

反相高效液相色谱法测定(E)-3-(4-((3,5,6-三甲基吡嗪-2-基)甲氧基)-3-甲氧基苯基)丙烯酸在SD大鼠血浆中的浓度

窦颖辉^{1,2}, 王丽^{1,2}, 何广卫³, 吴强³, 范国荣², 杭太俊¹ (1. 中国药科大学药物分析教研室, 江苏南京 210009; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 3. 合肥医工医药有限公司, 安徽合肥 230088)

[摘要] 目的 建立测定SD大鼠血浆中(E)-3-(4-((3,5,6-三甲基吡嗪-2-基)甲氧基)-3-甲氧基苯基)丙烯酸浓度的反相高效液相色谱(LC-UV)方法,并用于其在SD大鼠体内的药动学研究。方法 采用Diamonsil-C₁₈(2)柱(100 mm×4.6 mm, 5 μm),以乙腈:水(含5 mM的醋酸铵,用醋酸调节pH至4.0)=30:70为流动相,测定70只SD大鼠单剂量尾静脉给药15 mg/kg后不同时刻血浆中药物的浓度,并由此计算其在SD大鼠体内的药动学参数。结果 SD大鼠血浆中(E)-3-(4-((3,5,6-三甲基吡嗪-2-基)甲氧基)-3-甲氧基苯基)丙烯酸测定的线性范围为0.020 16~10.08 μg/ml,提取回收率大于95%,批内批间精密密度均小于15%。大鼠尾静脉注射给药后,血浆中峰浓度(c_{max})为35.60 μg/ml,半衰期($t_{1/2}$)为3.36 h,0~12 h药时曲线下面积(AUC_{0-12})为17.12 μg·h/ml,0~∞药时曲线下面积($AUC_{0-∞}$)为17.72 μg h/ml。结论 本法方便快捷,可用于(E)-3-(4-((3,5,6-三甲基吡嗪-2-基)甲氧基)-3-甲氧基苯基)丙烯酸的临床前药动学研究。

[关键词] (E)-3-(4-((3,5,6-三甲基吡嗪-2-基)甲氧基)-3-甲氧基苯基)丙烯酸;高效液相色谱法;血药浓度;药动学

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)01-0042-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.01.011

Determination of (E)-3-(3-methoxy-4-((3,5,6-trimethylpyrazin-2-yl) methoxy) phenyl) acrylate in rat plasma by RP-HPLC

DOU Ying-Hui^{1,2}, WANG Li^{1,2}, HE Guang-Wei³, WU Qiang³, FAN Guo-Rong², HANG Tai-Jun¹ (1. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China; 3. Hefei Medical Engineering Pharmaceutical Co., Ltd., Hefei 230088, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for determination of (E)-3-(3-methoxy-4-((3,5,6-trimethylpyrazin-2-yl) methoxy) phenyl) acrylate in plasma of SD rats by RP-HPLC. **Methods** The chromatographic separation was performed on a Diamonsil-C₁₈ column(100 mm×4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase consisting of acetonitrile/5 mM ammonium acetate buffer(pH 4.0) (30/70, v/v). The single intravenous injection of (E)-3-(3-methoxy-4-((3,5,6-trimethylpyrazin-2-yl) methoxy) phenyl) acrylate was given to 70 SD rats to study the pharmacokinetics. **Results** The intra-run and inter-run RSD were less than 15%. The pharmacokinetics parameters were as follows: C_{max} was 35.60 μg/ml, $t_{1/2}$ was 3.36 h, AUC_{0-12} was 17.12 μg h/ml, $AUC_{0-∞}$ was 17.72 μg h/ml. **Conclusion** The method was simple and accurate, which could be used to separation and determination of (E)-3-(3-methoxy-4-((3,5,6-trimethylpyrazin-2-yl) methoxy) phenyl) acrylate.

