

尼卡地平血药浓度测定及其人体药代动力学

陈 汇^{1*}, 吴文中², 张庆华², 顾世芬¹, 肖 宙¹, 曾繁典¹

(1. 同济医科大学临床药理研究所, 湖北 武汉 430030; 2. 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

摘要: 目的 建立入血浆中尼卡地平(Nic)浓度测定的毛细管柱气相色谱法, 并以此法研究健康受试者 *po* Nic 缓释胶囊后的药代动力学。方法 样品经甲苯提取, 过无水硫酸钠小柱后, 用 HP-1 25 m × 0.32 mm ID 毛细管柱分离, 采用无分流进样方式, 以巴尼地平作为内标, ⁶³Ni 电子捕获检测器检测。结果 该法在 0.5 ~ 100 ng·mL⁻¹ 浓度范围内呈线性关系, 最低定量浓度为 0.5 ng·mL⁻¹, 日内、日间 RSD 分别小于 4% 和 7%, 低、中、高浓度(0.5, 10, 50 ng·mL⁻¹) 的平均回收率分别为 86.0%, 95.7% 和 91.2%。用此法测定了 12 名健康受试者单剂量及多剂量 *po* Nic 缓释胶囊后的血药浓度经时变化过程。结论 此法提取率高, 重现性好, 操作简便, 检测灵敏度高, 适用于临床药代动力学研究及血药浓度监测。

关键词: 尼卡地平; 气相色谱法; 药代动力学

中图分类号: R97; R969.1; R972.4

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2000)08 - 0592 - 04

尼卡地平(nicardipine, Nic)为二氢吡啶类钙拮抗剂, 有较强的冠状动脉和全身血管扩张作用, 临床主要用于治疗高血压和心绞痛, 尤其适用于高血压合并冠心病的患者^[1], 但 Nic 血药浓度较低, 为进行药代动力学研究, 指导临床合理用药, 必须建立灵敏且简便的药物体内分析方法。

Nic 体内测定方法有分流进样毛细管柱气相色谱法(GC)^[2], 高效液相色谱法(HPLC)^[3,4] 和气相色谱-质谱联用(GC-MS)^[5] 等方法。已报道的 GC 或 HPLC 法, 样品提取步骤繁琐、费时, 且灵敏度较低, 不能达到血药浓度测定的要求。近年来发展的 GC-MS 方法虽检测灵敏度较高, 但操作复杂, 不经济, 不适于大量生物样品的分析。本研究简化提取步骤, 并采用无分流毛细管柱气相色谱法测定人血浆中 Nic 浓度, 提高了检测灵敏度, 最低检测浓度达 0.5 ng·mL⁻¹, 可满足 Nic 缓释制剂药代动力学研究及血药浓度监测的需要。

材 料 与 方 法

仪器、试剂和药品 HP 5890 A 气相色谱仪, ⁶³Ni 电子捕获检测器, HP 3396 B 积分仪。甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。无水硫酸钠、甲苯(德

国 Promchem GmbH 公司), 碳酸氢钠(南京化学试剂公司); 盐酸 Nic, 盐酸巴尼地平(内标)标准品(日本山之内制药株式会社); 盐酸 Nic 缓释胶囊试验药(沈阳山之内制药有限公司, 批号 960118), 每粒含量 40 mg; 盐酸 Nic 缓释胶囊对照药(日本山之内制药有限公司, 批号 960201 A), 每粒含量 40 mg。实验用超纯水以日本 Millipore 公司纯水器制备。

标准溶液 准确称取 Nic 标准品 10 mg, 内标 10 mg, 分别置于 10 mL 和 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 分别配制 Nic 1.0 mg·mL⁻¹ 和内标 200 μg·mL⁻¹ 的贮备液。然后用甲醇分别稀释成一定浓度的标准溶液。

样品制备 取肝素抗凝血浆 1 mL, 加入内标溶液 50 μL (2 μg·mL⁻¹), 饱和碳酸氢钠溶液 100 μL 和甲苯 2 mL, 震荡 30 min, 离心 10 min (3 000 r·min⁻¹)。收集有机相, 过无水硫酸钠小柱, 室温下氮气吹干, 用 100 μL 甲苯定容后进样 2 μL。

