

## 大鼠血浆中马来酸曲美布汀的 HPCE 测定法及药物动力学

余丽宁, 李发美\*

(沈阳药科大学基础部, 辽宁 沈阳 110015)

**摘要:** 目的 建立快速、准确测定大鼠血浆中马来酸曲美布汀浓度的 HPCE 方法,并用于其在大鼠体内的药物动力学研究。方法 以盐酸麻黄碱为内标,  $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钠 (pH 6.0) 为运行缓冲溶液, 紫外检测波长为 214 nm。血浆样品经乙腈除蛋白后, 于 50 °C 水浴用氮气吹干, 残渣溶于甲醇-水(1:1), 进样分析。结果 线性范围 5 - 200  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 日内 RSD < 14%, 日间 RSD < 13%, 回收率为 72.8% - 87.9%, 最低定量浓度为 5  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。ig 给药 30 min 后, 血浆中药物浓度达峰值,  $T_{1/2(K_e)}$  为 173 min,  $K_e$  为  $5.6 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ , AUC 为  $7.83 \mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结论 方法灵敏度高, 操作简便, 适用于马来酸曲美布汀的药物动力学研究。

**关键词:** 马来酸曲美布汀; 高效毛细管电泳法; 药物动力学

中图分类号: R927.2; R969.1

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2001)02 - 0131 - 03

马来酸曲美布汀(trimebutine maleate) 是有独特的双向调节作用的新型胃功能调节剂<sup>[1]</sup>, 临床用于治疗胃炎、消化不良和过敏性肠症候群引起的消化道功能异常。其在大鼠体内的血药浓度较低, 血药浓度的检测方法, 国外采用放射性元素标记法<sup>[2]</sup>及 HPLC 法<sup>[3]</sup>。高效毛细管电泳(HPCE) 是 80 年代发展起来的新型分离分析技术, 因其有样品前处理简单、分离能力强、分析速度快等特点, 并可在低波长 200 nm 附近测定, 不受 HPLC 中溶剂截止波长的限制, 在药物动力学研究中的应用日益广泛。我们曾用 HPCE 测定胶囊剂中马来酸曲美布汀含量<sup>[4]</sup>, 为研究马来酸曲美布汀的药物动力学, 本文建立了测定该药在大鼠血浆中浓度的 HPCE 方法。

## 材料与 方法

**仪器与试剂** 实验室组装的毛细管电泳仪包括: GDY-30kV 型毛细管电泳高压电源仪(山东大学化学学院), Spectra-100 可变波长检测器(Spectra-Physics, USA) 改装成毛细管电泳检测器; 江申色谱工作站(大连江申分离科学技术公司); 石英毛细管(河北永年光导纤维厂), 内径 75  $\mu\text{m}$ , 总长度为 50 cm, 有效长度为 40 cm。

盐酸麻黄碱对照品购自中国药品生物制品检定所, 马来酸曲美布汀对照品(含量为 99.7%) 由本校

药剂教研室提供, 甲醇、乙腈均为色谱纯(山东省禹王实业总公司化工厂), 磷酸二氢钠、氢氧化钠均为分析纯试剂。实验用水为重蒸水。

**溶液配制** 马来酸曲美布汀储备液: 精密称量马来酸曲美布汀 200 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 4 °C 保存, 临用前用水稀释至所需浓度。内标物储备液: 精密称量盐酸麻黄碱适量, 用甲醇溶解并稀释成  $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液, 4 °C 保存。马来酸曲美布汀灌胃剂: 精密称取马来酸曲美布汀适量, 用 5% 吐温 80 水溶液溶解并稀释成  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的混悬溶液。

**动物** Wistar 大鼠 6 只, ♀ ♂ 各半, 体重(210 ± 20) g(沈阳药科大学动物饲养中心)。

**电泳条件** 以  $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钠(以  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠调节至 pH 6.0) 为运行缓冲液; 分离电压为 10.0 kV; 压差进样 20 s, 进出口液面高度差 25 cm; 检测波长为 214 nm, 柱温为室温。