[Key words] (E)-3-(3-methoxy-4-((3,5,6-trimethylpyrazin-2-yl) methoxy) phenyl) acrylate; HPLC; plasma concentration; Pharmacokinetics

(E)-3-(4-((3,5,6-三甲基吡嗪-2-基)甲氧基)-3-甲氧基苯基)丙烯酸(通用名:川阿格雷)是基于传统中药理论,运用现代技术合成的新一代血小板凝集抑制剂(图1)。其结构中含有类似于川芎嗪、阿魏酸的结构,经体内代谢可产生阿魏酸,为疗效显著的活

血化淤活性成分^[1,2]。川阿格雷适用于预防和治疗因血小板高聚集状态引起的心、脑及其它动脉的循环障碍疾病。体外抗血小板聚集试验结果显示,川阿格雷四个剂量组对ADP诱导的血小板聚集均有明显的抑制作用,并呈剂量依赖性。目前,尚无文献对川阿格雷进行报道。因此,建立血浆样品中川阿格雷的浓度测定方法,以研究生物体内川阿格雷的代谢过程,确定其相关代谢常数,对于新一代血小板凝集抑制剂川阿格雷的后续研究与发展,以及指导临床安全合理用药,都有着十分重要的意义。

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09301-011)。

[作者简介] 窦颖辉(1984-),男,硕士研究生。E-mail: dyh_1120@yahoo.com.cn.

[通讯作者] 杭太俊. Tel: (025) 83271290, E-mail: tj_hang@yahoo.com.cn.

本文建立了一种简单、灵敏、快速的高效液相色谱方法,以测定血浆样品中川阿格雷的浓度,并将建立的方法应用于川阿格雷在SD大鼠体内的药动学研究。

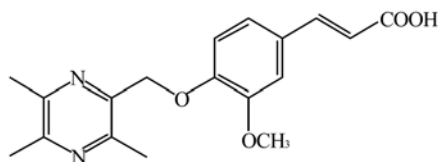


图1 川阿格雷结构图

1 仪器与材料

1.1 仪器 美国戴安公司 Ultimate 3000 型高效液相色谱仪, (包括 Ultimate 3000 四元液相泵, Ultimate 3000 自动进样器, Ultimate 3000 柱温箱, Ultimate 可变波长检测器), Chromeleon 6.8 工作站。XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂), TGL-16G 台式高速离心机(浙江托普仪器有限公司), XS205 电子天平(瑞士梅特勒-托利多集团), Thermo CR3i 冷冻离心机(美国热电公司), DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司), SK7200H 超声仪(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 材料 川阿格雷合成品, 内标桂皮醛(含量 98.8%, 由中国药品生物制品检定所提供, 批号: 110710-200915)。乙腈为克莱顿公司生产的色谱级试剂, 乙酸、乙酸铵、盐酸均为中国医药集团上海化学试剂公司提供的分析纯试剂。所使用的蒸馏水为 Hi-Tech 水纯化系统自制的去离子水(18.2 M)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈柱(100 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(含 5 mM 的醋酸铵, 用醋

酸调 pH 至 4.0)(30 : 70, V : V); 流速为 1 ml/min; 检测波长 276 nm; 柱温 25 °C; 进样量 50 μl。

2.2 血浆样品预处理方法 准确吸取血浆样品 450 μl, 向其中加入 100.3 ng/ml 的内标工作溶液 50 μl, 混匀后加入 1 M 盐酸 10 μl, 涡旋震荡 30 s。准确加入甲基叔丁基醚 5 ml, 涡旋震荡 3 min, 于 4 000 r/min 下离心 10 min, 取上清液 4 ml 于另一干净 10 ml 离心管中, 控制温度于 30 °C 下吹干, 用 100 μl 流动相复溶, 12 000 r/min 下高速离心 10 min, 取上清液 80 μl 于进样小瓶中, 自动进样 50 μl 进行 LC-UV 分析。

2.3 标准溶液的配制 ①川阿格雷工作溶液: 精密称取川阿格雷 10.06 mg 以甲醇溶解得 1.006 mg/ml 的储备液。用 30% 乙腈水溶液稀释, 分别得到浓度为 0.201 6、0.504 0、1.008、2.016、5.040、20.16、50.40、100.8 μg/ml 的工作溶液。②桂皮醛工作溶液(内标): 精密称取桂皮醛 1.003 g, 配制成 1.003 mg/ml 的内标储备液, 用 30% 乙腈水溶液稀释得 100.3 ng/ml 的内标工作溶液。所有储备液和工作溶液均保存在 4 °C 冰箱中备用。

