

HPLC 检测人血浆中厄贝沙坦的浓度

陈慧敏¹, 赵建波², 邱相君³, 吴明伍³, 陈汇⁴ (1.浙江省中医院保健科, 杭州 310006; 2.杭州师范大学基础医学部药理学教研室, 杭州 310036; 3.河南科技大学医学院, 河南 洛阳 471003; 4.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 建立人血浆厄贝沙坦检测的高效液相色谱法。方法 血浆经乙醚萃取, 以 ZORBAX Extend-C₁₈ 为色谱柱; 流动相为乙腈-水-0.1% TFA-0.5 mmol·L⁻¹ SDS 体系, 流速为 0.8 mL·min⁻¹; 检测波长为 242 nm(0~6.5 min)和 266 nm(6.5~7.8 min)。结果 厄贝沙坦浓度在 0.05~6.00 mg·L⁻¹ 内线性关系良好($r=0.999\ 9$); 定量限为 0.05 mg·L⁻¹; 高中低 3 个浓度的相对回收率分别为(103.93±1.09)%、(99.85±0.65)%和(100.95±1.21)%; 日内 RSD 分别为 3.04%, 1.15%, 1.19%, 日间 RSD 分别为 4.50%, 3.32%, 1.18%。结论 本方法准确可靠、简便快速, 适用于人血浆厄贝沙坦浓度的测定及其药动学研究。

关键词: 高效液相色谱法; 厄贝沙坦; 血药浓度; 药动学

中图分类号: R969.11; R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)05-0422-04

Determination of Irbesartan in Human Plasma by HPLC

CHEN Huimin¹, ZHAO Jianbo², QIU Xiangjun³, WU Mingwu³, CHEN Hui⁴ (1.Department of Health Care, Zhejiang Hospital of Chinese Medicine, Hangzhou 310006, China; 2.Department of Pharmacology, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China; 3.Medical College of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China; 4. Institute of Clinical Pharmacology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a high performance liquid chromatography method for the determination of irbesartan in human plasma. **METHODS** The plasma were extracted by diethyl ether. The analytical column was packed with ZORBAX Extend-C₁₈. The mobile phase were acetonitrile-water-0.1% trifluoroacetic acid-0.5 mmol·L⁻¹ SDS and the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. The UV detection wavelength was 242 nm(0-6.5min) and 266 nm(6.5-7.8min). **RESULTS** Excellent liner relationship was obtained in the range of 0.05–6.00 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$). The limit determination of irbesartan was 0.05 mg·L⁻¹. The relative recoveries were (103.93±1.09)%, (99.85±0.65)% and (100.95±1.21)% respectively at three concentrations, the intra-day RSD were 3.04%, 1.15% and 1.19% and inter-day RSD were 4.50%, 3.32% and 1.18%, respectively. **CONCLUSION** The method was accurate, simple, rapid and could be used to determine the irbesartan concentration in human plasma and for study of its pharmacokinetics.

KEYWORDS: HPLC; irbesartan; plasma concentration; pharmacokinetics

厄贝沙坦(irbesartan)是一种长效的血管紧张素 II(Ang II)受体拮抗剂,能特异性地拮抗血管紧张素转换酶1受体(AT₁);在高血压患者中有剂量依赖的降压效果,并且有安慰剂样的耐受性;与利尿剂合用,厄贝沙坦的降压效果明显增强^[1]。所以厄贝沙坦和氢氯噻嗪固定剂量的复方制剂是临床上常用的抗高血压药物。

关于高效液相色谱法检测血浆厄贝沙坦,国内已有报道^[2-4];本试验在相关报道的基础上,建立了液液萃取法测定人血浆厄贝沙坦的高效液相色谱检测方法,具有操作简便,测定速度快、试剂

