

· 论著 ·

## 高效液相色谱法测定人血浆中阿克他利的浓度及其药动学研究

何娟<sup>1</sup>, 周成杰<sup>2</sup> (1. 上海中医药大学附属曙光医院药剂科, 上海 201203; 2. 上海新药研究中心, 上海 201203)

**[摘要]** 目的 建立人血浆中阿克他利浓度的高效液相色谱检测方法。方法 血浆样品采用液-液萃取的方法, 采用 Dikma C<sub>18</sub> 柱分离, 以水(含 1.2% 乙酸)-甲醇(50:50, V/V) 的混合溶液为流动相, 检测波长为 245 nm, 流速为 1.0 ml/min, 柱温 30℃。结果 建立的人血浆内阿克他利测定方法线性范围为 75~4 000 ng/ml, 定量下限可达 75 ng/ml。日内、日间精密密度(RSD)均小于 10%, 方法准确度大于 90%, 提取回收率大于 88%。结论 该方法快速、灵敏、专属, 适用于人血浆中阿克他利浓度的测定。

**[关键词]** 阿克他利; 高效液相色谱法; 药动学

**[中图分类号]** R927; R945

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2016)01-0041-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.01.011

## Study on pharmacokinetics and determination of actarit in human plasma by HPLC

HE Juan<sup>1</sup>, ZHOU Chengjie<sup>2</sup> (1. Department of Pharmacy, Shanghai Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai New Drug Research Center, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]** **Objective** To develop a simple and sensitive HPLC-UV method to determined actarit in plasma. **Methods** The chromatographic separation was carried out on a Dikma C<sub>18</sub> column with a mobile phase composed of water containing 1.2% acetic acid-methanol (50:50, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min and the temperature of column was 30℃. UV wavelength mode was monitored at 245 nm. **Results** A linear response function was established for the range of concentrations 75-4 000 ng/ml for actarit. The inter- and intra-day precision value were less than 10% for actarit and the accuracy was more than 90%. The extraction recovery was more than 88%. **Conclusion** This simple, sensitive, and exclusive method could be used in routine clinical practice to monitor actarit concentrations in human plasma.

**[Key words]** actarit; HPLC; pharmacokinetics

阿克他利(化学名:4-乙酰氨基苯乙酸),是一种口服的免疫调节剂,临床上用于类风湿性关节炎的治疗,其作用机制主要是抑制 T 淋巴细胞的活化与增生<sup>[1-3]</sup>。有文献报道<sup>[4]</sup>,口服单剂量阿克他利 100~800 mg,血药浓度与剂量呈线性相关,1~2 h 达峰值,半衰期约 1 h,但其他相关人体药动学参数报道较少<sup>[5]</sup>。另有国外学者使用离子对色谱法测定阿克他利片剂的含量,但该方法也局限于体外研究,不适用于体内血药浓度的测定<sup>[6]</sup>。

本研究在文献的基础上建立了一种快速、灵敏、专属的 HPLC 方法,可用于阿克他利的人体血浆中浓度的测定,并详细统计了中国健康受试者中的药动学参数,可为后期的新药开发及药物安全性评价提供参考。

### 1 仪器与试剂

SPD-10Avp 高效液相色谱仪(检测器,日本岛津公司);LC-10AT 色谱泵(日本岛津公司);L-2300 柱温箱(杭州瑞析科技有限公司);LC-20A 手动进样器(日本岛津公司);HP2000 色谱工作站(杭州英谱有限公司)。阿克他利(纯度:99.3%,安徽金太阳生化药业有限公司,批号 20120721);内标为香豆素(纯度:98.1%,上海基免实业有限公司,批号 80405);乙腈和甲醇为色谱纯;其他试剂均为分析纯;水为去离子水。

### 2 方法学验证与结果<sup>[6]</sup>

#### 2.1 标准溶液的配制

**2.1.1 阿克他利储备液** 精密称取阿克他利标准品 10 mg,置 10 ml 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 1 mg/ml 的阿克他利储备液。

**[作者简介]** 何娟,硕士,主管药师.研究方向:药物新剂型研究.  
Tel:(021)20256666;E-mail:hejuanhj@yeah.net

**2.1.2 香豆素储备液** 精密称取香豆素标准品 10 mg, 置 10 ml 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 1 mg/ml 的香豆素储备液, 置冰箱 4 °C 保存, 备用。

