

## · 论著 ·

## 左乙拉西坦缓释片在 Beagle 犬中的生物等效性研究

陈仁海, 黄晓玲, 邓轶方, 刘全海(中国医药工业研究总院上海医药工业研究院, 上海 200437)

**[摘要]** 目的 以 Beagle 犬为模型考察自制左乙拉西坦缓释片与参比缓释片(Keppra XR)在动物体内的生物等效性。方法 Beagle 犬分别单剂量口服自制缓释片与参比制剂 1 000 mg, 采用 LC-MS/MS 方法测定犬血浆中左乙拉西坦的浓度, 通过药代动力学计算软件 WinNonlin 5.2 以非房室模型分别计算左乙拉西坦的药代动力学参数。结果 自制缓释片与市售参比缓释片单剂量口服后, 左乙拉西坦的达峰时间  $t_{max}$  分为 1.67 h 和 3.0 h; 峰浓度  $C_{max}$  分别为 89.50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  和 71.18  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 消除半衰期  $t_{1/2}$  分别为 3.68 h 和 3.50 h; 药时曲线下面积  $\text{AUC}_{(0-48)}$  分别为 826.57  $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$  和 757.84  $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$ ; 药时曲线下面积  $\text{AUC}_{(0-\infty)}$  分别为 826.68  $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$  和 757.93  $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$ 。与参比缓释片相比, 自制左乙拉西坦缓释片的相对生物利用度为 109.07%。结论 初步判定两种制剂在犬体内具有类似的药代动力学特征和生物等效性。

**[关键词]** 左乙拉西坦; 缓释片; 生物等效性

**[中图分类号]** R945 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2015)01-0032-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.01.008

## Bioequivalence of levetiracetam extended-release tablets in Beagle dogs

CHEN Renhai, HUANG Xiaoling, DENG Yifang, LIU Quanhai (Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the bioequivalence of two kinds of levetiracetam extended-release tables including the reference product of Keppra XR in Beagle dogs. **Methods** Dogs were administrated orally with single dose of levetiracetam tablets (1 000 mg). The concentration of levetiracetam in dog plasma was detected by LC-MS/MS. All parameters of pharmacokinetics were performed by WinNonlin 5.2 software. **Results** Main pharmacokinetic parameters of test and reference tablets were as follow:  $t_{max}$  were 1.67 h and 3.0 h,  $C_{max}$  were 89.50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 71.18  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $t_{1/2}$  were 3.68 h and 3.50 h,  $\text{AUC}_{(0-48)}$  were 826.57  $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$  and 757.84  $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$ ,  $\text{AUC}_{(0-\infty)}$  were 826.68  $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$  and 757.93  $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$ . The relative bioavailability of test tablets was 109.07% to reference products of Keppra XR. **Conclusion** Therefore, the two kinds of levetiracetam extended-release tablets were bioequivalent in Beagle dogs.

**[Key words]** levetiracetam; extended-release tablet; bioequivalence

左乙拉西坦是一种新型抗癫痫药物, 具有作用机制独特、疗效确切、不良反应少、药代动力学优等特点, 广泛运用在临床癫痫治疗中。由于癫痫发病机制复杂、患者存在着明显的个体差异, 只有科学合理地进行药物治疗, 才能有效或完全控制癫痫发作, 否则易转化成难治性癫痫, 给患者、家庭和社会带来很大的心理和经济负担。研究发现, 抗癫痫药物给药次数增加, 导致癫痫患者药物治疗的依从性降低和易发生漏服药物的现象, 从而影响控制患者癫痫发作, 甚至导致治疗失败<sup>[1,2]</sup>。缓释制剂不但可减少每日给药次数以增加患者依从性, 而且能使血药浓度曲线变得更为平缓, 降低血药浓度的峰谷效应,

有效减少与峰浓度相关的不良反应, 因此缓释制剂能够改善病人依从性和提高对发作的有效控制, 带来更好的耐受性和治疗效果<sup>[3,4]</sup>。临床研究表明, 左乙拉西坦缓释片(Keppra XR, 500 mg/片, UCB公司)与普通制剂相比能够更加有效地控制难治性癫痫发作, 也具有更好的依从性和耐受性。迄今, 国外已有多家企业生产的左乙拉西坦缓释片被美国FDA批准上市, 迅速取得了临床使用和市场销售的认可, 但在国内尚未上市和临床使用, 也仅有少数企业在进口注册和申报临床批件。

因此, 左乙拉西坦缓释片是目前国内临床治疗急需的品种, 也具有广阔的市场前景。本研究采用 Beagle 犬进行药动学研究, 考察自制左乙拉西坦缓释片与参比制剂 Keppra XR 的口服生物等效性。