便宜等优点,便于推广使用。人体药动学试验经华中科技大学同济医学院伦理委员会批准,受试者签署知情同意书。

1 材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪为 Agilent1100 系列,包括 G1379A 在线脱气机, G1311A 四元泵, G1313A 自动进样器, G1316A 温控箱, G1315B 二极管阵列检测器和 Agilent 化学工作站 (Rev A.10.02.[1757])。电子分析天平(AB204-A,梅特勒-托利多(上海)仪器公司,灵敏度 0.1 mg);涡旋混

合器(XK96-B, 姜堰市新康医疗器械有限公司); 氮吹仪(D10 型, 杭州蓝焰科技有限公司)。

1.2 试剂和药品

甲醇和乙腈为一级色谱纯, 三氟乙酸(Sigma, 064K3647, TFA), 盐酸、乙醚、十二烷基磺酸钠(SDS)均为分析纯; 实验用水为娃哈哈纯净水。厄贝沙坦标准对照品(含量 99.8%, 北京柏雅联合药物研究所有限公司, 批号: 20071022); 伏立康唑标准对照品(含量 99.7%, 哈尔滨健迪医药科技开发有限公司, 批号: 041201)。

1.3 溶液配制

1.3.1 对照品配制 ①准确称取厄贝沙坦标准对照品 25 mg 于 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解定容至 25 mL, 得浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的厄贝沙坦标准储备液; 用甲醇稀释成浓度依次为 100, 10, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准工作液(临用时稀释)。②准确称取伏立康唑标准对照品 25 mg 于 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解定容至 25 mL。再用甲醇稀释成浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的伏立康唑内标工作溶液。

1.3.2 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS 准确称取 SDS 2.884 g, 用纯净水溶解后, 于 1 000 mL 量瓶中用纯净水定容, 得浓度为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS 溶液。准确吸取该溶液 50 mL 于 1 000 mL 量瓶中, 用纯净水定容至 1 000 mL, 得浓度为 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS 溶液, $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后使用。

1.3.3 0.1% TFA 溶液的配制: 准确吸取三氟乙酸

1 mL, 用纯净水稀释并定容至 1 L; $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后使用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: ZORBAX Extend-C18($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, Agilent, USA); 保护柱: Ex-C₁₈ 保护柱($4.6 \text{ mm} \times 12.5 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, Agilent, USA); 流动相: 乙腈-水- 0.1% TFA- $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS = 45:25:20:10; 流速: $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: 45°C ; 检测波长: 0~6.5 min, 242 nm; 6.5~7.8 min, 266 nm。

2.2 血浆样品处理方法

准确吸取待测血浆样品 1.0 mL 于 10 mL 具塞试管中, 加入 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的伏立康唑内标工作液 40 μL , 混匀后加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 200 μL 。再加入乙醚 5.0 mL, 漩涡混匀 2 min。转移上层有机相 4.5 mL 于另一刻度离心管中, 氮吹仪中吹干。用 300 μL 流动相复溶, 取复溶液于自动进样器的样品瓶中, 设定 10 μL 进样检测。

2.3 HPLC 图谱

厄贝沙坦纯标准品、空白血浆、厄贝沙坦血浆标准以及健康受试者血浆样品, 经 HPLC 分析测定得到的色谱图见图 1。由图可见在本实验条件下, 厄贝沙坦与内标能完全分离, 血浆中内源性物质不干扰厄贝沙坦和内标的检测; 厄贝沙坦的保留时间为 5.3 min, 内标的保留时间为 7.0 min。

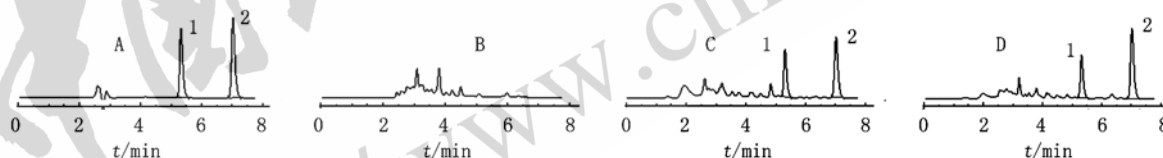


图 1 厄贝沙坦的高效液相色谱图

A-厄贝沙坦及内标; B-空白血浆; C-血浆加厄贝沙坦($2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)及内标($4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); D-样品($1.669 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); 1-厄贝沙坦; 2-内标

