

UPLC法测定大鼠血浆中那格列奈的浓度及药动学研究^Δ

王 凯*,蒋大鹏,张 伟,王淑梅[#](河北医科大学第二医院药学部,石家庄 050000)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)31-4381-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.31.16

摘要 目的:建立测定大鼠血浆中那格列奈浓度的方法,并研究其在大鼠体内的药动学特征。方法:采用超高效液相色谱法(UPLC)。色谱柱为Acquity UPLC[®] BEH C₁₈,流动相为乙腈-10 mmol/L磷酸二氢钾缓冲盐溶液(41:59, V/V),流速为0.38 mL/min,柱温为35 ℃,检测波长为210 nm,进样量为2 μL。18只Wistar大鼠分别ig那格列奈16 mg/kg,分别于给药前及给药后10、20、30、45、60、90、120、180、240、360、480 min于眼内眦取血0.4 mL,测定血浆中那格列奈的浓度;并采用DAS 2.1.1软件计算那格列奈药动学参数。结果:那格列奈质量浓度在0.05~6.4 μg/mL范围内线性关系良好($r=0.999\ 3$),定量下限为0.05 μg/mL;日内($n=5$)、日间($n=3$)精密度和稳定性($n=3$)试验的RSD均小于10%;提取回收率和方法回收率分别为78.71%~80.56%、91.78%~100.42%(RSD<10%, $n=5$)。大鼠ig那格列奈后,AUC_{0-8 h}为(5.87±2.32) μg·h/mL,AUC_{0-∞}为(6.11±2.48) μg·h/mL, $t_{1/2}$ 为(1.72±0.55) h, t_{max} 为(0.67±0.29) h, c_{max} 为(3.34±1.23) μg/mL。结论:该方法准确快速、专属性强,可用于大鼠体内那格列奈浓度的测定;那格列奈在大鼠体内吸收迅速、代谢较快。

关键词 那格列奈;超高效液相色谱法;药动学;大鼠

Concentration Determination of Nateglinide in Rats' Plasma by UPLC and Study on Its Pharmacokinetics

WANG Kai, JIANG Dapeng, ZHANG Wei, WANG Shumei (Dept. of Pharmacy, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the concentration determination of nateglinide in rats' plasma and study its pharmacokinetic characteristics in rats *in vivo*. METHODS: UPLC was performed on the column of Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-10 mmol/L potassium dihydrogen phosphate buffer (41:59, V/V) at flow rate of 0.38 mL/min, with column temperature of 35 ℃, detection wavelength of 210 nm and volume of 2 μL. 18 Wister rats were intragastrically administrated nateglinide 16 mg/kg. Blood sample 0.4 mL was taken from medial canthus before administration and after 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 min of administration. The concentration of nateglinide in rats' plasma was determined; then DAS 2.1.1 software was used to calculate its pharmacokinetic parameters. RESULTS: Nateglinide showed good linear relationship in 0.05-6.4 μg/mL ($r=0.999\ 3$), lower limit of quantification was 0.05 μg/mL; RSDs of inter-day ($n=5$), intra-day ($n=3$) and stability ($n=3$) tests were lower than 10%; extraction recovery rate and method recovery rate were 78.71%-80.56%, 91.78%-100.42% (RSD<10%, $n=5$), respectively. After rats were intragastrically administrated nateglinide, AUC_{0-8 h} was (5.87±2.32) μg·h/mL, AUC_{0-∞} was (6.11±2.48) μg·h/mL, $t_{1/2}$ was (1.72±0.55) h, t_{max} was (0.67±0.29) h and c_{max} was (3.34±1.23) μg/mL. CONCLUSIONS: The method is accurate, rapid with strong specificity, and can be used for the concentration determination of nateglinide in rats *in vivo*; nateglinide is absorbed and metabolized quickly in rats *in vivo*.

KEYWORDS Nateglinide; UPLC; Pharmacokinetics; Rats

那格列奈(Nateglinide)是用于治疗2型糖尿病的非磺脲类口服降糖主流药物之一^[1],可根据血液中葡萄糖水平调节胰岛素分泌,改善胰岛素初相分泌及糖化血红蛋白水平。该药具有起效快、作用时间短、组织选择性高、与心肌和骨骼肌亲和力低、不易引起低血糖反应等特点,能有效控制餐后血糖水平^[2-3];其安全性和有效性在2型糖尿病患者中得到验证^[4],并被《中国2型糖尿

