

超高效液相色谱-串联质谱联用技术在丙戊酸钠缓释片生物等效性研究中的应用

梁彦^{1*}, 陈建宁²

(1. 桂林医学院附属医院药学部, 桂林 541001; 2. 桂林市人民医院药学部, 桂林 541002)

摘要: 目的 建立一个能够快速、简便、大批量分析检测丙戊酸钠血药浓度, 并可应用于评价丙戊酸钠缓释片在健康志愿者中的生物等效性的检测方法。**方法** 组织受试者服用规格为0.5 g的丙戊酸钠缓释片受试制剂与参比制剂, 采集血样并制备血浆样本。用所建立的超高效液相色谱-串联质谱联用技术 (ultra performance lc-mass spectrometry/mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 测定血浆中丙戊酸的浓度。**结果** 在空腹和餐后条件下, 两制剂在吸收速度、吸收程度上均生物等效。**结论** 本实验建立了一种准确、快速地检测人血浆样本中丙戊酸含量的UPLC-MS/MS法。两种制剂具有生物等效性。

关键词: 药理学; 丙戊酸钠缓释片; 药物代谢动力学; 生物等效性; 超高效液相色谱-串联质谱

Application of ultra performance lc-mass spectrometry/mass spectrometry method in the bioequivalence study of Sodium Valproate Sustained-Release Tablets

LIANG Yan^{1*}, CHEN Jian-Ning²

(1. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, China; 2. Department of Pharmacy, Guilin People's Hospital, Guilin 541002, China)

ABSTRACT: Objective Establish a detection methodology that can quickly, easily, and in large quantities analyze and detect the blood concentration of valproic acid, and can be applied to evaluate the bioequivalence of Sodium Valproate Sustained-Release Tablets in healthy volunteers. **Methods** Organize subjects to take the test and reference formulations of 0.5 g sodium valproate sustained-release tablets, collect blood samples, and prepare plasma samples. Determine the concentration of valproic acid in plasma using the established ultra performance lc-mass spectrometry/mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Results** Under fasting and postprandial conditions, both formulations were bioequivalence in terms of absorption rate and degree. **Conclusion** This experiment established an accurate and rapid UPLC-MS/MS method for detecting the content of valproic acid in human plasma samples. Two formulations have bioequivalence.

KEY WORDS: methodology; Sodium Valproate Sustained-Release Tablets; pharmacokinetics; bioequivalence; ultra performance lc-mass spectrometry/mass spectrometry

0 引言

丙戊酸钠 (valproic acid, VPA) 能够促进 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 受体的激活, 增加 GABA 的释放, 或直接与 GABA 受体结合, 增强其抑制效应^[1]。这种机制可以抑制神经元的异常放电, 从而抑制癫痫的发作。其是一种临床上常用的一线抗癫痫药物, 并广泛应用于治疗双相情感障碍、急性躁狂和偏头痛等疾病, 也具有抗肿瘤、抗戒断症状、抑菌等疗效。需要注意的是 VPA 属于窄治疗窗药物, 应根据患者的具体情况进行个体化的治疗方案。当血药浓度过高时可能会引起一些不良

反应, 如头晕、恶心、皮疹等, 患者在使用期间应注意不良反应的监测和管理。丙戊酸钠缓释片的良好疗效, 使其在临床得到了广泛的应用^[2]。一直以来, 国内生物等效性研究多采用 HPLC 或 LC-MS 法为主要检测手段^[3]。由于 VPA 属于窄治疗窗药物且有研究表明其变异较大^[4], 因此本品种生物等效性试验等效难度极大, 开展体内 BE 研究前需充分评估制剂差异, 临床试验过程中应注重个体内变异控制, 提高临床试验质量, 降低试验不等效的风险, 根据《窄治疗指数药物生物等效性研究技术指导原则》^[5], 本文通过建立 UPLC-MS/MS 法, 测定人血浆中 VPA 的浓度, 根据参比制剂的个体内变异 (within subject variability, WSV) 标度

* 通信作者: 梁彦, 主管药师, 研究方向为药物代谢研究。E-mail: 23696724@qq.com

* Corresponding author: LIANG Yan, Chief Pharmacist, Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, China. E-mail: 23696724@qq.com

的平均生物等效性标准来评价国内某厂家生产的丙戊酸钠缓释片与参比制剂(德巴金)是否具有生物等效性,为国内做相关药物实验的工作人员提供参考和依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 试验药物信息

