

手性和非手性联用色谱法研究尼卡地平对映异构体兔体内过程的差异性

王嗣岑, 贺浪冲*, 刘 飞

(西安交通大学药学院, 陕西 西安 710061)

摘要: 目的 研究尼卡地平(NCD)对映体在家兔体内药代动力学和组织分布的差异性。方法 生物样品在碱性条件下,正己烷-醋酸乙酯(1:1)提取,用手性和非手性联用色谱法进行分离分析。结果 尼卡地平及其对映体分别在反相色谱系统及手性色谱系统中分离良好,浓度为55-550 ng·mL⁻¹线性关系良好。对映体的平均日内、日间RSD分别为5.25%和8.97%,回收率分别为99.99%和97.10%;对映体间主要动力学参数 T_{max} , C_{max} 和 AUC , $S-NCD$ 为(2.49 ± 0.03) h, (134 ± 2) ng·mL⁻¹ 和(1082 ± 32) ng·mL⁻¹·h, $R-NCD$ 为(1.24 ± 0.05) h, (109 ± 2) ng·mL⁻¹ 和(778 ± 22) ng·mL⁻¹·h;在主要脏器和细胞中 $S-NCD$ 的浓度明显高于 $R-NCD$ 。药代动力学和靶组织分布均有一定差异性。结论 尼卡地平对映体兔体内过程包括代谢动力学和靶细胞浓度分布存在着立体差异性。

关键词: 尼卡地平; 对映体; 联用色谱; 手性拆分; 立体选择性

中图分类号: R917; TQ460.72 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2001)05-0364-04

二氢吡啶类(DHPs)钙拮抗剂是目前临床上应用最广泛的化学合成药物,主要用于治疗高血压、心绞痛等疾病。大多数DHPs钙拮抗剂含有手性中心,其对映体进入体内后均表现出不同的药理活性和毒性^[1,2]。而对映体的药代动力学,尤其是在重要效应器官和消除器官的浓度分布差异性,是造成对映体药物生物活性差异性的重要因素之一。迄今为止,用高效液相色谱法研究DHPs钙拮抗剂的立体选择性特性还主要集中在拆分方法学和药代动力学方面^[3,4],未见有对对映体在靶组织及细胞水平上浓度分布差异性的研究报道。

尼卡地平(nicardipine, NCD)属1,4-二氢吡啶类钙拮抗剂,有一对对映异构体。本文利用手性和非手性联用色谱法对尼卡地平对映体在家兔体内的药代动力学和靶组织中细胞间液、细胞膜及细胞内液的浓度分布进行了研究,以探讨其生物活性差异性的主要影响因素。

材 料 与 方 法

仪器 Shimadzu 10 Avp 型高效液相色谱系

统,配置SPD-10Avp型可调波长紫外检测器,LC-10ATvp型溶剂输送泵(日本Shimadzu),Anastar色谱工作站(天津);Herlme ZK401型高速冷冻离心机(德国Herlme);SK-1型快速混匀器(深圳);ASS105A型超声波清洗器(上海);GP5-2S空气压缩机(日本Shimadzu)。

材料 尼卡地平标准品(美国Sigma);NCD片(西北第二合成制药厂);肝素钠注射液(徐州万邦生化制药厂);分析纯正己烷、无水乙醇(西安化学试剂厂),用前重蒸;色谱纯甲醇(美国Fisher公司);水为三重蒸馏水,其余试剂均为分析纯;空白血浆本实验室自制。

健康大耳白兔(2.0 ± 0.2) kg;♀ ♂不限,由西安交通大学实验动物中心提供。

色谱系统 色谱条件 I: LiChrosorb C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(75:25);流速1.0 mL·min⁻¹;检测波长236 nm;室温。色谱条件 II: Chiralcel OJ 手性柱(250 mm × 4.6 mm, 10 μm)和 C₁₈ 预柱(15 mm × 4.6 mm, 10 μm);流动相为正己烷-无水乙醇(85:15);流速0.5 mL·min⁻¹;检测波长236 nm;室温。在色谱条件 II 下,NCD对映体得到基线分离,由文献^[5]可知第一峰为 S(-) NCD,第二峰为 R(+) NCD,且 R(+) NCD 和 S(-) NCD 的峰面积比为 0.98 ± 0.01 (n = 11)。

