

RP-HPLC 法测定家兔血浆中甲苯唑派浓度和药代动力学参数

谢晓燕* 程务本 周智善 秦芝玲

(上海医科大学药学院, 上海 200032)

提要 本文建立了以紫外 230 nm 波长检测的反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定家兔血浆中甲苯唑派浓度。填料使用 LiChrosorb RP-C18, 流动相为甲醇-水-三乙胺-磷酸(63:37:1:0.8 v/v), 血样(或尿样)经碱化后用乙醚提取, 再以 0.2 mol/L 硫酸回提, 进样。方法回收率为 99.84 ± 3.10 (SD)%; 天内、天间精密度平均 CV 为 4.12% 及 3.95% (n=5); 最低检测限 3 ng, 经提取的标准线性浓度在 25 ~ 2000 ng/ml 范围内, $Y=0.002865X-0.01346$, $r=0.9999$, 内源性物质及可能的合并用药不干扰色谱测定。文内用质谱法鉴定血样中甲苯唑派色谱峰纯度, 并由尿样分析对其主要代谢物予以初步验证。本法可应用于药代动力学参数测定。家兔按 8 mg/kg 静注后, 药-时曲线符合二室模型 $T_{1/2}=4.8008 \pm 1.1522$ (SD) h。

关键词 甲苯唑派; 反相高效液相色谱法; 药代动力学

甲苯唑派 [盐酸 1-(对-甲苯基)-2-(2-哌啶乙酰基)-1,2,3,4-四氢异喹啉] 代号 70026, 为国内首先合成的 1,2-二取代四氢异喹啉衍生物⁽¹⁾。药理研究结果表明甲苯唑派对多种实验性心律失常模型均有明显的拮抗作用, 和广谱抗心律失常效果。鉴于甲苯唑派有可能成为一个有前途的抗心律失常新药, 本文研究了体液中甲苯唑派浓度的检测及其药代动力学参数。方法符合专一、灵敏、准确和精密的要求。为甲苯唑派进一步应用于临床提供了分离分析方法。

实验部分

一. 仪器与试剂

(一) 仪器 Bio-Rad 高效液相色谱仪; 1330 输液泵, 1306 型紫外可变波长检测器; CDMC-1 型色谱数据处理机(上海计算机技术研究所); LM14-204 自动平衡记录仪(上海大华仪表厂)。

(二) 试剂 甲醇、三乙胺、乙醚均为 AR 级并经重新蒸馏; 磷酸(优级纯)、蒸馏水(三次蒸馏); 氨-氯化铵缓冲液(pH 9.5)系 0.1 mol/L 氯化铵溶液与 0.1 mol/L 氨水按 1:1 体积混合。对照品甲苯唑派 mp 230 ~ 231.5 °C; 内标物 1-(对-甲氧苯基)-2-(2-哌啶乙酰基)-1,2,3,4-四氢异喹啉, mp 124.5 ~ 125.5 °C, 水解产物 1-(对-甲苯基)-1,2,3,4-四氢异喹啉, mp 74 ~ 75 °C; 均由上海医科大学药化教研室提供。

本文于 1990 年 3 月 6 日收到。

* 1989 届硕士研究生

甲苯喹啉及内标物的甲醇溶液分别配成 0.05 mg/ml 及 0.03 mg/ml 备用。

二. 分离分析步骤

(一) 血浆样品的预处理 吸取含甲苯喹啉血浆 1 ml 置 10 ml 具塞试管中, 加内标溶液 (0.03 mg/ml) 8 μ l 与氨—氯化铵缓冲液 (pH 9.5) 0.5 ml 混匀后, 用乙醚 (4 ml, 3 ml) 二次提取, 合并乙醚提取液于尖底试管中, 氮气流下浓缩至约 1 ml, 加 0.2 mol/L 硫酸液 50 μ l 离心, 吸取硫酸液 20 μ l 进行色谱测定。

(二) 色谱条件 色谱柱: LiChrosorb RP-C18 5 μ m (E. Merck) 15 cm \times 4.6 mm ID; 流动相: 甲醇—水—三乙胺—磷酸 (63:37:1:0.8 v/v), 流速 1 ml/min; 检测波长 230 nm; 灵敏度 0.04 AUFS; 记录纸速 2 mm/min; 室温。