受试制剂为国内某药企生产的丙戊酸钠缓释片,参比制剂根据化学仿制药参比制剂目录(第六十四批),选择由SANOFI WINTHROP INDUSTRIE公司生产的丙戊酸钠缓释片(Depakine® Chrono, 德巴金)。待测物对照品选用从中国食品药品检定研究院购买的丙戊酸钠(批号100963-202004),内标选用从加拿大TLC购买的丙戊酸-D14钠盐(批号4376-018A3)。

1.2 主要仪器

液相色谱仪和质谱系统皆是来自美国Waters公司,移液器等材料主要选择Gilson和Rainin公司的产品。

1.3 方法学的开发与验证

1.3.1 分析条件

通过查阅丙戊酸的理化性质与化学结构,采用以纯乙腈为基础的蛋白质沉淀法对样本进行预处理,以丙戊酸-D14作为内标。本方法操作快捷且提取效果较好,乙腈和5 mmol/L碳酸氢铵配置的流动相,具有较好的分离度和响应。

1.3.2 测定条件

色谱条件:色谱柱Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm);柱温40℃;流动相A:5 mmol/L碳酸氢铵水溶液,流动相B:乙腈;流速:0.3 mL/min。质谱条件:离子源ESI;检测模式为多反应监测扫描(MRM);喷雾器电压1500 V;温度150℃。电离方式为负离子电离,用于检测的离子对为丙戊酸(m/z: 143.08/143.08),内标丙戊酸-D14(157.18/157.18),二者皆以原型母离子保留,故检测母离子。

1.3.3 溶液配置

工作液的配制:称取丙戊酸加入适量甲醇配制成1.000 mg/mL丙戊酸储备液,取适量储备液用50%甲醇水逐级稀释,配制成丙戊酸的终浓度为6.000、12.000、36.000、72.000、216.000、480.000、960.000、1200.000 μg/mL的标准曲线溶液。

1.3.4 样品的预处理方法

取血浆100 μL至96孔聚丙烯板,加入200 μL乙腈,将板密封后在振荡器上振荡2 min,后在4000 r/min,下离心15 min。取上清100 μL转移到另一个96孔聚丙烯板,加入300 μL稀释剂混匀,后在4000 r/min,下离心15 min,将样品转移至进样器中等待进样。

1.3.5 回收率及精密度实验

分别配制0.900、20.000、45.000 μg/mL丙戊酸血浆样本,按“1.3.4”项下操作,得出丙戊酸低、中、高浓度回收率:76.04%、72.48%、75.15%,回收率的变异系数分别为4.07%、2.39%、2.68%,提取后样品待测物响应变异系数分别为2.76%、1.98%、2.90%,未提取样品待测物响应变异系数分别为4.26%、1.08%、1.19%;不同浓度水平待测物回收率的总体变异系数为2.48%。符合《中华人民共和国药典》规定中变异系数<15%的要求^[6]。

本法满足各项验证要求,能够在0.300~60.000 μg/mL范围内准确测定丙戊酸血浆样本的含量,因此展开生物等效性研究。

1.4 临床试验

1.4.1 受试者的选择

选取男女健康受试者(n=80),通过临床评估(体格检查、心电图)和血、尿常规,肝肾功能和传染病筛查等实验室检查对其健康状况进行评估。临床研究方案经伦理委员会审核同意。

受试者在充分了解试验的目的、方法与受试药物的药理作用、不良反应及临床基本应用后,自愿签署“志愿受试者知情同意书”成为本试验志愿受试者。

1.4.2 给药方案

采用随机、开放、单中心、四周期、两序列完全重复交叉设计,单剂量给药试验,将筛选合格的80名受试者随机分配到空腹组及餐后组,空腹44人,餐后36人,给药剂量为1片,空腹和餐后试验的受试者均随机分2组,空腹组于给药前空腹10 h,空腹状态下服用受试制剂(T)1片或参比制剂(R)1片,餐后组在试验当日晨取空白血后进食高脂高热量早餐,并在30 min内用餐完毕,进餐后30 min时(±1 min),准时服用T药或R药1片。空腹组和餐后组均在给药后1小时内禁止饮水,给药4、10小时后进食清淡饮食。

1.4.3 血样采集

分别于给药前(0 h)及给药后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、24、36、48、72、96 h采集静脉血约3 mL。并在采血后1 h内置于低温离心机在4℃,1200 g条件下离心10 min。离心完成之后,将血浆样本分成两份,一份检测(分装约0.75 mL),一份备份(剩余的血浆)。当血浆量不足时,优先保证检测管用量^[6]。血样离心后于2 h内转入-80℃超低温冰箱保存至将血浆样品转运到实验室。后续按上述方法进行检测。

