

大鼠胆汁中四种盐酸非洛普代谢物的 HPLC测定法及其动态研究

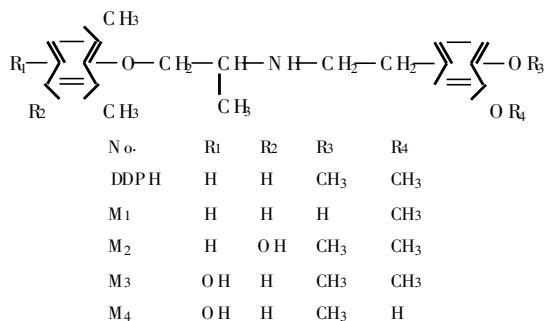
丁黎 张正行 陈 浩 戴 路 倪沛洲¹ 王广基² 安登魁

(中国药科大学药物分析学教研室;¹有机化学教研室;新中新药研究中心,南京 210009)

摘要 建立了同时测定大鼠胆汁中4种盐酸非洛普(DDPH)I相代谢物的HPLC方法。胆汁样品经盐酸水解后以Alltech C₁₈固相萃取小柱纯化富集,然后进行HPLC分析。色谱柱为Hypersil ODS2 10^μ 30 cm×4.6 mm ID,流动相为甲醇-水-三乙胺-冰乙酸(450:550:1:0.7),检测波长为278 nm。测定了ip DDPH后大鼠胆汁中4个DDPH代谢物的体内动态。结果表明M₁和M₂为DDPH主要体内代谢产物。给药后5 h DDPH代谢产物的胆汁累积排泄量已达胆汁总排泄量的75%~80%。给药后0.5~1 h时间段DDPH代谢物的胆汁排泄速率达峰值。

关键词 盐酸非洛普;代谢物;高效液相色谱法;固相萃取;测定;胆汁

盐酸非洛普(phenoprolamine hydrochloride)的化学名为1-(2,6-二甲基苯氧基)-2-(3,4-二甲氧基苯乙胺基)丙烷盐酸盐(DDPH)。DDPH是在研究慢心律衍生物的过程中得到的一个兼具弱钙拮抗活性的α₁受体拮抗剂,现正作为降压新药开发^[1~3]。DDPH在体内代谢较快,其体内主要I相代谢产物为M₁、M₂、M₃和M₄,结构如下:



为了研究DDPH相代谢产物在大鼠胆汁中的动态及判定胆汁中主要的DDPH相代谢产物,本文设计了同时测定大鼠DDPH代谢产物的HPLC方法,并用该法测定了ip DDPH后不同时间段上述4种代谢产物在大鼠胆汁中的排泄情况。

1 仪器及试药

Shimadzu LC-6A 平流泵; Waters 486TM可变波长紫外吸收检测器; HS色谱数据工作站 Ver 3.

4 for DOS(杭州英谱科技开发有限公司); 500 mg 6ml Alltech C₁₈固相萃取小柱(Cat No. 205350); M₁、M₂、M₃、M₄对照品(中国药科大学有机化学教研室合成,纯度高于99.5%);甲醇、冰乙酸、三乙胺均为分析纯;L半胱氨酸(上海康达氨基酸厂,批号980601)。

标准溶液:M₁、M₂、M₃、M₄均配成100.0^μg/ml的甲醇溶液。雄性SD大鼠由中国药科大学动物室提供。

2 实验方法

2.1 色谱条件

色谱柱为Hypersil ODS2 10^μ 30 cm×4.6 mm ID,流动相为甲醇-水-三乙胺-冰乙酸(450:550:1:0.7),流速1 ml/min,检测波长278 nm,灵敏度为0.001 AU FS,温度为20°C。

2.2 大鼠胆汁样品的采集

取健康成年雄性SD大鼠3只,以5 ml/kg的剂量ip 2%乌拉坦溶液,待大鼠麻醉后将其固定于鼠板上,打开腹腔,作胆管插管,插管后以2 ml/kg的剂量ip 5 mg/ml的DDPH溶液,于给药后0~0.5,0.5~1,1~1.5,1.5~2,2~3,3~4,4~5.5~6,6~8,8~12和12~24 h 10个时间段分别收

集胆汁,每个时间段以 ip方式补充生理盐水 1 ml

2.3 胆汁样品的测定方法

取胆汁样品 0.5 ml,置 10 ml 离心管中,加入 L-半胱氨酸 20 mg,浓盐酸 0.2 ml,涡旋 10 s,加塞密封后于 100°C 水浴水解 30 min,取出放冷后以 3500 r/min 离心 5 min,取上清液以 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 6~7,供 C₁₈小柱预处理用。

