

HPLC- 荧光检测法测定人血浆中厄贝沙坦的浓度

王婉钢, 刘启明(武汉钢铁集团公司职工总医院, 武汉市 430080)

中图分类号 R969.1

文献标识码 A

文章编号 1001-0408(2007)32-2512-02

摘要 目的: 建立以 HPLC- 荧光检测法测定人血浆中厄贝沙坦浓度的方法。方法: 色谱柱为 Diamonsil C₁₈, 流动相为 0.02mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾-乙腈(50:50), 荧光激发波长为 250nm, 发射波长为 375nm, 流速为 1.0mL·min⁻¹, 柱温为 40℃。结果: 厄贝沙坦检测浓度在 1.0~1000ng·mL⁻¹ 范围内线性关系良好($r=0.9998$); 低、中、高 3 种浓度(2.0、50.0、500.00ng·mL⁻¹) 的平均相对回收率分别为 97.4%、106.1%、101.6%, 日内、日间 RSD 均小于 10%。结论: 本方法简便、快速、准确、特异性和灵敏度高, 可用于厄贝沙坦的血药浓度测定和药动力学研究。

关键词 HPLC- 荧光检测法; 厄贝沙坦; 血药浓度

Determination of Concentration of Irbesartan in Human Plasma by HPLC with Fluorescence Detection

WANG Wan'gang, LIU Qiming(General Staff Hospital, Wuhan Iron and Steel(Group) Corp, Wuhan 430080, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To determine plasma concentration of irbesartan by HPLC with fluorescence detection. METHOD: Samples were separated on Diamonsil C₁₈ with mobile phase consisted of 0.02mol·L⁻¹ KH₂PO₄-acetonitrile(50:50) at a flow rate of 1.0mL·min⁻¹. The fluorescence detector was set at an excitation wavelength of 250nm and an emission wavelength of 375nm. The column temperature was 40℃. RESULTS: The linear range for irbesartan was from 1.0 to 1000ng·mL⁻¹ ($r=0.9998$). The mean relative recoveries of irbesartan at low, middle and high concentrations(2.0, 50.0, and 500.00ng·mL⁻¹) were 97.4%, 106.1% and 101.6%, respectively. Both intra-day and inter-day RSD were below 10%. CONCLUSION: The method is simple, rapid, accurate and specific, and it can be used for the plasma concentration determination and pharmacokinetic study of irbesartan.

KEY WORDS HPLC with fluorescence detection; Irbesartan; Plasma concentration

厄贝沙坦(Irbesartan)是血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)受体拮抗药, 化学名称为 2-丁基-3-[4-[(1H-四唑-5基)苯基]苄基]-1,3-二氮杂螺[4.4]壬-1-烯-4-酮。其能特异性地拮抗血管紧张素转换酶 1 受体(AT1), 对 AT1 的拮抗作用为血管紧张素转换酶 2 受体(AT2)的 8500 倍, 通过选择性地阻滞 AngⅡ与 AT1 受体的结合, 抑制血管收缩和醛固酮的释放, 产生降压作用。本试验采用高效液相色谱(HPLC)-荧光检测法测定人血浆中厄贝沙坦的浓度, 方法简便、快速、准确、特异性和灵敏度高, 可用于厄贝沙坦药动学与生物等效性的研究。

1 材料

1.1 仪器

高效液相色谱系统, 包括 2695 高效液相色谱仪、2475 荧光检测器、Millennium 32 色谱工作站(美国 Waters 公司)。

1.2 试剂

厄贝沙坦对照品(浙江华海药业股份有限公司, 批号: D4392-051102); 内标: 替米沙坦(中国药品生物制品检定所, 批号: 10178-0005); 乙腈、甲醇为色谱纯, 其它试剂均为分析纯, 试验用水为双重蒸馏水。

2 方法与结果^[1-3]

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈(200mm×4.6mm, 5μm); 流动相:

[3] Sun JG, Wang GJ, Wang W, et al. Simultaneous determination of loratadine and pseudoephedrine sulfate in human plasma by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for pharmacokinetics studies[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 39(2): 217.

[4] Ma M, Feng F, Sheng YL, et al. Development and evaluation of an efficient HPLC/MS/MS method for the simultaneous determination of pseudoephedrine and cetirizine in human plasma: Application to Phase-I phar-

macokinetic study[J]. *J of Chromatogr B*, 2007, 846(2): 105.