1.4.4 药代动力学参数的计算

采用1.3项下的方法学对受试者的血浆样本进行血药浓度分析,对各受试者的给药剂量和血药浓度-实际采血结束时点数据,采用Phoenix WinNonlin 8.2软件,以非房室模型法(NCA模块)计算T_{max}、C_{max}、AUC_{0-t}、AUC_{0-∞}、t_{1/2}等药代动力学参数。

2 结果与分析

2.1 药代动力学参数

采用UPLC-MS/MS法对样本进行丙戊酸含量的分析。待测样本的检测共44个分析批次,其中空腹组24个分析批次,餐后组20个分析批次。本次待测样本分析中无质控样品准确度偏差范围超过±15.0%的情况,标曲中所有浓度点的准确度均在85%~115%范围内,标准曲线r²均值为0.997645≥0.99。所有分析批次都符合接受标准。在检测过程中血药浓度数据无缺失,空腹组和餐后组丙戊酸的平均血药浓度-时间关系如图1~2。

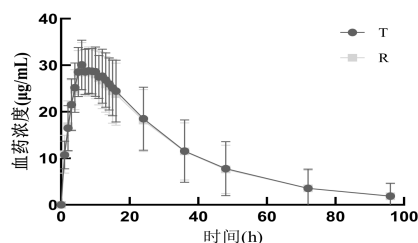


图1 空腹试验平均药时曲线图

Fig.1 Verage drug time curve of fasting test

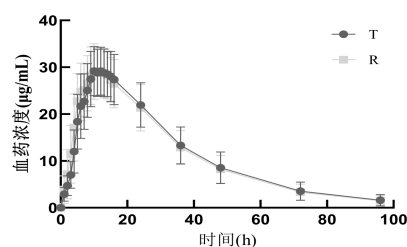


图2 餐后试验平均药时曲线图

Fig.2 Average drug time curve of postprandial test

2.2 生物等效性评价

空腹组: 最小二乘均数估计法计算, 受试制剂 T 与参比制剂 R 的 C_{max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 的几何均数比值 (GMR) 及其 90% 置信区间分别为 101.06% (98.46%~103.31%)、101.71%

(99.18%~104.41%)、100.94% (99.30%~104.87%), 均在《药物制剂人体生物利用度和生物等效性试验指导原则》中生物等效性的等效范围要求内 (80.00%~125.00%), 可认为两制剂具有生物等效性, 具体见下表 1。

表 1 空腹组等效性统计分析结果

Table 1 Results of equivalence statistical analysis for fasting test

药动学参数(单位)	最小二乘几何均值及比值				结果
	受试制剂(NT)	参比制剂(NR)	T/R 比值(%)	T/R 比值(%)的 90% CI	
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	31.242(44)	30.993(44)	101.06	98.46~103.31	等效
AUC_{0-t} ($\text{h}\cdot\mu\text{g/mL}$)	988.5(44)	970.6(44)	101.71	99.18~104.41	等效
$AUC_{0-\infty}$ ($\text{h}\cdot\mu\text{g/mL}$)	1012.1(43)	990.2(42)	101.94	99.30~104.87	等效

餐后组最小二乘均数估计法计算, 受试制剂 (T) 与参比制剂 (R) 的 C_{max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 的几何均数比值 (GMR) 及其 90% 置信区间分别为 99.82% (97.70%~101.87%)、99.66% (97.74%~101.88%)、100.03% (98.00%~102.34%), 均在《药物

制剂人体生物利用度和生物等效性试验指导原则》中生物等效性的等效范围要求内 (80.00%~125.00%), 可认为受试制剂 (T) 与参比制剂 (R) 具有生物等效性。丙戊酸的主要药动学参数等效性统计分析结果见下表 2。

表 2 餐后组等效性统计分析结果

Table 2 Results of equivalence statistical analysis for postprandial test

药动学参数(单位)	最小二乘几何均值及比值				结果
	受试制剂(NT)	参比制剂(NR)	T/R 比值(%)	T/R 比值(%)的 90% CI	
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	30.562(34)	30.628(35)	99.82	97.70~101.87	等效
AUC_{0-t} ($\text{h}\cdot\mu\text{g/mL}$)	1049.1(34)	1051.3(35)	99.66	97.74~101.88	等效
$AUC_{0-\infty}$ ($\text{h}\cdot\mu\text{g/mL}$)	1093.1(34)	1091.5(35)	100.03	98.00~102.34	等效

