92,17(3)
169—171

维普资讯 http://www.cqvip.com

硝苯吡啶的HPLC测定方法及在人肝微粒体内的代谢动力学

药理教研室 何 坎* 全钰珠

R969.1

摘 要 本文建立了测定生物样品中硝苯吡啶浓度的反相HPLC法。选用非那西丁作为内标物，固定相用Nova-Pak C18分析柱，流动相为甲醇-水（68:32），紫外检测波长为240nm。样品由乙酸乙酯一次性提取，硝苯吡啶回收率为95.3±4.0%。本方法最低检测限为4ng。硝苯吡啶在人肝微粒体内代谢需NADPH再生系统，生成一个主要代谢物；按原药消除计算，硝苯吡啶代谢的Km和Vmax分别为58.0 μmol/L和1.51nmol/mg/min

关键词 硝苯吡啶；HPLC；肝微粒体；代谢 药代动力学；高效液相色谱；
中图分类号 R969.1；R927.2

硝苯吡啶（Nifedipine，NF）作为钙通道阻断药，广泛用于治疗心绞痛、高血压等疾病。NF的氧化代谢存在明显的个体差异，血药浓度在个体间变化很大，是否表现遗传多态性尚有待进一步研究[1,2]。Guengerich等从人肝微粒体中分离得到P450[3]，该P450同功酶氧化代谢包括NF在内的一系列1,4-二氢吡啶类化合物[4]。鉴于NF类Ca^{2+}通道阻断剂的临床应用价值，探讨人肝微粒体代谢NF的规律，具有重要意义。本文建立了测定NF的HPLC法，并研究了NF在人肝微粒体内的代谢动力学。

材料和方法

1. 药品与试剂 硝苯吡啶（上海第十七制药厂），非那西丁（Macarthys, U.K.），NADP（8809212，纯度>70%；中国科学院上海生化所东风试剂厂），葡萄糖6-磷酸（1269263/Jul, Bioehringer Mannheim），葡萄糖6-磷酸脱氢酶（Type XV, Sigma），甲醇（AR，重庆东风试剂厂），乙酸乙酯（AR，重庆东风试剂厂）用前重蒸，并用等量纯水饱和三次。

2. 仪器与色谱条件 所用仪器为LC-6A高效液相色谱仪配SPD-6A UV-VIS紫外—可见分光光度检测器和C-R3A色谱数据处理装置（Shimadzu），固定相为Nova-Pak C18（4μm，3.9×150mm，Waters及YWG预柱（10μm，4.6×50mm，大连化物所）。流动相为甲醇-水（68:32），流速0.8ml/ml，柱温40℃；紫外检测波长240nm，在该波长下，内标物非那西丁与NF的摩尔消光系数比为0.54。对NF代谢物定量时，假定非那西丁与NF代谢物的摩尔消光系数比为1[5]。

3. 样品预处理 在1ml血浆或微粒体温孵液中，加乙酸乙酯4ml，混旋1.5min后，离心3,000 rpm 5min，然后取3ml乙酸乙酯相，于50℃水浴下，氮气流挥干。测定前用1ml甲醇溶解，取20μl进样。

4. NF在人肝微粒体的代谢

人肝微粒体制备见文献[6]，反应体系含NADP 0.1mmol/L、葡萄糖6-磷酸10mmol/L、葡萄糖6-磷酸脱氢酶2u/ml、$MgCl_2$ 5mmol/L、人肝微粒体1mg/ml；NF首先配成不同浓度的甲醇溶液，取10μl加入反应体系中，用磷酸缓冲液（0.1mol/L，pH7.4）稀释至1ml。于37℃水浴振荡温孵

