

RP-HPLC法测定帕潘立酮原料药在大鼠体内的血药浓度及其药动学研究

季平^{1*},袁浩宇^{1#},易红¹,石庆平²(1.核工业四一六医院,成都 610051;2.安徽蚌埠医学院第一附属医院,安徽蚌埠 233004)

中图分类号 R965;R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)17-1569-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.17.12

摘要 目的:建立测定大鼠血浆中帕潘立酮浓度的方法并研究其药动学。方法:6只大鼠单剂量灌胃给予帕潘立酮2.5 mg。以利培酮为内标,采用反相-高效液相色谱法测定给药前及给药后0.25、0.5、1、1.5、2、4、8、12、24、36、48 h的血药浓度。采用DAS软件计算药动学参数。色谱柱为Sciencome Kromasil C₁₈,流动相为乙腈-0.1 mol/L Na₂HPO₄(pH 6.0)(62:38),流速为1.0 ml/min,检测波长为237 nm,柱温为35 ℃,进样量为20 μl。结果:帕潘立酮检测质量浓度的线性范围为0.01~0.40 μg/ml($r=0.9995$),方法回收率为98.7%~102.2%,萃取回收率为82.8%~85.8%,日内和日间RSD均<9%。帕潘立酮在大鼠体内吸收符合二室模型,主要药动学参数 c_{max} 为(102.3±21.56) μg/L、 t_{max} 为(1.5±0.22) h、 $t_{1/2\beta}$ 为(14.969±5.651) h、 V_d 为(17.568±9.688) L、AUC_{0-48 h}为(1799.721±329.573) μg·h/L。结论:本方法适用于帕潘立酮的血药浓度测定;帕潘立酮在大鼠体内消除较慢,分布较广。

关键词 帕潘立酮;反相-高效液相色谱法;血药浓度;大鼠

Plasma Concentration and Pharmacokinetic Study of Paliperidone in Rats by RP-HPLC

Ji Ping¹, Yuan Hao-yu¹, Yi Hong¹, Shi Qing-ping²(1.No. 416 Hospital of Nucleus Industry Ministry, Chengdu 610051, China; 2.The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Anhui Bengbu 233004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the determination of paliperidone (PA) concentration in the rat plasma, and to study pharmacokinetics of PA in rats. METHODS: 6 rats were given a single dose of 2.5 mg PA. The plasma concentration of PA was determined by RP-HPLC before medication and 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 h after medication, using risperidone as internal standard. Pharmaceutical parameters were calculated with DAS software. The analytic column was Sciencome Kromasil C₁₈ with acetonitrile-0.1 mol/L Na₂HPO₄ (pH 6.0) (62:38) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 237 nm and column temperature was 35 ℃. The injection volume was 20 μl. RESULTS: The linear range of PA were 0.01-0.40 μg/ml ($r=0.9995$). The method recoveries were 98.7%-102.2%, and extraction recoveries were 82.8%-85.8%. RSD of inter-day and intra-day were less than 9%. The plasma concentration-time curve of PA was fitted to two-compartment open pharmacokinetic model. The main pharmacokinetic parameters were as follows: c_{max} was (102.3±21.56) μg/L; t_{max} was (1.5±0.22) h; $t_{1/2\beta}$ was (14.969±5.651) h; V_d was (17.568±9.688) L; AUC_{0-48 h} was (1799.721±329.573) μg·h/L. CONCLUSIONS: This method is suitable for the determination of PA concentration in rat plasma. PA is eliminated slowly and then distributed widely in rats *in vivo*.

KEY WORDS Paliperidone; RP-HPLC; Plasma concentration; Rats

帕潘立酮(Paliperidone, PA),又名9-羟利培酮(9-Hydroxy-risperidone),是非典型性抗精神病药物。帕潘立酮可有效延迟精神分裂症的复发,用于精神分裂症急性期和长期维持性治疗,减轻病症,长期使用可有效稳定患者病情^[1]。但其作用机制仍未完全清楚,有文献^[2]报道,其可能与多巴胺D₂和5-羟色胺2A(5-HT_{2A})的阻滞作用有关。其对肾上腺素α₁、α₂和组胺H₁受体有阻滞作用,对胆碱和肾上腺素β₁及β₂受体无亲和力,其左旋和右旋体在体外药理作用相似。为了更好地研究帕潘立酮的作用机制,笔者首次建立了大鼠血浆中帕潘立酮浓度的测定方法,并对其药动学进行了研究。

