

阿齐沙坦在大鼠血浆中的药动学研究

杨旭^{1#}, 王旭光^{1#}, 李彬瑶¹, 杨俊凤¹, 李昊丰², 黄莹^{1*}

1. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

2. 中国药科大学, 江苏 南京 210009

摘要: 目的 建立简单、快速、灵敏的测定大鼠血浆中阿齐沙坦血药浓度的 HPLC-荧光分析方法。方法 色谱柱为 Agilent Epilent plus C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1%磷酸水溶液-甲醇 (35 : 65), 激发波长为 265 nm, 吸收波长为 378 nm。结果 血浆中内源性物质对待测物无干扰; 线性范围为 0.1~100 μg/mL, R²=0.999; 定量下限为 0.1 μg/mL; 高中低浓度样品提取回收率在 87.76%~95.65%, 批内批间精密密度 RSD 在 0.86%~1.87%, 相对误差 RE 均小于 5%, 符合相关生物样品检测标准。SD 大鼠 ig 给予 2.0 g/kg 的阿齐沙坦酯钾后, 阿齐沙坦在大鼠体内 AUC_{0-t} 为 (5451.94±297.96) μg/L·h, C_{max} 为 (258.01±49.75) μg/mL。结论 建立了专属性强、灵敏度高、重复性好的 HPLC-荧光分析方法, 可用于阿齐沙坦在大鼠血浆中血药浓度测定。

关键词: 阿齐沙坦; 阿齐沙坦酯; 高效液相色谱; 血药浓度; 荧光测定

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2016)04-0572-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.04.011

Determination of concentration of Azilsartan in rat plasma by HPLC with fluorescence detection

YANG Xu¹, WANG Xu-guang¹, LI Bin-yao¹, YANG Jun-feng¹, LI-Hao-feng², HUANG Yin^{1*}

1. TJIPR Drug Assessment Co.Ltd, Tianjin 300301, China

2. China Pharmaceutical University, Nanjin 210009, China

Abstract: Objective To establish a HPLC-fluorescence method for determination of concentration of Azilsartan in rat plasma.

Methods Chroma-tographic column: Agilent Epilent plus C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); Mobile phase was 0.1% phosphoric acid solution and methanol (35 : 65); Excitation wavelength was 265 nm; Ereceiver wavelength was 378 nm. **Results** Endogenous substance in plasma samples had no effect on result. Calibration curves were linear over 0.1—100 μg/mL (R²=0.999) and the minimum detection concentration was 0.1 μg/mL. The recoveries of azilsartan from plasma were between 87.76% and 95.65%. The RSD values of intra and inter-day were between 0.86%—1.87%. The accuracy (RE%) was blow 5%. After i.g. of 2 000 mg/kg Azilsartan, the pharmacokinetics parameters were estimated as follows: AUC_{0-t} values were (5 451.94 ± 297.96) μg/L·h and C_{max} were (258.01 ± 49.75) μg/mL. **Conclusion** A sensitive and reliable HPLC-fluorescence method is developed, and it can be used for determination of concentration of Azilsartan in rat plasma.

Key words: Azilsartan; Azilsartan medoxomil; HPLC; blood concentration; fluorimetry

阿齐沙坦 (Azilsartan) 是日本武田制药开发的新一代抗高血压药, 其实质为一种血管紧张素 II 受体的竞争性拮抗剂, 在治疗高血压方面, 治疗效果优于现有的缬沙坦和奥美沙坦^[1-3]。阿齐沙坦酯 (Azilsartan medoxomil) 是阿齐沙坦的前药, 在胃肠

道吸收过程中会被芳香酯酶水解为阿齐沙坦^[4-5]。阿齐沙坦酯于 2011 年通过美国 FDA 批准在美国上市, 而阿齐沙坦则在 2012 年于日本上市^[6]。本文旨在建立简单、快速、准确的测定大鼠血浆中阿齐沙坦的 HPLC-荧光法, 用于阿齐沙坦血药浓度的测定。

收稿日期: 2016-03-30

基金项目: 中药复方生殖发育毒性及毒代动力学关键技术研究 (2015ZX09501004-002-001)

作者简介: 杨旭 (1988—), 男, 湖南人, 理学硕士, 研究方向为非临床药代动力学、毒代动力学。Tel: 18920862797 E-mail: yangx8@tjipr.com

王旭光 (1988—), 女, 黑龙江人, 理学硕士, 研究方向为非临床药代动力学、毒代动力学。Tel: 15802239982 E-mail: wangxg@tjipr.com

