

人血浆中尼莫地平的毛细管气相色谱 电子捕获检测法及药代动力学

丁黎*, 高凌¹, 王广基¹, 张正行, 安登魁

(中国药科大学药物分析研究室, ¹ 药物代谢动力学研究中心, 南京 210009)

摘要 目的: 建立测定人血浆中尼莫地平的毛细管气相色谱电子捕获检测法, 并用本法研究尼莫地平片剂在健康人体内的药代动力学及相对生物利用度。方法: 色谱柱为 25 m × 0.2 mm ID OV-101 熔融石英毛细管柱, 检测器为 ⁶³Ni 电子捕获检测器。内标为尼群地平, 血浆样品在碱性条件下用正己烷-乙酸乙酯(1:1) 提取。结果: 浓度在 2.0 ~ 150.0 ng·ml⁻¹ 与峰面积比呈良好线性关系, $r = 0.99989$ 。人血浆中尼莫地平的最低检出浓度为 0.1 ng·ml⁻¹, 方法重现性好, 提取回收率大于 80%。10 名志愿者随机交叉口服单剂量 100 mg 二种国产尼莫地平片剂后, 以本法测定其体内过程符合一室模型。二种片剂的 AUC_{0-∞}, C_{max}, T_{max} 均无显著差异。结论: 尼莫地平血药浓度测定结果表明两种尼莫地平片剂生物等效, A 片剂对 B 片剂的相对生物利用度为 102.0%。

关键词 尼莫地平; 毛细管气相色谱电子捕获检测法; 药物代谢动力学

尼莫地平为扩张脑血管、解除脑血管痉挛的一种 1,4-二氢吡啶类钙离子通道拮抗剂, 临床上主要用于治疗有明显症状的老年性脑功能损伤和由于蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛引起的缺血性神经损伤、偏头痛及轻、中度高血压等疾病。目前血浆中尼莫地平的含量测定方法多采用 HPLC 法^[1~4], 但多数存在来自血浆的内源性物质的干扰, 使方法的专属性受影响, 双内标法虽能部分解决杂峰干扰问题^[3], 但较繁琐。此外, 这些方法检测灵敏度不高, 血浆中尼莫地平的最低检出浓度只能达到 2 ~ 5 ng·ml⁻¹, 某些受试者服药 6 ~ 8 h 后已无法检出尼莫地平^[3,4]。Krol 等^[1] 虽最早报道了血浆中尼莫地平的 GC 测定法, 但该方法需将尼莫地平氧化成吡啶类似物后再测定, 方法繁琐且不能区分原形药物及其代谢产物, 故不适于体内样品测定方法。此后, Jakobsen 等^[5] 报道了血浆中尼莫地平的填充柱气相色谱电子捕获检测法, 该方法使尼莫地平的检测灵敏度提高了一个数量级, 血浆中尼莫地平的最低检出浓度可达 0.5 ng·ml⁻¹, 但该方法中内标尼群地平并未与杂质峰达到基线分离。本文设计了血浆中尼莫地平的高分辨毛细管气相色谱电子捕获检测法, 此法不但改善了色谱分离, 而且使检测灵敏度得到进

一步提高, 血浆中尼莫地平的最低检出浓度可达 0.1 ng·ml⁻¹。用此法对 10 名健康志愿者口服国内两家药厂生产的尼莫地平片剂后的体内过程进行了研究, 统计学结果表明两种片剂生物等效。

实验部分

1 仪器与试剂

Shimadzu GC-14A 气相色谱仪; Shimadzu C-R6A 数据处理机; Shimadzu ⁶³Ni 电子捕获检测器; 正己烷、乙酸乙酯、甲醇均为分析纯; 尼莫地平 and 尼群地平(江苏省药品检验所提供); 尼莫地平片剂(常州聚荣制药有限公司, 批号 970813, 20 mg/片, 以下简称 A 片; 上海信谊药厂, 批号 E970701, 20 mg/片以下简称 B 片)。

2 色谱条件

色谱柱为 25 m × 0.2 mm ID OV-101 熔融石英毛细管柱, 膜厚 0.2 μm; 载气为高纯度氮气, 柱中载气流速为 1.8 ml·min⁻¹, 分流比为 1:33, 尾吹为 17 ml·min⁻¹, 柱室、气化室及检测器的温度分别为 260, 270, 300 °C。电子捕获检测器参数为脉冲电流 1 nA, 量程 1。

3 血药浓度测定方法及最低检测浓度

于暗室中, 取血浆 1 ml 置离心管中, 精密加入 1 μg·ml⁻¹ 尼群地平甲醇溶液 35 μl, 1 mol·L⁻¹ NaOH 0.5 ml, 涡旋 10 s, 加乙酸乙酯-正己烷(1:1) 6 ml,