色谱条件 毛细管柱为 HP-1, 25 m × 0.32 mm ID, 液膜厚 0.1 μm。载气: 氦气, 柱头压: 115.2 kPa, 检测器尾吹: 50 mL·min⁻¹。温度设置: 进样口 280 °C, 检测器 310 °C, 柱温 300 °C。进样方式: 无分流进样, 吹扫时间为 1.5 min。

药代动力学研究方案 受试者: 12 名健康男性志愿者, 年龄 (21.3 ± 1.2) 岁, 身高 (167 ± 5.3) cm, 体重 (61.3 ± 4.8) kg。受试者试验前两周至试验期间未服用任何其他药物。经全面体检, 血、尿常规,

血生化检查均在正常值范围;血压及心电图检查均正常。

给药方法及血样采集:受试者随机分组,进行自身对照交叉试验。于清晨 7:30 单剂量空腹 *po* 盐酸 Nic 缓释胶囊试验药或盐酸 Nic 缓释胶囊对照药 1 粒(40 mg),服药前(0 h)及服药后不同时间肘静脉采血各 5 mL。上述受试者于单剂量试验的次日开始,每天 7:30 和 19:30 各服 1 粒(40 mg),连续服药 7 d, d 3~6 每晚服药前采血 5 mL,测谷浓度值。d 7 清晨服药前和服药后 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24 和 36 h 各采血 5 mL。血样置肝素化真空管, 4℃离心分离血浆,并于 -20℃以下贮存待测。停药清洗期为 14 d。

数据处理:采用南京医科大学编制的药代动力学软件,计算单剂量及多剂量给药的药动学参数。单剂量试验的达峰时间(T_{max})和峰浓度(C_{max})为实测值,多剂量试验的稳态峰浓度[$C_{ss(max)}$]和稳态谷浓度[$C_{ss(min)}$]为末次给药前后血药浓度实测值,平均稳态浓度(C_{ss})按 AUC_t/τ 计算,波动系数 $FI = C_{ss(max)} - C_{ss(min)} / C_{ss}$ 。

结 果

1 色谱行为

该法测得 Nic 与内标保留时间分别为 11.0~11.5 min 和 15.2~15.7 min。测试几种相关药物(尼莫地平、地尔硫革、维拉帕米、普萘洛尔、美托洛尔)对本测定系统均无干扰,血浆中杂质及内源性物质对测定无干扰。Nic 峰与内标峰分离度 R_s 为 2.2。色谱图见图 1。

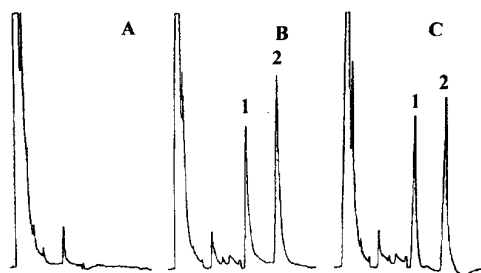


Fig 1 Chromatograms of nicardipine in human plasma by GC

A. Blank plasma; B. Blank plasma spiked with nicardipine and internal standard (barnidipine); C. Plasma sample after oral administration of nicardipine. 1. Nicardipine; 2. Internal standard

2 血浆标准曲线

于空白血浆中准确加入不同量的盐酸 Nic 标准溶液及内标 100 ng,按样品制备项下操作,分别制作低浓度(0.5~10 ng·mL⁻¹)及高浓度(10~100 ng·mL⁻¹)标准曲线,以药物浓度(C)对峰高比(R)进行直线回归,回归方程 1(0.5~10 ng·mL⁻¹): $R = -0.002635 + 0.01298 C, r = 0.997$;回归方程 2(10~100 ng·mL⁻¹): $R = -0.01474 + 0.01477 C, r = 0.999$ 。最低定量浓度为 0.5 ng·mL⁻¹。

3 回收率及精密度试验

按上述标准曲线方法配制浓度为 0.5, 10, 50 ng·mL⁻¹的 Nic 血浆样品,另加入内标 100 ng,按样品制备项下操作;同时用超纯水分别加入 Nic 和内标,同法操作,计算药物在血浆中的回收率。精密度试验方法同上,分别于同日内测定及连续不同日测定其日内及日间 RSD,结果见表 1。

Tab 1 Recovery and precision of nicardipine from human plasma by GC-ECD ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Added/ ng·mL ⁻¹	Determined/ ng·mL ⁻¹	Recovery/ %	RSD/ %	
			Within day	Between day
0.5	0.43 ± 0.02	86.0	3.60	3.85
10	9.57 ± 0.39	95.7	3.82	6.30
50	45.60 ± 2.53	91.2	2.98	4.24