## 1 仪器与试药

ZPW-5 型式压片机(上海天和制药机械有限公

**[作者简介]** 陈仁海, 博士研究生, Tel: (021) 65179533; E-mail: chenrenhai@yahoo.com

**[通讯作者]** 刘全海, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 新药研发和分子药理学, Tel: (021) 65179533; E-mail: liuquanhai\_lqh@163.com

司);LC Solution 2010 HPLC(岛津公司);质谱仪(API4000,美国应用生物系统公司);电喷雾离子源(ESI),串联四极杆质量分析器;数据处理系统为Analyst 软件(美国应用生物系统公司)。

左乙拉西坦原料药(百灵威科技有限公司);市售参比左乙拉西坦缓释片(UCB Pharma SPA,商品名为Keppra XR,规格500 mg);华法林(内标,Toronto Research Chemicals Inc.,含量99%);自制左乙拉西坦缓释片(上海医药工业研究院);健康 Beagle

犬(6只,雌雄各半,体重10~12 kg)。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱:XTerra MS-C<sub>18</sub>(2.1 mm × 50 mm, 3.5 μm);流速:1.0 ml/min;流动相:0.1%甲酸水溶液:甲醇(20:80)。

**2.2 质谱条件** 雾化气:8;气帘气(CUR):8;碰撞气(CAD):4;离子源电压(IS):5 000 V;离子源温度(TEM):500 °C;质谱参数见表1。

表1 质谱参数

质谱参数	Q1(amu)	Q3(amu)	Dwell time(t/ms)	DP(v)	EP(v)	CE(v)	CXP(v)
左乙拉西坦	171.1	126.1	150	26	140	10	21
华法林(IS)	309.2	163.0	150	26	140	10	10

### 2.3 溶液配制

**2.3.1 对照品储备液** 精密称取左乙拉西坦对照品约5 mg,置10 ml棕色容量瓶中,加甲醇使待测物完全溶解后定容,配制成浓度为500 μg/ml的储备液。储备液存放在4 °C冰箱中待用。

**2.3.2 华法林储备液(内标)** 精密称取华法林至容量瓶中,加甲醇使待测物完全溶解后定容,配制成浓度为229 μg/ml的内标储备液。储备液贮存在4 °C冰箱中待用。

**2.4 样品处理方法** 取血浆样品解冻后放至室温,涡流混匀,并经过空白血浆定量稀释后加入250 μl内标溶液(500 ng/ml华法林甲醇溶液,空白溶液内不加内标补加相同体积的甲醇);样品涡旋混匀,离心5 min(15 000 r/min),取上清液150 μl,LC-MS/MS分析。

**2.5 专属性试验** 取对照品溶液、空白血浆溶液,分别进样,LC-MS/MS色谱图见图1。实验结果表明,血浆内源性成分不干扰药物及内标的测定。

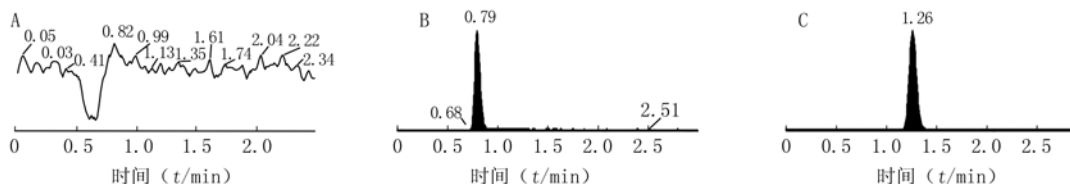


图1 典型LC-MS/MS色谱图

A. 空白血浆;B. 空白血浆+左乙拉西坦;C. 空白血浆+华法林

**2.6 标准曲线和最低定量限** 取适量左乙拉西坦对照品,用甲醇逐级稀释,配制成浓度为100、40、20、4、2、0.4 μg/ml标准溶液,作为储备液;分别精密量取储备溶液各5 μl平行加入到195 μl犬空白血浆中,制得浓度为2 500、1 000、500、100、50、10 ng/ml的标准曲线样品,分别进样,记录峰面积。以各组峰面积Y为纵坐标,相应浓度X为横坐标,进行线性回归,得回归方程,具体见表2和图2。结果表明,左乙拉西坦血药浓度在10~2 500 ng/ml范围内线性关系良好,最低定量限为10 ng/ml。