Fig 1 HPLC chromatograms of irbesartan

A-irbesartan and internal standard; B-blank plasma; C-plasma spiked with irbesartan ($2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and internal standard ($4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); D-sample($1.669 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); 1-irbesartan; 2-internal standard

2.4 线性关系及定量下限(LOQ)

配成浓度相当于 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00, $6.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的厄贝沙坦血浆标准品溶液, 再按“2.2”项下处理后检测, 测定厄贝沙坦峰面积 A_i 、内标峰面积 A_s , 以 A_i/A_s 为纵坐标, 以所对应各点浓度(C)为横坐标绘制标准曲线。得厄贝沙坦的标准曲线回归方程为 $C=3.130 3A_i/A_s+0.034 3(r=0.999 9)$ 。取标准曲线的最小浓度值 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LOQ($n=6$, $\text{RSD}=4.78\%$, $\text{RE}=6\%$)。

2.5 回收率和精密度试验

2.5.1 相对回收率试验 配制低、中、高3种浓度(0.10, 1.00, $4.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的厄贝沙坦血浆标准品溶液, 每种浓度5份, 再按“2.2”项下处理后检测。依据标准曲线计算各自的浓度, 计算相对回收率, 结果见表1。

2.5.2 绝对回收率试验 配制低、中、高3种浓度(0.10, 1.00, $4.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的厄贝沙坦血浆标准品溶液, 每种浓度5份, 再按“2.2”项下处理后检

测, 记录厄贝沙坦的峰面积, 为血浆标准的峰面积。另取锥底试管6支, 2个一组; 每组加入与配制血浆标准品溶液相同的厄贝沙坦标准品溶液, 直接吹干后用流动相300 μL 复溶, 10 μL 进样检测; 记录不同浓度厄贝沙坦的峰面积, 为该浓度的纯标准品的峰面积。计算血浆标准的峰面积与纯标的峰面积的比值, 即为绝对回收率, 结果见表1。

2.5.3 精密度试验 配制低、中、高3种浓度(0.10, 1.00, 4.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的厄贝沙坦血浆标准品溶液, 每种浓度5份, 再按“2.2”项下处理后于同一日内测定, 依据当日标准曲线计算检测量, 计算日内精密度; 连续3 d内测定, 计算日间精密度, 结果见表1。

表1 血浆厄贝沙坦的回收率及精密度

Tab 1 Recoveries and precisions of irbesartan in human plasma

加入量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	相对回 收率/%	绝对回 收率/%	RSD/%	
			日内	日间
0.10	103.93 $\pm$ 1.09	71.72 $\pm$ 1.81	3.04	4.50
1.00	99.85 $\pm$ 0.65	79.08 $\pm$ 1.43	1.15	3.32
4.00	100.95 $\pm$ 1.21	77.50 $\pm$ 1.36	1.19	1.18

2.6 样品稳定性

2.6.1 处理后的血浆样品的稳定性 配制低、中、高3个浓度(0.10, 1.00, 4.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的厄贝沙坦血浆标准溶液, 按“2.2”项下处理后, 分别放置0, 6, 12 h后检测, 考察其稳定性。低、中、高3个浓度的RSD分别为2.00%, 0.57%, 1.02%, 结果显示处理后样品在12 h内稳定, 适合自动化进样检测。

2.6.2 冻融条件下血浆样品的稳定性 配制低、中、高3个浓度(0.10, 1.00, 4.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的厄贝沙坦血浆标准溶液, 每个浓度5 mL; 放置 $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱2 h后解冻, 各取1.0 mL血浆样品检测。剩余的血浆样品再次放入 $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 2 h后解冻, 各取1.0 mL血浆样品检测。重复3次, 考察其稳定性。低、中、高3个浓度的RSD分别为4.67%, 1.58%, 0.72%, 结果显示冻融条件对血浆样品的检测结果没有明显的影响。