兔血浆和组织样品采集与处理 (1) 取家兔3只,禁食24 h,耳动脉插管。将NCD片研成细粉,混

收稿日期: 2000-10-04.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770856)。

作者简介: 王嗣岑,男,助教;

贺浪冲,男,教授,博士生导师。

* 通讯作者 Tel: (029)5275142, Fax: (029)5268351,

E-mail: superbo@pub.xaonline.com

悬于生理盐水中, ig $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。ig 前取空白血, ig 后 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 10, 12 和 24 h 耳动脉采血 2 mL, 肝素抗凝, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心制成血浆。取血浆 1.0 mL, 加 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液 0.2 mL, 混匀, 用正己烷-醋酸乙酯(1:1) 5 mL 提取, 取上层提取液 4.5 mL, 避光下空气吹干, 残渣加流动相 0.5 mL 溶解, $15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 上清液为供试液, 精密吸取 $50 \mu\text{L}$ 注入色谱系统, 在色谱条件 I 测定 NCD 总量, 记录色谱图。收集检测器后 NCD 色谱峰流份, 避光下立即将流份中的甲醇吹干, 用上述提取方法处理, 残渣用甲醇 $100 \mu\text{L}$ 溶解后, 精密吸取 $80 \mu\text{L}$ 注入手性色谱系统, 用色谱条件 II 拆分, 计算对映体峰面积比值, 并由 NCD 总量计算对映体的血浆浓度。(2) 另取家兔 3 只, 禁食 24 h, 同法 ig 后 4 h, 颈动脉放血处死, 迅速取出心脏、大脑、小脑和肾脏等组织置生理盐水中。用滤纸吸干后, 分别称各组织湿重, 加适量生理盐水匀浆, 量取 $1/4 - 1/3$ 体积用于脏器组织对映体的测定。其余匀浆液按文献方法^[6]置离心试管中, 4°C 离心 10 min ($2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 将上清液转移至一干净具塞试管中, 沉淀再加适量生理盐水, 涡旋震荡 3 min, 4°C 离心 10 min ($2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 合并上清液作为靶组织的细胞悬液。将细胞悬液置于具塞试管中, 4°C 离心 10 min ($10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 转移上清液, 沉淀用生理盐水洗涤、离心, 合并上清液作为细胞间液; 沉淀中加入适量低渗缓冲液, 超声 15 min 破碎细胞后, 4°C 离心 10 min ($18000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 转移上清液, 沉淀再加入适量低渗缓冲液, 重复上步操作, 合并上清液, 作为靶细胞内液; 沉淀作为靶细胞膜。将细胞间液、细胞内液及细胞膜同法提取, 分别制备成供试液, 分别在色谱条件 I 和 II 下测定 NCD 对映体在靶组织不同部分的浓度分布。

结 果

1 联用色谱系统适用性

NCD 消旋体在色谱条件 I 下的保留时间 (t_R) 为 11.53 min, 理论塔板数 (n) 为 2000。生物样品中杂质成分无干扰, 色谱图见图 1。收集经反相色谱分离后 NCD 色谱峰流出液, 提取制样后注入 OJ 手性色谱系统, 在色谱条件 II 下测定, 结果 S-NCD 与 R-NCD 得到基线分离, 保留时间分别为 21.03 和 24.21 min, 对映体间的分离度 (R_s) 为 1.43 (图 2)。

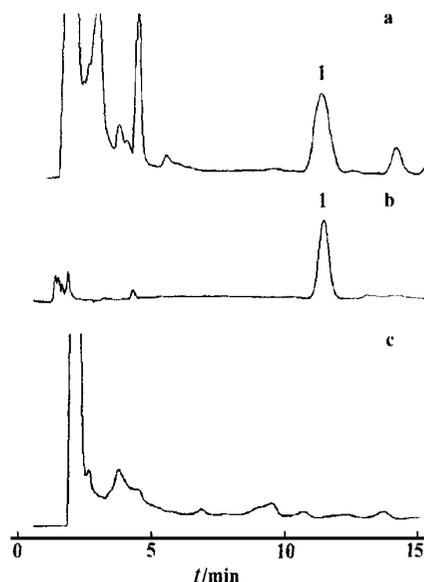


Fig 1 Typical chromatograms in reversed system a. Plasma sample from rabbit; b. Nicardipine; c. Drug-free plasma. 1. Peak of nicardipine. Reversed phase liquid chromatographic condition (I): C_{18} column, flow rate: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, mobile phase: methanol-water (75:25), and room temperature

