

# HPLC-荧光法测定坎地沙坦血药浓度及坎地沙坦酯制剂的生物等效性研究

张乐\*,周世文,徐颖,应懿,黄永平,汤建林#(第三军医大学新桥医院临床药理基地,重庆 400037)

中图分类号 R972\*.4;R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)06-0522-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.06.16

**摘要** 目的:建立准确、灵敏的测定坎地沙坦血药浓度的方法,并研究坎地沙坦酯胶囊的生物等效性。方法:血浆样品用乙醚处理后,采用高效液相色谱-荧光法进行测定,色谱柱为 Diamonsil C<sub>18</sub>,流动相为甲醇-0.02 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液(66:34,磷酸调pH至4),内标为缬沙坦,荧光检测器激发波长为265 nm、发射波长为395 nm。另对坎地沙坦酯胶囊(受试制剂)与坎地沙坦片(参比制剂)进行药动学参数比较,判断2种制剂的生物等效性。结果:血浆中坎地沙坦浓度在0.98~500.00 ng/ml范围内线性关系良好( $r=0.9997, n=2$ ),低、中、高3种质量浓度样品的绝对回收率分别为95.89%、101.82%、100.75%,相对回收率分别为99.9%、99.8%、103.7%,日内和日间RSD分别为3.2%~9.0%和4.2%~7.8%( $n=5$ )。受试制剂经对数转换后的药动学参数AUC<sub>0-36h</sub>、AUC<sub>0-∞</sub>、 $c_{max}$ 的90%可信限分别落在参比制剂的80.4%~107.3%、80.2%~107.0%、80.1%~111.6%范围内。 $t_{max}$ 经非参数检验无显著性差异。结论:本方法操作简便、灵敏度高,适用于血浆中坎地沙坦的浓度测定。坎地沙坦酯胶囊与片剂生物等效。

**关键词** 坎地沙坦;高效液相色谱-荧光法;血浆样品;血药浓度

## Determination of Candesartan Concentration in Human Plasma by HPLC-Fluorometric Method and Bioequivalence of Candesartan Cilexetil Preparations

ZHANG Le, ZHOU Shi-wen, XU Ying, YING Yi, HUANG Yong-ping, TANG Jian-lin (Clinical Pharmacology Base, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish an accurate and sensitive method for the determination of candesartan concentration in human plasma, and to study the bioequivalence of 2 candesartan cilexetil preparations. METHODS: Plasma samples were treated with aether and determined by HPLC Fluorometric method. The determination was performed on Diamonsil C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of methanol-0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate buffer (66:34, pH adjusted to 4 using phosphoric acid) using valsartan as internal standard. Excitation wavelength and emission wavelength of fluorescence detection were 265 nm and 395 nm, respectively. The pharmacokinetics parameters were compared between candesartan cilexetil capsules (test preparation) and tablets (reference preparation). RESULTS: The linear range of candesartan was 0.98-500 ng/ml ( $r=0.9997, n=2$ ). The absolute recovery and relative recovery at low, medium, high concentrations were 95.89%, 101.82%, 100.75 and 99.9%, 99.8%, 103.7%. The intra-day and inter-day RSD were 3.2%-9.0% and 4.2%-7.8% ( $n=5$ ), respectively. 90% confidence limit of test preparation of the logarithmic transformed parameters AUC<sub>0-36h</sub>, AUC<sub>0-∞</sub>,  $c_{max}$  were in 80.4%-107.3%, 80.2%-107.0%, 80.1%-111.6% vs. the reference preparation, respectively. No significant difference was found by nonparametric test of  $t_{max}$ . CONCLUSION: The method is simple and sensitive and suitable for the determination of candesartan concentration in plasma. 2 preparations are bioequivalent.