*通信作者: 黄莹, 女, 副研究员。Tel: 13820118868 E-mail: huangy@tjipr.com

#为并列第一作者

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1200, 安捷伦科技(中国)股份有限公司出品; 检测器: Agilent FLD, G-1321A; 自动进样器: Agilent 1200 ALS, G-1329A; 泵: Agilent 1200 Quat Pump, G-1311A; 脱气机: Agilent 1200 Degasser, G-1322A; 柱温箱: Agilent 1200 TCC, G-1316A; 记录工作站: Agilent chemstation B.03.02。

1.2 药品与试剂

阿齐沙坦酯钾(供试品), 质量分数 99.3%, 批号 BJZSAK150520, 日本武田制药公司产品; 阿齐沙坦(对照品), 质量分数 99.7%, 批号 20150408, 中国食品药品检定研究院产品; 缙沙坦(内标), 质量分数 100.0%, 批号 100651-201203, 中国食品药品检定研究院产品。

乙腈, 色谱纯, 购于 Fisher Scientific; 甲醇, 色谱纯, Fisher Scientific; 醋酸乙酯, 色谱纯, 天津市康科德科技有限公司。

1.3 实验动物

SD 大鼠 6 只, 雌雄各半, 体质量 180~220 g, 北京维通利华实验动物技术有限公司, 生产单位许可证编号: SCXK(京)2012-0001。动物使用方案经天津药物研究院新药评价有限公司实验动物管理和使用委员会(IACUC)审查并批准。

2 方法

2.1 色谱条件

流动相为 0.1%磷酸水溶液-甲醇(35:65), 体积流量 1.0 mL/min。色谱柱为 Agilent Epilent plus C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。激发波长 265 nm, 吸收波长 378 nm。

2.2 溶剂配制

稀释剂及复溶剂: 70 mL 乙腈与 30 mL 甲醇混合均匀, 取 70 mL 与 30 mL 去离子水混合, 再加入 100 μL 磷酸, 混匀。

萃取剂: 120 mL 醋酸乙酯与 80 mL 乙腈溶液混合, 加入 200 μL 磷酸, 混匀。

2.3 阿齐沙坦标准系列溶液及质控溶液配制

精密称取适量阿齐沙坦对照品, 稀释剂溶解并稀释成质量浓度为 1 000、500、100、50、10、5、1 μg/mL 的阿齐沙坦标准系列溶液和质量浓度为 800、50、2.5 μg/mL 的质控溶液。

2.4 缙沙坦(内标)溶液配制

精密称取缙沙坦适量, 甲醇溶解并稀释成质量

浓度为 100 μg/mL 的内标溶液。

2.5 模拟血浆样品配制

取阿齐沙坦标准系列溶液及质控溶液 15 μL 加入空白大鼠血浆 135 μL, 混匀。

2.6 血浆样品处理过程

取待测血浆样品 150 μL, 加入 50 μL 内标溶液(100 μg/mL), 混匀, 加入 900 μL 萃取剂, 涡旋离心后取上清 800 μL, 氮气吹干, 稀释剂复溶, 涡旋离心, 取上清进样测定。

3 动物给药方案及血浆样本采集

SD 大鼠 6 只, 雌雄各半, ig 给予 2 000 mg/kg 的阿齐沙坦酯钾, 于药前(0 h)及药后 0.25、1、4、10、24、48 h 眼底静脉丛采血, 肝素钠抗凝, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清-80℃冻存待测。

4 数据分析

使用 Agilent chemstation B.03.02 工作站对目标峰进行积分, 记录峰面积, 以待测物浓度(X)为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值(Y)为纵坐标, 用加权最小二乘法(权重为 $1/X^2$)进行回归运算, 求得回归方程即为血浆校正曲线。各毒代动力学参数用 Das 2.0 计算得出。