**2.7 准确度试验** 分别配制低、中、高3个浓度的样品,各取6份,按照“2.1 色谱条件”测定,计算回收率。样品溶液配制方法如下。

表2 左乙拉西坦在犬空白血浆中线性实验结果

	浓度(μg/ng · ml <sup>-1</sup> )					
	10.15	50.75	101.50	507.50	1 015.00	2 537.50
峰面积	10.26	52.17	101.57	491.26	986.74	2 512.51
线性方程	Y=0.989X-3.569 4 (r=0.999 9)					

**2.7.1 质控样品配制** 取空白血浆样品,室温自然融化,加入左乙拉西坦对照品储备液配制成质控样品(浓度为15、800、2 000 ng/ml,每浓度6份),涡旋30 s,取50 μl样品至1.5 ml离心管中,分别加入250 μl内标溶液涡旋混匀,取上清液进样分析。

**2.7.2 基质样品配制** 取空白血浆,加入250 μl甲醇溶液,涡旋60 s后离心5 min(10 000 r/min),取上清液待用。在195 μl的上清液中,加入5 μl的

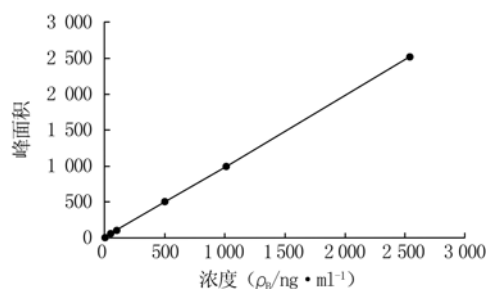


图2 左乙拉西坦在犬空白血浆中标准曲线

左乙拉西坦储备溶液(0.6、32、80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),涡旋30 s混匀。取50  $\mu\text{l}$ 样品至1.5 ml离心管中,分别加入250  $\mu\text{l}$ 内标溶液涡旋混匀,取样分析,每一浓度水平配制6份。

**2.7.3 溶液样品配制** 取195  $\mu\text{l}$ 的甲醇加入5  $\mu\text{l}$ 的左乙拉西坦储备溶液(0.6、32、80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),涡旋60 s,然后按照样品处理方法处理,每一浓度水平配制6份。

通过质控样品与基质样品药物峰面积响应的比较,以评价方法的回收率;通过基质样品与溶液样品药物峰面积响应的比较,以评价方法的基质效应。实验结果表明,在3个浓度条件下回收率范围在92.21%~103.55%内,本方法回收率良好。

**2.8 精密度试验** 取“2.7”项下质控样品,分别连续进样6次,实验结果表明3个浓度峰面积RSD为0.04%~2.15%,本方法精密度良好。

**2.9 稳定性试验** 取配制好的质控样品,存放于-80  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,24 h后取出,室温下自然融化,当样品完全溶解后再次存放于-80  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻。如此反复冻融,在第3次融化以后进行分析。结果表明,3个浓度样品经-80  $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置24 h后,含量测定RSD为1.94%~3.44%,表明本样品稳定性良好。

## 2.10 药动学研究

**2.10.1 给药方案** 6只Beagle犬随机分为2组,每组3只,给药前禁食过夜(12~16 h)。分别给予口服参比制剂Keppra XR 2片(500 mg/片)或自制缓释片1片(1000 mg/片),将给药前记为0点,给药后的0.25、0.5、0.75、1、2、3、4、6、8、24、48 h在犬颈静脉取血约1 ml。所取血样均置肝素化离心管中,离心(3500 r/min)10 min后分离血浆,-20  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,备测。

**2.10.2 血药浓度测定方法** LC-MS/MS分析方法验证结果表明,拟定分析方法完全能满足血液样品中左乙拉西坦含量的测定,可运用于该药的非临床药动学研究。从冰箱中取出样品(-80  $^{\circ}\text{C}$ ),室温自然融化后涡旋30 s,取10  $\mu\text{l}$ 加入40  $\mu\text{l}$ 空白血浆中混匀,再取其中10  $\mu\text{l}$ 加入90  $\mu\text{l}$ 空白血浆中。进

行上述两次稀释后,取出50  $\mu\text{l}$ 加入250  $\mu\text{l}$ 内标溶液(500 ng/ml华法林甲醇溶液)混匀,离心5 min(15000 r/min),取上清液150  $\mu\text{l}$ ,采用拟定分析方法,测定血样中左乙拉西坦含量,药-时曲线见图3。