4 药代动力学研究

12 名受试者单剂量 *po* 两种 Nic 缓释胶囊 40 mg 及多剂量 *po*(40 mg, bid × 7 d) 给药达稳态的平均血药浓度-时间曲线见图 2,计算主要药代动力学

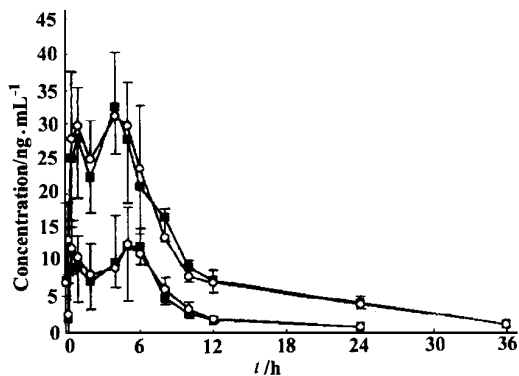


Fig 2 Profile of mean concentrations versus time after a single (40 mg, the lower curves) and multiple (40 mg bid × 7 d, the upper curves) oral doses of sustained release capsules of nicardipine in 12 healthy volunteers ($\bar{x} \pm s$)

■—■ Test nicardipine; ○—○ Reference nicardipine

参数见表 2。结果表明, p_o 两种缓释胶囊在人体内的血药浓度经时变化过程基本一致, 单剂量空腹 p_o 给药后吸收迅速, 约 0.5 ~ 1 h 血药浓度达第 1 峰, 其后血药浓度有所降低, 4 ~ 6 h 血药浓度-时间曲线出现第 2 峰, 且浓度略高于第 1 峰, 呈现缓释双峰曲线特征。给药 6 h 后血药浓度缓慢下降, 末端相消除半衰期约 5.5 h。多剂量给药谷浓度测定表明, 服药 d 4 开始, 血药浓度已达稳态, 故服药 7 d 的血药浓度测定结果在稳态浓度范围。

Tab 2 Pharmacokinetic parameters after a single (40 mg) and multiple (40 mg bid × 7 d) oral doses of sustained release capsules of nicardipine in 12 healthy volunteers ($\bar{x} \pm s$)

Parameter	Test nicardipine	Reference nicardipine
Single dose		
$T_{max 1}/h$	0.79 ± 0.45	0.67 ± 0.25
$T_{max 2}/h$	5.08 ± 0.79	5.33 ± 0.65
$C_{max 1}/ng \cdot mL^{-1}$	14.2 ± 8.2	14.5 ± 2.6
$C_{max 2}/ng \cdot mL^{-1}$	16.9 ± 5.8	16.0 ± 7.0
$T_{1/2ke}/h$	5.49 ± 2.53	5.61 ± 2.98
MRT/h	7.74 ± 2.36	7.84 ± 2.11
$AUC_{0-24}/ng \cdot h \cdot mL^{-1}$	97.9 ± 24.8	101.4 ± 30.7
Multiple dose		
$C_{ss(max)}/ng \cdot mL^{-1}$	36.9 ± 6.1	37.9 ± 5.4
$C_{ss(min)}/ng \cdot mL^{-1}$	7.3 ± 1.6	7.0 ± 1.8
$C_{ss}/ng \cdot mL^{-1}$	19.1 ± 3.2	19.8 ± 3.4
FI	1.56 ± 0.26	1.58 ± 0.15
$AUC_{ss(0-36)}/ng \cdot h \cdot mL^{-1}$	341.4 ± 48.5	347.6 ± 65.1

讨 论

本文选用 Nic 结构类似物巴尼地平作为内标, 二者色谱行为一致, 药物峰、内标峰及血浆中内源性杂质峰均得到良好的分离, 且分析周期较短, 定量准确。按照文献^[2]提取方法, 将样品碱化后用有机溶剂作两次提取, 中间尚需用盐酸回提, 方可除去样品中杂质的干扰。本文采取血样碱化后甲苯一次提取, 再过无水硫酸钠小柱, 此法提取物既无杂质干扰, 易于分离, 提取率亦高, 并简化了操作程序, 适用于体内药物浓度测定及药代动力学研究, 尤其是临床样品分析。