**2.2 色谱条件** 色谱柱为 Dikma Diamonsil C<sub>18</sub>, 流动相为水(1.2% 乙酸)-甲醇(50 : 50, V/V), 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 30 °C; 检测波长 245 nm。

**2.3 血浆样品的处理** 取血浆 1 ml 置离心管中, 先后加入 50 μl (100 μg/ml) 内标溶液和 50 μl 20% 高氯酸溶液, 最后加入 2.9 ml 的混合溶液[乙腈-二

氯甲烷(1 : 3, V/V)], 混合振荡 5 min, 12 000 r/min 离心 10 min。将弃除沉淀后的液体于 45 °C 氮气吹干, 残渣用 100 μl 流动相复溶, 过微孔滤膜(0.45 μm), 取 20 μl 进 HPLC 分析。

**2.4 方法学验证**

**2.4.1 方法的专属性** 在本色谱条件下, 阿克他利和内标分离良好, 血浆中杂质不干扰药物与内标的测定。阿克他利与内标的保留时间分别为 5.2 min 和 9.3 min, 二者的分离度大于 1.5, 色谱图见图 1。

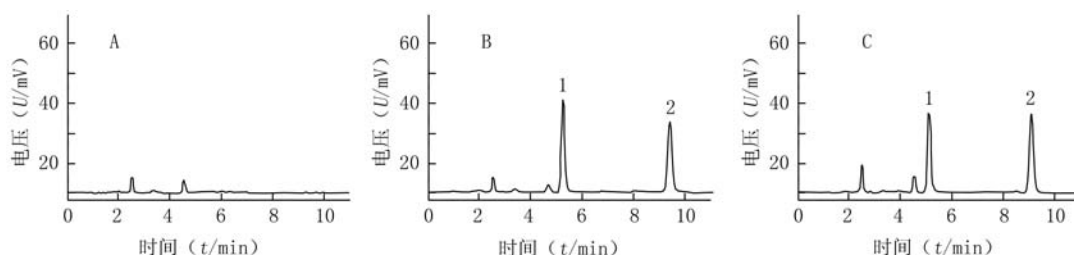


图 1 血浆中阿克他利色谱图

A. 空白血浆; B. 标准血浆样品(1 500 ng/ml); C. 给药后的血浆样品(t=4 h, 1 520 ng/ml); 1. 阿克他利; 2. 内标

**2.4.2 标准曲线和最低定量浓度** 取空白血浆 900 μl, 准确加入不同浓度的阿克他利标准液(100 μl), 使其浓度分别为 75、150、300、750、1 500、3 000 和 4 000 ng/ml, 按“2.3”项下操作, 将测得的阿克他利与内标峰面积比(R)对药物浓度(C)进行直线回归计算(加权系数为 1/c<sup>2</sup>), 回归方程为 R=0.862 C+0.044(r=0.999 1), 在 75~4 000 ng/ml 浓度范围内呈线性关系, 最低定量浓度为 75 ng/ml (S/N=10, SD=6.7 ng/ml, RSD=8.9%)。

**2.4.3 精密度与准确度** 配制 150、1 500、3 000 ng/ml 的标准血样各 5 管, 于同一天按血样预

处理方法处理后做 HPLC 分析, 计算测定数据的相对标准差, 即为日内准确度。以后连续测定 5 d, 每天测定上述浓度的当日配制样品, 计算日间准确度。以血样中阿克他利的峰面积与相同浓度阿克他利标准溶液的峰面积的比值求算阿克他利的提取回收率, 见表 1。

**2.4.4 样品稳定性** 本试验分别考察了阿克他利血浆样品在 -20 °C 的冰箱中放置 30 d 后的稳定性, 反复冻融 3 次以及生物样品用流动相复溶后室温下保存 24 h 的稳定性。检测结果表明, 血浆中阿克他利的含量没有发生明显变化, 结果见表 2。