3 讨论与结论

根据《以药动学参数为终点评价指标的化学药物仿制药人体生物等效性研究技术指导原则》的规定一般推荐仅测定原形药物, 因为相比代谢产物, 其药时曲线一般能更程度的突出两种制剂的差异性^[8]。且根据要求如同时满足以下两点, 才需要同时予以测定: (1) 代谢产物主要产生于进入体循环以前, 如源自首过效应或肠道内代谢等; (2) 代谢产物显著影响药物的安全性和有效性^[9]。建议以原形药物评价生物等效性, 代谢产物的相关数据用于进一步支持临床疗效的可比性^[10]。VPA 口服后在血浆中基本以原形存在, 其代谢产物未同时满足上述两点条件, 故仅检测丙戊酸的血液浓度。本文采用液质联用的方法不仅样本处理简单、耗时短, 也更灵敏。

免疫测定法是治疗药物监测实验室最常用的方法, 因为它易于使用, 但缺乏高选择性并且不能大批量检测。通过 HPLC 和 GC 制备丙戊酸分析样品的传统方法很复杂。而采用液质联用的方法不仅样本处理简单、耗时短, 也更灵敏。结合方法学的建立与验证部分的数据来看, 从系统适应性, 特异性, 基质效应, 回收率与稳定性等方面均表明此分析方法各项指标均符合《中华人民共和国药典》9012 指导原则的要求, 且准确性和用时都优于以往的 LC-MS 法和《中华人民共和国药典》中记载的 HPLC 法, 可以用于实际临床应用中丙戊酸的检测, 也可以为其他药物的检测提供参考价值。

丙戊酸钠缓释片属于高变异指数、窄治疗指数药物, 而以往的等效性研究中, 均采用两周期或三周期实验设计, 而我们采用完全重复 (两制剂、四周期、两序列) 交叉设计, 这样做不仅可以减少的受试者获得更多的样本量, 节省大量人力及财力成本, 减少不必要的人群暴露, 可以同时获得确切的受试制剂个体内变异系数。对于口服缓释制剂, 建议同时进行空腹和餐后生物等效性研究。这又是本实验对比以往研究的一大创新点。

本研究成功建立了具有高度特异性, 适用于检测血浆样本中丙戊酸含量的 UPLC-MS/MS 方法, 其快速、简便且经济, 适用于样本的大批量处理。并且验证了以丙戊酸计, 两制剂

在空腹及餐后条件下的吸收速度、吸收程度上均生物等效。

参考文献

- [1] KUANYSHBEK A, WANG M, ANDERSSON Å, *et al.* Anti-seizure mechanisms of midazolam and valproate at the $\beta 2$ (L51M) variant of the GABA receptor [J]. *Neuropharmacology*, 2022, 221: 109295.
- [2] TOMSON T, BATTINO D, PERUCCA E. The remarkable story of valproic acid [J]. *Lancet Neurol.* 2016, 15(02): 141.
- [3] 国家药监局发布生物等效性研究的统计学指导原则和高变异药物生物等效性研究技术指导原则 [J]. *中国医药生物技术*, 2018, 13(06): 546.
- [4] JOHANNESSEN LANDMARK C, BURNS ML, BAFTIU A, *et al.* Pharmacokinetic variability of valproate in women of childbearing age [J]. *Epilepsia*, 2017, 58(10): e142-e146.
- [5] LAWRENCE XY, BING VL. FDA 生物等效性标准 [M]. 姚立新, 译. 北京: 北京大学医学出版社, 2017: 180-181.
- [6] 国家药典委员会. 9012 生物样品定量分析方法验证指导原则 [M]//《中华人民共和国药典 2020 版》. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [7] 马婧怡, 李敏, 王骏. 调释制剂仿制药生物等效性研究要求 [J]. *中国食品药品监管*, 2021, (08): 34-39.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 版 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 460-466.
- [9] 刘倩, 南楠, 李涛, 等. FDA《特定药物的生物等效性指导原则》内源性物质药物生物等效性指导原则介绍 [J]. *中国新药杂志*, 2018, 27(05): 509-514.
- [10] 李龙宽, 谢娟. 丙戊酸钠代谢产物 2-丙基-2-戊烯酸的药理作用和安全性研究进展 [J]. *药物不良反应杂志*, 2015, 17(06): 436-439.

作者简介

梁彦, 主管药师, 研究方向为药物代谢研究。
陈建宁, 硕士, 初级药师, 研究方向为临床药学及应用。