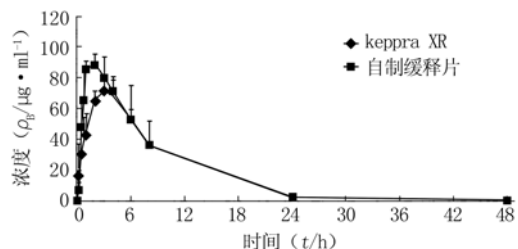


图3 两种左乙拉西坦缓释片在犬体内平均药-时曲线

**2.10.3 药动学研究结果** 根据药物的血药浓度数据,使用药动学计算软件WinNonlin 5.2以非房室模型分别计算左乙拉西坦的药动学参数,结果表明,自制缓释片与市售参比缓释片(Keppra XR)单剂量口服后,左乙拉西坦的达峰时间 $t_{\text{max}}$ 分别为1.67 h和3.0 h;峰浓度 $C_{\text{max}}$ 分别为89.50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和71.18  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;消除半衰期 $t_{1/2}$ 分别为3.68 h和3.50 h;药时曲线下面积 $\text{AUC}_{(0-48)}$ 分别为826.57  $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$ 和757.84  $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$ ;药时曲线下面积 $\text{AUC}_{(0-\infty)}$ 分别为826.68  $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$ 和757.93  $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$ 。双单侧 $t$ 检验结果显示 $C_{\text{max}}$ 和 $\text{AUC}_{(0-48)}$ 的 $P$ 值分别为0.091和0.26,均大于0.05,表明自制品与市售品的 $C_{\text{max}}$ 和 $\text{AUC}_{(0-48)}$ 无显著性差异,其中自制缓释片的AUC值均落在参比制剂(Keppra XR)的80%~125%之内, $C_{\text{max}}$ 值落在参比制剂的75%~133%之内,见表3。

表3 两种左乙拉西坦缓释片在犬体内的药动学研究

参数	Keppra XR	自制缓释片
$\text{AUC}_{(0-48)}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$ )	757.84	826.57
$\text{AUC}_{(0-\infty)}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$ )	757.93	826.68
$\text{MRT}_{(0-\infty)}$ (h)	6.43	6.22
$t_{1/2}$ (h)	3.50	3.68
$t_{\text{max}}$ (h)	3.00	1.67
$C_{\text{max}}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	71.18	89.50
$F(\%)$		109.07

## 3 讨论

本研究建立了测定Beagle犬体内左乙拉西坦的LC-MS/MS方法。经验证,方法简便、专属性好、灵敏度高,适用于血浆中左乙拉西坦的浓度测定及药动学研究<sup>[5]</sup>。研究结果表明,自制的左乙拉西坦缓释片与参比制剂Keppra XR没有显著性差异,

且药-时曲线高度重合。自制缓释片的相对生物利用度为109.07%，初步判定自制缓释片具有与参比制剂(Keppra XR)相类似的动物体内药动学特征。

### 【参考文献】

- [1] Cramer JA, Glassman M, Rienzi V. The relationship between poor medication compliance and seizures[J]. *Epilepsy Behav*, 2002, 3(4):338-342.
- [2] Claxton AJ, Cramer J, Pierce C. A systematic review of the

associations between dose regimens and medication compliance[J]. *Clin Ther*, 2001, 23(8):1296-1310.

- [3] Bialer M. Extended-release formulations for the treatment of epilepsy[J]. *CNS Drugs*, 2007, 21(9):765-774.
- [4] Sommerville KW. Bioequivalence in development of antiepileptic drugs[J]. *Epilepsy Res*, 2006, 68(1):82-85.
- [5] 何小爱, 刘智, 朱刚直. 左乙拉西坦片在健康人体内的生物等效性研究[J]. *中国药房*, 2013, 24(10):907-909.

[收稿日期] 2014-03-28 [修回日期] 2014-09-17  
[本文编辑] 顾文华

(上接第31页)

引起的动物肝损伤具有较好的治疗作用。

IgAN目前尚无有效的治疗方法,临床一般采用免疫抑制剂、抗血小板聚集、控制诱发因素等方式治疗。中医学把IgAN归属于“尿血、腰痛、虚劳”等范畴,其病机为风湿郁热、痹阻肾络之“肾痹症”,在治疗上以清热祛湿、宣痹通络立法。百蕊草具有清热解毒、消炎利湿的功效,在1g/kg剂量下对阿霉素肾病大鼠展现出良好的抗炎、利尿、降低尿蛋白浓度作用<sup>[2]</sup>。本实验结果显示,在同等剂量下,百蕊草水提取物(TT组)和大孔树脂50%乙醇洗脱部位(TT50组)不仅能够有效降低IgAN大鼠的尿蛋白、尿沉渣中红细胞数量、血清肌酐和尿素氮水平,而且可以减少肾组织系膜区的免疫复合物沉积,改善肾小球、肾小管的损伤状况,对IgAN大鼠具有良好的治疗作用,其效果优于阳性对照雷公藤多苷,而其他部位则效果不明显。上述结果表明,以大孔树脂吸附,不同浓度乙醇梯度洗脱作为活性部位分离和富集的方法较为合理,中等极性的大孔树脂50%乙醇洗脱组分为其有效成分富集部位。