每次开机后, 依次用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液及重蒸馏水各冲洗毛细管 1 min, 2 次进样间均用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液、重蒸馏水、缓冲溶液清洗毛细管 1 min。采用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液清洗毛细管的目的是消除毛细管壁对血浆中残余蛋白质的吸附, 以获得良好的重现性。所有清洗操作均用注射针管在出口端减压进行。

上述溶液在使用前经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过并超声脱气。

**血浆样品预处理** 取血浆样品 400  $\mu\text{L}$ , 加入内标溶液 20  $\mu\text{L}$  及乙腈 0.80 mL, 涡流混合 2 min,

收稿日期: 2000-07-11

作者简介: 李发美, 女, 教授, 博士生导师。

\* 通讯作者 Tel: (024) 23843711 - 3336, Fax: (024) 83890024,

E-mail: fameili@ihw.com.cn

4 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min, 移取上清液, 于 50 °C 水浴氮气流吹干, 残渣加甲醇-水(1:1) 20 μL, 涡旋溶解, 离心后进样。

## 结 果

### 1 方法专属性

将大鼠空白血浆加入马来酸曲美布汀和大鼠灌胃后收集的 plasma 样品按“血浆样品预处理”项下操作, 将所得电泳谱图进行比较, 证明血浆中的内源性物质不干扰测定, 见图 1。马来酸曲美布汀和内标的迁移时间分别为 5.7 min 和 6.4 min。

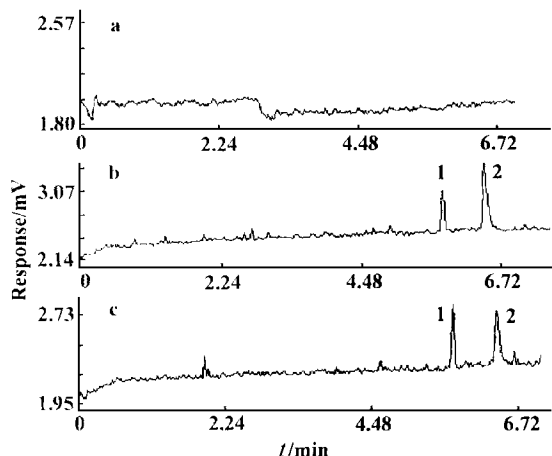


Fig 1 Electropherograms of trimebutine maleate in rat plasma

a. Blank plasma; b. Blank plasma spiked with trimebutine maleate and ephedrine hydrochloride (IS); c. Plasma sample after ig of 100 mg·kg<sup>-1</sup> trimebutine maleate. 1. Ephedrine hydrochloride (IS); 2. Trimebutine maleate

### 2 标准曲线和线性范围

吸取肝素抗凝的空白血浆 400 μL, 加入马来酸曲美布汀标准系列溶液 50 μL, 使血浆浓度为 5, 10, 20, 40, 80 和 200 μg·L<sup>-1</sup>, 其余同“血浆样品预处理”项下操作, 依法测定, 以马来酸曲美布汀的浓度为横坐标, 以其与内标物峰高比为纵坐标, 用加权最小二乘法进行线性回归, 得回归方程, 用此方程测定已知浓度的质量控制样品, 选择使各点误差之和最小, 且各点的相对误差接近的权重为 10<sup>6</sup>/C<sup>2</sup>, 式中 C 为样品浓度。以此权重因子计算求得相关系数  $\gamma = 0.9924 - 0.9954$ , 符合生物分析方法对线性的要求<sup>[5]</sup>。同时测得最低定量浓度为 5 μg·L<sup>-1</sup>。

### 3 回收率

将马来酸曲美布汀对照品溶液加入空白血浆中, 按“血浆样品预处理”项下操作, 以测得的马来酸

曲美布汀与内标物峰高比值得和对照品溶液直接进样测得的马来酸曲美布汀与内标物峰高比值得之比计算回收率。血药浓度为 10, 40 和 200 μg·L<sup>-1</sup> 时, 平均回收率 (n = 6) 分别为 72.8%, 81.1% 和 87.9%, RSD 分别为 14%, 6.5% 和 4.8%。

