

高效液相色谱法同时测定动物血浆中萘哌地尔及其主要代谢产物浓度

袁 牧 汤 磊 付晓钟 石京山* 郑志昌 刘 香

(贵阳医学院药理学系, 贵阳 550004; * 遵义医学院药理教研室, 遵义 563003)

摘要 为研究大鼠口服萘哌地尔的药代动力学规律, 建立了同时测定萘哌地尔及其去甲基代谢产物浓度的高效液相色谱法。以甲醇、乙腈以及 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液为流动相, RP-C₁₈ 为固定相, 普萘洛尔作内标, 紫外定量波长 240 nm。此条件下内标物、去甲基物和原药的保留时间分别为 6.2, 7.6 和 10.3 min; 绝对回收率分别为 97.4%, 86.6% 和 86.1%。去甲基物和原药在 $10 \sim 800 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 血浆浓度范围内线性关系良好, $\gamma = 0.9998$, 最低检测浓度分别为 $8 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 和 $5 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$; 日内和日间的相对标准偏差(RSD)均分别小于 6.3% 和 11.6% ($n = 5$)。并用此法研究了大鼠单次口服萘哌地尔后两者的药时规律。

关键词 高效液相色谱法; 萘哌地尔

萘哌地尔(naftopidil, NAF)是一个新型选择性 α_1 -肾上腺受体拮抗剂, 降压作用显著、作用时间持久^[1]、副作用小。同时该药还有 Ca^{2+} 通道拮抗^[2] 和 5-HT_{1A} 受体激动作用^[3]。文献报道^[1] ¹⁴C示踪的 NAF($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, po)在大鼠体内吸收迅速, 但原药生物利用度仅为 8.6%; 原药的血浆半衰期为 6.9 h, 而总放射性活度的半衰期为 35.4 h, 由此可见原药在大鼠体内有明显的首过效应。此药的给药特点 1 d 只需 po 1 次, 药动学和药效学的差异提示 NAF 可能在体内转变成活性代谢物, 所以有必要建立同时测定原药及代谢物血药浓度的分析方法。人体内同时测定原药及代谢物浓度国外已有 HPLC 法^[4], 采用荧光检测器。但荧光检测器的检测对象需能发射荧光, 仪器专一性较高。为了寻找一个能普遍适用的分析方法, 本文结合本室条件建立了同时测定大鼠血浆中 NAF 及其代谢产物去甲基萘哌地尔(desmethylnaftopidil, DMN)的 HPLC 法, 并用此方法研究了大鼠单

次 po NAF 的药代动力学规律。同时测定大鼠体内原药及代谢物的方法, 国内外尚未见报道。

材 料 与 方 法

仪器与试剂 Shimadzu LC-9A 高效液相色谱系统, 包括: LC-9A 泵, 7161 进样阀, SPD-M6A 光电二极管阵列检测器, SPDM6A 分析软件; 80-2 型离心机。萘哌地尔精制品(自制, 批号 960620, 含量: 99.9%); 萘哌地尔盐酸盐(自制, 批号 960914, 含量: 99.8%); 去甲基萘哌地尔盐酸盐(德国 BoehringerMannheim 公司); 内标物(IS)普萘洛尔(propranolol)(东北制药总厂); 甲醇(色谱纯, 北京化工厂); 乙酸乙酯(分析纯, 北京化工厂); 乙腈(色谱纯, 北京化工厂); 磷酸、碳酸钠、磷酸二氢钾均为分析纯; 实验用水为三次重蒸馏水。

动物 体重 $250 \pm 10 \text{ g}$ Wistar 大鼠, ♂, 贵阳医学院医学动物中心提供。

标准品贮备液及内标贮备液 以甲醇为溶剂, 精密配制 NAF 标准贮备液 $4 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 及 $40 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, DMN 标准贮备液 $4 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 及 40

$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 内标标准贮备液 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。置 4°C 保存。