收稿日期: 1998-05-20

* Tel: (025) 3305996 - 301, Fax: (025) 3301655,

E-mail: dingli88 @ public 1. ptt. js. cn

涡旋 3 min, 于 4000 r·min⁻¹ 离心 5 min。取有机相 5 ml 于 50 °C 水浴, 氮气流吹干, 用甲醇 50 μl 溶解残渣, 精密吸取 2 μl, 按上述色谱条件进样分析。色谱图见图 1。尼莫地平及内标尼群地平的出峰时间分别为 12.6 min 及 7.6 min, 血浆中杂质峰不干扰样品测定, 以尼莫地平理论塔板数为 1.1 × 10⁵。在上述条件下, 测得血浆中尼莫地平最低检出浓度为 0.1 ng·ml⁻¹ (S/N=3)。

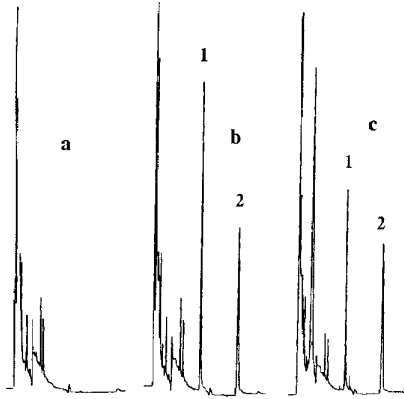


Fig 1 Gas chromatograms of blank plasma (a), blank plasma with nitrendipine and nimodipine (b), volunteer plasma after oral administration of nimodipine tablets (c). 1. Nitrendipine; 2. Nimodipine.

4 人体实验方案

4.1 受试者选择 10 名健康男性受试者, 体重 (67.6 ± 7.7) kg, 年龄 (22.1 ± 0.7) a, 经生化检验证实肝、肾功能正常, 心电图检查正常, 精神状态良好。受试者在被告知所有与药物有关的可能的不良反应后, 签署受试者知情同意书, 保持随时退出实验的权利。实验前一周及实验期间未服用其它任何药物及烟和酒, 用药前 12 h 及用药后 4 h 内禁食, 实验期间统一饮食。

4.2 给药方案及血样采集 采用双交叉试验设计方案, 即 10 名男性健康受试者, 按体重分组随机分成 A、B 两组, 随机一半先服 A 片, 后服 B 片; 另一半先服 B 片, 后服 A 片。剂量均为 100 mg (5 × 20 mg), 两种制剂间隔一周。于早上 7:00 空腹服药 100 mg (5 × 20 mg), 用温开水 200 ml 送服。于服药后 0.33, 0.67, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0 和 10.0 h 于肘静脉取血 3.0 ml, 置肝素化试管中, 4000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取血浆 1.0 ml 供血样分析。

4.3 数据分析 将所得血药浓度-时间数据用

PKBP-NI 程序计算药物的药代动力学参数, 再取均值 ± s。A 片的相对生物利用度以 B 片为对照, 非房室模型依赖性参数 AUC 和清除率 (Cl/F) 分别按下列各式计算:

$$AUC_{0-10} = \sum (C_i + C_{i-1}) \times (T_i - T_{i-1}) / 2$$

$$AUC_{0-\infty} = \sum (C_i + C_{i-1}) \times (T_i - T_{i-1}) / 2 + C_n / \lambda_n$$

$$Cl/F = D / AUC_{0-\infty}$$

$$T_{1/2} = 0.693 / \lambda_n$$

式中 C_n 为最后取样点浓度, λ_n 为末端相消除速率常数。D 为给药剂量。

所得参数用交叉实验设计的方差分析, 其中 AUC_{0-∞}, AUC₀₋₁₀, C_{max} 先进行自然对数转换, 再进行分析, 并进行双单侧检验 (显著性水平 α = 0.05)。

结 果

1 线性关系考察

于暗室中, 取离心管数支, 精密加入不同量的尼莫地平及空白血浆 1.0 ml, 配成浓度为 0.0, 2.0, 10.0, 25.0, 40.0, 60.0, 100.0 和 150.0 ng·ml⁻¹ 的标准含药血浆, 按“血药浓度测定法”项下操作, 每种浓度做 5 份样品, 记录峰面积。以样品与内标峰面积比值 (f) 对浓度 (C) 进行回归计算, 结果表明尼莫地平在 2.0 ~ 150.0 ng·ml⁻¹ 范围内线性良好, 回归方程为: f = 0.0235 C + 0.0751, r = 0.99989 (n = 5), 斜率 RSD = 2.39%。