5 结果

5.1 专属性

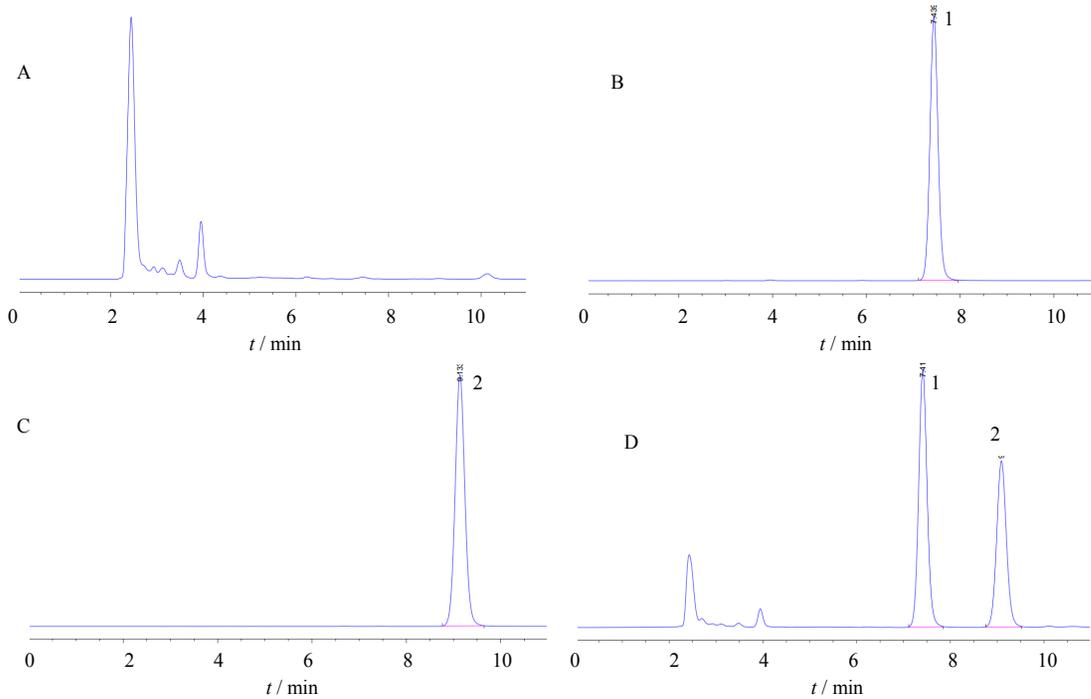
配制大鼠空白血浆、阿齐沙坦和内标溶液以及含药血浆样品, HPLC 测定后得色谱图(图 1), 结果显示, 血浆内源性物质对目标峰不存在干扰, 阿齐沙坦保留时间约 7.4 min, 内标保留时间约 9.1min, 阿齐沙坦与内标分离完全且峰形良好, 证明该分析方法专属性良好, 能够用于测定阿齐沙坦的血药浓度。

5.2 标准曲线及定量下限

取 2.5 项下配制的系列浓度阿齐沙坦模拟血浆样品, 按照 2.6 方法操作, 进行 HPLC 分析。求得回归方程: $Y=0.0327X+0.0095$, $R^2=0.999$ 。结果表明阿齐沙坦在 0.1~100 μg/mL 线性良好。配制质量浓度为 0.1 μg/mL 的阿齐沙坦血浆样品, 平行 6 份, 按照 2.6 方法操作, 进行 HPLC 检测, 测定质量浓度为 (0.102 ± 0.001) μg/mL, RE 为 2.43%, RSD 为 1.34%, 说明本方法测定血浆中阿齐沙坦的定量下限可达到 0.1 μg/mL。

5.3 提取回收率

取 2.5 项下配制的质量浓度为 0.25、5、80 μg/mL 的质控模拟血浆样品, 按照 2.6 方法提取, 进行



A-空白血浆; B-阿齐沙坦对照品; C-缬沙坦对照品; D-阿齐沙坦及缬沙坦血浆样品; 1-阿齐沙坦; 2-缬沙坦
A- blank plasma; B- standards of Azilsartan; C- standards of valsartan; D- samples of Azilsartan and valsartan; 1- Azilsartan; 2- valsartan

图1 阿齐沙坦 HPLC-荧光色谱图

Fig 1 HPLC-fluorescence chromatogram of Azilsartan in rat plasma

HPLC 检测, 样品峰面积记为 A_1 。另配制质量浓度为 0.25、5、80 $\mu\text{g/mL}$ 的阿齐沙坦标准溶液样品, 进行 HPLC 检测, 样品峰面积记为 A_2 , 以 A_1/A_2 计算回收率。结果显示, 低中高浓度样品提取回收率分别为 $(87.76 \pm 1.39)\%$ 、 $(95.65 \pm 1.03)\%$ 及 $(94.13 \pm 2.11)\%$, 符合相关生物样品检测标准。