* 现在中国医学科学院药物研究所 北京100050

维普资讯 http://www.cqvip.com

30min后，置于－30℃冰箱终止反应。以上所有操作及样品处理均在避光条件下进行。

5. 资料处理 Km和Vmax按Eadie-Hofstee方法计算[7]。

结　果

1.色谱分离及方法特异性 在本色谱条件下，内标物、NF及代谢物均达基线分离，其色谱保留时间t_R分别为2.6、3.1和3.6min。兔血浆及人肝微粒体温孵液的杂质峰不干扰测定（见图1）。

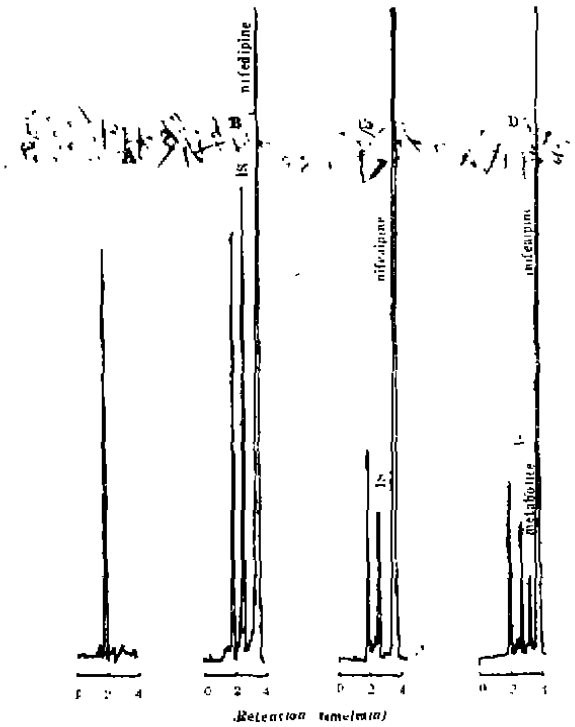


图1 硝苯吡啶及其代谢物的高效液相色谱图

（A）空白血浆；（B）加有内标和硝苯吡啶的血浆；（C）硝苯吡啶在人肝微粒体反应体系中未经温孵；（D）硝苯吡啶在微粒体反应体系中温孵30min后。

2. 线性关系、回收率及灵敏度 将NF配成浓度为25、50、100、200、400、800μg/ml的甲醇溶液，分别取10μl加入1ml兔血浆中，并在血浆中加入内标物2.5μg。按上述方法处理样品后，用1ml甲醇溶解残留物，取20ul进样。NF浓度对绝对峰高的回归方程为Y＝1417X－92(r＝0.9994)；NF浓度对NF与内标物峰高比的回归方程为Y＝0.20X－0.01(r＝0.9996)。NF在0.25－8.0μg/ml范围内，按绝对峰高计算，回收率为94.6±5.0%；按NF与内标物的峰高比计算，回收率为95.3±4.0%(n＝18)。内标物回收率为100.4±2.4%(n＝18)

本方法最小检测度为4ng。

3. 精密度和稳定性 取兔血浆1ml若干份，分别加入0.5、2.0、8.0ug NF，每管均含内标物2.5μg/ml，每种浓度重复5管；日内三种浓度的变异系数(CV)分别为9.6和4.0%。将含NF 2.0 μg/ml的血浆样品放置在－30℃冰箱1个月后，取出测定NF与内标物峰高比与当日样品的测定结果无差异。