**KEY WORDS** Candesartan; HPLC Fluorometric method; Plasma sample; Plasma concentration

坎地沙坦酯是一种血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)受体AT<sub>1</sub>亚型拮抗药,在化学结构与氯沙坦、伊贝沙坦相似,同属二苯四咪唑类。它可选择性地阻滞由AT<sub>1</sub>受体所介导的AngⅡ功能(如血管收缩和醛固酮分泌),从而发挥降压作用。其与AT<sub>1</sub>受体的亲和力是AT<sub>2</sub>受体的10 000倍,具有亲和力强和解离慢的特点。临床研究表明,每日给予高血压患者本品4~16 mg,其降压作用呈剂量依赖性,降压效果优于氯沙坦50 mg。坎地沙坦酯口服后迅速从胃肠道吸收,并水解成具有活性的代谢产物坎地沙坦产生血管收缩对抗作用。食物对本品吸收没有影响,重复给药无蓄积作用。由于坎地沙坦酯血浆中药物含量低且内源性物质干扰大,采用常规的高效液相色谱(HPLC)-紫外检测方法难以达到所需的检测灵敏度<sup>[1]</sup>。本试验根据药物的理化性质及国内外文献<sup>[1]</sup>,设计建立了高效液相色谱-荧光法,用于坎地沙坦的测定,并对坎地沙坦酯制剂进行人

体生物等效性研究。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Waters-600E型高效液相色谱系统,配2475型荧光检测器,717plus型自动进样器及Millennium<sup>32</sup>色谱管理软件(美国Waters公司);MC-210S型电子天平(精度0.01 mg,德国Sartorius公司);高速离心机(美国Abbott公司);Millipore超纯水系统(美国Millipore公司)。

### 1.2 药品与试剂

受试制剂(T):坎地沙坦酯胶囊(重庆市西曦药物技术开发有限公司生产,每粒含坎地沙坦酯4 mg,批号:061001);参比制剂(R):坎地沙坦酯片(商品名:必洛斯,日本武田药品工业株式会社生产,重庆市西曦药物技术开发有限公司提供,每片含坎地沙坦酯8 mg,批号:060601);坎地沙坦对照品(重庆圣华曦制药有限公司,纯度:99.5%);内标:缬沙坦对照品(重庆圣华曦制药有限公司,纯度:99.0%);三乙胺(德国Fluka公司,纯度≥99.5%);乙醚、甲醇均为色谱纯,磷酸等其他试剂均为分析纯,试验用水均为超纯水。

\* 主管药师,博士。研究方向:中药药理学。电话:023-68774939。

E-mail: nanofishle@163.com

# 通信作者:教授,硕士研究生导师。研究方向:药物分析。电话:023-68755311。E-mail: tang6317@163.com

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C<sub>18</sub> (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 保护柱: C<sub>18</sub> 柱芯 (4.0 mm×3.0 mm); 流动相: 甲醇-0.02 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液 (66:34, V/V, 磷酸调 pH 至 4.0); 流速: 1 ml/min; 激发波长: 265 nm, 发射波长: 395 nm; 柱温: 30 °C。在选定的色谱条件下, 分别考察了 7 个不同来源的空白血浆、空白血浆+对照品及实测样品的色谱分离情况。结果表明, 被测物、内标与血浆内源性杂质分离完全, 无干扰。坎地沙坦和内标峰的保留时间分别为 5.9、8.9 min。测得坎地沙坦色谱图见图 1。

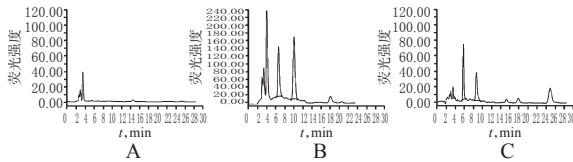


图 1 高效液相色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+坎地沙坦对照品溶液+内标溶液; C. 受试者血样+内标溶液; 1. 坎地沙坦; 2. 缬沙坦

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma+ candesartan control+ internal standard; C. blood sample+ internal standard; 1. candesartan; 2. valsartan

### 2.2 标准溶液的配制

2.2.1 坎地沙坦标准溶液: 准确称取坎地沙坦对照品 5.38 mg 于 50 ml 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 配成质量浓度为 107.6 μg/ml 的对照品贮备液, 于 4 °C 避光保存。临用前, 精密吸取该贮备液 4 ml 于 10 ml 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 配成 43.04 μg/ml 的坎地沙坦标准溶液, 于 4 °C 避光保存, 备用。