5.4 精密度及准确度

按照 2.5 项下配制方法, 配制质量浓度为 0.25、5、80 $\mu\text{g/mL}$ 的模拟血浆样品, 每批每浓度平行 6 份, 连续配制 3 批, 按照 2.6 方法操作, 进行 HPLC 检测, 考察结果见表 1, 结果显示, 低中高浓度样

品日内 RSD 分别为 1.87%、1.46%、1.14%, 日间 RSD 分别为 0.75%、0.86%、1.47%, RE 分别为 3.10%、2.86%、-1.59%, 符合生物样品检测标准。

5.5 样品稳定性

按照 2.5 项下配制方法, 配制质量浓度为 0.25、5、80 $\mu\text{g/mL}$ 的模拟血浆样品, 考察血样室温放置 4 h、-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻融循环 3 次、处理后进样器放置 24 h 的稳定性, 测定结果见表 1。结果表明, 血样室温放置 4 h、-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻融循环 3 次及处理后进样器放置 24 h 后, 样品测定结果 $\text{RE} < 10\%$, 说明在上述条件下样品稳定。

表 1 稳定性实验结果 (n=6)

Table 1 Result of stability experiment (n = 6)

浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	RE/%		
	室温放置 4 h	进样器放置 24 h	-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻融循环 3 次
0.25	4.00	4.80	5.60
5	4.80	-2.00	0.60
80	-2.03	-2.40	-1.63

5.6 动物实验研究结果

SD 大鼠 6 只, ig 给予 2 000 mg/kg 的阿齐沙坦酯钾后, 血药浓度-时间关系见图 2, 动力学参数分

别见表 2。结果显示, ig 给予 2.0 g/kg 的阿齐沙坦酯钾后, 阿齐沙坦在大鼠体内 AUC_{0-t} 为 $(5451.94 \pm 297.96) \mu\text{g/L}\cdot\text{h}$, C_{max} 为 $(258.01 \pm 49.75) \mu\text{g/mL}$ 。

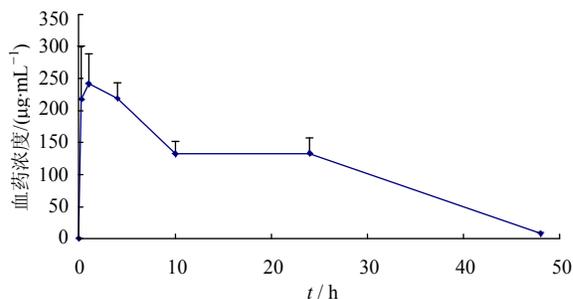


图2 阿齐沙坦在大鼠体内的药时曲线 (n=6)

Fig 2 Blood concentration-time curve of Azilsartan in rat (n = 6)

表2 阿齐沙坦在大鼠体内的毒代动力学参数 (n=6)

Table 2 Toxicokinetics parameters of Azilsartan in rat (n = 6)

参数	单位	数值
AUC _{0-t}	µg/L·h	5 451.94 ± 297.96
C _{max}	mg/L	258.01 ± 49.75
t _{1/2z}	h	6.71 ± 0.05
T _{max}	h	0.58 ± 0.38
Vz/F	L/kg	3.52 ± 0.15
CLz/F	L/(h·kg)	0.36 ± 0.02

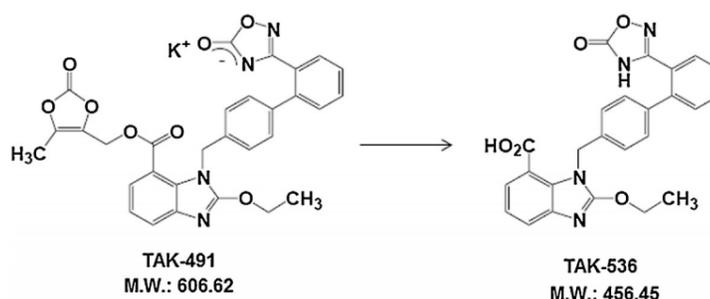


图3 阿齐沙坦酯水解过程

Fig. 3 Hydrolysis process of the Azilsartan medoxomil

在液相条件摸索阶段, 参考相关文献^[9-11], 通过对流动相不同配比和 pH 条件进行筛选, 对洗脱时间不断优化, 最终确定本研究的色谱测定条件。稀释剂及复溶剂采用含 0.1%磷酸的甲醇乙腈水的混合溶液, 能够促进阿齐沙坦的溶解和维持样品的稳定。流动相中加入了 0.1%磷酸, 有利于样品及内标峰形的改善, 提高了样品分离度。在实验样品处理过程中, 选用醋酸乙酯作为提取剂, 提取效果不佳, 回收率仅 60%左右, 经实验摸索, 发现采用醋酸乙酯与乙腈混合溶液(混合比例 6:4), 加入 0.1%磷酸作为提取剂, 提取效果良好, 回收率高达 85%以上。