Nic 缓释制剂按常规临床用药量, 血浆药物浓

度较低, 因此需要灵敏度较高的测试方法。本文采用无分流进样法测定, 此法利用了溶剂效应和热聚焦原理使样品组分在柱的入口端再浓集^[6], 故提高了检测灵敏度, 血浆中最低定量浓度达 0.5 $ng \cdot mL^{-1}$, 可满足血药浓度测定的要求。

12 名健康志愿者单剂量与多剂量空腹 p_o 试验与对照 Nic 缓释胶囊的药代动力学研究表明, 两种缓释胶囊体内过程基本一致。单剂量及多剂量给药达稳态的经时血药浓度曲线均呈双峰, 该曲线变化与其 1:3 速释与缓释, 即胃溶与肠溶两种成分构成的药剂学特征吻合。若餐后服药, 可因食物影响速释部分吸收, 将形成缓释单峰曲线, 从而减少药物吸收量^[7]。本试验研究结果与文献报道^[8]基本一致。

REFERENCES:

- [1] Jin MW, Fang DC. Calcium channel blockers [A]. Chen X, Chen WZ, Zeng GY. *Cardiovascular Pharmacology* [M]. Second Edition. Beijing: People's Health Press, 1997. 213 - 238.
- [2] Anne TW, Jan JM, Stanley K. Capillary column gas chromatographic method using electron-capture detection for the simultaneous determination of nicardipine and its pyridine metabolite II in plasma [J]. *J Chromatogr*, 1987, **415**(1): 65 - 73.
- [3] Kobayashi SI. Simple method for the determination of nicardipine in plasma using high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr*, 1987, **420**(2): 439 - 444.
- [4] Eastwood RJ, Galustian C, Bhamra RK, et al. High-performance liquid chromatographic method for the measurement of nicardipine in plasma or serum [J]. *J Chromatogr*, 1990, **530**(2): 463 - 468.
- [5] Tokuma Y, Fujiwara T, Noguca H. Combined capillary column gas chromatography/electron capture negative ion chemical ionization mass spectrometry of dihydropyridine calcium antagonists [J]. *Bio-med Environmen Mass Spectrom*, 1986, **13**(1): 251 - 255.
- [6] An DK. *Pharmaceutical Analysis* [M]. Jinan: Jinan Press, 1992. 327 - 332.
- [7] Buice RG, Subramanian V, Lane E. Bioequivalence of two orally administered nicardipine products [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 1996, **17**(6): 471 - 480.
- [8] Inotsume N, Iwaoka T, Honda M, et al. Pharmacokinetics of nicardipine enantiomers in healthy young volunteers [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 1997, **52**(4): 289 - 292.

DETERMINATION OF NICARDIPINE IN PLASMA BY GC-ECD AND STUDY ON ITS PHARMACOKINETICS IN HEALTHY VOLUNTEERS

CHEN Hui¹, WU Wen-zhong², ZHANG Qing-hua², GU Shi-fen¹, XIAO Zhou¹, ZENG Fan-dian¹

(1. Institute of Clinical Pharmacology, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China;

2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

ABSTRACT: **AIM** A gas chromatographic method was developed for the determination of nicardipine in human plasma and its pharmacokinetics in healthy volunteers. **METHODS** Nicardipine in plasma was extracted with toluene and barnidipine was used as internal standard. Chromatography was performed on a 25 m × 0.32 mm ID fused-silica capillary column by splitless injection with an electron-capture detector. **RESULTS** The calibration curve was linear in the range of 0.5 ~ 100 ng•mL⁻¹, the minimal detectable concentration in plasma was 0.5 ng•mL⁻¹. The precisions (RSD) of within-day and between-days were less than 4% and 7% respectively. The extraction recoveries for the concentrations of 0.5, 10 and 50 ng•mL⁻¹ were 86.0%, 95.7% and 91.2%, respectively. The plasma concentration-time curves and the pharmacokinetic characteristics of nicardipine sustained release capsules after a single and multiple oral doses in 12 healthy volunteers were studied by the GC-ECD method. **CONCLUSION** The established method was shown to be sensitive, accurate and simple for the determination of nicardipine levels in human plasma. It is suitable for its pharmacokinetic study and therapeutic drug monitoring.

KEY WORDS: nicardipine; GC-ECD; pharmacokinetics