

## 间硝苯地平在 Beagle 犬体内的药代动力学

杨志福, 周四元, 杨铁虹, 梅其炳\*

(第四军医大学 药理学教研室, 陕西 西安 710032)

**摘要:** 目的 用反相高效液相色谱法研究间硝苯地平(*nifedipine*, *nif*) 在 Beagle 犬体内的药代动力学特征。方法 正交设计优化色谱分离条件, Beagle 犬分别 iv 给予 *nif* 0.288 mg·kg<sup>-1</sup> 和 ig *nif* 1.152, 3.456, 10.370 mg·kg<sup>-1</sup>。用反相高效液相色谱法分析血浆中原型药物浓度, 血浆药物浓度-时间数据用 3P97 药代动力学软件分析。结果 Beagle 犬 iv *nif*, 其体内过程符合二室模型,  $T_{1/2\beta}$  为 116.8 min; ig 给予 *nif* 后在 Beagle 犬体内的代谢符合一室模型, 其中低剂量(1.152 mg·kg<sup>-1</sup>) 组  $C_{max}$  为 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $T_{1/2}(K_e)$  为 147 min; 中剂量(3.456 mg·kg<sup>-1</sup>) 组  $C_{max}$  为 36  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $T_{1/2}(K_e)$  为 122 min; 高剂量(10.37 mg·kg<sup>-1</sup>) 组  $C_{max}$  为 69  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $T_{1/2}(K_e)$  为 144 min。结论 Beagle 犬 ig 和 iv *nif* 后, 血浆中药物消除迅速, 口服绝对生物利用度较低。

**关键词:** 间硝苯地平; 药物代谢动力学; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2004)08-0609-04

## Pharmacokinetics of *nifedipine* in Beagle dogs

YANG Zhi-fu, ZHOU Si-yuan, YANG Tie-hong, MEI Qi-bing\*

(Department of Pharmacology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

**Abstract:** **Aim** To study the pharmacokinetics of *nifedipine* (*nif*) in Beagle dogs. **Methods** The Beagle dogs were divided into two groups. *nif* was intravenously administered to the Beagle dogs in group 1 at the dose of 0.288 mg·kg<sup>-1</sup>, and it was orally administered to the Beagle dogs in group 2, 3 and 4 at the dose of 1.152, 3.456 and 10.370 mg·kg<sup>-1</sup>, respectively. *nif* in plasma was detected by reversed phase high performance liquid chromatography. The pharmacokinetic parameters were calculated by 3P97 software. **Results**

When *nif* was intravenously administered, the plasma concentration-time curve was fit to a two-compartment model and  $T_{1/2\beta}$  was 117 min. When *nif* was orally administered, the plasma concentration-time curve was fit to a one-compartment model.  $T_{1/2}(K_e)$  and  $C_{max}$  were 147 min and 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; at the low dose of 1.152 mg·kg<sup>-1</sup>.  $T_{1/2}(K_e)$  was 122 min and  $C_{max}$  was 36  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  at the middle dose of 3.456 mg·kg<sup>-1</sup>.  $T_{1/2}(K_e)$  was 144 min and  $C_{max}$  was 69  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  at the high dose of 10.37 mg·kg<sup>-1</sup>, respectively.

**Conclusion** It was showed that the speed of elimination of *nif* was high in Beagle dogs. The absolute bioavailability of *nif* given orally was very low.

**Key words:** *nifedipine*; pharmacokinetics; high performance liquid chromatography

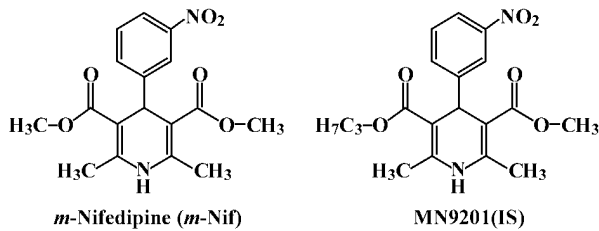
间硝苯地平(*nifedipine*, *nif*) 化学名为 2,6-二甲基-4-(3-硝基苯基)-1,4-二氢吡啶-3,5-二羧酸二甲酯(图 1), 是一新的二氢吡啶类钙通道阻滞剂, 与临床应用的硝苯地平互为同分异构体。研究发