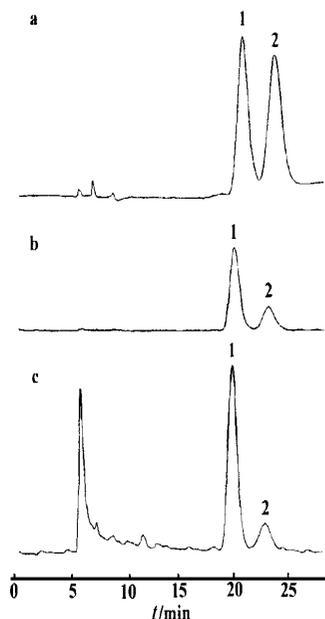


Fig 2 Typical chromatograms in chiral system a. (\pm)-Nicardipine; b. Plasma sample; c. Tissue sample. 1. S-Nicardipine; 2. R-Nicardipine. Chiral separation chromatographic condition (II): Chiralcel OJ column, flow rate: $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, mobile phase: n-hexane-ethanol (85:15), and room temperature

2 线性范围

取不同量的 NCD 消旋体标准品加入到 1.0 mL

空白血浆中,制备成浓度 110 - 1 100 ng•mL⁻¹的系列标准溶液,按“样品采集与处理”项下操作、测定。结果 NCD 消旋体和对映体的色谱峰面积(*A*)与其进样量(*m*, ng)呈良好的线性关系,线性回归方程分别为:

NCD 消旋体: $A = 802 m - 369 \quad \gamma = 0.9981 (n = 3)$

S- NCD: $A = 404 m - 178 \quad \gamma = 0.9967 (n = 3)$

R- NCD: $A = 394 m - 192 \quad \gamma = 0.9957 (n = 3)$

当信噪比(S/ N)大于 3 时,测定对映体的最低检测限为 11 ng。

3 精密度和准确度

取 NCD 浓度为 110, 220 和 440 ng•mL⁻¹的血浆样品,按“样品采集与处理”项下操作,分析,考察联用方法的精密度和准确度。结果对映体的日内和日间平均相对标准偏差(RSD) 分别为 5.2% 和 8.9%,平均回收率分别为 99.9%和 97.1%,见表 1。

Tab 1 Within day and between day RSDs and recoveries of nicardipine (*n* = 5)

Added/ ng•mL ⁻¹	Within day			Between day		
	Found/ ng•mL ⁻¹	RSD/ %	Recovery/ %	Found/ ng•mL ⁻¹	RSD/ %	Recovery/ %
NCD						
110	109 ± 3	2.7	99.3	106 ± 2	2.1	96.7
220	216 ± 8	3.7	98.3	215 ± 10	4.6	98.1
440	447 ± 20	4.4	100.4	414 ± 15	3.6	94.3
S- NCD						
55	58 ± 4	6.0	105.2	49 ± 4	8.4	90.2
110	104 ± 7	6.7	94.3	113 ± 12	10.6	103.2
220	214 ± 7	3.4	97.5	203 ± 13	6.4	92.4
R- NCD						
55	53 ± 5	8.4	97.6	54 ± 7	13.6	98.7
110	109 ± 3	2.7	99.9	112 ± 11	10.2	102.3
220	231 ± 10	4.3	105.3	210 ± 10	4.6	95.8
Average		5.2	99.9		8.9	97.1

NCD: Nicardipine

4 药代动力学研究

由“兔血浆和组织样品采集与处理”项下(1)所得 NCD 消旋体和对映体的“药-时”数据,经 3P87 药代动力学程序软件处理,求得各药代动力学参数见表 2。平均药-时曲线见图 3。结果对映体的药代动力学参数有明显的差异性。

5 脏器分布研究

由“兔血浆和组织样品采集与处理”项下(2)所得 S- NCD 及 R- NCD 在组织细胞间液、细胞内液及细胞膜中的浓度分布,结果对映体在不同靶组织及同一靶组织的不同部分浓度分布的差异性明显。

Tab 2 The pharmacokinetic parameters (±SE) of S- nicardipine and R- nicardipine in rabbit after oral (±)- nicardipine (40 mg•kg⁻¹, *n* = 3)