2.2.2 内标溶液: 准确称取缬沙坦对照品 5.13 mg 于 100 ml 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 配成质量浓度为 51.3 μg/ml 的内标贮备液, 4 °C 保存。临用前, 取内标贮备液 1 ml 于 10 ml 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 配制成 5.13 μg/ml 的内标溶液备用。

### 2.3 血浆样品预处理

取血浆 1 ml 加入内标溶液 (5.13 μg/ml 缬沙坦) 50 μl, 混合均匀后, 加入 1 mol/L 盐酸 200 μl, 涡旋混合 3 min, 加入乙醚 5 ml 提取, 完全旋涡, 3 000 r/min 离心 10 min, 取乙醚层置于另一试管中, 37 °C 氮气吹干, 残留物加入流动相 300 μl 溶解, 旋涡混合 1 min, 4 000 r/min 离心 20 min, 取上清液 100 μl 进样。

### 2.4 标准曲线的制备

取空白血浆 1 ml 依次加入内标溶液 (5.13 μg/ml 缬沙坦) 50 μl 和不同浓度系列标准溶液 50 μl, 配制成相当于坎地沙坦血浆质量浓度为 0.98、1.95、3.91、7.81、15.62、31.25、62.50、125.00、250.00、500.00 ng/ml 的血浆标准样品。按“2.3”项下依法操作, 每一浓度进样 100 μl, 记录色谱图, 以质量浓度 (x) 为横坐标, 药物与内标峰面积之比 (y) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程  $y = -6.32 \times 10^{-3}x + 1.03 \times 10^{-2}$  ( $r = 0.9997$ )。说明坎地沙坦血药浓度在 0.98~500.00 ng/ml 范围内线性关系良好。血浆中坎地沙坦定量下限为 0.98 ng/ml (信噪比为 5,  $\bar{x} = 1.11$  ng/ml, RSD = 11.5%,  $n = 5$ )。

### 2.5 精密度试验

取空白血浆 1 ml, 按“2.4”项下方法配制低、中、高 3 个质量浓度的血浆样品各 5 份, 按“2.3”项下依法操作, 于同一天不同时间段测定, 考察日内精密度。3 个质量浓度的血浆样品各 5 份, 连续测定 3 d, 考察日间精密度, 结果见表 1。

### 2.6 回收率试验

表 1 精密度及回收率试验结果

Tab 1 Results of precision and recovery tests

加入量, ng/ml	日内精密度 (n=5)		日间精密度 (n=5)		相对回收率, %	绝对回收率, %
	测得量, ng/ml	RSD, %	测得量, ng/ml	RSD, %		
1.95	2.02±0.06	3.2	2.08±0.15	7.3	99.9±8.7	95.89±16.62
31.25	30.37±2.73	9.0	31.78±2.49	7.8	99.8±2.1	101.82±13.69
250	252.01±16.1	6.4	256.89±10.72	4.2	103.7±5.0	100.75±11.39

2.6.1 相对回收率: 取空白血浆 1 ml, 按“2.4”项下的方法制备低、中、高 3 个质量浓度 (坎地沙坦血浆浓度分别为 1.95、31.25、250 ng/ml) 的样品各 5 份并依法测定。将药物与内标峰面积之比代入标准曲线求得药物浓度, 其与实际药物浓度的比值即为相对回收率, 结果见表 1。

2.6.2 绝对回收率: 取空白血浆 1 ml, 按“2.4”项下的方法制备低、中、高 3 个质量浓度 (坎地沙坦血浆浓度分别为 1.95、31.25、250 ng/ml) 的样品各 5 份并依法测定。以提取后待测物色谱峰面积与相同浓度未经提取直接进样获得的色谱峰面积之比, 计算样品的绝对回收率, 结果见表 1。

### 2.7 稳定性试验

本试验考察了未经处理的坎地沙坦血浆样品室温放置 24 h, -20 °C 冷冻放置 21 d 及冻融 3 次的稳定性, 结果见表 2。

表 2 稳定性试验结果

Tab 2 Results of stability test

加入量, ng/ml	室温放置 24 h (n=6)		-20 °C 放置 21 d (n=16)		冻融 3 次 (n=6)	
	测得浓度, ng/ml	RSD, %	测得浓度, ng/ml	RSD, %	测得浓度, ng/ml	RSD, %
1.95	2.17±0.19	8.8	2.04±0.19	9.3	2.05±0.14	7.01
31.25	31.65±2.16	6.8	30.36±1.96	6.5	30.49±3.42	11.23
250	273.61±15.48	5.7	271.22±11.35	4.2	253.85±22.47	8.85