表 1 阿克他利的精密度与回收率试验结果( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

浓度 ( $\rho_B$ /ng·ml <sup>-1</sup> )	日内			日间			提取回收率 (%)
	测定值 ( $\rho_B$ /ng·ml <sup>-1</sup> )	准确度(%)	精密度 (%)	测定值 ( $\rho_B$ /ng·ml <sup>-1</sup> )	准确度(%)	精密度 (%)	
150	153.2±10.6	102.1	6.9	148.5±9.4	99.0	6.3	88.2±4.3
1 500	1 519.4±143.7	101.3	9.5	1 512.1±139.5	100.8	9.2	85.1±3.2
3 000	3 009.2±221.3	100.3	7.4	2 988.2±214.6	99.6	7.2	86.7±4.6

表 2 样品稳定性试验结果( $\bar{x} \pm s, n=5, \text{ng/ml}$ )

浓度 ( $\rho_B$ /ng·ml <sup>-1</sup> )	-20 °C 存放		反复冻融		复溶液	
	0	30 d	冻融前	第 3 次冻融	0	24 h
150	149.5±9.2	151.4±10.2	152.4±10.3	151.9±9.8	150.2±9.3	151.1±10.1
1 500	1 507.3±138.6	1 512.3±141.3	1 511.2±151.4	1 512.3±143.4	1 510.6±141.3	1 511.8±145.7
3 000	3 006.4±212.5	2 989.3±209.2	2 999.7±208.2	3 001.8±207.4	3 003.3±202.3	3 001.9±208.6

**2.5 人体药动学研究** 8名健康成年男性,平均年龄24.2岁,平均身体质量指数(BMI)为22.5±3.6。所有受试者均接受病史、临床、实验室检查(血液学、血液生化学、尿分析)合格后才符合健康标准。并且其被要求试验前至少两周不得服用任何药物(包括OTC药物)。该研究受试者在试验前和试验后4h内禁食,试验按单剂量方案给受试者口服100mg阿克他利片,并用250ml水服送。通过静脉留置针,在给药前5、15、45min和给药后的1、2、4、6、8、10、12、24h分别取血浆4ml,血样分别置涂有肝素的离心管中,于3000r/min离心10min,取上层血浆,于-20℃保存,备用。该研究经当地伦理委员会的许可,所有受试者均签署知情同意书。

**2.6 统计学处理** 用梯形法计算  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_n / \lambda$ ,  $t_n$ 为最后一次可测浓度的取样时间,  $C_n$ 为测定的最后一点的血药浓度,  $\lambda$ 为末端消除速率常数,  $t_{1/2} = 0.693 / \lambda$ 。其他药动学参数采用DAS 3.0药动学统计软件计算。

**2.7 药动学参数** 8名受试者单剂量口服100mg阿克他利片剂后主要药动学参数见表3。8名受试者单剂量口服100mg阿克他利片剂后体内平均药-时曲线见图2。

表3 单剂量口服100mg阿克他利片剂后的主要药动学参数

参数	$\bar{x} \pm s$
$C_{max}$ (ng/ml)	3 212.5±257.2
$t_{max}$ (h)	1.2±0.3
$t_{1/2}$ (h)	2.1±0.7
MRT(h)	18.1±3.2
$V_d$ (L)	33.2±5.4
$AUC_{0-t}$ (h·ng/ml)	14 532.8±1 033.2
$AUC_{0-\infty}$ (h·ng/ml)	16 209.6±1 297.3

