

依那普利在大鼠体内的药动学研究

张 静¹, 隋强君², 王 晨^{1*}

1. 天津医科大学肿瘤医院 药学部 国家肿瘤临床医学研究中心 天津市肿瘤防治重点实验室, 天津 300060

2. 天津市第三中心医院 检验科, 天津 300170

摘要: 目的 通过 LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中依那普利活性代谢产物依那普利拉浓度, 研究依那普利在大鼠体内的药动学。方法 Wistar 大鼠 ig 依那普利 15 mg/kg, 采用固相萃取法对大鼠血浆样品预处理, 洗脱液为甲醇、水。色谱与质谱条件为 Diamond C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 5 mmol/L 乙酸铵 (45 : 55); 体积流量: 0.5 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 5 μL。采用 ESI (+) 离子源; 干燥气 (N₂) 体积流量 11.0 L/min, 压力 275.8 kPa, 温度 350 °C; 毛细管电压 3 500 V; 多级反应监测 (MRM) 模式, 正离子模式; EMV 为 400 eV。结果 血浆中内源性物质对测定无干扰, 依那普利拉的线性范围为 20~1 500 ng/mL, 最低定量限为 20 ng/mL。准确度和精密度良好。血浆样本中依那普利拉的提取回收率大于 85%, 且无浓度相关性。经 2 次冻融以及冷冻 14 d 稳定良好。大鼠体内依那普利拉的主要药动学参数: AUC_{0-t} 为 (8015±297.7) ng/mL·h, C_{max} 为 (1 405±269.10) ng/mL, t_{max} 为 (2.45±0.19) h, t_{1/2} 为 (4.82±0.32) h, Clz/F 为 (2.18±0.10) L/kg·h, Vz/F 为 (12.63±1.31) L/kg。结论 本方法专属性强、灵敏度高、准确性好。通过测定代谢产物依那普利拉经时血药浓度, 可以考察依那普利的药动学特征。

关键词: 依那普利; 依那普利拉; 贝那普利拉; LC-MS/MS; 药动学

中图分类号: R969.1

文献标志码: A

文章编号: 1674 - 5515(2016)06 - 0757 - 05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2016.06.006

Pharmacokinetics of enalapril in rats

ZHANG Jing¹, SUI Qiang-jun², WANG Chen¹

1. Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, National Clinical Research Center for Cancer, Department of Pharmacy, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China

2. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China

Abstract: Objective To investigate the pharmacokinetics of enalapril in rat by establishing LC-MS/MS method for determination of enalaprilat, active metabolite of enalapril in rat plasma. **Methods** Wistar rats were ig administered with a single dose 15 mg/kg of enalapril. Plasma samples were pretreated by solid-phase extraction, and elution solutions were methanol and water. The separation was performed on Diamonsil C₁₈ column (150 mm × 4.6mm, 5 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-5mmol/L ammonium (45 : 55) at 0.5 mL/min. The column temperature was set at 30 °C, and the flow rate was 0.5 mL/min with injection volume of 5 μL. Enalaprilat was determined by LC-MS/MS in the positive ion multiple reaction monitoring (MRM) mode with EMV 400 eV. ESI (+) ion source was used, dry gas (N₂) had flow rate of 11.0 L/min, pressure was 275.8 kPa with temperature 350 °C, and capillary voltage was 3 500 V. **Results** No endogenous interfering peak was observed in chromatograms. The calibration curve was linear over the concentration range of 20 — 1 500 ng/mL, and the lower limit of quantitation was 20 ng/mL. Accuracy and precision met the requirements. The recovery of enalaprilat was more than 85% with no concentration dependence. The plasma samples were stable after two freeze-thaw cycles and after being stored for 14 d. Main pharmacokinetic parameters of enalaprilat were as following: AUC_{0-t} (8 015 ± 297.7) ng/mL·h, C_{max} (1 405 ± 269.10) ng/mL, t_{max} (2.45 ± 0.19)h, t_{1/2} (4.82 ± 0.32) h, Clz/F (2.18 ± 0.10) L/kg·h, Vz/F (12.63 ± 1.31) L/kg. **Conclusions** The method is excellent specificity, acceptable precision, and accuracy.