1 材料

1.1 仪器

2010C高效液相色谱仪,包括紫外检测器、泵及柱温箱(日本岛津公司);CP225D电子天平(德国赛多利斯公司);TGL-

* 主管药师。研究方向:临床药理学和医院药学。电话:028-82991270

通信作者:副主任药师。研究方向:临床药理学和医院药学。电话:028-82991607

16C台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂);IKA漩涡混合仪(德国IKA公司)。

1.2 药品与试剂

帕潘立酮原料药(批号:11082301,纯度:99.2%)、利培酮原料药(批号:110322A,纯度:99.0%)均购自济南伟都化工有限公司;甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

健康SD大鼠,♀♂各半,体质量250~300 g,由四川大学实验动物中心提供,动物合格证号为SCXK(川)10-2006。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

取帕潘立酮及利培酮原料药各约25 mg,精密称定,置于25 ml量瓶中,加甲醇溶解,稀释并定容至刻度,摇匀即得1000 μg/ml的贮备液,4 ℃冷藏保存。临用前用甲醇稀释即得工作溶液。

2.2 血浆样品预处理

精密量取血浆样品0.1 ml,加入内标溶液(0.1 μg/ml利培

酮溶液) 20 μl 、甲醇 20 μl 、10% 三氯乙酸溶液 0.1 ml, 旋涡混匀 2 min, 置于离心机中, 10 000 r/min 离心 5 min, 精密量取上清液 20 μl 注入色谱仪进行分析。

2.3 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Sciencome Kromasil C_{18} (200 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1 mol/L Na_2HPO_4 (pH 6.0) (62:38), 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 237 nm; 柱温: 35 $^\circ\text{C}$; 进样量: 20 μl 。在上述色谱条件下, 测得空白血浆、空白血浆+帕潘立酮+内标、给药后 8 h 的血浆样品+内标中, 帕潘立酮和内标的保留时间分别约为 8.0、11.0 min, 血浆中内源性物质不干扰内标与帕潘立酮的测定。色谱见图 1。

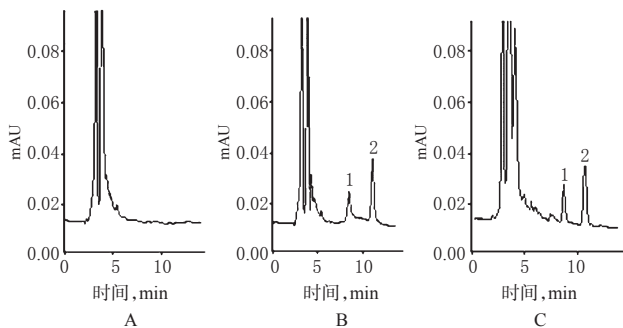


图 1 高效液相色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+帕潘立酮+内标; C. 血浆样品+内标; 1. 帕潘立酮; 2. 利培酮

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma+PA+internal standard; C. plasma sample+internal standard; 1. PA; 2. risperidone

2.4 线性关系考察

精密吸取帕潘立酮贮备液适量, 分别用甲醇稀释成系列浓度的工作溶液, 各取 20 μl 加入至 0.1 ml 空白血浆中, 使血浆中帕潘立酮的质量浓度分别为 0.01、0.02、0.04、0.08、0.12、0.16、0.20、0.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 再各加入内标溶液 20 μl , 按“2.2”项下方法处理, 进样测定, 记录色谱。以帕潘立酮峰面积与内标峰面积的比值(y)为纵坐标, 血浆中帕潘立酮质量浓度(c)为横坐标, 进行回归分析。得标准曲线方程为 $y=0.1623c-0.0039$ ($r=0.9995$, 权重为 $1/c^2$), 帕潘立酮检测质量浓度的线性范围为 0.01~0.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 检测限为 3 ng/ml。

2.5 方法回收率试验

精密量取帕潘立酮工作溶液各 20 μl , 加入至 0.1 ml 空白血浆中, 配制成高、中、低(0.20、0.12、0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$)水平的样品, 按“2.4”项下方法, 从“加入内标溶液 20 μl ”开始操作, 以测得值与加入量的比值计算回收率, 结果见表 1。

表 1 回收率试验结果 ($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests ($n=6$)

| 加入量, $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 方法回收率 | | 萃取回收率 | | | |
|---------------------------------|--------------|-----------|------------------|----------------|----------------|----------------|
| | 平均回 收率, % | RSD, % | 帕潘立酮平 均回收率, % | 帕潘立酮 RSD, % | 内标平均 回收率, % | 内标平均 RSD, % |
| 0.20 | 98.7 | 3.89 | 82.8 | 4.63 | | |
| 0.12 | 102.2 | 4.61 | 85.8 | 5.43 | 85.3 | 3.92 |
| 0.02 | 99.2 | 5.85 | 83.3 | 3.86 | | |