现, *nif* 对光稳定性好<sup>[1]</sup>, 能抑制血管紧张素 II 对血管平滑肌细胞的增殖和蛋白质合成的影响<sup>[2]</sup>, 而且能维持细胞膜  $\beta$  受体数目的稳定性<sup>[3]</sup>。对 *nif* 有关药代动力学仅有家兔体内实验报道<sup>[4,5]</sup>。本文旨在观察静脉和口服给药后, *nif* 在 Beagle 犬体内的药代动力学特征, 可望为其临床前研究提供依据。

收稿日期: 2003-08-01

通讯作者 Tel / Fax: 86 - 29 - 83374552,

E-mail: yang-zf@hotmail.com, qbmei@fmmu.edu.cn



MN9201 : 2,6-Dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3-carboxylic acid dimethylester-5-carboxylic acid propyl ester

Figure 1 Chemical structures of *m* nifedipine and MN9201 (IS)

## 材料和方法

**实验仪器** 高效液相色谱仪(美国 Beckman 公司), LD5-2A 型离心机(北京医用离心机厂)。色谱分析柱为  $C_{18}$  柱(250 mm × 4.6 mm ID, 5  $\mu$ m, Phenomenex)。

**药品和主要试剂** *m* Nif 和内标 MN9201 [2,6-二甲基-4-(3-硝基苯基)-1,4-二氢吡啶-3-羧酸甲酯-5-羧酸丙酯](图1)为本室合成,纯度大于98%。甲醇为色谱纯(TEDIA 公司),碱化液为50 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸氢二钠溶液(用 NaOH 调至 pH 12),其他试剂均为分析纯。用乙醇-二甲基亚砜(DMSO)-聚乙二醇(PEG 400)-生理盐水(5103055)将 *m* Nif 配置成0.75 g·L<sup>-1</sup>的注射液;再用0.5% CMCNa 将 *m* Nif 分别配制成0.375, 1.125 和 3.375 g·L<sup>-1</sup>的混悬液,均需避光保存。

**实验动物** 实验用 Beagle 犬 20 只,(10.6 ± 1.2) kg,由国家医药管理局新药研究管理中心成都实验动物基地提供,随机分成4组,分别为静脉给药组,口服给药低剂量组,中剂量组和高剂量组,每组5只动物,实验前禁食12 h,自由饮水。

**色谱条件** 流动相为甲醇-10 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲液 pH 5(8317),流速1 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长为350 nm。

**血浆样品处理** 含药犬血浆0.5 mL,加入内标溶液(5.00 mg·L<sup>-1</sup>) 0.05 mL,混匀,加入碱化液1 mL,混匀后用乙醚1 mL 提取2次,合并提取液于尖底试管中,挥干溶剂。残留物用甲醇50  $\mu$ L 溶解,取溶解液20  $\mu$ L 进样分析。

**标准曲线** 取6支试管分别加入犬空白血浆0.5 mL,然后分别加入不同浓度的 *m* Nif 对照液0.05 mL(含内标5.00 mg·L<sup>-1</sup>),使其终质量浓度为0, 10, 15, 100, 200 和 500  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>(内标为500  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>),按上述方法中“血浆样品处理”项下操作。同时分别制备质量浓度为5, 8 和 10  $\mu$ g·L<sup>-1</sup> *m* Nif

的血浆样品,每个浓度8份,按上述方法中“血浆样品处理”项下操作,进行最低检测浓度的测定。

**准确度和精密度** 分别于0.5 mL 空白血浆中加入低、中、高(终质量浓度分别为20, 150 和 400  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>)的 *m* Nif 溶液(含内标),混匀,按上述方法中“血浆样品处理”项下操作,进行准确度测定;同样再分别取空白血浆0.5 mL 加入低、中、高(终质量浓度分别为15, 100 和 500  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>)的 *m* Nif 溶液(含内标),混匀,进行精密度测定。