病防治指南》推荐使用^[5]。

由于那格列奈仅在210 nm波长左右有吸收峰^[6],故其检测易受血浆内源性物质干扰。目前,国内外的研究多采用固相萃取联合高效液相色谱法(HPLC)或高效液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS)测定血浆中那格列奈的浓度^[7-10],以减少杂质对其测定的干扰。但由于这些方法存在分析时间长、样品处理方法烦琐、成本较高等缺点,在实际应用中受到了很大限制。本研究拟采用液-液萃取联合超高效液相色谱(UPLC)法,通过优化色谱条件,建立快速、可大批量测定大鼠血浆中那格列奈浓度的方法,并测定大鼠灌胃给予那格列奈后的经时血药浓度,研究其在大鼠体内的药动学,为其临床血药浓度监测提供新的方法学参考。

Δ 基金项目:河北省药学会2015年度临床药学专项科研项目(No.YX201505)

* 硕士研究生。研究方向:体内药物分析。电话:0311-66003762。E-mail:691158182@qq.com

通信作者:主任药师,硕士生导师。研究方向:体内药物分析和药物相互作用。电话:0311-66002089。E-mail:shumei-wang@163.com

1 材料

1.1 仪器

Waters AcQuity UPLC 系统,包括恒温自动进样器、四元梯度泵、紫外检测器、柱温箱和 Waters Empower 3 操作平台(美国 Waters 公司);CPA 225D 分析天平(德国赛多利斯公司)。

1.2 药品与试剂

那格列奈对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100619-200501,纯度:99.5%);那格列奈片(江苏德源药业有限公司,批号:13101052,规格:每片 0.12 g);格列齐特对照品(内标,中国食品药品检定研究院,批号:100269-201505,纯度:99.5%);乙腈、磷酸、磷酸二氢钾、甲酸均为色谱纯,乙醚、乙酸乙酯均为分析醇,水为蒸馏水。

1.3 动物

健康 Wistar 大鼠 18 只,♂,体质量 220~240 g,购自河北省动物实验中心,动物生产许可证号:SCXK(冀)-2013-1-003。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Acquity UPLC®BEH C₁₈(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈-10 mmol/L 磷酸二氢钾缓冲盐溶液(41:59, V/V, 磷酸调节 pH 至 4.25);流速:0.38 mL/min;柱温:35 ℃;检测波长:210 nm;进样量:2 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 那格列奈系列对照品溶液的制备 精密称取那格列奈对照品 10 mg,置于 10 mL 量瓶中,用 41% 乙腈溶液溶解、定容,制成质量浓度为 1 mg/mL 的对照品贮备液。分别精密量取对照品贮备液适量于量瓶中,用 41% 乙腈溶液制成质量浓度分别为 64、32、16、8、4、2、1、0.5 μg/mL 的系列对照品溶液,4 ℃ 保存,待用。

2.2.2 内标标准工作液的制备 精密称取格列齐特对照品 10 mg,置于 10 mL 量瓶中,用 41% 乙腈溶液溶解、定容,制成质量浓度为 1 mg/mL 的内标贮备液。精密量取内标贮备液适量于量瓶中,用 41% 乙腈溶液制成质量浓度为 20 μg/mL 的标准工作液,4 ℃ 保存,待用。

2.3 血浆样品的处理

取血浆样品,室温下解冻后,离心(离心半径为 6 cm、10 900 r/min,下同)2 min。取上清液 200 μL 于 5 mL 离心管中,加入内标标准工作液 20 μL、6% 甲酸溶液 100 μL,涡旋 30 s 后加入乙醚-乙酸乙酯(70:30, V/V)混合液 1.5 mL,再涡旋 2 min,离心 3 min。取上清液于另一 5 mL 离心管中,40 ℃ 氮气流下吹干后,用 100 μL 的 41% 乙腈溶液复溶,吸取 2 μL 进样测定。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性 取那格列奈对照品溶液(8 μg/mL)、内标标准工作液进样;另取空白血浆和给药后 1 h 大鼠血浆,分别按“2.3”项下方法处理后,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,在该色谱条件下,那格列