在选定的色谱条件下, 甲苯喹啉和内标的保留时间分别为 10.88 和 7.88 min, 色谱图如图 1。

甲苯喹啉浓度用色谱数据处理机测量峰面积, 以内标法计算。

三. 实验结果

(一) 线性范围 精密吸取甲苯喹啉标准溶液 (0.05 mg/ml) 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 和 40 μ l, 分别置于 10 ml 具塞试管中, 各加入内标溶液 (0.03 mg/ml) 8 μ l。氨—氯化铵缓冲液 (pH 9.5) 0.5 ml 及空白血浆 1 ml, 按上述预处理步骤提取后, 进样测定峰面积 (A), 以 $A_{\text{标}}/A_{\text{内}}$ 为 Y 值、血浆浓度 (0.025 ~ 2.000 μ g/ml) 为 X 值作线性回归, $Y = 2.865 \times 10^{-3}X - 0.01346$; $r = 0.9999$ ($n = 5$), 线性关系良好。

(二) 提取回收率 吸取甲苯喹啉标准溶液 (0.05 mg/ml) 1.0, 5.0, 20 μ l (50, 250, 1000 ng), 各与空白血浆 1 ml 混合, 加氨—氯化铵缓冲液 (pH 9.5) 0.5 ml, 用乙醚 (4 ml, 3 ml) 二次提取, 提取液用氮气流浓缩至约 1 ml, 加内标溶液 (0.03 mg/ml) 8 μ l 及 0.2 mol/L 硫酸液 50 μ l, 混匀后离心, 吸取硫酸液 20 μ l 进样测定。另取甲苯喹啉标准液 10 μ l 二份, 各与乙醚 1 ml, 0.2 mol/L 硫酸 50 μ l 及内标液 8 μ l 混匀后离心, 吸取硫酸液 20 μ l 进样, 测定校正因子。

每一浓度做 5 管, 测得浓度为 50, 250, 1000 ng/ml 血浆的提取回收率分别为 84.79, 93.37, 93.70%, CV (%) 分别为 7.68, 1.84, 4.43。提取回收率的平均值为 90.62 ± 5.05 (SD)%。

(三) 方法回收率 吸取甲苯喹啉标准溶液 3 份, 浓度同提取回收率, 各与空白血浆 1 ml、内标溶液 8 μ l 及氨—氯化铵缓冲液 (pH 9.5) 0.5 ml 混匀, 提取后测定。

每一浓度做 5 管, 测得浓度为 50, 250, 1000 ng/ml 血浆的方法回收率分别为 98.88, 97.32, 103.31%, 其 CV (%) 分别为 2.14, 3.26, 2.62。方法回收率的平均值为 99.84 ± 3.10 (SD)%。

(四) 精密度的测定 甲苯喹啉浓度为 50, 250, 1000 ng/ml 的血浆, 测得天内和日间精密度的结果如表 1。

(五) 检测限 当甲苯喹啉标准液 (0.5 mg/ml) 进样量为 6 μ l 时, 色谱峰峰高为基线噪音的两倍, 其最小检测限为 3 ng; 最低检测浓度为 120 ng/ml 血浆。

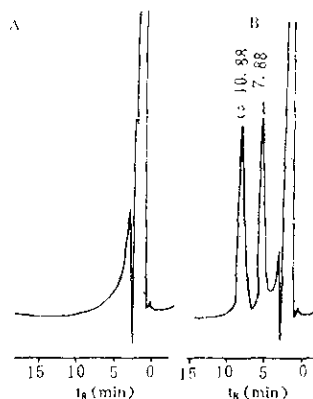


Fig 1. HPLC chromatograms. A. Blank rabbit plasma; B. Extracted plasma sample. 1. IS; 2. 1-(p-Methylphenyl)-2-(2-piperidinoacetyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline hydrochloride (70026).

Tab 1. Precision of the method

	Added (ng/ml)	Found (ng/ml) ($\bar{x} \pm SD; n=5$)	Recovery (%)	CV (%)
Within - day	50	45.77 \pm 3.33	91.54	6.67
	250	243.31 \pm 7.48	97.52	2.99
	1000	1033.19 \pm 27.10	103.32	2.71
Between - day	50	48.84 \pm 2.68	97.68	5.35
	250	240.01 \pm 6.58	96.00	2.63
	1000	1025.20 \pm 38.83	102.52	3.88

(六) 专一性 收集给家兔静注甲苯咪唑后血浆样品的色谱峰洗脱液, 减压蒸干, 碱化后用乙醚提取, 提取液挥干, 取残渣作质谱分析。收集组分的质谱图与甲苯咪唑对照品质谱图比较, 两者的分子离子峰、高丰度碎片离子峰均一致。由此确定, 收集的组分确属甲苯咪唑的色谱峰。甲苯咪唑可能的合并用药如抗心律失常药奎尼丁、普萘洛尔或美西律, 降血脂药氯贝丁脂, 利尿药氢氯噻嗪等, 在选定的色谱条件下, 经实验表明, 各药物均不干扰甲苯咪唑的测定。