### 2.8 血样采集

根据国家药品监督管理局新药临床研究批件 (2003L00047), 经伦理委员会批准, 20 名健康男性受试者在知情情况下填写知情同意书, 并实施试验。20 名健康受试者口服 8 mg 受试制剂或参比制剂后, 分别采集服药前及服药后 0.5、1、2、3、4、5、6、8、10、12、24、36 h 时的静脉血约 4 ml 肝素抗凝, 分离得到血浆于 -20 °C 冰箱保存, 待测血药浓度。

### 2.9 药动学参数

用 BECS 软件程序对经对数换后的 AUC<sub>0-t</sub>、AUC<sub>0-∞</sub>、c<sub>max</sub> 和实测 t<sub>max</sub> 进行统计分析。方差分析后进行双单侧 t 检验及 90% 的可信限判断, 坎地沙坦酯胶囊经对数转换后 AUC<sub>0-t</sub>、AUC<sub>0-∞</sub> 的 90% 可信限分别落在参比制剂的 80.4%~107.3% 和 80.2%~107.0% 范围内。经对数转换后 c<sub>max</sub> 的 90% 可信限落在参比制剂的 80.1%~111.6% 范围内。t<sub>max</sub> 经非参数检验无显著性差异。由此判断 2 种制剂生物等效。20 名受试者单剂量口服 8 mg 受试制剂或参比制剂后的平均药-时曲线见图 2。

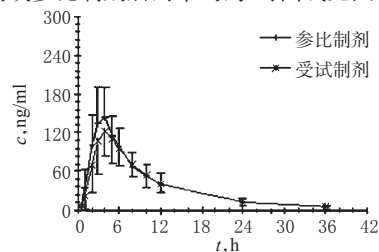


图 2 20 名健康受试者分别口服受试制剂和参比制剂后坎地沙坦药-时曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time curves in 20 healthy volunteers of test and reference candesartan preparations

# 苯扎贝特在不同性别健康人体内的药动学研究

李忠亮\*, 张治然, 袁荣刚(解放军第210医院药学部, 辽宁大连 116021)

中图分类号 R972\*.6;R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)06-0524-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.06.17

**摘要** 目的:研究健康男、女志愿者单剂量口服苯扎贝特片的药动学。方法:健康志愿者20名(其中男、女各半),单剂量口服苯扎贝特片400 mg,采用高效液相色谱法测定血浆中苯扎贝特的浓度。用DAS软件程序进行数据处理,用SPSS软件对不同性别药动学参数进行统计分析。结果:男、女受试者单剂量口服苯扎贝特片400 mg的主要药动学参数分别为: $c_{\max}$ (11.41±3.24)、(11.06±3.06) μg/ml,  $t_{\max}$ (1.93±0.29)、(2.07±0.38)h,  $t_{1/2}$ (2.06±0.33)、(2.03±0.27)h,  $AUC_{0-12\text{h}}$ (35.46±9.26)、(39.36±9.63) μg·h/ml,  $AUC_{0-\infty}$ (40.34±10.35)、(39.57±9.28) μg·h/ml。结论:健康志愿者单剂量口服苯扎贝特片的体内药动学过程符合二室开放模型。经统计学分析,本品在健康志愿者体内药动学过程不存在性别差异。