2.9.3 室温放置和冰冻保存血浆样品的稳定性 配制低、中、高3个浓度(0.10, 1.00, 4.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的厄贝沙坦血浆标准样品溶液, 每个浓度5份, 其中3份在室温下放置0, 6, 12 h后再经血浆样品处理方法处理后进样检测, 记录结果。另外2份分别在 $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冰冻保存3周和6周后, 再

经血浆样品处理方法处理后进样检测, 考察其稳定性。低、中、高3个浓度的RSD分别为4.01%, 1.67%, 1.50%。结果显示厄贝沙坦血浆样品在室温放置和冰冻保存的条件下, 均有很好的稳定性。

3 人体药动学应用

3.1 血浆药-时数据

22名健康志愿者单剂量口服厄贝沙坦氢氯噻嗪片2片(每片含厄贝沙坦150 mg /氢氯噻嗪12.5 mg , 批号071024, 杭州赛诺菲安万特民生制药有限公司)后, 用此HPLC检测血浆中厄贝沙坦的浓度, 平均的血浆药物浓度-时间曲线见图2。

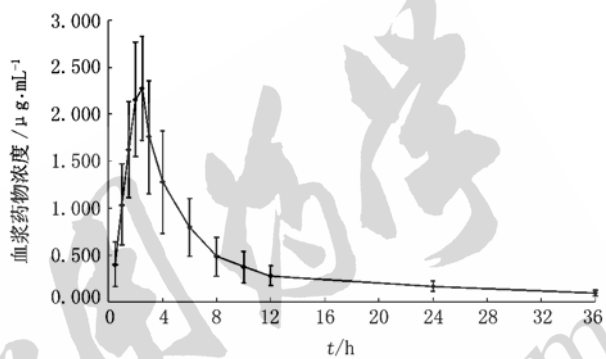


图2 22名健康志愿者单剂量口服300 mg 厄贝沙坦的平均血浆药物浓度时间曲线

Fig 2 Mean concentration-time curve of irbesartan after a single dose of 300 mg irbesartan administration to 22 healthy volunteers

3.2 药动学参数

血浆药物浓度经DAS(Drug And Statistics, version2.0)程序处理, 用非房室模型估算药动学参数。22名健康志愿者单剂量口服厄贝沙坦氢氯噻嗪片(剂量为300 mg 厄贝沙坦)后, 厄贝沙坦的主要药动学参数见表2。

表2 单剂量口服300 mg 厄贝沙坦的主要药动学参数

Tab 2 Pharmacokinetical parameter of irbesartan after a single dose of 300 mg irbesartan

药动学参数	$\bar{x} \pm s$
$C_{\text{max}}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	2.49 $\pm$ 0.55
t_{max}/h	2.25 $\pm$ 0.40
$t_{1/2(ke)}/\text{h}$	12.35 $\pm$ 3.39
$\text{AUC}_{(0-36)}/\text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	14.62 $\pm$ 4.14
$\text{AUC}_{(0-\text{inf})}/\text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	16.21 $\pm$ 4.50

4 讨论

厄贝沙坦有很好的荧光光谱和紫外吸收, 关于血浆药物浓度检测有采用荧光检测^[2]和紫外检测^[3-5]的报道。本研究采用紫外检测的方法, 比较

容易普及。研究发现,厄贝沙坦在整个紫外区均有很好的吸收,紫外末端吸收大,随着波长的增高,吸收降低;本研究使用了二极管阵列检测器波长梯度的功能,在 0~6.5 min 使用 246 nm 波长检测厄贝沙坦,6.5~7.8 min 使用 266 nm 波长检测内标伏立康唑,获得了良好的色谱峰。