血浆样品前处理 血浆 $1.00\ \text{ml}$ 置 $10\ \text{ml}$ 具塞离心管内, 精密加入内标贮备液, 使其在血浆中浓度为 $500\ \text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, 混旋 $10\ \text{s}$, 加入 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液 $0.5\ \text{ml}$ ($\text{pH}\ 11$), 振荡 $1\ \text{min}$, 加入乙酸乙酯 $4.5\ \text{ml}$, 振荡 $5\ \text{min}$, $3500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 $3\ \text{min}$, 移取上层有机相, 水相再加入乙酸乙酯 $2.5\ \text{ml}$, 振荡 $5\ \text{min}$, $3500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 $3\ \text{min}$, 合并上层有机相。 40°C 水浴中以 N_2 吹干, 残渣以甲醇 $100\ \mu\text{l}$ 溶解后, 进样 $20\ \mu\text{l}$ 。

色谱条件 Shim-pack CLC-ODS 色谱柱, $6.0\ \text{mm}\times 15\ \text{cm}$, 粒径 $5\ \mu\text{m}$ 。流动相: A. 0.02

$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{KH}_2\text{PO}_4\text{—H}_3\text{PO}_4$ ($1000:1$); B. 甲醇—乙腈 ($1:1$)。A 及 B 均于用前以 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤。有机溶剂在过滤后超声波脱气。A:B = $0.43:0.57$ 。流速 $1\ \text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, 定量波长: $240\ \text{nm}$ 。灵敏度 $0.02\ \text{AUFS}$ 。

实验结果

1 色谱行为

根据内标物选定原则, 选用普萘洛尔作内标。在上述色谱条件下, IS, DMN 及 NAF 峰分离良好。保留时间 IS: $6.2\ \text{min}$; DMN: $7.66\ \text{min}$; NAF: $10.3\ \text{min}$ 。色谱图见图 1。

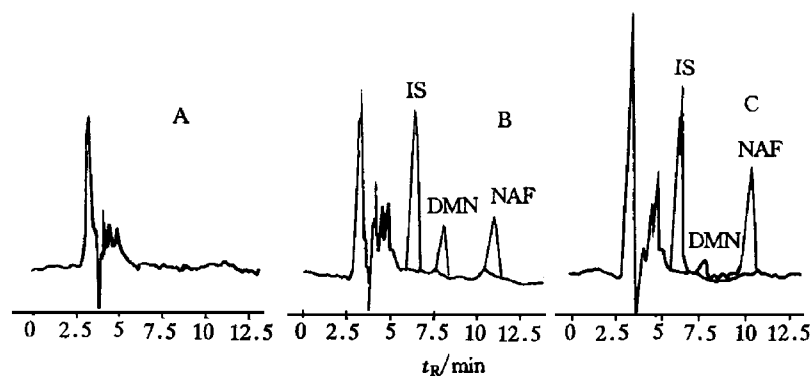


Fig 1 Chromatogram of naftopidil (NAF) and desmethylnaftopidil (DMN) in plasma by HPLC. A. Rat plasma; B. IS (propranolol), DMN and NAF added to plasma; C. DMN and NAF after NAF $20\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($6\ \text{h}$).

2 标准曲线制备

吸取空白大鼠血浆 $1\ \text{ml}$ 置 $10\ \text{ml}$ 带塞离心管中, 吸取不同体积的 NAF 及 DMN 贮备液于离心管中, 使含量均为 $10, 20, 40, 80, 160, 240, 800\ \text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, 各浓度配制 3 份。各样品同前血浆处理方法萃取后进行 HPLC 分析, 以 DMN 和 NAF 的峰面积与内标峰面积之比对各自的浓度进行线性回归, 得回归方程。NAF: $Y = 3.3045 \times 10^{-3} X - 0.0152$, $\gamma = 0.9998$; DMN: $Y = 2.4404 \times 10^{-3} X + 8.5188 \times 10^{-5}$, $\gamma = 0.9998$ 。

3 精密度测定

准确配制浓度为 $40, 80, 160\ \text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的 NAF 及 DMN 的血浆样品各 5 管, $1\ \text{d}$ 内经萃