4. NF在人肝微粒体的代谢 NF被人肝微粒体代谢后，在色谱图上发现一个主要代谢物（见图1）。原药消除及代谢物生成均需NADPH再生系统。温孵时间在30min

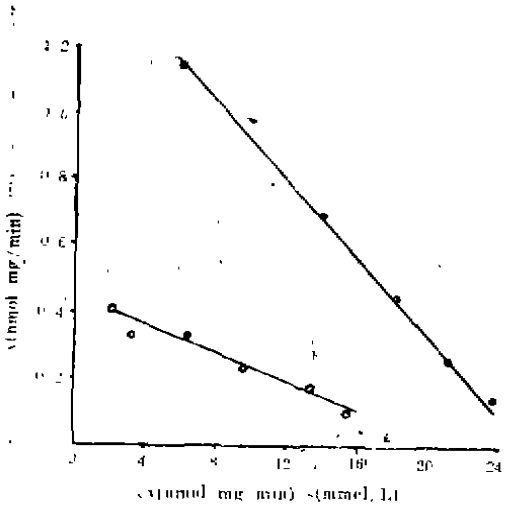


图2 硝苯吡啶在人肝微粒体内代谢动力学的 Eadie-Hofstee 作图。·——·：原形药的消失；○——○：代谢物的形成。

维普资讯 http://www.cqvip.com

以内或微粒体蛋白浓度在1mg/ml以内，NF原药消除及代谢物生成量均在线性范围内。按原药消除计算，NF代谢的Km和Vmax分别为58.0μmol/L和1.51nmol/mg/min；按代谢物生成计算，Km为20.9μmol/L，Vmax为0.44nmol/mg/min（见图2）。

讨 论

本实验建立了一种快速、灵敏的HPLC测定方法，用于检测生物样品中NF及其代谢物的含量，其灵敏度能够满足NF药代动力学和体外代谢研究的需要。选用Nova-Pak C18分析柱，使分析时间缩短，以甲醇-水作为流动相代替了价格昂贵的乙腈，节省了分析费用。由于NF易溶于乙酸乙酯，故样品处理用水饱和的乙酸乙酯一次性提取，方法简便，回收率较用甲苯-乙烷高[6]，与用三氯甲烷-戊烷接近[9]。NF在人肝微粒体中代谢需NADPH再生系统，只生成一个主要代谢物，与文献[5,14]报道相同。NF在人肝微粒体内由二氢吡啶氧化生成吡啶。是血浆中的主要代谢物，该代谢物在体内进一步水解成尿中代谢物[8]。NF在人肝微粒体内消除速率的Vmax与报道中按代谢物生成计算的Vmax接近[3]。近年发现，硝苯吡啶及其它二氢吡啶类化合物的氧化代谢均由P450ⅢA（P450NF）负责，此外P450ⅢA还参与奎尼丁氧化[10]、aldrin环氧化、17β-雌二醇2和4位羟化、睾酮6β-羟化、d-苯丙脱脱甲基反应[3]以及某些毒物或致癌物的代谢活化[11]。因此以NF作为典型底物研究P450ⅢA的代谢规律具有重要意义。

参 考 文 献

[1] Kleinbloesem GH, et al. Biochem Pharmacol 1984; 33:3721

[2] Schellens JHN, et al. Biochem Pharmacol 1988; 37:2507

[3] Guengerich FP, et al. J Biol chem 1986; 261:5051

[4] Bocker RH, et al. J Med Chem 1986; 29:1596

[5] Horning MG, et al. In: Mitchell JR, Horning MG, ed. Drug Metabolism and Toxicity, Raven Press, New York. 1988:353

[6] 何坎，等. 药学学报（待发表）

[7] Lenk W, Biochem Pharmacol 1976; 25:997

[8] Böje K, et al. J Pharmacol Exp Ther. 1989; 249:567

[9] Kleinbloesem CH, et al. J Chromatogr. 1984; 308:209

[10] Guengerich FP, et al. Mol Pharmacol 1986; 30:287

[11] Guengerich FP, et al. Chem Res Toxicol 1991; 4:391

（收稿日期1992-02-17）

HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRATHY ASSAY FOR NIFEDIPINE IN BIOLOGICAL FLUIDS AND KINETICS OF NIFEDIPINE METABOLISM BY HUMAN LIVER MICROSOMES

He Kan, et al

Department of Pharmacology

A high-performance liquid chromatographic method was developed to determine nifedipine in biological fluids, by using ultraviolet detection at 240 nm. Phenacetin was chosen as internal standard. A Nova-Pak C18(4 um, 3.9×150mm) was employed