

## 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<sup>1,2</sup>, 王丽<sup>1,2</sup>, 何广卫<sup>3</sup>, 吴强<sup>3</sup>, 范国荣<sup>2</sup>, 杭太俊<sup>1</sup> (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-C<sub>18</sub>(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<sup>1,2</sup>, WANG Li<sup>1,2</sup>, HE Guang-Wei<sup>3</sup>, WU Qiang<sup>3</sup>, FAN Guo-Rong<sup>2</sup>, HANG Tai-Jun<sup>1</sup> (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-C<sub>18</sub> 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<sup>[1,2]</sup>。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。

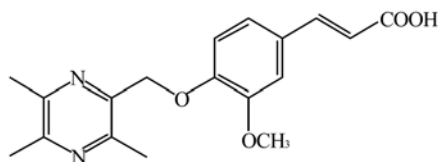


图1 川阿格雷结构图

## 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 C<sub>18</sub>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。

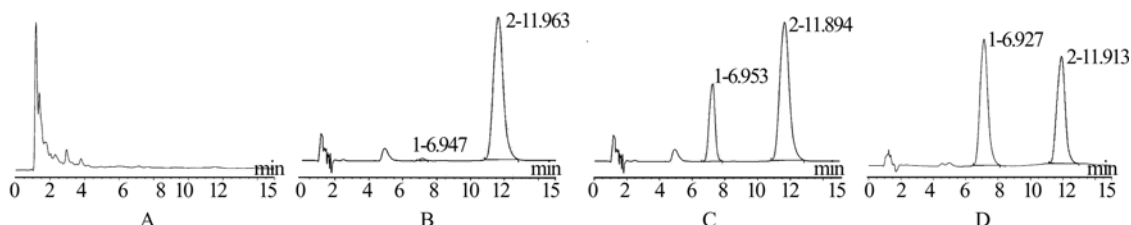


图2 血浆样品高效液相典型色谱图

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  $\text{mg/kg}$ , 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  $\text{mg/kg}$  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 $t_{\text{max}}$ 、 $c_{\text{max}}$ 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。

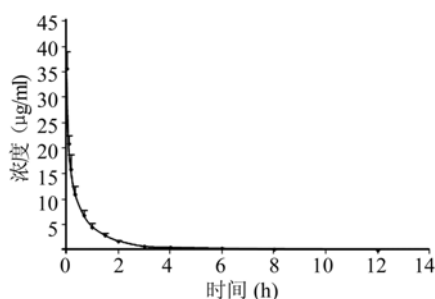


图3 70只SD大鼠静脉注射川阿格雷15  $\text{mg/kg}$  后平均血药浓度-时间曲线

**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)

- 药学杂志, 2003, 38(1): 12.
- [2] 高守红, 杨少麟, 范国荣. 虎杖苷的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2005, 23(3): 145.
- [3] 李蓟龙, 尹京湘, 张 力, 等. 虎杖中白藜芦醇对豚鼠左心室流出道自律组织电活动的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2010, 26(3): 311, 364.
- [4] 刘 铭, 刘 华, 张国平, 等. 虎杖苷对脑出血性损伤大鼠血清白细胞介素-1 $\beta$ 和脑组织 Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 中草药, 2010, 41(12): 2010.
- [5] Gao S, Fan G, Hong Z, *et al.* HPLC determination of polydatin in rat biological matrices: application to pharmacokinetic studies [J]. J Pharmaceut Biomed, 2006, 41(1): 240.
- [6] 吕春艳, 张兰桐, 袁志芳, 等. 虎杖苷在大鼠体内的药动学特点和组织分布研究[J]. 中草药, 2006, 38(2): 235.
- [7] 林建海, 李笑宏, 唐跃年, 等. 白藜芦醇苷的 HPLC 法分析及其在苗猪体内的药代动力学研究[J]. 药物分析杂志, 2001, 21(05): 325.
- [8] 杨润涛, 周四元, 章 翔, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定血浆中白藜芦醇苷及其代谢产物[J]. 分析化学, 2007, 35(9): 1309.
- [9] Zhou S, Yang R, Teng Z, *et al.* Dose-dependent absorption and metabolism of trans-polydatin in rats [J]. J Agr Food Chem, 2009, 57(11): 4572.
- [收稿日期] 2011-02-10  
[修回日期] 2011-12-21

(上接第 44 页)