奈、格列齐特峰形良好,保留时间分别为 3.29、2.27 min;大鼠血浆中内源性物质对测定无干扰,各峰间分离度均大于 1.5,色谱图见图 1。

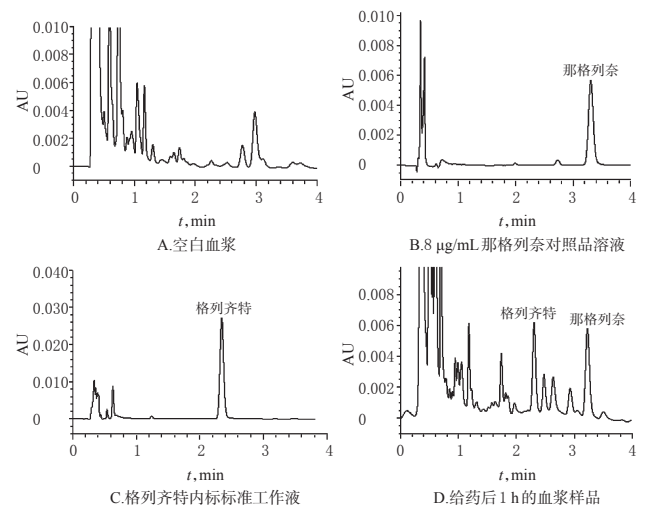


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4.2 标准曲线与定量下限 取那格列奈系列对照品溶液各 20 μL,置于 40 ℃ 氮气流下吹干,再分别加入空白血浆 200 μL,制成质量浓度分别为 6.4、3.2、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05 μg/mL 的系列那格列奈血浆样品,按“2.3”项下方法处理后,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以那格列奈质量浓度为横坐标(x)、那格列奈与内标格列齐特的峰面积的比值为纵坐标(y)进行线性回归,得回归方程为 $y = 0.718 6x - 0.004 1$ ($r = 0.999 3$)。结果表明,那格列奈在质量浓度为 0.05~6.4 μg/mL 范围内线性关系良好,定量下限为 0.05 μg/mL。

2.4.3 准确度、提取回收率与精密度 分别制备低、中、高质量浓度(0.1、0.8、5.8 μg/mL)血浆样品,各 5 份,按“2.3”项下方法处理后,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录那格列奈峰面积 A,根据标准曲线方程计算方法回收率。取等量对照品直接进样测定,记录峰面积 B,则提取回收率(%) = $A/B \times 100\%$ 。按上述方法分别制备低、中、高质量血浆样品各 5 份,按“2.3”项下方法处理后,日内连续进样 5 次,连续进样 3 d,分别考察日内、日间精密度。结果,方法回收率为 91.78%~100.42% (RSD < 10%, n = 5),提取回收率为 78.71%~80.56% (RSD < 10%, n = 5),日内(n = 5)、日间(n = 3)精密度试验的 RSD 均小于 10%。

2.4.4 稳定性 取“2.4.3”项下低、中、高质量浓度血浆样品,分别于室温放置 12 h、4 ℃ 进样器内放置 24 h、-40 ℃ 冷冻保存 15 d、反复冻融 3 次,均平行 3 份,按“2.3”项下方法处理,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,上述各条件下稳定性试验的 RSD 均小于 10% (n = 3),表明样品在上述条件下稳定性良好。

2.5 药动学研究

将那格列奈片研成粉末,精密称取粉末 196.8 mg

(相当于那格列奈 40 mg),加入 3%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液 10 mL,制成质量浓度约为 4 mg/mL 的那格列奈混悬液。取 18 只 Wistar 大鼠,禁食不禁水 12 h 后,ig 那格列奈混悬液 16 mg/kg(给药剂量根据体表面积法确定,为人用量的 7 倍)。分别于给药前及给药后 10、20、30、45、60、90、120、180、240、360、480 min 自眼内眦取血 0.4 mL(自给药 120 min 后,大鼠每次取血后均 ig 0.4 mL 生理盐水补充体液),置于肝素化的 1.5 mL 离心管中,离心 5 min,取上层血浆于离心管中,置于 -40 °C 冰箱中保存,待测。动物实验结束后,将待测血浆样品于室温下自然解冻,按“2.3”项下方法处理后,按“2.1”项下色谱条件进样测定,绘制血药浓度-时间曲线。那格列奈在大鼠体内的药-时曲线见图 2。

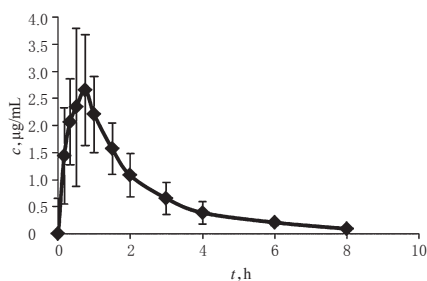


图2 那格列奈在大鼠体内的药-时曲线

Fig 2 Plasma concentration-time curve of nateglinide in rats *in vivo*

采用 DAS 2.1.1 药动学软件计算主要药动学参数。结果,那格列奈在大鼠体内的 AUC_{0-8h} 为 $(5.87 \pm 2.32) \mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$, $AUC_{0-\infty}$ 为 $(6.11 \pm 2.48) \mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$, $t_{1/2}$ 为 $(1.72 \pm 0.55) \text{h}$, t_{max} 为 $(0.67 \pm 0.29) \text{h}$, c_{max} 为 $(3.34 \pm 1.23) \mu\text{g}/\text{mL}$, CL 为 $(3.17 \pm 1.69) \text{L}/(\text{h} \cdot \text{kg})$, V 为 $(7.32 \pm 3.05) \text{L}/\text{kg}$ 。