注: MRT:平均滞留时间;  $V_d$ :表观分布容积

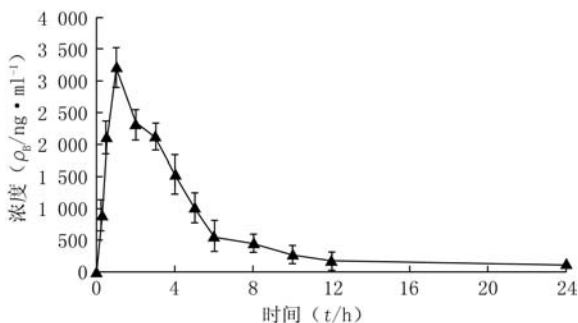


图2 单剂量口服100mg阿克他利片剂药-时曲线图

### 3 讨论

阿克他利是一种有效的口服免疫调节剂。对类

风湿性关节炎相关模型动物(Ⅱ型胶原性关节炎小鼠、自发性自身免疫性关节炎小鼠)关节炎病变的发展有控制作用,对类风湿性关节炎患者的病情有改善作用,但无镇痛和抗炎作用<sup>[4,8]</sup>。

根据预实验结果阿克他利易溶于甲醇,因此标准溶液在配制时选用甲醇为溶剂。在色谱条件的选择上,作者考察了乙腈和水、含乙酸(0.5%~1.5%)的甲醇溶液分别为流动相的组成,结果当流动相为水(1.2%乙酸)-甲醇(50:50, V/V),流速为1.0 ml/min时能够获得较好的峰形及保留时间。在样品的制备上最初采用甲醇或乙腈的蛋白沉淀法,但样品分离度差,且有内源性杂质干扰,后改用高氯酸溶液提取,虽能显著降低杂质干扰,但主药和内标的提取回收率较低,在参考文献[9]后最终选用在乙腈和二氯甲烷的混合溶液中增加少量高氯酸作为提取剂,既保证了有较高的提取率又避免血浆内杂质的干扰。此外,对建立的HPLC方法进行了验证,其专属性、线性、灵敏性、稳定性、日内及日间准确度等均符合生物样品检测标准。

本文系统地报道了中国人群单剂量口服阿克他利片剂的药动学参数,在药动学研究的过程中该药物表现出很好的耐受性,且无受试者发生不良反应。血药的达峰时间和半衰期均与国内外文献报道一致<sup>[5,9]</sup>。因此,该方法可以成功应用于阿克他利的体内研究。

### 【参考文献】

- [1] Nakamura H, Ueki Y, Sakito S, *et al.* Clinical effects of actarit in rheumatoid arthritis: improvement of early disease activity mediated by reduction of serum concentrations of nitric oxide[J]. Clin Exp Rheumatol, 2000, 18(4):445-450.
- [2] Takeba Y, Suzuki N, Wakisaka S, *et al.* Effects of actarit on synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis[J]. J Rheumatol, 1999, 26(1):25-33.
- [3] Fujisawa H, Nishimura T, Inaba M, *et al.* Suppressive effect of actarit on IgA production in mice: activation of CD4+ suppressor T-cells in Peyer's patches[J]. Int J Immunopharmacol, 1995, 17(7):611-617.
- [4] Kawai K, Kobayashi Y, Hirayama M, *et al.* Suppressive effects of 4-acetylamino-phenylacetic acid (actarit) on experimental autoimmune encephalomyelitis in rats[J]. Immunopharmacology, 1998, 39(2):127-138.
- [5] 张运芳,李俊,金涌,等. 血浆阿克他利的高效液相色谱检测[J]. 安徽医药,2001,5(3):212-213.
- [6] Fang F, Xu G, Lu B. HPLC determination of 4-acetylamino-phenylacetic acid[J]. J Liq Chromatogr Rel Technol, 2001, 24(2):1021-1027.

采用以上2种方法,测定3个规格的各3批次样品,测定结果见表2。

表2 2种方法测定盐酸利多卡因注射液试验结果

规格	批号	新方法		原《规范》方法	
		占标示量百分比 (%)	RSD (%)	占标示量百分比 (%)	相对平均偏差 (%)
10 ml : 0.2 g	130722-1	92.0	0.5	95.1	0.2
	130722-2	93.4	0.3	95.8	0.3
	130722-3	92.3	0.3	95.4	0.2
5 ml : 25 mg	130722-1	91.5	0.2	94.7	0.4
	130722-2	91.4	0.1	94.7	0.2
	130722-3	91.4	0.1	94.5	0.2
2 ml : 5 mg	130722-1	93.9	0.1	97.9	0.3
	130722-2	93.5	0.3	97.4	0.1
	130722-3	93.4	0.1	97.4	0.2