四. 方法应用

(一) 家兔静注甲苯咪唑后血浓度及其药代动力学参数测定

取健康家兔六只(体重约 2 kg, 雌雄兼有), 按 8 mg/kg 剂量耳静脉注射甲苯咪唑, 定时股动脉取血 2.5 ml, 离心后吸取血浆 1 ml, 加入内标溶液(0.03 mg/ml) 8 μ l, 按本法预处理后进行色谱测定。以血药浓度(ng/ml)的对数 Log C 与给药后时间绘制药-时曲线(图 2)。

由图 2 可知甲苯咪唑在家兔体内的药代动力学过程符合开放型两室模型。本文采用南京军区总医院 PKBP-NI 程序处理血药浓度数据, 推算药代动力学各参数(表 4)。

由表 2 的分布相半衰期 $T_{1/2} = 0.5780$ h, 说明甲苯咪唑在兔体内较快达到分布平衡; 消除相半衰期 $T_{1/2} = 4.8008$ h 则属于中等消除速度。

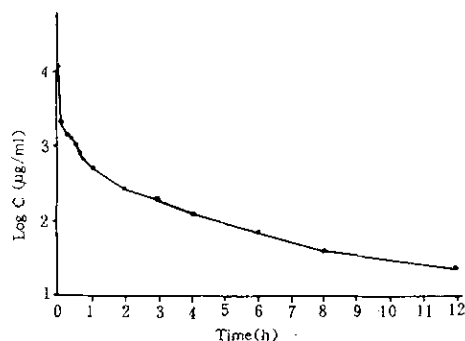


Fig 2. Logarithm of 70026 plasma level versus time curve for No. 1 rabbit after intravenous administration of 8 mg per kg body weight

Tab 2. Average and variance of pharmacokinetic parameters for six rabbits after intravenous administration at 8 mg per kg body weight

No.	1	2	3	4	5	6	$\bar{x} \pm SD$
A (μ g/ml)	2019.2	1012.4	1466.2	1337.2	1152.8	1726.7	1542.4 \pm 372.39
(h^{-1})	1.9984	1.1765	1.2225	1.1243	0.8614	1.2748	1.2763 \pm 0.3820
$T_{1/2}$	0.3469	0.5891	0.5670	0.6165	0.8046	0.5437	0.5780 \pm 0.1467
B (μ g/ml)	345.28	109.15	129.34	120.20	86.690	237.53	171.37 \pm 100.05
(h^{-1})	0.2419	0.1154	0.1378	0.1225	0.1341	0.1699	0.1536 \pm 0.0471
$T_{1/2}$ (h)	2.8656	6.0058	5.0296	5.6582	5.1663	4.0795	4.8008 \pm 1.1522
K_{21}	0.4984	0.2187	0.2257	0.2051	0.1850	0.3035	0.2727 \pm 0.1177
K_{12}	0.7720	0.4523	0.3883	0.3702	0.1859	0.4276	0.4327 \pm 0.1920
K_{10}	0.9699	0.6210	0.7464	0.6714	0.6246	0.7136	0.7245 \pm 0.1299
VC	3.3833	7.1324	5.0138	5.4892	6.4542	4.0727	5.2576 \pm 1.4126

(二)毒性反应与血药浓度 家兔静注甲苯唑啉 8 mg/kg 后, 出现颈部, 四肢强直等一系列中毒反应症状。为研究毒性反应与血药浓度之间关系, 给药后记录颈部强直消失时间并采集血样进行分析。实验结果: 家兔在给药后 30 min 左右颈部强直症状消失。此时, 测得的最大有效血药浓度为 784.40 ± 122.76 ng/ml。

讨 论

本文新建立的分析方法准确、灵敏、简便。所用试剂及仪器常见且价廉、毒性低, 易于推广。

血浆样品用乙醚二次提取, 以 0.2 mol/L 硫酸 50 μ l 回提乙醚液, 平均提取率为 90.62%, 但回提时要小心操作。如果单用乙醚提取, 血浆中杂质干扰甲苯唑啉的测定。