**药代动力学实验** Beagle 犬实验前禁食12 h,自由饮水。(1)按0.288 mg·kg<sup>-1</sup>剂量(0.384 mL·kg<sup>-1</sup>)给 Beagle 犬 iv *m* Nif 注射液,分别于 iv 后0, 5, 10, 20, 40, 60, 120, 180 和 240 min,犬前腿部静脉采集血液标本,肝素抗凝,离心得血浆后,按上述方法中“血浆样品处理”项下操作,测定其浓度。(2) *m* Nif 混悬液分别按1.152, 3.456 和 10.37 mg·kg<sup>-1</sup>剂量(3.072 mL·kg<sup>-1</sup>,单位重量的犬给予混悬液的体积相同) ig 给予 Beagle 犬,分别于 ig 后0, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 和 420 min,犬前腿部静脉采集血液标本,肝素抗凝,离心得血浆后,按上述方法中“血浆样品处理”项下操作,测定其浓度。

**数据统计分析** 用 3P97 药代动力学软件(中国科学院北京数学研究所研制)进行数据分析。

## 结果

### 1 方法专属性

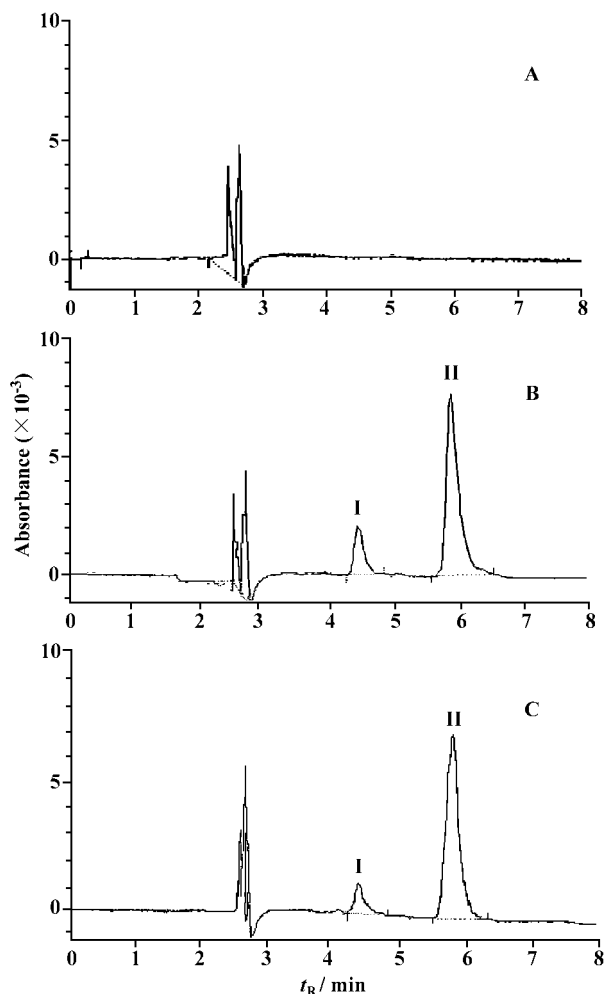
采用正交实验设计优化色谱分离条件,由典型色谱图(图2)可见, *m* Nif 与 MN9201 峰形良好,无杂峰干扰测定。本方法具有较好的专属性。

### 2 标准曲线的制备

以血浆中 *m* Nif 浓度( $X$ )为横坐标, *m* Nif 与内标 MN9201 的峰面积之比( $Y$ )为纵坐标,得标准曲线回归方程为  $Y = 0.00223X - 0.01139$  ( $r = 0.9994$ ,  $n = 8$ ),线性范围为10 ~ 500  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>。最低检测浓度为8  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>。

### 3 回收率和精密度

当 *m* Nif 的血浆浓度为20, 150 和 400  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>时,回收率( $n = 8$ )分别为(111 ± 6)%, (106 ± 5)% 和(104 ± 3)%。当 *m* Nif 的血浆浓度为15, 100 和 500  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>时,日内 RSD 分别为9.7%, 3.1% 和 1.8% ( $n = 8$ );日间 RSD 分别为14.5%, 7.2% 和 5.4% ( $n = 8$ )。