取 Alltech C₁₈固相萃取小柱一根,以 10 ml 甲醇洗脱活化,再以 10 ml 水洗去甲醇,将上述调节 pH 至 6~7 的胆汁样品滤过 C₁₈小柱,弃去滤过液,小柱依次分别以 10 ml 水,10 ml 甲醇水(1:10)洗脱,弃去洗脱液,小柱再以 5 ml 甲醇洗脱,收集甲醇洗脱液,于 40°C 水浴以氮气流吹去甲醇,残渣加 200 μl 流动相,涡旋 10 s 后以 3500 r/min 离心 5 min,取上清液 20 μl 供 HPLC 分析,色谱图见图 1 M₁, M₂, M₃, M₄ 的保留时间分别为 73.7, 38.3, 28.0 和 19.5 min。

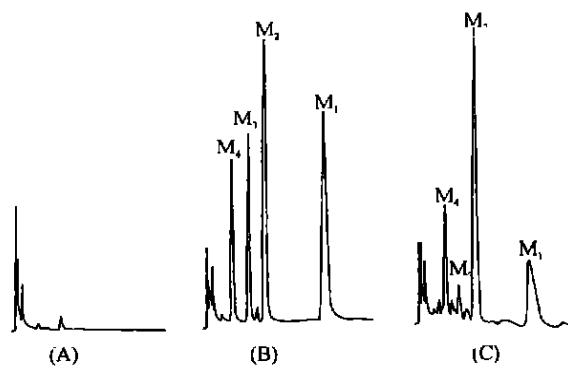


Fig 1. Chromatograms of (A) blank rat bile, (B) blank rat bile with metabolite M₁, M₂, M₃ and M₄, (C) rat bile after ip administration of DDPH

3 结 果

3.1 线性关系考察

取离心管数支,分别精密加入不同量的 M₁, M₂, M₃ 和 M₄ 的标准溶液,以 1 ml 空白大鼠胆汁配成含 M₁ 和 M₂ 分别为 30.0, 60.0, 120.0, 250.0, 500.0, 1000.0 μg/ml, 含 M₃ 分别为 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 160.0, 320.0 μg/ml, 含 M₄ 分别为 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 160.0 μg/ml 的系列标准胆汁液,按“胆汁样品的测定方法”项下操作,记录峰面积,以各代谢物的峰面积(Y)对浓度(C)进行回归计算,结果表明 4 种 DDPH 代谢产物在上述各自浓度范围内线性良好。在 30.0~1000.0

μg/ml 浓度范围内 M₁ 和 M₂ 的回归方程分别为: Y = 7996.5C - 25131, r = 0.998; Y = 11067C - 107367, r = 0.999 在 10.0~320.0 μg/ml 浓度范围内 M₃ 的回归方程为 Y = 17094C - 25789, r = 0.998 在 5.0~160.0 μg/ml 浓度范围内 M₄ 的回归方程为 Y = 22259C - 65493, r = 0.998

3.2 精密度试验

按“线性关系考察”项下操作配制含 M₁ 和 M₂ 的浓度分别为 60.0, 250.0, 1000.0 μg/ml, 含 M₃ 的浓度分别为 20.0, 80.0, 320.0 μg/ml, 含 M₄ 的浓度分别为 10.0, 40.0, 160.0 μg/ml 的低、中、高三浓度的标准胆汁液,每种浓度 5 份,进行分析,记录峰面积。测得 M₁, M₂, M₃, M₄ 在低、中、高三浓度的 RSD(%, n=5) 分别为: 5.7, 3.9, 2.7, 5.2, 3.6, 3.1; 6.3, 4.5, 2.5; 7.1, 5.0, 3.3

3.3 回收率试验

按“精密度试验”项下操作,配制 M₁, M₂, M₃, M₄ 低、中、高三浓度的标准胆汁液,每种浓度 5 份,进行分析,记录峰面积 (Y_x)。另分别取 M₁, M₂, M₃, M₄ 标准溶液适量于离心管中,配成与上述三种浓度相一致的甲醇溶液,取各浓度的甲醇溶液 0.5 ml 以氮气流吹干,残渣以 200 μl 流动相溶解,进行 HPLC 分析,记录峰面积 (Y_s)。胆汁中各代谢物的回收率(%) = Y_x / Y_s × 100%。结果表明 M₁, M₂, M₃, M₄ 低、中、高三浓度标准胆汁的回收率(%, n=5) 及 RSD(%) 分别为: 86.1(5.3), 93.5(3.5), 98.9(2.1); 98.2(5.4), 98.3(3.8), 96.9(2.6); 91.3(7.1), 92.4(4.2), 93.3(3.0); 84.2(6.9), 87.1(4.6), 91.6(2.5)

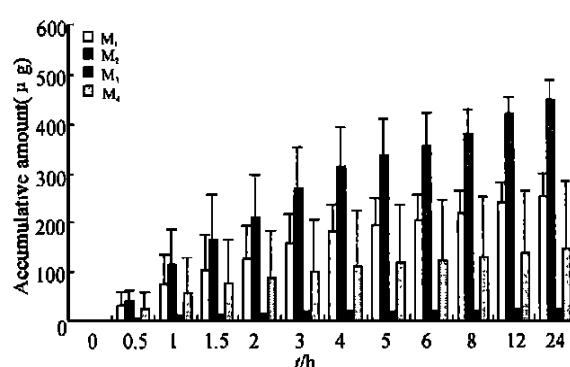


Fig 2. Accumulative amount of metabolite M₁, M₂, M₃ and M₄, in rat bile after ip administration of DDPH