表 2 SD 大鼠静脉注射川阿格雷 15 mg/kg 后主要药动学参数

药动学参数	参数数值
C <sub>0</sub> (ng/ml)	35 598.71
t <sub>1/2</sub> (h)	5.47
MRT (h)	1.14
AUC <sub>0-24</sub> (h ng/ml)	14 566.6
AUC <sub>0-∞</sub> (h ng/ml)	14 847.59
CL (L/h/kg)	1.01
Vd (L/kg)	1.15

**3.2 预处理条件的选择与优化** 液-液提取法, 其优点在于通过对有机溶剂的优化, 可以选择性的提取目标物, 减少内源性物质的干扰, 且回收率较高。本试验考察了乙酸乙酯, 甲基叔丁基醚, 正己烷(含 2% 正丁醇)等提取溶剂。试验结果表明, 样品经乙酸乙酯和正己烷(含 2% 正丁醇)提取后干扰较多; 甲基叔丁基醚提取回收率较高, 且内源性物质及其他物质不影响样品及内标的测定, 因此选用甲基叔丁基醚为提取溶剂。

**3.3 色谱条件的选择与优化** 分别考察了川阿格雷在 Diamonsil(2) C<sub>18</sub>(150 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m)、Diamonsil C<sub>18</sub>(150 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m)、Ultimate C<sub>18</sub>(150 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m) 和 Hedera ODS-2(150 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m) 等色谱柱上的保留情况, 结果表明, 川阿格雷在 Diamonsil(2) C<sub>18</sub> 柱上峰型良好, 样品、内标可以实现较好的分离, 内源性物质不干扰样品的测定。

由于川阿格雷在色谱柱上保留较弱, 出峰较早, 故需要选用水相比例较大的溶剂系统。本试验考察了乙腈: 水(20: 80, 30: 70, 40: 60)等溶剂系统。结果表明乙腈: 水(30: 70)时, 川阿格雷出峰时间较合适, 分离度较好。

同时, 流动相的 pH 值对川阿格雷的分离测定有较大影响, 流动相 pH 值降低, 样品和内标的保留时间缩短, 灵敏度增高。本试验选用醋酸-醋酸铵缓冲盐体系, 醋酸铵浓度为 5 mM, pH 为 4.0。在不损伤色谱柱使用寿命的前提下, 使色谱峰型与灵敏度得到了改善。

**3.4 内标的选择** 内标法定量可以减小样品前处理过程中产生的误差。本试验考察了亚叶酸、对羟基苯甲酸、布洛芬、丹皮酚、桂皮醛等化合物, 实验结果表明亚叶酸、对羟基苯甲酸、丹皮酚等在甲基叔丁基醚提取下, 回收率较低; 布洛芬、桂皮醛回收率较高; 但布洛芬出峰位置与待测物相重叠, 桂皮醛回收率较高, 且出峰位置不与待测物相干扰, 峰形较好, 故选择桂皮醛为内标。

**3.5 川阿格雷是运用现代技术合成的抗凝血新药<sup>[3-5]</sup>**, 目前尚未有文献对川阿格雷进行报道。本实验首次建立了血浆样品中川阿格雷分离测定的方法, 并将之用于其在 SD 大鼠体内的药动学研究, 为后续的研究奠定了基础。

【参考文献】

- [1] 潘赞红, 金 鑫. 川芎嗪与阿魏酸配伍对大鼠心肌缺血再灌注损伤心肌的保护作用[J]. 天津医药. 2008, 36(10): 796.
- [2] 杨家荣, 张密霞, 常亮堂, 等. 川芎嗪-阿魏酸及其配伍对心肌缺血再灌注模型大鼠的保护作用及对黏附分子的影响[J]. 中草药. 2008, 39(7): 1054.
- [3] 杜 希. 氯吡格雷的药理作用与临床评价[J]. 首都医药. 2002, 7: 44.
- [4] 李 琳, 张临洪, 徐武平. 氯吡格雷联合奥扎格雷钠治疗后循环脑梗死的临床疗效观察[J]. 中国临床神经外科杂志. 2010, 15(8): 474.
- [5] 王茜莎, 潘雪刁, 张德志, 等. 奥扎格雷钠对心肌缺血的保护作用研究[J]. 广东药学院学报. 2010, 26(3): 292.

[收稿日期] 2011-04-08

[修回日期] 2011-11-08