上述测定结果表明,此2种方法的测定结果有较大差异,原方法结果偏高,理由是:我们配制盐酸利多卡因注射液时,按处方投料加入盐酸利多卡因固体原料,而此固体原料实际上是含1个结晶水的盐酸利多卡因固体,每1g折算成盐酸利多卡应为: $1 \times 270.8 / 288.8 = 0.9377 \text{ g}$ ,即我们配成的盐酸利多卡因注射液理论含量约相当于标示量的93%左右,考虑原料在储存过程中可能吸潮等原因,实际含量可能更低(即实际投料量偏低)。

采用SPSS统计学软件中ONE Way ANOVA方差分析,比较二次测定结果,发现存在显著性差异( $P < 0.05$ )。采用t检验,比较新拟定方法的测定结果与理论标示量值93%之间的差异,结果无显著性差异( $P > 0.05$ );而比较原《规范》方法的测定结果与理论标示量值93%之间的差异,结果存在显著性差异( $P < 0.05$ )。根据以上结果分析可知,用HPLC法可准确测定盐酸利多卡因注射液中盐酸利多卡因的含量,而原《规范》方法的测定结果明显偏高。

### 3 讨论

3.1 有关物质的检查,参考了《中国药典》2010年版二部盐酸利多卡因注射液中有关物质检查的方法。经方法学验证,拟定的方法操作简单、快速可靠,可用于该制剂中有关物质的检查。

3.2 《规范》采用提取后剩余滴定法测定盐酸利多卡因的含量,方法烦琐,步骤复杂,测量误差较大,测定结果偏高,且试验中大量使用剧毒试剂氯仿。笔者采用HPLC法测定盐酸利多卡因的含量,方法操作简单,结果准确可靠,纠正了原方法使检测结果偏高的问题,建议采用HPLC法替代原方法来测定盐酸利多卡因注射液的含量。

3.3 含量测定的样品及对照品色谱图可用于盐酸利多卡因的专属性鉴别试验,列入质量标准中。

3.4 本文含量测定及2,6-二甲基苯胺杂质检查,均未采用强光照射、高温、高湿、酸碱水解或氧化的方法进行加速破坏试验,原因是本文考察的2,6-二甲基苯胺杂质为可获得的、有市售的对照品。根据《中国药典》2010年版附录关于药品质量标准分析方法验证指导原则规定,对于含量测定和杂质检查测定,在杂质可获得的情况下,对于含量测定,试样中可加入杂质或辅料,考察测定结果是否受干扰,并可与未加杂质或辅料的试样比较测定结果。对于杂质测定,也可向试样中加入一定量的杂质,考察杂质之间能否得到分离。专属性试验结果显示,杂质未对试验的测定结果产生干扰。

### 【参考文献】

- [1] 总后卫生部.中国人民解放军医疗机构制剂规范[S].北京:人民军医出版社,2002:298-299.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2010年版二部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:709-710.
- [3] 王曙东,潘璟,方李,等.反相高效液相色谱法测定壳糖止血海绵中诺氟沙星和盐酸利多卡因的含量[J].药学实践杂志,2010,28(1):45-47.

[收稿日期] 2015-02-05 [修回日期] 2015-06-03

[本文编辑] 顾文华

(上接第43页)

- [7] Huang Y, Shi R, Gee W, et al. Regulated drug bioanalysis for human pharmacokinetic studies and therapeutic drug management[J]. Bioanalysis, 2012, 4(15):1919-1931.
- [8] Ye J, Wang Q, Zhou X, et al. Injectable actarit-loaded solid lipid nanoparticles as passive targeting therapeutic agents for rheumatoid arthritis[J]. Int J Pharm, 2008, 352(1-2):273-

279.

- [9] Loya P, Saraf MN. Determination of actarit from human plasma for bioequivalence studies[J]. Indian J Pharm Sci, 2010, 72(6):726-731.

[收稿日期] 2014-03-25 [修回日期] 2015-02-01

[本文编辑] 顾文华