2 精密度试验

于暗室中, 取离心管数支, 精密加入不同量的尼莫地平及空白血浆 1.0 ml, 配成浓度为 2.0, 25.0 和 100.0 ng·ml⁻¹ 的尼莫地平标准血浆, 按“血药浓度测定方法”项下操作, 每种浓度做 5 份样品, 记录峰面积。测定日内和 5 d 内的日间 RSD。结果表明 2.0, 25.0 和 100.0 ng·ml⁻¹ 3 种浓度标准血样的日内 RSD (n = 5) 分别为 8.5%, 7.0%, 1.1%; 日间 RSD (n = 5) 分别为 8.8%, 7.5%, 2.9%。

3 提取回收率

于暗室中, 取离心管数支, 分别加入尼莫地平标准液适量, 配成含尼莫地平 2.0, 25.0 和 100.0 ng·ml⁻¹ 的标准溶液, 每份 1 ml, 加入浓度为 1 μg·ml⁻¹ 的尼群地平甲醇溶液 35 μl, 混匀, 吹去溶剂后, 用甲醇 50 μl 溶解残渣, 取 2 μl 进样分析, 记录色谱图, 并计算尼莫地平峰面积与内标峰面积的比值 (f_s)。另于暗室中, 取离心管数支, 精密加入不同

量的尼莫地平及空白血浆 1 ml, 配成浓度为 2.0, 25.0 和 100.0 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的标准含药血浆, 每种浓度做 5 份样品, 每份 1 ml, 分别加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 液 0.5 ml, 涡旋 10 s, 加乙酸乙酯—正己烷(1:1) 6 ml, 涡旋 3 min, $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min。取有机相加入浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的尼群地平甲醇溶液 35 μl , 混匀, 于 50°C 水浴氮气流吹干, 用甲醇 50 μl 溶解残渣, 精密吸取 2 μl 进样分析。计算尼莫地平的峰面积与内标的峰面积之比值(f_x)。上述 f_x 与 f_s 的比值即血浆中尼莫地平的提取回收率($R\%$), 回收率按下式计算, $R\% = f_x/f_s \times 100\%$ 。结果表明 2.0, 25.0 和 100.0 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 3 种浓度标准血样的提取回收率($n=5$)分别为 82.3%, 88.4%, 89.2%。

4 药代动力学研究

A 片及 B 片给药后的血药浓度-时间曲线见图 2。根据血药浓度-时间曲线比较及 AIC 值显示, A 片及 B 片在人体内的药代动力学过程用一房室模型拟合较好, 因此血药浓度数据采用 PKBP-NI 程序选择一房室模型进行拟合计算, 结果见表 1。表 1 结果表明 A 片及 B 片的药代动力学参数相近。以 B

片为对照, 算得 A 片的相对生物利用度为 1.02 ± 0.07 。

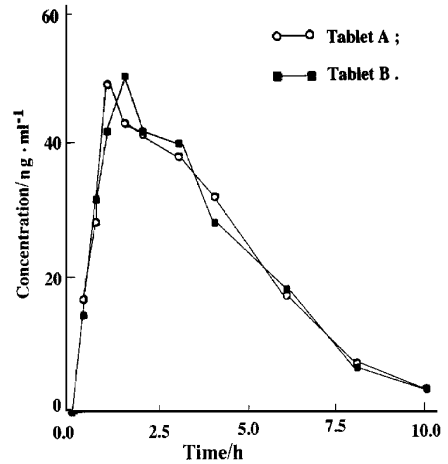


Fig 2 Mean plasma concentration - time curve of nimodipine after a single oral dose (100 mg) of tablet A and tablet B in ten volunteers. $\circ - \circ$ Tablet A; $\blacksquare - \blacksquare$ Tablet B.

经双单侧检验分析两制剂的 AUC_{0-10} 和 $AUC_{0-\infty}$ 及 C_{\max} , 结果表明两制剂生物等效。

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of nimodipine after a single oral dose of 100 mg in volunteers ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tablet	$T_{1/2}$ /h	$T_{1/2ka}$ /h	k /h ⁻¹	C_{\max} /ng·ml ⁻¹	T_{\max} /h	CL/F /L·h ⁻¹	AUC_{0-10} /ng·h·ml ⁻¹	$AUC_{0-\infty}$ /ng·h·ml ⁻¹
A	2.54 ± 0.74	0.50 ± 0.44	0.29 ± 0.07	54.35 ± 19.05	1.60 ± 0.77	445.83 ± 117.09	227.54 ± 16.76	238.83 ± 62.57
B	2.17 ± 0.48	0.52 ± 0.33	0.34 ± 0.07	56.87 ± 14.41	1.70 ± 0.80	455.88 ± 125.21	223.72 ± 56.41	233.40 ± 58.45

