

HPLC-荧光法测定人血浆中卡维地洛浓度及其药动学研究

顾世芬, 肖 宙, 代宗顺, 陈 汇*

(华中科技大学同济医学院临床药理研究所, 武汉 430030)

【摘 要】 目的: 建立测定人血浆中卡维地洛浓度的方法, 用于研究卡维地洛片的药代动力学。方法: 血样经乙醚萃取, 再以稀硫酸回提, 采用 HPLC-荧光法检测。以 Crom Hypersil ODS C₁₈柱为固定相, 甲醇-0.03 mol/L 磷酸二氢钾(70:30)为流动相, 激发波长 285 nm, 发射波长 340 nm, 内标为 β -萘酚。结果: 该法在 1.56~100 ng/ml 浓度范围内呈线性关系, $r=0.9988$ 。最低检测浓度 1.56 ng/ml, 平均提取回收率为 76.49%, 日内 RSD 2.76%、日间 RSD 4.67%。结论: 本法重现性好、灵敏度高, 适用于临床药代动力学分析, 测得两种片剂的主要药代动力学参数无显著性差异。

【关键词】 卡维地洛; 药代动力学; 高效液相-荧光法

【中图分类号】 R917; R945 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2004)01-0054-03

卡维地洛(carvedilol)为一新型具有多种药理活性的抗高血压药物, 其化学名为 1-(9H-咔唑-4-氧代)-3-[[2-(2-甲氧基苯氧基)乙基]氨基]-2-丙醇。该药除具有非选择性 β 受体阻滞作用外, 还有选择性 α_1 受体阻滞作用, 同时具有心肌保护及血管保护作用^[1,2], 临床主要用于轻、中度原发性高血压治疗。近年来国内已开始对该药进行系统的临床研究及应用。本文参考国外文献[3], 建立了卡维地洛反相高效液相荧光检测法, 测定了 10 名健康志愿者口服药物后体内血药浓度变化过程, 求得药代动力学参数, 为临床合理用药提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

高效液相色谱仪: Merck-Hitachi L-6000 泵; Merck-Hitachi F-1000 荧光检测器; Gilson 201-401 自动进样器; Shimadzu Cr-3A 积分仪。

1.2 药品与试剂

卡维地洛(深圳市源政药业有限公司研制, 每片 10 mg, 批号 97071); 卡维地洛片对照品(日本第一制药株式会社, 每片 10 mg, 批号 A4010); 卡维地洛对照品(深圳市源政药业有限公司, 纯度为 99.5%)。 β -萘酚系德国进口分装。

甲醇为色谱纯, 硫酸为优级纯, 其余试剂均为

分析纯, 实验用水为去离子亚沸重蒸水。

1.3 色谱条件

分析柱为 Crom Hypersil ODS C₁₈柱(5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm); 流动相为甲醇-0.03 mol/L 磷酸二氢钾(70:30); 流速 1 ml/min; 荧光检测器激发波长 285 nm, 发射波长 340 nm。内标为 β -萘酚。

1.4 血浆样品的处理

取血浆 1.0 ml 置肝素抗凝离心管中, 加 70 μ l(1 μ g/ml)内标溶液, 0.1 mol/L 硼酸缓冲液(pH 8.0) 0.5 ml, 乙醚 5 ml, 振荡混合 10 min, 3 000 r/min 离心 10 min。吸取有机相, 加入 0.05 mol/L 硫酸 300 μ l, 振荡离心后, 取水相 50 μ l 进样。

1.5 药代动力学研究方案

10 名男性健康志愿受试者, 年龄 20.5 ± 1.2 岁, 体重 57.6 ± 4.6 kg, 受试者无心、肝、肾等病史, 无低血压史。试验前及试验期间未用任何药物, 并禁烟酒。试验期间进统一食谱低脂饮食。研究方案经医学伦理委员会批准。

1.6 实验方案

10 名健康受试者随机交叉试验设计, 分别单剂量口服试验药或对照药各 20 mg, 温开水 150 ml 送服。服药 2 h 后饮水, 4 h 后进食, 于服药前(0 h)和服药后 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 24.0 h 由肘静脉取血 4 ml, 立即置肝素

化离心管中, 3 000 r/min 离心 15min, 分离血浆, 于 -20 ℃ 以下贮存供血样分析。

1.7 数据处理

采用 3p87 药代动力学程序进行血药浓度处理和药代动力学参数计算, $t_{\max}$ 和 $c_{\max}$ 用实测值, AUC 用梯形法计算。

2 结 果

2.1 方法的专属性

在本文的色谱条件下, 卡维地洛和内标(β -萘酚)分离良好, 血浆中杂质不干扰药物与内标的测定。内标与卡维地洛的保留时间分别为 5.22 min 和 6.81 min, 二者的分离度为 2.2, 色谱图见图 1。