收稿日期: 2016-01-08

作者简介: 张 静, 女, 硕士, 毕业于山东大学药学院, 研究方向: 药学。Tel: 15202272347 E-mail: dszhangjing@163.com

*通信作者 王 晨, 女, 主任药师, 研究方向: 医院药学。Tel: (022)23340123-5104 E-mail: jieyi789@126.com

The pharmacokinetics of enalaprilat, the active metabolite of enalapril in plasma could be investigated by determine the concentration-time, and pharmacokinetic characteristics of enalapril drug can also be investigated.

Key words: enalapril; enalaprilat; benazeprilat; LC-MS/MS; pharmacokinetics

依那普利为不含巯基的血管紧张素转化酶抑制剂 (ACEI), 作为前药在体内经脱乙酰基代谢成活性代谢产物依那普利拉, 对血管紧张素转化酶起强烈抑制作用, 降低血管紧张素 II 的含量, 舒张血管, 降低血压, 主要经肾脏排出体外^[1]。依那普利对血管紧张素转化酶的抑制作用约为卡托普利的 3 倍, 降压作用高效持久, 在临床上应用比较广泛。依那普利不仅可以单独用于治疗高血压, 还可与其他类型的抗高血压药合用, 如钙离子通道抑制剂、利尿药等, 提高药物疗效, 降低不良反应, 发挥协同降压作用。此外, 近年来研究发现, 依那普利在治疗慢性肺心病、冠状动脉疾病、改善左心室功能、慢性肾小球肾炎、高胰岛素血症、糖尿病肾病、改善血管内皮、治疗神经源性晕厥等方面效果显著^[2]。但是, 与钙离子通道抑制剂等相比, ACEI 类降压药的不良反应较多, 近年来依那普利的不良反应也有报道^[3-4]。因此, 检测依那普利的活性代谢产物依那普利拉的血药浓度在临床上具有重要意义, 尤其是肝肾功能减退的患者。本实验采用快速、灵敏的 LC-MS/MS 法, 通过测定依那普利代谢产物依那普利拉的经时血药浓度, 考察依那普利在大鼠体内的药动学特征。

1 材料

1.1 药品与试剂

马来酸依那普利原料药 (质量分数 >95%)、依那普利拉对照品 (批号 20040815, 质量分数 99.5%)、贝那普利拉 (批号 09081001, 质量分数 99.1%) 对照品均由山东绿因药业有限公司提供。乙腈、甲醇均为色谱纯, 美国 J.T. Baker 公司生产; 乙酸铵、氢氧化钠均购自中国医药上海化学试剂公司。

1.2 仪器

Agilent 1150 series HPLC, 6410 Triple Quad MS/MS (美国安捷伦科学技术公司); 1 mL Sep-pak C₁₈ 固相萃取小柱 (美国 Waters 公司); 梅特勒-托利多 AX-205 电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); XW-80A 型旋涡混合器 (上海精科实业有限公司); ABBOTT 高速离心机 (美国雅培公司); PK514BP 超声清洗器 (德国 BANDEL); BHW-IV 型电热恒温水温箱 (北京医疗设备厂); H97-A 恒

温磁力搅拌器 (梅颖浦仪器仪表制造有限公司)。

1.3 实验动物

健康雄性 Wistar 大鼠 6 只, 清洁级, 体质量为 (230±10) g, 购自山东省实验动物中心, 许可证号 SYXK (鲁) 2014 0010。实验鼠用配合饲料由山东省实验动物中心提供。动物房 12 h/12 h 明暗交替, 温度 (20±2) °C, 湿度 (45±5) %, 大鼠均自由进食饮水。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