A: Blank plasma; B: Blank plasma spiked with 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  *m*Nif (I) and internal standard (II); C: Plasma sample after 40 min with a single iv dose of 0.288  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  to Beagle dog

Figure 2 HPLC chromatograms of the sample (*m*Nif) and internal standard (MN9201)

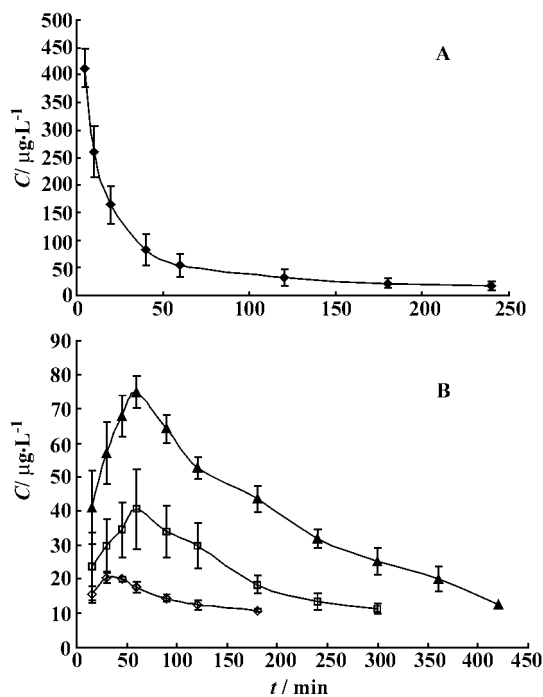
#### 4 血药浓度随时间的变化

Beagle 犬 iv *m*Nif 0.288  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  及 Beagle 犬 ig *m*Nif 1.152, 3.456 和 10.37  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  后,血药浓度随时间变化的情况如图 3 所示。采用 3P97 药代动力学软件对血药浓度-时间数据进行分析,结果表明 iv 后, *m*Nif 在动物体内代谢过程符合二室模型,药代动力学参数见表 1 所示,  $T_{1/2\beta}$  为 116.8 min; ig 给药后, *m*Nif 在动物体内代谢过程符合一室模型,其药代动力学参数如表 2 所示。

#### 5 绝对生物利用度

根据公式  $F = \frac{\text{AUC}_{\text{iv}} \times D_{\text{ig}}}{\text{AUC}_{\text{ig}} \times D_{\text{iv}}} \times 100\%$  ( $D$  为给药剂

量),将 ig 给予的低、中、高 3 个剂量所得 AUC 分别与 iv 的 AUC 进行比较,结果  $F$  值分别为 6.6%, 4.1% 和 3.0%,平均值为  $(4.6 \pm 1.8)\%$ 。



◆◆◆ 0.288  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (iv); ◇◇◇ Low (1.152  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ); □□□ Mid (3.456  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ); ▲▲▲ High (10.370  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )

Figure 3 Plasma concentration-time curve of *m*Nif in Beagle dog after iv (A) and ig (B) administration at the different doses ( $n=5$ )

Table 1 Pharmacokinetic parameters of *m*Nif in Beagle dog after intravenous administration of *m*Nif at the dose of 0.288  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Parameter	Value
$A/ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	443 $\pm$ 25
$\alpha/ \text{min}^{-1}$	0.070 $\pm$ 0.010
$B/ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	65.8 $\pm$ 2.9
$\beta/ \text{min}^{-1}$	0.010 $\pm$ 0.003
$V_d/ \text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$	5.7 $\pm$ 0.4
$T_{1/2\alpha}/ \text{min}$	9.89 $\pm$ 0.24
$T_{1/2\beta}/ \text{min}$	117 $\pm$ 10
$K_{21}/ \text{min}^{-1}$	0.0100 $\pm$ 0.0020
$K_{10}/ \text{min}^{-1}$	0.030 $\pm$ 0.005
$K_{12}/ \text{min}^{-1}$	0.030 $\pm$ 0.003
$\text{AUC}/ \mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$	$(1.74 \pm 0.21) \times 10^4$
$\text{CL}/ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.020 $\pm$ 0.005

**Table 2 Pharmacokinetic parameters of *m* Nif in Beagle dog after ig administration of *m* Nif at different doses (  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$  )**