[5] Wu N, Feng WQ, Lin E, et al. Quantitative and structural determination of pseudoephedrine sulfate and its related compounds in pharmaceutical preparations using high-performance liquid chromatography[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2002, 30(4): 1143.

[6] 杨汉煜, 陈笑艳, 钟大放, 等. 液相色谱-串联质谱法测定人血浆中的伪麻黄碱浓度[J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18(2): 116.

(收稿日期: 2007-02-08 修回日期: 2007-03-02)

副主任药师。研究方向: 药品质量检验。电话: 027-86487347。

E-mail: wangwang.ang@163.com

0.02mol·L⁻¹磷酸二氢钾(KH₂PO₄) - 乙腈(50:50); 荧光激发波长: 250nm; 发射波长: 375nm; 流速: 1.0mL·min⁻¹; 柱温: 40℃。

2.2 标准溶液及内标液的配制

准确称取厄贝沙坦对照品 0.010 0g, 置于 100mL 容量瓶中, 加甲醇 50mL 溶解后用水定容至刻度, 摇匀, 即得 100.0μg·mL⁻¹厄贝沙坦的标准液。取该标准液 2.0mL 至 50mL 容量瓶中, 加 50% 甲醇-水稀释至刻度, 摇匀, 即得 4.0μg·mL⁻¹厄贝沙坦的标准液。再依次稀释, 配成 0.02、0.04、0.2、1.0、5.0、10.0、20.0μg·mL⁻¹的系列厄贝沙坦标准液。另准确称取内标 0.005 0g, 置于 100mL 容量瓶中, 加甲醇 50mL 溶解后用水定容至刻度, 摇匀, 即得 50μg·mL⁻¹的内标液。取该内标液 2.0mL 至 25mL 容量瓶中, 用 50% 甲醇-水稀释并定容至刻度, 即得 4μg·mL⁻¹内标液。

2.3 血浆样品预处理

精密吸取 0.2mL 血浆, 置于离心管中, 再精密加入 4μg·mL⁻¹内标液 10μL, 振荡摇匀, 加入乙腈 0.5mL, 振荡 1min, 12 000r·min⁻¹ 离心 10min, 取 50μL 上清液进样, 记录分析结果。

2.4 系统适应性试验

厄贝沙坦、内标在“2.1”项色谱条件下出峰时间分别在 5.96、7.55min 左右, 且无杂峰干扰测定。色谱详见图 1。

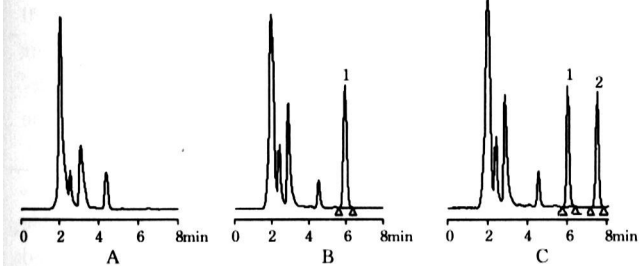


图 1 高效液相色谱

A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 厄贝沙坦标准液; C. 空白血浆 + 厄贝沙坦标准液 + 内标; 1. 厄贝沙坦; 2. 替米沙坦

Fig 1 HPLC

A. blank plasma; B. blank plasma + irbesartan standard solution; C. blank plasma + irbesartan standard solution + internal standard; 1. irbesartan; 2. telmisartan

2.5 标准曲线的绘制

取离心管数支, 分别精密加入系列厄贝沙坦标准液 10μL, 用氮气吹干, 再加入空白血浆 0.2mL, 涡旋混匀, 配成含厄贝沙坦分别为 1.0、2.0、10.0、50.0、250.0、500.0、1 000.0ng·mL⁻¹的系列标准血浆, 按“2.3”项方法操作, 每种浓度做 5 份样品(连续 3d 重复操作), 记录色谱, 计算厄贝沙坦峰面积(A_s)和内标峰面积(A_i)的比值(f)。以血药浓度(C)对平均比值f(f = A_s/A_i)作回归计算, 得回归方程 C = 198.41f - 0.11 (r = 0.9998), 权重因子为 W = 1/C²。结果表明, 厄贝沙坦检测浓度在 1.0~1 000.0ng·mL⁻¹ 范围内线性关系良好, 定量下限为 1ng·mL⁻¹。

