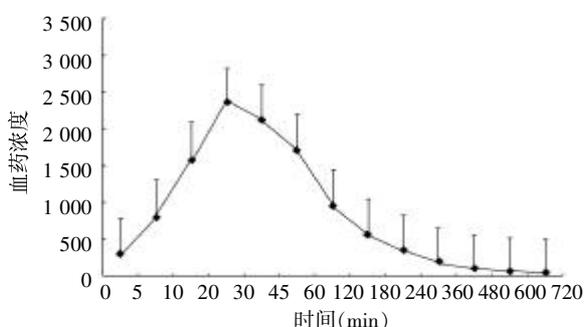


图2 10例健康受试者静脉输注30 mg依达拉奉,平均血药浓度-时间曲线图

## 3 讨 论

在日本,依达拉奉被广泛用于临床,有报道称 $^{14}\text{C}$ -MCI-186与人血浆蛋白的结合率为91.0%~91.9%。经过高氯酸沉淀血浆蛋白后,样品中依达拉奉显示良好的线性。文献报道采用同位素标记方法检测依达拉奉在尿液中的浓度,只能检测到头2 h的浓度。依达拉奉中1%以原型排泄,5%~13%以硫酸盐形式排泄,68%~83%经葡聚糖酸化作用排泄,注射后24 h从尿中排除<sup>[5]</sup>。

在本课题中 $C_{max}$ 值比文献报道的 $C_{max}$ 值有显著升高,可能原因有:①本研究依达拉奉的静注时间为30 min,文献的报道的为40 min;②本研究采用HPLC-UV法测定依达拉奉的血浆浓度,样品处理过程简便、快速,并且在10 min内得到上清液,更加方便和稳定;③预实验结果显示,人血浆中依达拉奉在室温放置45 min不稳定,与文献报道的结果一致<sup>[6]</sup>。一般提取方法耗时30 min以上,意味着依达拉奉会长时间暴露在空气中,特别是涡旋样品时,其液面接触空气的时间长短直接与其浓度下降的程度

相关。而且本课题组在受试者给药后24 h内检测完所有血浆样品,保证样品在短时间内得到处理和测定。同时还运用LC-MS/MS方法作为另一种检测手段,结果显示标准曲线在10~500 ng/ml呈线性,当线性浓度>500 ng/ml时则不成线性相关<sup>[4]</sup>。

本研究采用HPLC-UV法测定血浆中依达拉奉的浓度,样品处理过程快速、简便,血浆中杂质不干扰样品的测定,在30.1~6 017.2 ng/ml浓度范围内线性关系良好,批内、批间精密度和回收率符合生物样品测定要求,可满足人体药动学研究的需要。

## [参考文献]

- [1] Doepfner TR, Hermann DM. Free radical scavengers and spin traps - therapeutic implications for ischemic stroke [J]. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2010, 24(4): 511-520
- [2] Feng S, Yang Q, Liu M, et al. Edaravone for acute ischemic stroke [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2011, 12: CD007230
- [3] Yang J, Liu M, Zhou J, et al. Edaravone for acute intracerebral haemorrhage [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2011, 2: CD00 7755
- [4] Gu LQ, Xin YF, Zhang S, et al. Determination of edaravone in plasma of beagle dog by LC-MS [J]. Zhejiang Provincial Academy Med Sci, 2010, 21(1): 24-27
- [5] Lapchak P. A critical assessment of edaravone acute ischemic stroke efficacy trials: is edaravone an effective neuroprotective therapy? [J]. Expert Opin Pharmacother, 2010, 11(10): 1753-1763
- [6] Rolando B, Filieri A, Chegaev K, et al. Synthesis physicochemical profile and PAMPA study of new NO-donor edaravone co-drugs [J]. Bioorganic & Med Chem, 2012, 20(2): 841-850

[收稿日期] 2013-06-07