血浆标准曲线样品由 SD 大鼠空白血浆添加适量川阿格雷系列工作溶液制成, 浓度分别为 0.020 16、0.050 4、0.100 8、0.201 6、0.504、2.016、5.04、10.08 μg/ml。质控样品由空白大鼠血浆添加川阿格雷工作溶液得到, 浓度分别为 0.050 4、0.504、8.064 μg/ml。

2.4 特异性考察 川阿格雷和内标桂皮醛的保留时间分别为 7.0 min 和 12.0 min。取空白血浆, 空白血浆标准添加样品及实测样品, 按样品预处理方法操作, 进样分析得 SD 大鼠空白血浆、空白血浆添加标准品及实测血浆样品的典型谱图, 见图 2 所示。结果表明血浆中的内源性物质不干扰川阿格雷及内标桂皮醛的测定。

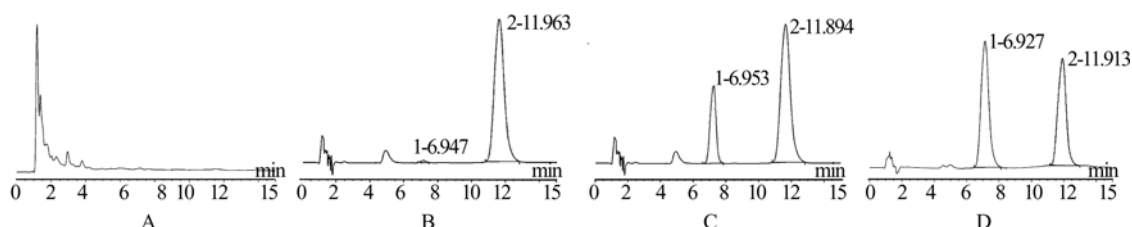


图2 血浆样品高效液相典型色谱图

A-空白血浆样品; B-血浆标添样品(0.020 16 μg/ml); C-血浆标添样品(0.504 μg/ml); D-给药 15 min 后的实测血浆样品;
1-川阿格雷; 2-桂皮醛

2.5 线性范围与最低定量限 以川阿格雷与内标的峰面积之比为纵坐标(A_{AS}/A_{IS} , Y)对相应的浓度(C , μg/ml)进行线性加权($1/x$)回归, 得血浆标准曲线方程为: Y

$= 0.326 6C - 0.002 768$, $r^2 = 0.999 5$, 线性范围为 0.020 16 ~ 10.08 μg/ml, 最低定量限为 0.020 16 μg/ml。

2.6 精密度与相对回收率

2.6.1 批内精密度与相对回收率考察 分别配置浓度为 0.050 4, 0.504, 8.064 $\mu\text{g/ml}$ 的样品, 平行制备 5 份, 进行批内精密度及相对回收率考察, 得到低、中、高 3 个浓度样品的批内精密度相对标准偏差 (RSD) 分别为 5.57%、4.63%、4.36%, 表明样品批内精密度良好, 符合检测要求; 3 个浓度的相对回收率相对偏差 (RE) 分别为 -8.71%、-2.68%、6.22%, 表明样品相对回收率较好, 符合相关检测要求。

2.6.2 批间精密度考察 分别配置浓度为 0.050 4, 0.504, 8.064 $\mu\text{g/ml}$ 的样品, 平行制备 5 份, 测定 3 批, 进行批间精密度考察。低、中、高 3 个浓度样品的批间精密度分别为 4.44%、5.80%、5.76%, 结果表明样品批间精密度良好, 符合检测要求。

2.7 提取回收率 0.050 4, 0.504, 8.064 $\mu\text{g/ml}$ 3 个浓度的样品, 按预处理方法处理后进样; 另一组空白血浆样品, 与处理后加入相同浓度的川阿格雷和内标。第一组样品峰面积的比值与第 2 组样品相应的峰面积比值进行比较, 得三个浓度 QC 样品的提取回收率, 分别为 (75.83 \pm 1.75)%、(70.49 \pm 6.35)%、(84.29 \pm 1.41)%, 内标回收率为 (70.19 \pm 1.60)%, 结果表明所选用的方法提取回收率较