2.6 萃取回收率试验

精密量取帕潘立酮工作溶液各 20 μl , 加入至 0.1 ml 空白血浆中, 配制成高、中、低水平的样品, 按“2.4”项下方法, 从“加

入内标溶液 20 μl ”开始操作, 记录峰面积; 另以水代替空白血浆, 同法记录高、中、低水平样品的峰面积。以前后两种处理测定得到的帕潘立酮峰面积之比和内标峰面积之比分别计算帕潘立酮和内标的萃取回收率, 结果见表 1。

2.7 精密度试验

按“2.5”项下方法, 测定 0.20、0.12、0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的样品溶液, 以同日内测定 6 次的结果计算日内 RSD, 以 1 周内测定 3 次的结果计算日间 RSD。结果表明, 日内 RSD 分别为 3.77%、4.63%、4.28%, 日间 RSD 分别为 5.61%、6.29%、8.68%。

2.8 稳定性试验

按“2.5”项下方法, 配制成高、中、低(0.20、0.12、0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$)水平的样品, 各 3 份。取 1 份, 按“2.2”项下操作, 分别于室温下放置 0、1、2、4 h 后测定, 考察样品在室温条件下稳定性; 1 份放置于 -20 $^\circ\text{C}$ 冰箱中, 反复冻融 3 次, 考察冻融条件下样品的稳定性; 1 份在 -20 $^\circ\text{C}$ 冰箱冷冻 7 d 后, 考察样品冷冻放置的稳定性。结果表明, 3 份样品溶液测定值的 RSD 均小于 10%, 表明样品溶液室温下放置 4 h、反复冻融 3 次和 -20 $^\circ\text{C}$ 中冷冻 7 d 后稳定性均良好, 可以满足样品分析检测要求。

2.9 药动学实验

取 6 只大鼠, 在实验前适应性喂养 7 d。实验前 12 h 禁食, 全程不禁饮水, 按大鼠与人等效剂量换算, 灌胃给予帕潘立酮供试液 (1 mg/ml) 2.5 mg, 于给药前及给药后 0.25、0.5、1、1.5、2、4、8、12、24、36、48 h 尾静脉取血 0.3 ml, 分取血浆, 置于 -20 $^\circ\text{C}$ 冰箱中保存, 按“2.2”项下方法处理后, 进样测定。用 DAS2.0 药动学计算程序进行处理, 计算药动学参数。结果帕潘立酮在大鼠体内的吸收符合二室模型。帕潘立酮在大鼠体内的药-时曲线见图 2; 药动学参数见表 2。

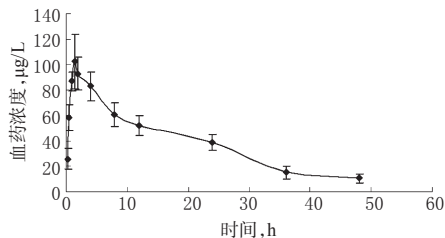


图 2 帕潘立酮在大鼠体内的药-时曲线

Fig 2 Mean concentration-time curve of PA in rats

表 2 帕潘立酮在大鼠体内的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Pharmacokinetic parameters of PA in rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 参数 | 结果 |
|--|-------------------------|
| $c_{\text{max}}, \mu\text{g}/\text{L}$ | 102.3 \pm 21.56 |
| t_{max}, h | 1.5 \pm 0.22 |
| $t_{1/2\alpha}, \text{h}$ | 0.908 \pm 0.332 |
| $t_{1/2\beta}, \text{h}$ | 14.969 \pm 5.651 |
| CL/F, L/h | 1.232 \pm 0.392 |
| V_d, L | 17.568 \pm 9.688 |
| $\text{AUC}_{0-48\text{h}}, \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$ | 1 799.721 \pm 329.573 |
| $\text{AUC}_{0-\infty}, \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$ | 2 029.77 \pm 486.389 |

3 讨论

大鼠单剂量灌服 2.5 mg 帕潘立酮后, 帕潘立酮在体内的吸收符合二室模型, $t_{1/2\beta}$ 为 (14.969 \pm 5.651) h, 消除较慢; V_d 为 (17.568 \pm 9.688) L, 远大于大鼠的体液总体积, 说明分布广泛。国内现有的研究报道多集中在帕潘立酮临床疗效上, 而

青霉素G亚砷对甲氧基苄酯的合成研究

秦伟*,王静*(齐齐哈尔医学院,黑龙江齐齐哈尔 161000)

中图分类号 R914.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)17-1571-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.17.13

摘要 目的:合成青霉素G亚砷对甲氧基苄酯(化合物A)。方法:以青霉素G钾盐和对甲氧基苄氯(1.1:1)为原料,四丁基溴化铵(TBAB)为催化剂,三氯甲烷/*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)为溶剂,过氧乙酸为氧化剂合成化合物A,并进行核磁共振结构表征。以收率为指标,确定较佳的酯化反应温度、酯化反应时间、TBAB用量等反应条件。结果:制备得到了化合物A(收率88%,纯度98.5%)并经过结构表征证实。化合物A的最佳反应条件是酯化反应温度为50℃,酯化反应时间为4h,TBAB用量为0.5%。结论:以确定的反应条件可得到目标化合物,合成周期短,利于工业化生产。