厄贝沙坦在 C_{18} 色谱柱中有较好的保留,流动相中乙腈的比例较大才能出峰;研究发现,在乙腈比例不变的情况下,流动相中不加 SDS 时,厄贝沙坦的保留时间为 4.6 min,厄贝沙坦峰的前后临近处均有血浆内源性物质峰,容易造成干扰。流动相中 SDS 的比例对厄贝沙坦的保留有很大的影响,SDS 的浓度为 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、比例为 10% 时,厄贝沙坦不出峰,在色谱柱中保留,内标的保留时间也较长;随着 SDS 的比例减少,厄贝沙坦开始出峰。研究发现,SDS 的浓度为 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、比例为 10% 时,厄贝沙坦的保留时间合适;此时流动相中 SDS 的比例对厄贝沙坦的保留时间仍然有较大的影响,而对内标的影响较小。

在人体药动学和生物等效性研究中,方法学确证的 LOQ 是标准曲线上的最低浓度点,表示测定样品中符合准确度和精密度要求的最低药物浓度。应能满足测定 3~5 个消除半衰期时样品中的药物浓度或能检测出 $C_{\max}$ 的 1/10 时的药物浓度。其准确度应在真实浓度的 80%~120% 内,RSD 应小于 20%。本研究中厄贝沙坦的 LOQ 为 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,有 6 个数据做了确证,RSD=4.78%;相对偏差 RE=6%;能满足 $C_{\max}(2.49\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1})/20$ 的要求。

关于血浆样品的处理方法,曾采用乙腈和高氯酸直接沉淀蛋白的方法,但乙腈沉淀后厄贝沙坦的柱效降低,而高氯酸沉淀后几乎检测不到厄贝沙坦;也曾采用乙酸乙酯和正己烷萃取的方

法,同样不能很好的萃取厄贝沙坦。本研究采用乙醚做萃取剂,不但萃取率高,而且乙醚很容易挥干,节省了样品处理的时间。

本试验结果表明,健康志愿者单剂量口服厄贝沙坦氢氯噻嗪片(剂量为 300 mg 厄贝沙坦)后,血浆厄贝沙坦在 2.25 h 左右达到 $2.49\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的峰值浓度,血浆消除半衰期为 12.35 h 左右;结果与文献[4]接近,但半衰期与文献[3]有较大的差异,可能是个体差异或者是受试者例数的不同。

本试验采用的高效液相色谱紫外法检测血浆厄贝沙坦浓度,专属性高,相对回收率均在 85%~115% 内,绝对回收率大于 70%;日内和日间变异均小于 10%,符合药动学和生物等效性研究的要求。同时本研究建立的方法,检测时间较短,7.5 min 就能完成一个样品的检测,节省了样品检测的时间,节约了成本。

REFERENCES

- [1] WAEBER B, BURNIER M. AT_1 -receptor antagonism in hypertension: what has been learned with irbesartan? [J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2003, 1(1): 23-33.
- [2] WANG W G, LIU Q M. Determination of concentration of irbesartan in human plasma by HPLC with Fluorescence detection [J]. J China Pharm (中国药房), 2007, 18(32): 2512-2513.
- [3] LIU J W, DENG X X, WANG Z W, et al. Bioequivalence study of compound irbesartan dispersible tablets [J]. Chin J Clin Pharm (中国临床药理学杂志), 2008, 17(2): 105-108.
- [4] JIN Y, YANG M J, LUO X, et al. Study on the pharmacokinetics and relative bioavailability of irbesartan orally disintegrating tablets in healthy volunteers [J]. China Pharm (中国药师), 2008, 11(2): 149-151.
- [5] SULTANA N, ARAYNE M S, ALI S S, et al. Simultaneous determination of olmesartan medoxomel and irbesartan and hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulation and human serum using high performance liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr (色谱), 2008, 26(5): 544-549.

收稿日期: 2009-09-08