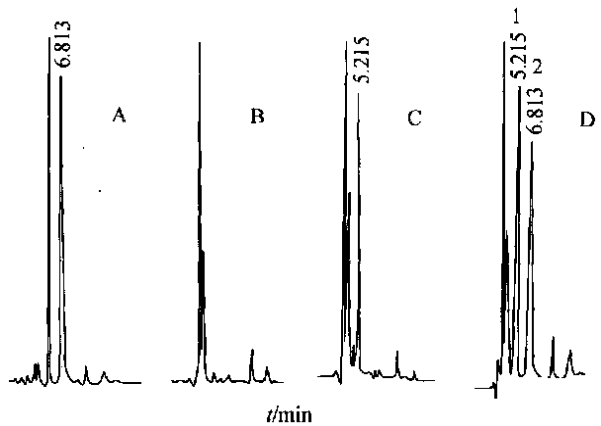


Fig 1. HPLC chromatograms of carvedilol
A. carvedilol standard; B. blank plasma; C. blank plasma with internal standard; D. plasma containing carvedilol and internal standard

1. internal standard; 2. carvedilol

2.2 标准曲线和最低检测浓度

取空白血浆 1.0 ml, 准确加入卡维地洛标准液, 使其浓度分别为 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ng/ml, 按“1.4”项下操作, 将测得的卡维地洛与内标峰高比(R)对药物浓度(c)进行直线回归计算, 回归方程为 $R=0.04206c-0.1029$, $r=0.9988$, 在 1.56~100 ng/ml 浓度范围内呈线性关系, 最低检测浓度为 1.56 ng/ml($S/N=3$)。

2.3 精密度试验

精密度试验在 5, 20, 50 ng/ml 3 个浓度水平进行, 测定日内变异和连续 5 日的日间变异。结果见表 1。

2.4 提取回收率

测得本法低、中、高浓度(5, 20, 50 ng/ml)的萃取回收率。结果见表 2。

Tab 1. Precision for the analysis of carvedilol in human plasma($n=5$)

Conc. (ng/ml)	Within-day RSD(%)	Between-day RSD(%)
5	2.41	5.03
20	3.18	4.75
50	2.68	4.22

Tab 2. Extraction recovery of method($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Added(ng/ml)	Recovery(%)	RSD(%)
5	79.64 $\pm$ 1.71	2.15
20	75.84 $\pm$ 2.74	3.56
50	74.00 $\pm$ 5.04	6.81

2.5 药代动力学研究

10 名健康受试者口服试验药或对照药各 20 mg 后, 血药浓度-时间曲线见图 2, 主要药代动力学参数见表 3, 结果表明, 卡维地洛体内过程符合二房室模型特征, 2 种制剂的主要药代动力学参数经统计学处理无显著性差异($P>0.05$)。

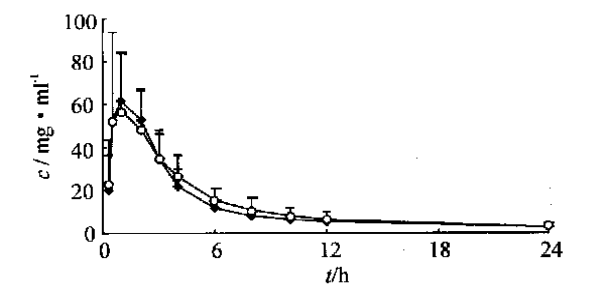


Fig 2. Mean plasma concentration-time curves of carvedilol tablets after a single oral dose of 20mg in 10 volunteers
—◆— test; —○— control

Tab 3. Pharmacokinetic parameters of carvedilol tablets after a single oral dose of 20mg in volunteers($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Parameters	Domestic tablet	Imported tablet
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0.44 $\pm$ 0.39	0.60 $\pm$ 0.97
$t_{1/2\alpha}$ (h)	1.06 $\pm$ 0.34	1.07 $\pm$ 0.52
$t_{1/2\beta}$ (h)	7.57 $\pm$ 2.61	7.74 $\pm$ 3.22
V/FL	212.7 $\pm$ 93.2	214.6 $\pm$ 107.3
CL/F(L/h)	72.4 $\pm$ 21.4	71.3 $\pm$ 33.6
$t_{\max}$ (h)	1.15 $\pm$ 0.88	1.15 $\pm$ 0.78
$c_{\max}$ (ng/ml)	72.5 $\pm$ 27.3	71.4 $\pm$ 27.9
AUC ₀₋₁ (h·ng/ml)	281.8 $\pm$ 62.2	308.6 $\pm$ 114.4
AUC _{0-∞} (h·ng/ml)	314.9 $\pm$ 67.1	345.8 $\pm$ 127.9