取进样分析算得 3 浓度的日内精密度 (RSD): NAF 为 $7.4\%, 11.3\%, 9.7\%$, DMN 为 $3.1\%, 5.0\%, 6.0\%$; 再配制上述 3 浓度的 NAF 及 DMN 的标准血浆, 分别于 $d\ 1, 3, 5, 7, 9$ 测定, 求得日间精密度: NAF 为 $11.6\%, 4.5\%, 6.5\%$, DMN 为 $4.6\%, 4.3\%, 6.3\%$ 。结果见表 1。

4 回收率的测定

配制浓度为 $40, 80, 160\ \text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的血浆样品管各 5 管, 每管 $1\ \text{ml}$, 各精密加入内标贮备液 $10\ \mu\text{l}$, 提取后经 HPLC 分析, 所测浓度与各自的配制浓度比较, 求出方法回收率, 结果见表 1。吸取同量的 DMN 和 NAF 于离心管内, N_2 吹干, $100\ \mu\text{l}$ 甲醇溶解残渣, 取 $20\ \mu\text{l}$ 进样。以

上述 3 浓度 DMN 和 NAF 经血浆提取后的平均峰面积与各浓度直接进样的峰面积相比,求

得各自的绝对回收率:内标物为 93.4%,NAF 为 80.2%,DMN 为 76.8%。

Tab 1 Precisions and recoveries of the determination of NAF and DMN by HPLC ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Drug	Concentration/ $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$		Recovery /%	RSD/%	
	Added	Determined		Within-day	Day-to-day
NAF	40	32.1 ± 7.0	80.3	7.4	11.6
	80	69.0 ± 8.9	86.2	11.3	4.5
	160	147.1 ± 4.7	91.9	9.7	6.5
DMN	40	31.5 ± 2.5	78.7	3.1	4.6
	80	71.2 ± 5.5	89.0	5.0	4.3
	160	147.3 ± 2.5	92.0	6.0	6.3

5 最低检测限和最低检测浓度

将 DMN 和 NAF 标准溶液的浓度逐渐稀释,得 DMN 的最低检测量为 1 ng,血浆最低检测浓度为 $8 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。NAF 最低检测量为 0.5 ng,血浆最低检测浓度为 $5 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

6 大鼠单次口服的药代动力学行为

大鼠分为 11 组,每组 6 只。用 1% 吐温 80-NS 配制 $0.2\% (\text{g}\cdot\text{ml}^{-1})$ NAF 混悬液,以 $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量灌胃,给药后分别于 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 10, 12, 24 h 自眼底取血,肝素抗凝, $2500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心制成血浆,取血浆 1 ml 按前述方法萃取后进行 HPLC 分析求得各时间点的血药浓度。以给药试剂为横坐标,血中 NAF 和 DMN 的对数浓度为纵坐标绘制药时曲线(图 2)。结果表明,大鼠口服萘哌地尔后吸收迅速,符合二房室开放模型。血浆消除半衰期为 8.13 h。

讨 论

NAF 分子结构中含有哌嗪环,为碱性结构。而代谢产物脱甲基化合物中产生了酚羟基,其 pKa 值与原药相差较大。有文献报道先在酸性条件下以乙醚除去部分杂质,再在碱性条件下以乙醚回提 NAF^[5],但该方法不能用于代谢物的提取。所以宜寻找一个合适的 pH 及有机溶剂,使得 NAF 及其代谢物在生物样品中均有较高的回收率。经过预实验,最后选用 pH 11 的 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ 溶液作碱化试剂。该条件下原药和代谢物的绝对回收率能满足实验需要。

$0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$ 溶液 1000 ml 中加入 1 ml 磷酸作为水相,以甲醇—乙腈(1:1)为有机相。当水相:有机相 = 0.43:0.57 时,各色谱峰分离良好。在大鼠血浆的药物浓度分析中本实验方法重现性好,标准曲线线性良好,能满足测定大鼠体内原药药动力学规律及代谢物的药一时规律的需要。从药时曲线看,代谢物的浓度变化无明显规律,但其最高浓度达 $98.4 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$,且代谢物浓度一些时间点上超过了原药的浓度,这或许是萘哌地尔长效的因素之一。