### 4 精密度与准确度

配制低、中、高 3 个浓度 (10, 40 和 200 μg·L<sup>-1</sup>) 的质量控制 (QC) 样品, 并与标准曲线同时进行测定, 计算 QC 样品的测得浓度, 与配制浓度对照, 以相对标准偏差 (RSD) 和相对回收率表示方法的精密度与准确度。本法的相对回收率为 88.3% - 108.4%, 日内 RSD < 14% (n = 6), 日间 RSD < 13% (n = 18), 符合 2000 年版《中华人民共和国药典》<sup>[6]</sup> 二部附录 XIX B 中对生物样品分析方法的基本要求。

### 5 大鼠 ig 给药后的药物动力学

取大鼠 6 只, 经 12 h 空腹 (禁食不禁水) 后 ig 马来酸曲美布汀灌胃剂, 按 100 mg·kg<sup>-1</sup> 给药, 分别于给药后 5, 15, 30, 60, 120, 180, 300 和 420 min 于眼眶取血 1 mL, 离心后取血浆 400 μL, 以当日的标准曲线计算各时间点样本中马来酸曲美布汀的浓度, 平均药时曲线见图 2。采用梯形法计算药物动力学参数, 结果见表 1。

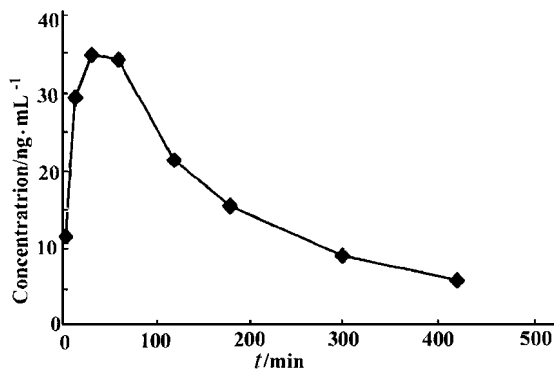


Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of trimebutine maleate after ig 100 mg·kg<sup>-1</sup> in rat

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of trimebutine maleate after ig 100 mg·kg<sup>-1</sup> to rat (n = 6,  $\bar{x} \pm s$ )

AUC <sub>0-∞</sub> / μg·min·mL <sup>-1</sup>	T <sub>max</sub> / min	C <sub>max</sub> / μg·L <sup>-1</sup>	T <sub>1/2(Ke)</sub> / min	K <sub>e</sub> (× 10 <sup>-3</sup> ) / min <sup>-1</sup>
8 ± 3	30 ± 16	39 ± 7	173 ± 93	5.6 ± 2.6

## 讨 论

药物及其代谢物的血药浓度测定常用 HPLC 法, 近年来 HPCE 法的应用也日益广泛。文献<sup>[3]</sup>报道测定马来酸曲美布汀血药浓度的 HPLC 方法需

要采用荧光检测器,以克服 UV 检测器灵敏度低的缺点。HPCE 法受溶剂吸收的干扰小,可在低波长检测。马来酸曲美布汀在其最大吸收波长 268 nm 的检测灵敏度较低,有很强的末端吸收,因此选择低波长 214 nm 为检测波长进行测定,可大大提高检测的灵敏度。本法的血浆样品预处理可除去大部分蛋白质,且将样品浓缩了 20 倍;此外,进样时间为 20 s(较长)。结果使方法的灵敏度适合于测定大鼠血浆中浓度很低的马来酸曲美布汀,满足药物动力学研究的要求。