精密称取依那普利拉对照品 10 mg, 置 25 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配成质量浓度为 0.2 mg/mL。精密称取贝那普利拉对照品 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并加至刻度, 得 1.0 mg/mL 母液, 用流动相稀释至刻度, 得 5 μg/mL 溶液, 放入 4 °C 保存, 使用时放至室温。

2.2 样品处理

取血浆样品 200 μL, 加入内标 10 μg/mL 贝那普利拉溶液 15 μL, 混匀, 加入 1 mol/L 氢氧化钠 15 μL, 充分涡旋混匀后, 留待上样。Sep-pak C₁₈ 固相萃取小柱依次用 1 mL 甲醇、1 mL 纯净水活化 2 遍, 把处理好的加标血浆上样, 然后用 1 mL 纯净水洗涤, 弃去洗涤液。用 1 mL 甲醇洗脱, 洗脱液于 40 °C 水浴中用 N₂ 吹干, 残渣用 100 μL 流动相溶解, 即得。

2.3 测定条件

2.3.1 色谱与质谱条件 Diamond C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-5 mmol/L 乙酸铵 (45:55); 体积流量: 0.5 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 5 μL。

采用 ESI (+) 离子源; 干燥气 (N₂) 体积流量 11.0 L/min, 压力 275.8 kPa, 温度 350 °C; 毛细管电压 3 500 V; 多级反应监测 (MRM) 模式, 正离子模式; EMV 为 400 eV。依那普利拉与内标贝那普利拉的定量离子对分别为 *m/z* 349.1→206.2, 397.2→351.2。

2.3.2 专属性试验 大鼠空白血浆、依那普利拉和内标贝那普利拉对照品溶液、空白血浆外加依那普利拉和内标贝那普利拉、大鼠给药后血浆样本处理

后进样测定, 所得的色谱图见图 1。依那普利拉、内标贝那普利拉出峰时间分别为 3.45、3.08 min。

结果表明, 各色谱峰形良好, 血浆中的内源性物质不干扰测定。

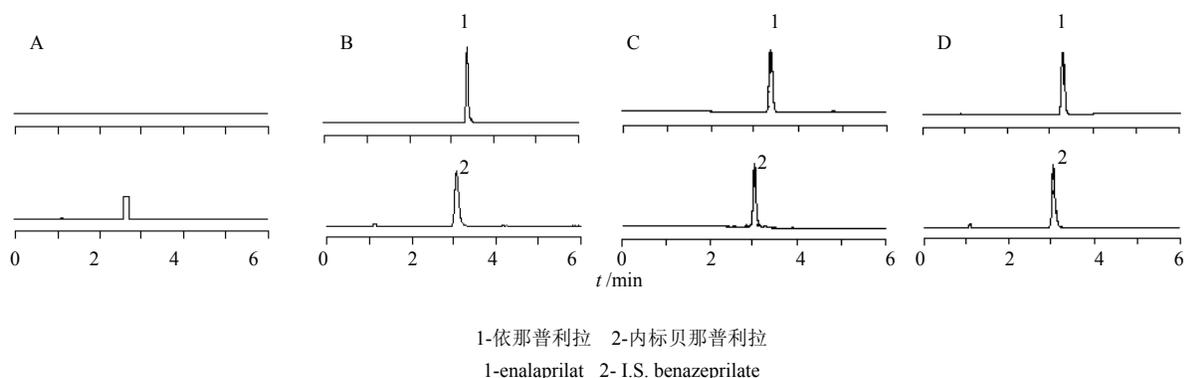


图 1 空白血浆 (A)、依那普利拉 500 ng/mL 和内标溶液 (B)、空白血浆加依那普利拉 50 ng/mL、内标溶液 (C) 和依那普利给药后 3 h 血浆样品 (D) 色谱图