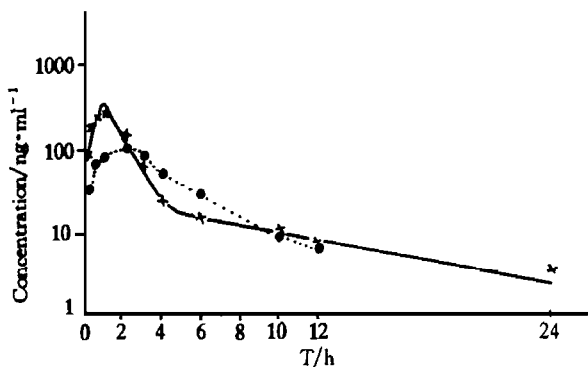


Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of naftopidil (NAF) and desmethyl-naftopidil (DMN) after a single oral dose of NAF $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ in rats. \times — \times NAF; \bullet - - - \bullet DMN.

参 考 文 献

1 Himmel HM. Naftopidil, a novel antihypertensive

- drug. *Cardiovasc Drug Rev*, 1994, **12**:32
- 2 Grundeke M, Himmel HM, Weeter E, *et al.* Characterization of calcium-antagonistic effects of three metabolites of new antihypertensive agent naftopidil (naphthyl) hydroxy-naftopidil, and *O*-desmethyl-naftopidil. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1991, **18**:918
 - 3 Borbe HO, Metzner D, Szelenyi L. 5-HT_{1A}-agonistic properties of naftopidil, a novel antihypertensive drug. *Eur J Pharmacol*, 1991, **205**:105
 - 4 Niebch G, Borbe HO, Besenfelder E. High-performance liquid chromatography of naftopidil, a novel antihypertensive drug, and two metabolites in human plasma. *J Chromatogr*, 1990, **534**:247
 - 5 於东晖, 万里涛, 楼雅卿. 高效液相色谱法测定生物样品中萘哌地尔浓度. *药 学 学 报*, 1995, **30**:286

DETERMINATION OF NAFTOPIDIL AND ITS MAIN METABOLITE IN PLASMA BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Yuan Mu(Yuan M), Tang Lei(Tang L), Fu Xiaozhong(Fu XZ), Shi Jinshan(Shi JS)*, Zheng Zhichang(Zheng ZC) and Liu Xiang(Liu X)

(Department of Pharmacy, Guiyang Medical College, Guiyang 550004;

* Department of Pharmacology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003)

ABSTRACT A method was developed for the determination of naftopidil (NAF) and its main metabolite desmethyl-naftopidil (DMN) in plasma by HPLC. A mixture of methanol, acetonitrile and 0.02 mol·L⁻¹ K₂HPO₄ solution was used as mobile phase. Stationary phase was RP-C₁₈. Propranolol was chosen as internal standard (IS), and the detector wavelength was 240 nm. Under these conditions, the retention times of IS, DMN and NAF were 6.2, 7.6 and 10.5 min respectively. Absolute recoveries from plasma were up to 93.4% (IS), 76.8% (DMN) and 80.2% (NAF). The assay was linear for DMN and NAF in the range of 10~800 ng·ml⁻¹ plasma concentration, $\gamma = 0.9998$. The lowest detection limits were 8 ng·ml⁻¹ (DMN) and 5 ng·ml⁻¹ (NAF), and the precisions within-day and day-to-day were no more than 6.3% for MDN and 11.6% for NAF. The drug concentration—time pattern of these two substances was also studied with this method. Result showed that naftopidil was quickly absorbed after po and the concentration—time data were fitted to two compartment model, with half life ($T_{1/2\beta}$) of 8.13 h.

KEY WORDS High-performance liquid chromatography; Naftopidil