讨 论

由于尼莫地平遇光降解较快^[6], 故本实验所有的操作过程均在暗室中避光进行。

血浆中脂肪酸等酸性内源性物质在中性条件下可被有机溶剂提取, 这些物质往往会在气相色谱中产生干扰峰而影响色谱分离。在提取前将血浆样品进行碱化, 这样可使这些酸性内源性物质留在水层, 而不被有机溶剂提取, 从而使血浆提取物的气相色谱图比较纯净, 减少干扰, 因此在尼莫地平血浆样品提取前, 先用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液进行碱化。实验中, 在选择提取溶剂时, 曾试用了乙醚、乙酸乙酯、正己烷、氯仿、苯及甲苯。结果表明, 氯仿、苯、乙酸乙酯的提取物有较多杂峰, 干扰测定, 正己烷提取物的图谱中杂峰虽较少, 但尼莫地平的提取回收率不够高, 乙醚及甲苯的提取效果较好, 但甲苯毒性较大, 乙醚吹干时挥发太快, 易造成样品损失, 故均未被采用。用乙酸乙酯—正己烷(1:1) 作为提取溶剂

效果最好, 色谱图干净, 且尼莫地平的提取回收率较高。

参 考 文 献

- 1 Krol GJ, Noe AJ, Yeh SC. GC and liquid chromatographic analyses of nimodipine calcium antagonist in blood plasma and cerebrospinal fluid. *J Chromatogr Biomed Appl*, 1984, **305**: 105
- 2 Jain R, Jain CL. Microquantification of nimodipine in intravenous infusions using high speed liquid chromatography. *Indian Drugs*, 1990, **28**: 154
- 3 卢炜, 王建卓, 赵甘霖, 等. 高效液相色谱法测定人血浆中尼莫地平浓度. *药物分析杂志*, 1995, **15**: 3
- 4 施孝金, 王宏图, 韦阳, 等. 国产尼莫地平片和尼莫通片的生物利用度比较. *药学报*, 1997, **32**: 708
- 5 Jakobsen P, Mikkelsen EO. Determination of nimodipine by gas chromatography using electron-capture detection; external factors influencing nimodipine concentrations during intravenous administration. *J Chromatogr Biomed Appl*, 1986, **374**: 383
- 6 王树岚, 马文诗, 王祥. 高效液相色谱法测定尼莫地平注射液含量及其稳定性研究. *药物分析杂志*, 1991, **11**: 81

DETERMINATION OF NI MODIPINE AND ITS PHARMACOKINETICS IN HUMAN PLASMA BY CAPILLARY GAS CHROMATOGRAPHY USING ELECTRON CAPTURE DETECTION

Ding Li(Ding L) , Gao Ling(Gao L)¹ , Wang Guangji(Wang GJ)¹ ,
Zhang Zhengxing(Zhang ZX) and An Dengkui (An DK)

(Department of Pharmaceutical Analysis , ¹Research Center of Pharmacokinetics ,
China Pharmaceutical University , Nanjing 210009)

ABSTRACT **AIM:** To develop a capillary GC-ECD method for the study of pharmacokinetics and relative bioavailability of nimodipine tablet in human body. **METHODS:** Chromatography was performed on a 25 m × 0.2 mm ID 0.2 μm film thickness OV-101 fused-silica capillary column coupled with a ⁶³Ni electron-capture detector. The carrier gas was highly pure nitrogen. The flow rate of carrier gas in the capillary column was 1.8 ml•min⁻¹. The split ratio was 1:33. The flow rate of make-up gas was 17 ml•min⁻¹. The temperatures of the column, injector and detector were 260 °C, 270 °C and 300 °C, respectively. The internal standard was nitrendipine. After making alkaline with 1 mol•L⁻¹ NaOH solution, the plasma was extracted with n-hexane — ethyl acetate (1:1). **RESULTS:** A good linearity was obtained from 2.0 ng•ml⁻¹ to 150.0 ng•ml⁻¹ of nimodipine in human plasma with a correlation coefficient of 0.99989. The detection limit of nimodipine in human plasma was 0.1 ng•ml⁻¹. The extraction recovery was more than 80%. The pharmacokinetics of nimodipine was determined by this GC-ECD method following a single oral dose of 100 mg of two kinds of domestic nimodipine tablets given to each of 10 volunteers in an open randomized two way crossover design. The results showed that the plasma concentration-time courses of the two kinds of tablets conformed to one compartment model. There was no significant difference between the two formulations in the AUC_{0-∞}, C_{max} and T_{max}. **CONCLUSION:** The established GC-ECD method was found to be a good method for determination of nimodipine in human plasma. The results of statistical analysis showed that the two formulations of nimodipine were biologically equivalent. The relative bioavailability of tablet A was 102.0% compared with that of tablet B.

KEY WORDS nimodipine; capillary GC-ECD; pharmacokinetics