Fig. 1 Chromatograms of blank plasma (A), enalaprilat 500 ng/mL and I.S. standard solution (B), blank plasma sample spiked with enalaprilat 50 ng/mL and I.S. (C), and plasma sample 3 h after ig administration (D)

2.3.3 标准曲线与最低定量限 取空白血浆适量, 用对照品溶液配制含依那普利拉 20、50、100、200、500、1 000、1 500 ng/mL 的样本, 每个浓度 5 份样本, 处理后进样分析。以待测物质量浓度为横坐标, 待测物与内标峰面积比值为纵坐标, 用加权法 ($W=1/x^2$) 进行回归运算, 得回归方程 $Y=7.09 \times 10^{-4} X-0.016 2 (r=0.995)$, 结果表明依那普利拉在 20~1 500 ng/mL 线性关系良好。

以信噪比 (S/N) 大于 10 确定其最低定量限。依那普利拉质量浓度为 20 ng/mL 时, S/N 为 10.3, 因此, 最低定量限为 20 ng/mL。

2.3.4 精密度和准确度试验 取空白血浆适量, 用对照品溶液配制含依那普利拉 50、200、1 000 ng/mL 的样本, 每个浓度 5 份样本, 连续测定 3 d, 根据当日标准曲线回归方程计算依那普利拉的质量浓度, 日内、日间 RSD 和 RE 分别表示精密度和准确度, 见表 1。

2.3.5 稳定性试验 取空白血浆适量, 用对照品溶液配制含依那普利拉 50、200、1 000 ng/mL 的样品, 置超低温冰箱 -80 °C 冷冻保存。分别经提取后室温放置 7 h、冻融 2 次以及冷冻 14 d 后, 进行样品分析, 每个浓度进行 5 个样本, 见表 2。结果表明, 血浆样本中依那普利拉经冻融 2 次以及长期冷冻后稳定性良好。

2.3.6 回收率与基质效应试验 取空白大鼠血浆分别配制依那普利拉质量浓度分别为 50、200、1 000 ng/mL 的质控样品, 进行样本处理后, 测得峰面积 A_1 ; 以对照品溶液配制质量浓度分别为 100、400、2 000 ng/mL 的标准样本, 测得峰面积 A_2 ; 200 μ L 空白血浆处理后, 分别采用 100、400、2 000 ng/mL 标准溶液 100 μ L 复溶, 测得峰面积 A_3 。以 A_1/A_3 表示提取回收率, A_3/A_2 表示基质效应, 见表 3。结果表明, 依那普利拉的回收率大于 85%, 且回收率无浓度相关性。

表 1 精密度和准确度试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)
Table 1 Results of precision and accuracy test ($\bar{x} \pm s, n=5$)

加入质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	日内精密度			日间精密度		
	测得质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%	RE/%	测得质量浓度/(ng/mL)	RSD/%	RE/%
50	48.60 ± 3.47	7.20	-2.80	51.42 ± 3.49	6.79	2.84
200	201.52 ± 9.86	4.88	0.65	190.33 ± 9.87	5.19	-4.84
1 000	991.09 ± 45.12	4.55	-0.87	1 051.13 ± 47.43	4.51	5.11

表 2 稳定性试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)
Table 2 Results of stability test ($\bar{x} \pm s, n=5$)

加入质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	冷冻前		室温放置 7 h		冻融 2 次		冷冻 14 d	
	测得质量浓 度/(ng·mL ⁻¹)	RSD%	测得质量浓 度/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%	测得质量浓 度/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%	测得质量浓 度/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%
50	50.42±2.66	5.27	52.13±4.09	7.85	47.56±4.09	8.60	48.08±3.97	8.28
200	201.22±7.74	3.85	200.09±2.11	4.91	204.38±9.87	4.83	206.38±10.08	4.85
1 000	994.82±36.82	3.70	1 033.35±47.43	4.59	983.31±47.43	4.82	976.55±51.82	5.31

表 3 提取回收率和基质效应试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)
Table 3 Results of recovery test and matrix effect test ($\bar{x} \pm s, n=5$)