关键词 青霉素G钾盐;青霉素G亚砷对甲氧基苄酯;合成

Study on Synthesis of P-methoxybenzyl Penicillin G Sulfoxide Ester

QIN Wei, WANG Jing (Qiqihar Medical College, Heilongjiang Qiqihar 161000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To synthesize P-methoxybenzyl penicillin G sulfoxide ester (compound A). METHODS: Compound A was synthesized by using potassium penicillin G and P-methoxybenzyl (1.1:1) as raw material, tetrabutyl ammonium bromide (TBAB) as catalytic agent, trichloromethane/*N,N*-dimethylformamide as solvent and peroxyacetic acid as oxidation agent; the structure of it was characterized by NMR. The optimal reaction conditions such as reaction temperature, reaction time, amount of TBAB were well studied with yield as index. RESULTS: Compound A (yield of 88%, purity of 98.5%) were obtained and confirmed. The optimal reaction condition of compound A was as follows: esterification temperature of 50℃, esterification time of 4 h, TBAB amount of 0.5%. CONCLUSIONS: Target compound could be obtained by this technology. The synthetic cycle is short, which is suitable for industrial production.

KEY WORDS Potassium penicillin G; P-methoxybenzyl penicillin G sulfoxide ester; Synthesis

头孢类药物因具有低毒、高效、广谱、耐酶等特性发展相当迅速,其作为临床的一线用药,发展前景十分广阔。头孢类药物及其中间体的合成研究也备受关注。7-苯乙酰胺-3-氯甲基头孢烷酸对甲氧基苄酯(GCLE)是新型的头孢菌素母核^[1],GCLE结构中C—3位的氯甲基具有高反应活性,可以实现多种官能团间的转换,可用于合成C—3位含双键、巯甲基、氮甲基等不同取代基的新型头孢类药物^[2]。青霉素G亚砷对甲氧基苄酯(化合物A)是合成GCLE的重要中间体,其还可扩环合成多种头孢类药物。有文献报道,化合物A的制备多以青霉素G钾盐为原料,有先氧化后酯化^[3]和先酯化后氧化^[4]两种工艺。第一种先酯化后氧化工艺中,第一步产物为油状物,不易进行质量控制;第二种先氧化后酯化工艺中,第一步产物直接

以固体形式析出,不需要精制,可直接用于酯化反应,因此应用较为广泛^[5]。笔者对第一种先酯化后氧化工艺进行了改进,以青霉素G钾盐为原料,首次在相转移催化剂四丁基溴化铵(TBAB)的催化下,以三氯甲烷/*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)为溶剂,用对甲氧基苄氯保护羧基,第一步产物不经过分离,反应体系经过简单处理后,直接用于下一步的氧化反应,合成目标化合物。该合成方法收率高、后处理简单、成本较低,适合工业化生产。

1 材料

1.1 仪器

YRT-3型熔点仪(天津瑞莱特仪器有限公司);FA2004电子天平(上海方瑞仪器有限公司);Bruker DRX 400 MHz 核磁

对其在生物样品中的研究报道很少,如均采用类似的高效液相色谱法测定了人血中的帕潘立酮^[3-4],未见其他生物样品中的研究结果。本文首次建立了灵敏、快速的大鼠血浆中帕潘立酮的测定方法,并对大鼠体内情况进行了研究。结果显示帕潘立酮在大鼠体内消除较慢,体内分布较广,为进一步的体内研究奠定了良好的实验基础。

参考文献

* 讲师,硕士。研究方向:药物合成。电话:0452-2663160。E-mail:qiqiharmuqinwei@163.com

通信作者:教授,硕士。研究方向:药物研发和药物合成。电话:0452-2663160。E-mail:469531593@qq.com

- [1] 王超,禹艳坤,刘爱霞,等.帕潘立酮的合成[J].中国医药工业杂志,2010,41(10):721.
- [2] 王来海,吕路线,蒋立新.帕潘立酮缓释片[J].中国新药杂志,2007,16(18):1539.
- [3] 付崇铭,王登勤,郭瑞臣,等.反相高效液相色谱法测定人血中利培酮及9-羟利培酮及其临床应用[J].中国临床药理学杂志,2001,17(2):121.
- [4] 孟珺,何光明,刘丽娟.反相高效液相色谱法测定利培酮及其活性代谢物的血药浓度[J].深圳中西医结合杂志,2005,15(3):178.

(收稿日期:2012-09-21 修回日期:2012-11-09)