6 讨论

阿齐沙坦酯钾是阿齐沙坦酯的制剂形式, Naohiro 等^[5]对阿齐沙坦酯体内吸收过程进行了研究, 结果表明大鼠空肠注射阿齐沙坦酯后, 现有条件下, 血浆中几乎检测不到阿齐沙坦酯, 而阿齐沙坦作为主要的活性代谢产物大量存在于体内, 说明阿齐沙坦酯进入体内后几乎完全水解为阿齐沙坦(图 3), 因此可以通过研究阿齐沙坦体内变化间接反映阿齐沙坦酯在动物体内的代谢情况。

目前, 测定血浆中药物浓度常用的检测方法有 HPLC-UV、LC-MS/MS 等。Vekariya 等^[7]采用 HPLC-PDA 法测定血浆中阿齐沙坦的浓度, 检出限仅为 1.0 µg/mL, 不能满足本研究中血浆药物浓度检测的要求。此外, 采用 HPLC-UV 法进行测定, 血浆样品中的内源性物质可能对待测物产生干扰。LC-MS/MS 虽解决了上述问题, 但同时也提高了检测成本。文献报道阿齐沙坦分子结构中存在能够发射强荧光的共轭结构^[8], 因此本文选择采用 HPLC-荧光法测定阿齐沙坦的血药浓度。

与 HPLC-UV 方法对比, 本文建立的 HPLC-荧光法具有更高的灵敏度和抗干扰能力, 同时较 LC-MS/MS 更为经济实用。本方法线性范围为 0.1~100 µg/mL, 定量下限为 0.1 µg/mL。在此线性范围内对准确度、日内日间精密度、提取回收率以及稳定性等项目进行了验证, 考察结果均符合相关生物样品检测标准, 可用于阿齐沙坦在大鼠体内的血药浓度测定。

参考文献

- [1] Rakugi H, Kario K, Enya K. Effect of azilsartan versus candesartan on nocturnal blood pressure variation in Japanese patients with essential hypertension [J]. *Blood*

- Press*, 2013, 22(1): 22-28.
- [2] 孙文俊, 阎 卉, 王成港. 血管紧张素受体 AT1 亚型受体拮抗剂-阿齐沙坦酯 [J]. *药物评价研究*, 2011, 34(3): 230-235.
- [3] Lam S. Azilsartan: a newly approved angiotensin receptor blocker [J]. *Cardiol Rev*, 2011, 19(6): 300-304.
- [4] 赵春艳, 王京晶, 刘 洋. 心血管疾病新药阿齐沙坦酯的药理与临床评价 [J]. *中国新药杂志*, 2011, 20(19): 1831-1835.
- [5] Naohiro K, Takuya E, Toshiyuki T. Absorption of TAK-491, a new angiotensin II receptor antagonist, in animals [J]. *Xenobiotica*, 2013, 43(2): 182-192.
- [6] 陈 玲, 邹 栩, 黄文龙. 2011 年 FDA 批准上市新药及全球新药研究最新进展 [J]. *中国新药杂志*, 2011, 20(23): 2286-2300.
- [7] Vekariya P P, Joshi H S. Development and validation of RP-HPLC method for azilsartan medoxomil potassium quantitation in human plasma by solid phase extraction procedure [J]. *Isrn Spectroscopy*, 2013, 2013(2013): 1-6.
- [8] 束蓓艳, 吴雪松, 岑均达. 阿齐沙坦的合成 [J]. *中国医药工业杂志*, 2010, 41(12): 881-884.
- [9] 米 楠, 苏慕君, 臧可昕. 阿齐沙坦油水分配系数的测定 [J]. *药物评价研究*, 2013, 36(6): 452-455.
- [10] 顾维钧, 侯玉婷, 杨明华. 高效液相色谱法测定阿齐沙坦的含量和有关物质[J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(12): 2085-2191.
- [11] 唐了平, 产运霞, 马贵红. 阿齐沙坦片固产品溶出度试验方法的建立及与原研品体外溶出行为比较 [J]. *中国药房*, 2014, 25(17): 1609-1611.