Pharmacokinetic parameter	(±)- Nicardipine	S- Nicardipine	R- Nicardipine
<i>T</i> _{max} /h	1.76 ± 0.03	2.49 ± 0.03	1.24 ± 0.05
<i>C</i> _{max} /ng•mL ⁻¹	231 ± 4	134 ± 2	109 ± 2
<i>T</i> _{1/2} (<i>K</i> _a)/h	0.510 ± 0.020	0.720 ± 0.010	0.35 ± 0.03
<i>T</i> _{1/2} (<i>K</i> _e)/h	4.17 ± 0.09	4.93 ± 0.12	3.03 ± 0.12
AUC/ng•mL ⁻¹ •h	1862 ± 54	1082 ± 32	778 ± 22
(<i>V</i> / <i>F</i>) / mg•mL•kg ⁻¹ •ng ⁻¹	0.130 ± 0.001	0.26 ± 0.003	0.220 ± 0.003

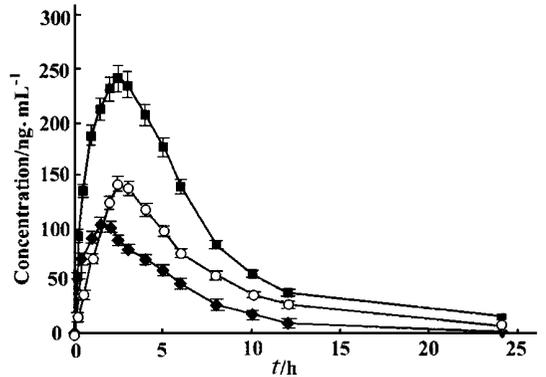


Fig 3 The mean plasma concentration-time curves of (±)- nicardipine (■—■), S- nicardipine (○—○) and R- nicardipine (◆—◆) in rabbit after oral nicardipine tablets (40 mg•kg⁻¹, *n* = 3)

讨 论

NCD 属弱碱性药物,本文参考文献^[5,7]在偏碱性条件下采用液-液萃取法处理生物样品。在测定方法上采用手性和非手性联用色谱法分析研究 NCD 对映体的体内过程,非手性反相色谱系统的应用可以同时解决分析中的两个问题:① 求得 NCD 消旋体在生物样品中的总量,为计算对映体的分量奠定了基础;② 通过收集 NCD 的柱后流出液,对生物样品作进一步纯化,基本消除生物样品内源性物质对 NCD 对映体测定的干扰,为对映体的准确定量和保护手性柱提供了保障。

NCD 对映体的血药浓度-时间数据经 3P87 程序软件处理后,求得其达峰时间(*T*_{max}) 分别为: S- NCD 2.49 h, R- NCD 1.24 h;吸收半衰期(*T*_{1/2}(*K*_a)) 分别为: S- NCD 0.72 h, R- NCD 0.35 h;消除半衰期(*T*_{1/2}(*K*_e)) 为: S- NCD 4.93 h, R- NCD 3.03 h;可见 S- NCD 较 R- NCD 吸收慢且消除也慢,作用相对持久。曲线下面积(AUC), S- NCD 约为 R- NCD 的 1.4 倍,相对于 NCD 消旋体的 AUC, S- NCD 的相对生物利用度为 58.1%, R- NCD 为 41.9%。

给家兔一次性 ig NCD 消旋体 ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 后 4 h, 在主要效应器官小脑、大脑和心脏组织中 NCD 消旋体的浓度分布依次为: $C_{\text{小脑}} > C_{\text{大脑}} > C_{\text{心脏}}$, 而对映体在小脑中 S-NCD 浓度是 R-NCD 的 4.3 倍, 在心脏中 S-NCD 浓度是 R-NCD 的 1.7 倍, 在大脑中各对映体浓度无明显差异。另外, 在消除器官肾脏中各对映体浓度也无较大差异性。