**关键词** 苯扎贝特;高效液相色谱法;药动学;性别因素

## Study on Pharmacokinetics of Bezafibrate in Healthy Volunteers of Different Genders

LI Zhong-liang\*, ZHANG Zhi-ran, XI Rong-gang (Dept. of Pharmacy, No. 210 Hospital of PLA, Liaoning Dalian 116021, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the pharmacokinetics of Bezafibrate tablets after a single oral dose in healthy male or female volunteers. METHODS: 10 healthy male volunteers and 10 healthy female volunteers were involved in the study. Each subject received a single dose of Bezafibrate tablets 400 mg. The plasma concentration of bezafibrate was determined by HPLC. The pharmacokinetic parameters were calculated by DAS software and were statistically analyzed by SPSS software. RESULTS: The main pharmacokinetic parameters of a single dose of Bezafibrate tablets 400 mg in male volunteer vs. female volunteers were as follows:  $c_{\max}$  (11.41±3.24) μg/ml vs. (11.06±3.06) μg/ml;  $t_{\max}$  (1.93±0.29) h vs. (2.07±0.38) h;  $t_{1/2}$  (2.06±0.33) h vs. (2.03±0.27) h;  $AUC_{0-12\text{h}}$  (35.46±9.26) μg·h/ml vs. (39.36±9.63) μg·h/ml;  $AUC_{0-\infty}$  (40.34±10.35) μg·h/ml vs. (39.57±9.28) μg·h/ml. CONCLUSION: The results show that the plasma concentration-time curves of bezafibrate are fitted to a two-compartment open model and the main pharmacokinetic parameters of bezafibrate have no significant differences between male and female volunteers.

**KEY WORDS** Bezafibrate; HPLC; Pharmacokinetics; Gender factor

苯扎贝特(Bezafibrate)是氯贝丁酸衍生物类血脂调节药,能够降低升高了的血清甘油三酯、总胆固醇以及极低密度脂蛋白-胆固醇的水平,从而使高脂血症患者的脂质正常化。其作用机制有2个方面:(1)抑制羟甲基戊二酸单酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶而减少胆固醇的合成;(2)增加脂蛋白酯酶和肝酯酶的活性而加快甘油三酯的清除以及增加高密度脂蛋白-胆固醇的水平。本药还可以轻度降低血糖,适用于糖尿病伴高脂血症患者。国内关于苯扎贝特在健康人体内的药动学研究数据并不充分,本试验开展苯扎贝特在不同性别健康人体内的药动学研究,从而为临床合理应用提供数据参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-10ATvp 高压液相色谱仪,包括Sil-10ADvp 自动进样

器、SPD-10Avp 紫外检测器、Class-VP 色谱工作站(日本岛津公司);TGL-16M 台式高速冷冻离心机(湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司);XW-80A 微型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器有限公司);TG328A 型分析天平(上海精密科学仪器有限公司);Delta 320 型精密 pH 计(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);MTN-2800W 氮吹浓缩装置(天津奥特塞恩斯仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

苯扎贝特片(阿贝他,江苏天力士贝特制药有限公司,规格:每片200 mg,批号:06050103);苯扎贝特对照品(批号:100627-200801,纯度:98.0%,0.98 mg/1 mg)、格列吡嗪(内标,批号:100285-200604,纯度:99.9%,0.999 mg/1 mg)均由中国食品药品检定研究院提供;甲醇为色谱纯,冰乙酸、正己烷、无水乙醚、无水乙酸钠、四丁基溴化铵均为分析纯;水为二次蒸

## 3 讨论

在摸索流动相体系的过程中,我们考察了流动相中甲醇的不同体积分数(70%、66%、60%)及流动相的不同 pH 值(5.0、4.5、4.0、3.5、3.0、2.5)对分析结果的影响,通过比较,选择本流动相效果最佳。在此条件下,杂质峰对样品峰干扰小,保留时间适宜,坎地沙坦和内标缬沙坦保留时间分别为5.9 min 和8.9 min,与文献报道相比均有所提前,既节省进样时间又节省试验经费。样品处理时考虑到操作的方便性,采用盐酸沉

淀蛋白后直接用乙醚提取,坎地沙坦提取回收率较高,且不受内源性物质的干扰,同时还提高了测定灵敏度,定量下限为0.98 ng/ml。试验结果表明,本法可用于该药的血浆含量测定及制剂的生物等效性研究。

## 参考文献

[1] Stenhoff H, Per-Olof Lagerström, Andersen C. Determination of candesartan cilexetil, candesartan and a metabolite in human plasma and urine by liquid chromatography and fluorometric detection[J]. *Journal of Chromatography B*, 1999, 731(9):411.

(收稿日期:2012-07-01 修回日期:2012-11-01)

\* 主管药师,硕士研究生。研究方向:药动学。电话:0411-39847085。E-mail:lizhongliang210@126.com