3 讨论

在血浆样品处理方法的筛选中,笔者尝试了蛋白沉淀法和液-液萃取法。虽然蛋白沉淀法操作简便,但杂质过多,而且处理后的样品浓度会被稀释,不利于检测;采用乙酸乙酯进行提取,其灵敏度较低,难以满足测定要求。刘茜等^[11]采用乙醚作提取剂,提取回收率仅能达到 60% 左右;刘亮^[12]采用异丙醇-二氯甲烷(80:20, V/V)作提取剂,提取剂的使用量为 3 mL。参阅上述文献,经多次优化后,最终确定提取剂为乙醚-乙酸乙酯(70:30, V/V)混合液。为了提高提取回收率,根据相似相溶原理,当化合物以分子形式存在时,更易溶于乙醚或乙酸乙酯。且陈毅挺等^[13]研究表明,当 pH 小于 2.5 时,那格列奈基本以分子形式存在。故在加入提取剂前在血浆中加入 6% 的甲酸溶液 100 μL 后,仅需要提取剂 1.5 mL 即可使提取回收率提高到 80% 左右。因此,与文献报道的其他方法相比,该方法既提高了工作效率,又降低了成本。

在流动相选择方面,为得到良好的峰形和较高的响应值,试验中曾采用不同比例的乙腈-水、乙腈-甲酸水溶液作为流动相,但峰形均不理想。参阅文献[8],选用 10 mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液为水相,并用磷酸调节 pH

值。经多次优化筛选后,最终将流动相确定为乙腈-磷酸二氢钾缓冲液(41:59, V/V, 磷酸调 pH 至 4.25)。在内标选择方面,笔者曾尝试选用瑞格列奈,但在选定的色谱条件下其出峰时间与杂质重叠,测定受干扰;选用布洛芬作为内标,在选定的色谱条件下其保留时间较长(大于 5 min);而用格列齐特作为内标,保留时间适宜,与那格列奈分离完全,且峰形良好,无内源性物质干扰。

药动学结果显示,那格列奈口服吸收迅速、代谢较快, t_{max} 为 $(0.67 \pm 0.29) \text{h}$, $t_{1/2}$ 为 $(1.72 \pm 0.51) \text{h}$, 这与文献[11]报道基本一致。

综上所述,本研究采用液-液萃取联合 UPLC 法测定大鼠体内那格列奈浓度,操作简便、分析时间短,可应用于大样本的大鼠血浆中那格列奈浓度测定和药动学研究,为今后人体内那格列奈与其他药物的相互作用研究提供了方法学参考。

参考文献

- [1] 赵云鹤,单柏宇,王卓琰,等.糖尿病治疗药物那格列奈的研究进展[J].糖尿病新世界,2016,19(23):197-198.
- [2] 袁红宇,张伟中,郭玉娇,等.那格列奈与瑞格列奈治疗 2 型糖尿病疗效与安全性的 Meta 分析[J].中国药房,2012,23(41):4196-4200.
- [3] 丁嘉寅,王剑. HPLC-MS 法测定那格列奈的血药浓度[J].海峡药学,2010,22(3):193-195.
- [4] 吴曼,马建丽,刘皈阳,等.那格列奈治疗 2 型糖尿病有效性与安全性的 Meta 分析[J].中国循证医学杂志,2014,14(8):984-990.
- [5] 中华医学会糖尿病学分会.中国 2 型糖尿病防治指南(2013 年版)[J].中华内分泌代谢杂志,2014,30(10):26-89.
- [6] 田宝娟,杨更亮,李志伟,等.紫外分光光度法测定那格列奈[J].光谱实验室,2003,20(2):269-271.
- [7] 朱南平,徐平声. HPLC 测定血浆中那格列奈及其人体药动学和相对生物利用度研究[J].中国药学杂志,2006,41(13):1013-1015.
- [8] Singh AV, Nath LK, Pani NR. Development and validation of analytical method for the estimation of lamivudine in rabbit plasma[J]. J Pharm Ana, 2011, 1(4): 251-257.
- [9] 李铮,李杨,李可欣. HPLC 法测定人血清中那格列奈浓度及人体生物等效性研究[J].首都医药,2010,17(12):69-70.
- [10] 杨小英,魏世杰,陈和莉,等.替米沙坦与那格列奈在比格犬体内的药动学相互作用[J].中国医院药学杂志,2012,32(23):1873-1876.
- [11] 刘茜,邵馨,赵辉,等.卡维地洛对那格列奈在大鼠体内药动力学的研究[J].中南药学,2011,9(6):427-430.
- [12] 刘亮. HPLC 法测定血浆中那格列奈的浓度[J].亚太传统医药,2013,9(10):27-28.
- [13] 陈毅挺,李艳霞,黄露,等.那格列奈与牛血清白蛋白的相互作用[J].分析实验室,2015,34(10):1121-1126.

(收稿日期:2016-12-26 修回日期:2017-09-12)

(编辑:刘明伟)