百蕊草的主要化学成分为以山奈酚为母核的黄酮苷类化合物,其中含量较高的是紫云英苷和百蕊草素I<sup>[7,8]</sup>。研究发现百蕊草的乙酸乙酯部位为其抗炎、止痛作用的有效部位,其主要有效成分为山奈酚和紫云英苷<sup>[9]</sup>。现代药理研究表明,山奈酚及其黄酮苷类化合物具有良好的抗肿瘤、抗感染、抗病毒和抗炎作用。山奈酚的抗炎作用可能与其作为诱导性一氧化氮合成酶抑制剂(iNOS)有关,能够抑制上皮细胞内NO的释放和iNOS的表达。山奈酚还是一种天然的免疫抑制剂,能非竞争性地抑制钙调磷酸酶(calcineurin, CN)的活性,且不依赖中介蛋白<sup>[10]</sup>。山奈酚能直接作用于T淋巴细胞并抑制Th1型细胞因子的产生,从而抑制CD8<sup>+</sup>淋巴细胞在体外的形成,因此可用于治疗急性移植抗宿主性疾病<sup>[11]</sup>。实验显示,经AB-8大孔树脂吸附后以40%乙醇洗脱部位可获得含量较高的紫云英苷<sup>[12]</sup>,

由此可推断本实验中,百蕊草提取物及TT50中,对IgAN具有良好疗效的活性成分可能是以紫云英苷为代表的黄酮苷类化合物。此类黄酮苷水溶性更好,更易被胃肠道吸收,可能作为前药,在进入体内后C-3位葡萄糖水解,代谢为山奈酚而发挥作用,但其确切的作用机制值得进一步研究。

### 【参考文献】

- [1] Donadio JV, Grande JP. IgA nephropathy[J]. *N Engl J Med*, 2002, 347(10):738-748.
- [2] 宣伟东, 唐大海, 卞俊, 等. 百蕊草对阿霉素肾病大鼠治疗作用的实验研究[J]. *药实践杂志*, 2012, 30(6):443-446.
- [3] 汤颖, 娄探奇, 成彩联, 等. 实验性IgA肾病模型的改进[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2006, 27(2):184-187.
- [4] 彭胜男, 曾慧红, 傅爱香, 等. 大鼠IgA肾病模型肾脏变化分析[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2012, 28(5):482-485.
- [5] 张君, 姜欣, 王莉, 等. 消斑愈肾颗粒对大鼠IgA肾病免疫调节的研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2002, 8(4):37-38.
- [6] 余英豪, 郑志勇. IgA肾病分类的国际共识:2009牛津分类法介绍[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2011, 27(3):227-229.
- [7] Lee HK, Kim KH, Choi SU, et al. Phytochemical constituents of *Thesium chinense* Turcz and their cytotoxic activities *in vitro*[J]. *Nat Prod Sci*, 2009, 15(4):246-249.
- [8] 刘洋, Parveen Z, 邓玉林, 等. 百蕊草中黄酮类化合物的研究[J]. *中药材*, 2009, 32(4):518-520.
- [9] Parveen Z, Deng Y, Saeed MK, et al. Antiinflammatory and analgesic activities of *Thesium chinense* Turcz extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside[J]. *Yakugaru Zasshi*, 2007, 127(8):1275-1279.
- [10] Wang H, Zhou CL, Lei H, et al. Kaempferol: a new immunosuppressant of calcineurin[J]. *IUBMB Life*, 2008, 60(8):549-554.
- [11] Okamoto I, Iwaki K, Koya-Miyata S, et al. The flavonoid kaempferol suppresses the graft-versus-host reaction by inhibiting type 1 cytokine production and CD8<sup>+</sup> T cell engraftment[J]. *Clin Immunol*, 2002, 103(2):132-144.
- [12] Parveen Z, Deng YL, Muhammad KS, et al. Optimizations of conditions for recovery of Astragaloside from *Thesium chinense* Turcz[J]. *J Appl Sci*, 2006, 6(13):2829-2832.

[收稿日期] 2013-12-04 [修回日期] 2014-07-03  
[本文编辑] 顾文华