3 讨 论

1) 流动相的选择。本实验方法参考国外文献 [3] 并加以改进, 采用 HPLC- 荧光法测定人血浆中卡维地洛药物浓度, 选择了甲醇-磷酸二氢钾系统为最佳流动相, 在该条件下, 卡维地洛峰、内标峰与

内源性杂质峰得到良好分离,且药物峰形好,分析周期短,灵敏度亦能达到血浆样品测定的要求。

2) 提取溶剂的选择。曾试用正己烷、二氯甲烷等几种不同的有机溶剂,结果发现,用正己烷提取,血浆中杂质峰较多,背景复杂,干扰药物及内标物出峰;国内曾有报道用二氯甲烷进行萃取,我们重复其实验,发现产生严重乳化现象,不易分离。本法采用血浆样品首先经乙醚提取,后以稀硫酸回提,提取物既无杂峰干扰,又易于分离,同时在血浆中加入 pH 8.0 的硼酸缓冲液,可提高萃取回收率并减少杂质干扰。本法为进行卡维地洛临床药代动力学研究提供了准确、灵敏的测定方法。

3) 药代动力学研究。实验结果表明,卡维地洛国产片和进口片的药代动力学参数无显著性差异。口服后吸收较为迅速,平均达峰时间为 1.15h,其末端相消除 $t_{1/2}$ (约 7.5 h, 所得参数值与文献报道基本一致^[4]。研究表明,口服卡维地洛体内血药浓度和药代动力学参数在不同受试者间存

在较大个体差异,其 $c_{\max}$ 、 $t_{1/2}$ (最大与最小值相差约 3 倍,主要参数在受试者个体间差异极显著 ($P < 0.01$)。上述现象符合多数 β 受体阻断剂药代动力学特征,可能与该类物质“首过效应”较高,不同个体间代谢速率差异较大有关。建议临床在使用该制剂时,应根据病人具体情况调整用药,以保证用药的安全性与有效性。

【参考文献】

- [1] Metavish D, Campoli-Richards D, Sorkin EM. Carvedilol: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy[J]. *Drugs*, 1993; **45**: 232-258.
- [2] 陈修, 陈维洲, 曾贵云. 心血管药理学[M]. 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 190-192.
- [3] Reiff K. High-performance liquid chromatographic method for the determination of carvedilol and its desmethyl metabolite in body fluids[J]. *J Chromatogr*, 1987; **413**: 355-362.
- [4] Louis WJ, McNeil JJ, Workman BS, et al. A pharmacokinetic study of carvedilol (BM 14.190) in elderly subjects: preliminary report[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1987; **10**(11): 89-93.

HPLC-fluorescence Determination of Carvedilol in Human Plasma and Study on its Pharmacokinetics

GU Shi-Fen, XIAO Zhou, DAI Zong-Shun, CHEN Hui

(Institute of Clinical Pharmacology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

【ABSTRACT】 AIM: A reversed-phase HPLC-fluorescence method was developed for the determination of carvedilol in human plasma and for the study of its pharmacokinetics in young volunteers. **METHOD:** Carvedilol in plasma was extracted with diethyl ether and re-extracted with sulphuric acid. Chromatography was performed on a Crom Hypersil ODS column (5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm) with methanol-0.03 mol/L KH_2PO_4 (70:30) as mobile phase, and β -naphthol was used as internal standard. The excitation and emission wavelength was 285 nm and 340 nm respectively. **RESULT:** The regression line was linear within the concentration range of 1.56 ~ 100 μ g/L ($r=0.9988$), and the limit of detection was 1 μ g/L. The extraction recovery was 76.49%, and the RSD of within-day and between-day were 2.76% and 4.67%, respectively. **CONCLUSION:** The established HPLC method was sensitive, accurate and precise. No endogenous interference was found in chromatograms of the biological samples, and it was applied to the pharmacokinetics studies of carvedilol in human.

【KEY WORDS】 Carvedilol; Pharmacokinetics; HPLC-fluorescence