甲苯唑啉的最大吸收波长在 213 nm, 为短波长吸收, 给分析带来极大困难。在短波长下, 流动相的高本底吸收及杂质吸收使基线不稳, 同时还出现倒峰和怪峰现象。实验表明, 于 220 nm 用甲醇或蒸馏水进样, 均在 5 min 后出现一个怪峰, 该峰时大时小, 与进样量无关; 有时还出现倒峰, 严重干扰测定。若将检测波长稳定 230 nm, 可解决此麻烦。这时, 基线稳定, 怪峰变小, 倒峰消失。虽甲苯唑啉吸收度降至原来的 65%, 但 Bio-Rad HPLC-UV 检测器取 0.04 AUFS 时, 仍可测得 ng 级水平。因此, 本法选取波长为 230 nm。

关于甲苯唑啉的代谢产物, 有待今后进一步研究。

参 考 文 献

1. 周智善, 等. 1, 2-二取代四氢异唑啉衍生物的合成及其抗心律失常作用. 上海医科大学学报 1987; 14: 15.
2. Beckett AH, et al. The metabolism and excretion of lignocaine in man. *J Pharm Pharmacol (Suppl)* 1966; 18: 76.
3. Bari K, et al. HPLC of apidine and its active decethyl metabolite in plasma. *J Chromatogr* 1983; 278: 228.
4. Felicity R. Metabolism and excretion of bupivacaine in man. *Brit J Anaesth* 1971; 43: 37.
5. Tomas J, et al. Neutral metabolites of mepivacaine in human. *Xenobiotica* 1973; 3: 191.

RP-HPLC DETERMINATION OF 1-(P-METHYLPHENYL)-2-(2-PIPERIDINOACETYL-1, 2, 3, 4-TETRAHYDROISOQUINOLINE HYDROCHLORIDE IN RABBIT PLASMA AND ITS PHARMACOKINETIC PARAMETERS

XY Xie*, WB Cheng, ZS Zhou and ZL Qin

(School of Pharmacy, Shanghai Medical University, Shanghai 200032)

ABSTRACT A reversed phase high performance liquid chromatographic method (RP-HPLC) was developed for the determination of rabbit plasma levels of 1-(p-

methylphenyl-2-(2-piperidinoacetyl)-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline hydrochloride (70026), a new antiarrhythmic agent with promising prospects. Its pharmacokinetic parameters were obtained from the rabbit plasma level-time curve measured.

70026 plasma sample was determined by extracting with ether and 0.2 mol/L sulfuric acid, chromatographing on LiChrosorb RP-C18 column, and detecting at 230 nm. The mobile phase selected was methanol-water-triethylamine-phosphoric acid (63:37:1:0.8 v/v). The average recovery of the entire procedure from plasma was 99.94 ± 3.10 (SD)%; the average CV of within-day and between-day were 4.12% and 3.95% respectively; the minimum detection limit was 3 ng; 70026 plasma concentration ranging from 25 ~ 2000 ng/ml yielded a good linear relationship with the peak area ratios, $Y = 0.002865X - 0.01346$, $r = 0.9999$. No endogeneous interference was found in chromatograms of plasma sample.

The purity of chromatographic peak of 70026 was identified and proved by mass spectrometry. In urine sample, the hydrolysate of 70026 was found as the original and bound forms.

The rabbit plasma level of 70026 after intravenous administration versus time curve was found to be in correspondence with two-compartment model, $T_{1/2} = 4.80 + 1.522$ (h).

Key words 1-(p-methylphenyl-2-(2-piperidinoacetyl)-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline hydrochloride; RP-HPLC; Pharmacokinetics

欢 迎 订 阅

《科技发展与管理》杂志

《科技发展与管理》是国家科委领导下的全国第一家大型综合性科技月刊。主要宣传科技战略和发展趋势。发布重要文件、政策、法规,及时报道国内外最新科技成果和动态,开展技术成果推广、专利及技术转让、需求信息发布等多种服务。是读者跟踪科技发展、拓展知识视野、进行信息交流的重要窗口。本刊时代感强、信息量大、文风清新、形式活泼。欢迎各界朋友订阅。《科技发展与管理》杂志为16开、64页月刊。国内外公开发行,每期定价1.60元。全年订费19.20元。全国各地邮局均可办理订阅手续。订阅代号:82-404。如读者在当地邮局未订到本刊,也可直接向杂志社邮购。订费采用邮汇、银行信汇均可。

邮汇地址:北京2837信箱。邮政编码:100044。

联系人:何京

银行信汇:北京工商银行紫竹院分理处 帐号:892181-93

电 话:842 1113 转 3095

842 2852 842 2851