加入质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	提取回收率试验		基质效应试验	
	数值/%	RSD/%	数值/%	RSD/%
50	88.6±3.37	3.80	101.4±6.07	5.99
200	92.5±3.96	4.28	99.6±5.96	5.98
1 000	88.1±5.12	5.81	97.2±4.16	4.28

2.4 药动学试验

雄性 Wister 大鼠 6 只, 适应性饲养 1 周。禁食 12 h 后, 分别 ig 依那普利 15 mg/kg。于给药前和给药后 1、2、3、4、6、8、12、24 h 颈静脉采血 1 mL, 立即移入肝素抗凝管中, 静置, 3 500 r/min 低温离心 5 min, 取上层血浆, -80 °C 冷冻保存。整个实验过程中大鼠状态良好, 进水进食情况正常, 无脱落。

血浆样本处理后, 采用 HPLC-MS/MS 法测定样品中依那普利拉经时血浓度。大鼠的血药浓度-时间曲线见图 2。采用 DAS 2.2 药动学分析软件, 以非房室模型处理血浆浓度-时间数据, 依那普利拉的主要药动学参数见表 4。

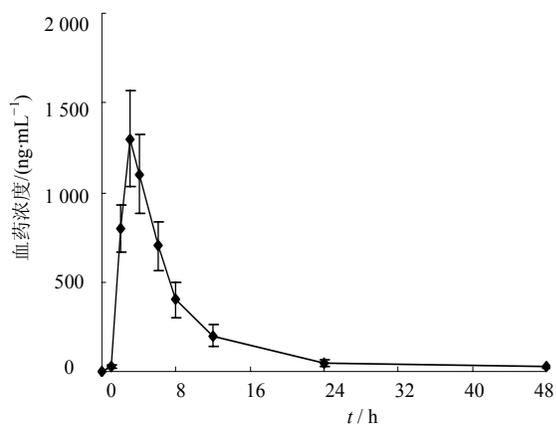


图 2 大鼠血浆中依那普利拉的浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Fig. 2 Plasma concentration-time curve of enalaprilat in rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表 4 大鼠体内依那普利拉主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 4 Major pharmacokinetic parameters of enalaprilat in rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	单位	数值
AUC _{0-t}	ng·mL·h ⁻¹	8 015±297.7
C _{max}	ng·mL ⁻¹	1 405±269.1
t _{max}	h	2.45±0.19
t _{1/2}	h	4.82±0.32
Cl _{z/F}	L·kg ⁻¹ ·h	2.18±0.10
V _{z/F}	L·kg ⁻¹	12.63±1.31

3 讨论

目前依那普利拉的测定方法报道较多, 有 GC 法^[5]、毛细管电泳^[6]、酶联法^[7-8]、HPLC-MS 法^[9]以及 LC-MS/MS 法^[1, 10-13]等。以上主要涉及药物制剂和人血浆样本中依那普利拉的测定。本实验建立方便可行的大鼠血浆中依那普利拉的测定方法, 用于研究依那普利在大鼠体内的药动学以及相关的药物相互作用。

大鼠血浆样本的预处理方法主要有液-液萃取法和固相萃取法。本实验考察了常用的多种有机溶剂的萃取效果, 如二氯甲烷、醋酸乙酯、异丙醇、氯仿, 结果发现上述有机溶剂不能有效地去除大鼠血浆中内源性物质的干扰, 或绝对回收率较低。采用固相萃取法进行样本预处理, 并对洗脱液的组成和顺序进行了考察, 结果显示 Waters Sep-pak C₁₈