2.6 精密度试验

取离心管数支, 分别精密加入低、中、高 3 种浓度的厄贝沙坦标准液 10μL, 用氮气吹干, 再加入空白血浆 0.2mL, 涡旋混匀, 配成含厄贝沙坦分别为 2.0、50.0、500.0ng·mL⁻¹的标准血浆, 按“2.3”项方法操作, 每种浓度做 5 份样品, 记录色谱, 计算f。将f代入当日标准曲线求算血药浓度, 连续 3d, 求得日

内和日间精密度。结果详见表 1。

表 1 回收率及精密度试验结果($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab 1 Recovery and precision test results($\bar{x} \pm s, n = 5$)						
加入量 /ng·mL ⁻¹	测得量 /ng·mL ⁻¹	相对回 收率/%	$\bar{x}$ /%	日内 RSD/%	日间 RSD/%	
2.0	1.92±0.09	96.0±4.5	97.4	4.69	7.25	
50.0	53.2±1.35	106.4±2.7	106.1	2.54	4.65	
500.0	513.1±10.45	102.6±2.1	101.6	2.04	2.81	

2.7 回收率试验

取离心管数支, 分别精密加入低、中、高 3 种浓度的厄贝沙坦标准液 10μL, 用氮气吹干, 再加入空白血浆 0.2mL, 涡旋混匀, 配成含厄贝沙坦分别为 2.0、50.0、500.0ng·mL⁻¹的标准血浆, 按“2.3”项方法操作, 每种浓度做 5 份样品, 记录色谱, 计算f。将f代入当日标准曲线求算血药浓度, 其与真实值的比值即为相对回收率。结果详见表 1。

2.8 稳定性试验

取离心管数支, 分别精密加入低、中、高 3 种浓度的厄贝沙坦标准液 10μL, 用氮气吹干, 再加入空白血浆 0.2mL, 涡旋混匀, 配成含厄贝沙坦分别为 2.0、50.0、500.0ng·mL⁻¹的标准血浆, 每种浓度各配制 20 份血浆样品。3 种浓度各取 5 份样品按“2.3”项方法立即处理, 测得血浆中药物浓度; 5 份在室温下放置 2h, 按“2.3”项方法处理, 测得血浆中药物浓度; 5 份反复冻融 2 次, 按“2.3”项方法处理, 测得血浆中药物浓度; 5 份置于 -20℃ 冰箱中冷冻 30d 后解冻, 按“2.3”项方法处理, 测得血浆中药物浓度。结果详见表 2。

表 2 稳定性试验结果($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab 2 Test result of stability($\bar{x} \pm s, n = 5$)				
加入量 /ng·mL ⁻¹	测得量/ng·mL ⁻¹	立即处理	室温放置2h	反复冻融
2.0	1.92±0.09	1.85±0.11	1.89±0.15	1.85±0.12
50.0	53.2±1.35	53.5±3.79	49.4±3.21	48.1±5.56
500.0	513.1±10.45	500.3±20.75	492.8±15.67	490.6±25.17

3 讨论

本试验建立的测定血浆中厄贝沙坦的 HPLC- 荧光检测法, 血浆中杂质不干扰样品的测定, 标准曲线线性范围为 1.0~1 000.0ng·mL⁻¹, 线性关系良好, 定量下限为 1ng·mL⁻¹; 低、中、高 3 种浓度的日内和日间变异均 < 10.0%; 相对回收率在 96.0%~106.4% 之间。符合药物(化学药品)制剂人体药理学试验指导原则生物样品分析要求。

本试验的血浆样品处理方法较文献采用的固相萃取法更简便易行, 分析快速且消耗也大为减少。

厄贝沙坦与内标分离完全, 没有干扰, 且能达到最低检测限的要求。可以用于该药的药动力学和生物等效性研究。

参考文献

[1] Gonza'lez L, Lo'pez JA, Alonso RM, et al. Fast screening method for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2002, 949(1): 49.

[2] 曾国光, 陈波, 孙华, 等. 国产厄贝沙坦胶囊的生物等效性研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2001, 17(3): 207.

[3] 吴良法. 反相高效液相色谱法测定伏立康唑的含量[J]. *中国药房*, 2007, 18(1): 58.

(收稿日期: 2007-07-27 修回日期: 2007-08-10)