3.4 大鼠胆汁中 DDPH 代谢产物的动力学研究

大鼠 ip DDPH 后,4 种代谢物在不同时间段

从胆汁中排出的累积量见图 2,各时间段从胆汁中排出速率见图 3。从图 2 可见 M_2 为 DDPH 的主要 I 相代谢产物,其次是 M_1 ,各代谢物转化率的顺序为 $M_2 > M_1 > M_4 > M_3$ 。给药后 5 h, DDPH 代谢物的胆汁累积排泄量已达胆汁中总排泄量的 75%~80%。由此可见 DDPH 在体内代谢速度较快。从图 3 可见, M_1 、 M_2 、 M_3 、 M_4 在 0.5~1 h 时间段排出速率达峰值。

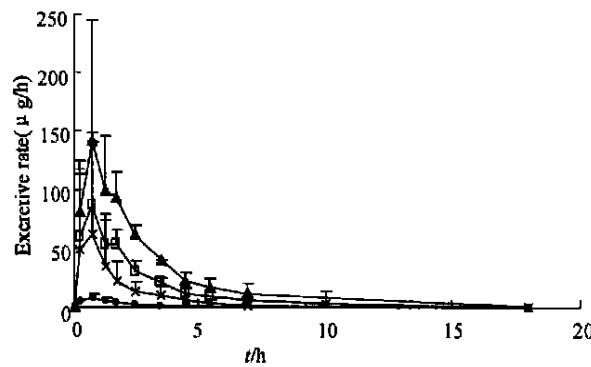


Fig. 3. Excretory rate curve of metabolite M_1 , M_2 , M_3 and M_4 , in rat bile after ip administration of DDPH

—□— M_1 ; —▲— M_2 ; —●— M_3 ; —×— M_4

4 讨论

本实验采用 Alltech C₁₈固相萃取小柱对胆汁

样品中的 DDPH I 相代谢物进行纯化富集。胆汁水解样品上柱后,先以 10 ml 水洗脱水溶性杂质,如 NaCl 等,再以甲醇-水(1:10)进一步洗去胆汁中的一些内源性杂质,然后再用甲醇将小柱中的 DDPH 代谢物洗下,以氮气流吹干浓缩。实验中曾考察了以① 甲醇-水(1:20)② 甲醇-水(1:10)和③ 甲醇-水(1:5)三种洗脱液对上柱后的样品进行纯化。结果表明,以① 纯化后的样品色谱图中杂峰仍较多,干扰物对 M_4 的测定仍有一定影响;以② 和③ 纯化的样品色谱图中杂峰较少,4 个 DDPH 代谢物出峰均未受到干扰,但洗脱液③ 中有少量 M_4 被洗脱下来,而洗脱液② 并无此现象,故胆汁上柱后,选择洗脱液② 来纯化样品。

参 考 文 献

- 1 倪沛洲,钱家庆,唐伟方等.一种抗高血压药物苯氧烷胺类化合物的结晶的制作方法. CN 1031369C
- 2 倪沛洲,彭久合,夏霖等. α_1 受体拮抗剂 DDPH 类似物的合成及其降压活性. 中国药科大学学报, 1992, 23(4): 203
- 3 彭久合,夏霖,倪沛洲等. α_1 受体拮抗剂 DDPH 相关的芳氧烷胺类化合物的合成与降压活性. 中国药科大学学报, 1998, 29(2): 81

Simultaneous Determination of Four Metabolites of Phenoprolamine Hydrochloride and Their Pharmacokinetics in Rat Bile by HPLC

DING Li, ZHANG Zheng-Xing, CHENG Hao, DAI Lu, NI Pei-Zhou¹, WANG Guang-Ji² and AN Deng-Kui

Department of Pharmaceutical Analysis;¹Department of Organic Chemistry;²Xinzhong New Drug Research Center, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract A HPLC method was designed for the simultaneous determination of four metabolites of phenoprolamine hydrochloride (DDPH) in rat bile. After hydrolysis by hydrochloric acid the rat bile was purified and enriched by the Alltech C₁₈ solid phase extraction column, and then determined by HPLC. Chromatography was performed on a Hypersil ODS2 Column (30 cm × 4.6 mm ID, 10^μm) with methanol-water-triethylamine-acetic acid (450:550:1:0.7) as mobile phase. The detection wavelength was 278 nm. The designed HPLC method was applied to determine the pharmacokinetics of four DDPH metabolites in rat bile. The experimental results showed that, in rat bile, metabolite M_1 and M_2 were the major metabolites of DDPH, 5 h after ip administration of DDPH the accumulative amount of excreted metabolites reached to 75%~80% of total excreted amount of metabolites, and during the period of 0.5~1 h the excretion rate of metabolites of DDPH in rat bile reached the maximum value.

Key words Phenoprolamine hydrochloride; Metabolite; HPLC; Solid phase extraction