Parameter	Dose/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$		
	1.152	3.456	10.370
$T_{1/2}(K_e)$ / min	147 $\pm$ 21	122 $\pm$ 25	144 $\pm$ 32
$C_{\text{max}}$ / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	20 $\pm$ 5	36 $\pm$ 6	69 $\pm$ 5
$\text{AUC}/\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1} (\times 10^3)$	4.60 $\pm$ 0.12	8.62 $\pm$ 0.21	18.8 $\pm$ 0.5

## 讨论

选择血浆中 *m* Nif 的提取方法时,分别比较了乙酸乙酯、正丁醇、甲基叔丁醚、环己烷等,结果因用环己烷和正丁醇提取,所得提取液不易挥干;用乙酸乙酯和甲基叔丁醚提取,提取溶剂中杂质太多,干扰样品的测定。二氢吡啶类药物在 237 nm 和 350 nm 存在双吸收现象,并且在 237 nm 为强吸收,在本实验条件下,237 nm 处的吸收几乎为 350 nm 处的 4 倍,但血浆内源性物质对测定有明显干扰,且在 350 nm 处检测不到样品信号时在 237 nm 也同时测不到,所以选择 350 nm 测定。

用正交设计方法对血浆中 *m* Nif 的提取方法和色谱条件进行优化,结果发现影响因素的顺序为:流动相比 > 碱化液用量 > 缓冲液浓度 > 缓冲液 pH 值 > 乙醚提取次数。血浆最佳处理方法为用乙醚提取 4 次,但考虑到乙醚提取次数是次要因素(4 次与 2 次的指标分差值为 2.07,而 4 次与 1 次指标分的极差值为 11.50),对结果的影响很小,而且 4 次提取要加大成本和时间,所以选择用乙醚提取 2 次。

本文建立的测定血浆中 *m* Nif 的 RP-HPLC 方法,经回收率、精密度及标准曲线考察,表明此分析方法具有灵敏、准确、迅速的特点。由于二氢吡啶类药物不稳定,反复冻融有可能对样品和内标产生影

响,所以本文在制备血样时,均为新鲜血样。

Beagle 犬静脉给予 *m* Nif 后,在体内代谢过程符合二室模型,消除半衰期为 117 min,表明 *m* Nif 在 Beagle 体内消除迅速。不同剂量 ig 给药后,*m* Nif 在 Beagle 犬体内代谢过程符合单室模型,平均消除半衰期为 148 min,与静脉给药结果(117 min)相近,符合药物代谢规律。随着 ig 剂量的增加, $C_{\text{max}}$  和 AUC 存在明显剂量依赖性,但  $C_{\text{max}}$  和 AUC 增加的比例与剂量增加的比例不一致,尤其在高浓度(10.37  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )更为明显,说明在 1.152 ~ 10.37  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量范围内,*m* Nif 在 Beagle 犬体内的代谢存在非线性动力学过程。本实验中口服 *m* Nif 的平均绝对生物利用度为 4.6%,表明口服 *m* Nif 的生物利用度较低。

## References:

- [1] Mei QB, Shang P, Zhao DH, *et al.* Comparison of photosensitivity of five dihydropyridines [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1998, **33**(5): 291 - 294.
- [2] Gu HB, Tang YH, Xu Y. Inhibitory effects of *m* nifedipine on angiotensin II stimulated proliferation and protein synthesis in cultured rabbit aortic smooth muscle cells [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1996, **31**(10): 732 - 736.
- [3] Li QP, Rao MR. Effects of nifedipine and menidipine on cardiac function and  $\beta$ -adrenoceptor density in ischemic icreperfused rat hearts after metoprolol withdrawal [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1998, **12**(2): 113 - 116.
- [4] Liang YB, Ma XY, Wu GJ, *et al.* Determination of *m* nifedipine and its pharmacokinetic study in rabbits by high-pressure liquid chromatography [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1992, **13**(2): 163 - 166.
- [5] Ma J, Xie JW, Jia ZP, *et al.* Pharmacokinetics of *m* nifedipine in rabbit after intravenous injection [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1996, **17**(2): 109 - 111.