药物到达靶组织, 分布于细胞间液、靶细胞膜表面和细胞内液中, 其细胞表面和细胞内液中浓度大小直接影响对映体药物的药理作用。例如在小脑细胞间液中 S-NCD 为 R-NCD 的 3.5 倍, 细胞膜上为 0.8 倍, 细胞内液中为 18 倍; 在大脑细胞间液中 S-NCD 为 R-NCD 的 0.4 倍, 细胞膜上相等, 细胞内液中为 3.3 倍; 在心肌细胞间液中 S-NCD 为 R-NCD 的 0.5 倍, 细胞膜上为 0.5 倍, 细胞内液中为 4.8 倍。可见, 在各效应细胞中 S-NCD 进入细胞内的浓度均大于 R-NCD, 说明对映体在由细胞外到细胞内的转运过程中 S-NCD 优先于 R-NCD, 这可能是 S-NCD 的钙通道阻滞作用强于 R-NCD^[8] 的重要因素之一。

对于 NCD 对映体, 由于其立体化学结构的差异性, 在吸收和转运等过程中存在着立体选择性, 造成了 NCD 对映体药代动力学和在不同靶组织及同一靶组织中浓度分布的差异性, 这种体内过程的差异性将是影响 NCD 对映体药理作用的直接因素之一。

STUDIES ON *IN-VIVO* PROCESS OF THE ENANTIOMERS OF NICARDIPINE IN RABBIT BY COUPLED CHIRAL AND ACHIRAL HPLC

WANG Si-cen, HE Lang-chong, LIU Fei

(College of Pharmacy, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

ABSTRACT: AIM To study the differences of the pharmacokinetics and tissue distribution of two enantiomers of nicardipine in the rabbit. **METHODS** Biological samples were diluted by $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH solution and extracted with n-hexane - ethyl acetate (1:1). The concentrations of S-nicardipine and R-nicardipine in samples were determined by coupled achiral C_{18} column ($150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) and chiral OJ column ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $10 \mu\text{m}$) chromatography. **RESULTS** The racemic nicardipine and the enantiomers in sample were separated well by the coupled system. The linear range was $55 - 550 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ for both enantiomers. The within day and between days RSD ($n=5$) were 5.25% and 8.97%, and the relative recoveries were 99.99% and 97.10% for R- and S-enantiomer, respectively. The mean T_{max} , C_{max} and AUC values were $(2.49 \pm 0.03) \text{ h}$, $(134 \pm 2) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(1082 \pm 32) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$ for S-nicardipine and $(1.24 \pm 0.05) \text{ h}$, $(109 \pm 2) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(778 \pm 22) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$ for R-nicardipine. The concentration of S-nicardipine were generally higher than that of R-nicardipine in main target tissues and cells. **CONCLUSION** There were significant differences between the two enantiomers of nicardipine in rabbit in pharmacokinetics and tissue distribution.

KEY WORDS: nicardipine; enantiomer; coupled HPLC; chiral separation; stereoselectivity

REFERENCES:

- [1] Jamali F, Mehvar R, Pasutto FM. Enantioselective aspects of drug action disposition: therapeutic pitfalls [J]. *J Pharm Sci*, 1989, **78**(9):695 - 715.
- [2] Lian XF, Zhao DK, Niu XL. *Pharmacological and Clinical Study of Calcium Antagonists* [M]. Xi'an: The People's Medical Publishing House of Shannxi, 1991. 241 - 242.
- [3] Tokhma Y, Noguchi H. Stereoselective pharmacokinetics of dihydropyridine calcium antagonists [J]. *J Chromatogr A*, 1995, **694**(1):181 - 193.
- [4] Mueck WM. Enantiospecific determination of nimodipine in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 1995, **712**(1):45 - 53.
- [5] Fischer C, Schonberger F, Muck W, et al. Simultaneous assessment of the intravenous and oral disposition of the enantiomers of racemic nimodipine by chiral stationary-phase high-performance liquid chromatography and gas chromatography/mass spectroscopy combined with a stable isotope technique [J]. *J Pharm Sci*, 1993, **82**(3):244 - 250.
- [6] Xu SY, Bian RL, Chen X. *Method of Pharmacological Experiment* [M]. 2nd Edition. Beijing: The People's Medical Publishing House, 1994. 521 - 527.
- [7] Wang SC, He LC. Determination and pharmacokinetic study of nicardipine in rabbit by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Pharm Anal (in Chinese)*, 2000, **20**(3):160 - 162.
- [8] Japelj I, Budhna MV, Stanovnik L, et al. Stereoselective and endothelium-independent action of nicaedipine on the isolated porcine coronary artery [J]. *Eur J Pharmacol*, 1999, **369**(1):43 - 47.