曾试用咖啡因、苯巴比妥、氨基比林、非那西丁等为内标,但在实验条件下它们的峰位在马来酸曲美布汀峰后,约为 8 - 10 min,血浆中内源性物质约在 10 min 出峰,与内标峰重叠。经实验确定盐酸麻黄碱为内标,其出峰时间早于马来酸曲美布汀,不受内源性物质干扰。为防止血浆中的内源性物质污染运行缓冲液,在马来酸曲美布汀出峰后 1 - 2 min 终止实验,用注射针管减压将剩余血浆物质抽出。

灌胃给药 30 min 后,大鼠血浆中药物浓度达峰,值与文献报道一致。文献采用放射性元素标记法测定马来酸曲美布汀在大鼠血浆中的浓度,用不同的放射性元素标记所得结果不同,不能真实反映该药

的药物动力学过程。本文采用毛细管区带电泳法测定大鼠血浆中马来酸曲美布汀含量,方法灵敏度高,操作简便,适用于马来酸曲美布汀原料药及其制剂的药物动力学研究。

#### REFERENCES:

- [1] Xue L, Fukuta H, Yamamoto Y, *et al.* Dual effects of trimebutine on electrical responses of gastric smooth muscles in the rat [J]. *Eur J Pharmacol*, 1995, **294**(1): 75 - 81.
- [2] Yoshikawa M, Endo H, Ohnogi Y, *et al.* Biological fate of trimebutine maleate (1). Absorption, Distribution and Excretion in rats, mice and dogs [J]. *Pharmacometrics*, 1982, **24**(2): 289 - 300.
- [3] Miura Y, Takeyama S, Yoshikawa M, *et al.* Metabolism of trimebutine maleate, a gastrointestinal tract motility regulator in rats and mice. Characterization and quantification of metabolites in urine, bile and plasma [J]. *J Pharm Soc Jpn*, 1988, **108**(10): 989 - 1000.
- [4] Yu LN, Li FM. Capillary Electrophoresis for the Determination of Trimebutine Maleate in Capsules [J]. *Chin J Pharm Anal* (in Chinese), 2001, in press.
- [5] Braggios, Barnabg RJ, Grossi P, *et al.* A strategy for validation of bioanalytical methods [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1996, **14**(4): 375 - 388.
- [6] The Pharmacopoeia Commission of PRC. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* [M]. Part II. Beijing: Chemical Industry Publishing House, 2000. Appendix XIX B.

## HPCE DETERMINATION OF TRIMEBUTINE MALEATE IN RAT PLASMA AND ITS PHARMACOKINETICS

YU Li ning, LI Fa mei

(Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To develop a method for the determination of trimebutine maleate in rat plasma by using high performance capillary electrophoresis. The method was employed to pharmacokinetic analysis of trimebutine maleate. **METHODS** Plasma samples were deproteinized with acetonitrile (containing ephedrine hydrochloride as internal standard) and the supernatant was dried under N<sub>2</sub> stream at 50 °C. The residue was dissolved with methanol-water (1:1) and injected into the capillary by siphon. The electrophoresis was performed in uncoated fused-silica capillary and the voltage was 10 kV. The running buffer was 0.03 mol·L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6.0). The eluate was detected at 214 nm by UV detection. **RESULTS** The recovery for trimebutine maleate in rat plasma was 72.8% - 87.9%. The calibration curve in plasma was linear over the range 5 - 200 μg·L<sup>-1</sup>. The limit of quantitation was 5 μg·L<sup>-1</sup>. The intraday relative standard deviation (n = 6) and the interday relative standard deviation (n = 18) were less than 14%. The highest concentration in plasma was observed at 30 min after ig trimebutine maleate to rats. The pharmacokinetic results were AUC<sub>0-∞</sub> = 8 μg·min·mL<sup>-1</sup>, T<sub>1/2(Ke)</sub> = 173 min and K<sub>e</sub> = 5.6 × 10<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup>. **CONCLUSION** The method is accurate, sensitive and suitable for pharmacokinetic study of trimebutine maleate.

**KEY WORDS:** trimebutine maleate; high performance capillary electrophoresis; pharmacokinetics