固相萃取小柱对大鼠血浆中依那普利拉的分离效果较好。固相萃取柱依次用 1 mL 甲醇、1 mL 纯净水活化 2 遍, 血浆样品上样后依次用 1 mL 纯净水洗涤, 1 mL 甲醇洗脱, 能够有效地除去血浆内源性物质的干扰, 降低基质效应, 回收率符合要求。实验过程中对流动相的组成也进行了考察, 甲醇造成测定背景不稳定并且基线较高, 药物浓度 - 峰面积的线性关系欠佳, 乙腈可改善上述现象。乙酸铵可以优化色谱峰形, 降低基质效应, 提高信号强度。内标对样品的测定具有至关重要, 本实验也考察了包括多种 ACEI 类在内的的化合物。贝那普利与贝那普利拉、依那普利拉的提取方式相对一致, 但是贝那普利的峰面积重现性差, 可能与大鼠血浆中存在的药物代谢酶有一定关系, 所以本实验采用同是 ACEI 类代谢产物的贝那普利拉作为内标。

综上所述, 本实验所采用的血浆样品的处理方法可有效提取依那普利拉, 并且无浓度相关性。LC-MS/MS 法简便易行, 最低定量限可达 20 ng/mL, 整个线性范围宽广, 可适用于依那普利多种剂量的代谢产物依那普利拉的测定。本方法可以快速有效的测定大鼠血浆中依那普利拉的浓度, 可用于研究依那普利在体内的代谢以及代谢物依那普利拉的血药浓度检测和药动学研究。

参考文献

[1] Burckhardt B B, Tins J, Laeer S. Simultaneous quantitative and qualitative analysis of aliskiren, enalapril and its active metabolite enalaprilat in undiluted human urine utilizing LC-ESI-MS/MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28(12): 1679-1691.

[2] Gerstein H C. Enalapril reduced the risk for developing new-onset diabetes in left ventricular dysfunction [J]. *ACP J Club*, 2003, 139(3): 68.

[3] Soejima H, Ogawa H, Suefuji H, et al. Comparison of effects of losartan versus enalapril on fibrinolysis and coagulation in patients with acute myocardial infarction [J]. *Am J Cardiol*, 2001, 87(12): 1408-1411.

[4] Spence J D. Effect of indomethacin on blood pressure in

elderly people with essential hypertension well controlled on amlodipine or enalapril [J]. *Am J Hypertens*, 2001, 14: 835.

[5] Shioya H, Shimojo M, Kawahara Y. Determination of enalapril and its active metabolite enalaprilat in plasma and urine by gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 1992, 6(2): 59-62.

[6] Trapp O, Trapp G, Schurig V. Determination of the cis-trans isomerization barrier of enalaprilat by dynamic capillary electrophoresis and computer simulation [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(2): 318-323.

[7] Arafat T, Awad R, Hamad M, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics profiles of enalapril maleate in healthy volunteers following determination of enalapril and enalaprilat by two specific enzyme immunoassays [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2005, 30(4): 319-328.

[8] Matalka K, Arafat T, Hamad M, Jehanli A. Determination of enalapril and enalaprilat by enzyme linked immunosorbent assays: application to pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2002, 16(3): 237-244.

[9] 文爱东, 杨志福, 王志睿, 等. 马来酸依那普利片的人体生物等效性研究 [J]. *中国药学杂志*, 2007, 42(7): 524-528.

[10] Cheregi M, Albu F, Udrescu S, et al. Greener bioanalytical approach for LC/MS-MS assay of enalapril and enalaprilat in human plasma with total replacement of acetonitrile throughout all analytical stages [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, 927: 124-132.

[11] Ramusovic S, Thielking G, Læer S. Determination of enalapril and enalaprilat in small human serum quantities for pediatric trials by HPLC-tandem mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2012, 26(6): 697-702.

[12] 张志涛, 蒋志文. 依那普利滴丸和片剂在人体内的药动学与生物等效性. *中国新药与临床杂志*, 2008, 27(12): 903-907.

[13] 董淑英, 李见春, 张志涛, 等. 马来酸依那普利口腔崩解片健康人体生物等效性研究 [J]. *中国新药杂志*, 2008, 17(9): 782-786.