高, 符合相关要求。

2.8 稳定性 配制浓度分别为 0.050 35 $\mu\text{g/ml}$ 、8.056 $\mu\text{g/ml}$ 的低、高两种 QC 样品进行稳定性试验。试验结果表明, 样品在自动进样器上放置 24 h 内保持稳定 [相对偏差 (RE) 在 \pm 8.61% 以内], 在室温下放置 3 h 后提取保持稳定 (RE 在 \pm 6.15% 以内), 冻融 3 次稳定 (RE 在 \pm 13.77% 以内), -80 $^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱放置 30 d 后提取保持稳定 (RE 在 \pm 6.28% 以内), 结果表明样品稳定性较好。

2.9 稀释效应 对于实测样品中浓度超出定量上限的样品, 需要进行逐级稀释 (稀释倍数为 2 倍, 5 倍和 10 倍), 这时需要考察稀释效应。配制浓度为 0.100 8、0.252、0.504 $\mu\text{g/ml}$ 的川阿格雷标准血浆样品, 将其分别稀释 2 倍、5 倍、10 倍, 得到浓度均为 0.050 4 $\mu\text{g/ml}$ 的 LQC 样品, 将这些稀释后的血浆样品按上述血浆样品预处理步骤操作并进样分析, 所得峰面积代入对应的标准曲线, 计算其浓度, 乘以相应的稀释倍数即获得高浓度血浆样品的实际测定浓度, 通过与标准添加浓度相比较, 计算其 RE 值。HQC 样品的稀释效应考察同法操作。结果见表 1。

表 1 血浆样品稀释效应考察结果

样品	稀释倍数	实际加入量 ($\mu\text{g/ml}$)	平均测得量 ($\mu\text{g/ml}$) ($n=5$)	RE (%)
低浓度质控样品 (0.050 4 $\mu\text{g/ml}$)	2 倍	0.100 8	0.109 3	8.47
	5 倍	0.252	0.281	11.53
	10 倍	0.504	0.553 9	9.9
高浓度质控样品 (8.064 $\mu\text{g/ml}$)	2 倍	16.128	16.297	1.05
	5 倍	40.32	42.77	6.08
	10 倍	80.64	81.78	1.41

2.10 药动学研究 70 只 SD 大鼠, 雌雄各半, 按时间点分成 14 组, 每组 5 只, 雌雄均匀分布。实验 SD 大鼠禁食过夜 (禁食 24 h) 后, 分别于尾静脉注射给药川阿格雷生理盐水溶液 15 mg/kg , 于给药前及给药后 0、0.083、0.167、0.333、0.667、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、12.0 h 将 SD 大鼠处死, 腹主动脉取血, 置肝素化试管中, 离心, 取上清液, 置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待测。

将该测定建立的 LC-UV 方法应用于 SD 大鼠静脉注射川阿格雷 15 mg/kg 后的药动学研究, 结果见图 3。并对测得的数据进行统计分析处理, 使用 BAPP2.0 软件, 采用非房室模型法分析 (统计矩法), 药动学参数 t_{max} 、 c_{max} 取实测值, 测得川阿格雷在 SD 大鼠体内的药动学参数, 结果见表 2。

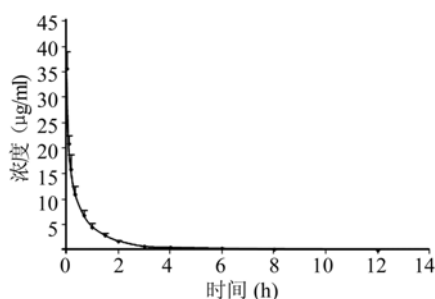


图 3 70 只 SD 大鼠静脉注射川阿格雷 15 mg/kg 后平均血药浓度-时间曲线

3.1 检测波长的选择 利用二极管阵列紫外检测器检测器, 对川阿格雷溶液在 200 ~ 500 nm 进行紫外扫描, 结果表明 220 和 276 nm 处均有较大的吸收; 但 220 nm 下空白样品干扰较大, 故选择 276 nm 为检测波长。

3 讨论

(下转第 48 页)

