bradycardia-depndent early afterdepolarizations. Afterdepolarizations and ventricular arrhythmias. *Circ Res* 1988; **63** : 286

10 Graham B, Gilmour RF, Stanton MS, Zipes DP. QPC-88117 suppresses early and delayed afterdepolarizations and arrhythmias induced by cesium, 4-aminopyridine and digitalis in situ. *Am Heart J* 1989; **118** : 708.

11 Bailie DS, Inoue H, Kaseda S, Beu-David J, Zipes DP. Magnesium suppression of early afterdepolarizations and ventricular tachyarrhythmias induced by cesium in dogs. *Circulation* 1988; **77** : 1395.

12 Adelmann WJ jr, French RJ. Blocking of the squid axon potassium channel by external cesium ions. *J Physiol* (Lond) 1978; **276** : 13.

13 January CT, Riddle JM, Salata JJ. A model for early afterdepolarizations: Induction with the Ca^{++} channel agonist Bay K 8644. *Circ Res* 1988; **62** : 563.

14 Jia HJ, Liu X, Yan YF, Ye YW. Comparison of anti-arrhythmic activities of valproic acid derivatives in animals. *Acta Pharmacol Sin* 1988; **9** : 37.

BIBLID: ISSN 0253-9756 中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1992 Mar; **13** (2) : 163-166

间硝苯啶的高压液相色谱法测定及在兔体内的药物动力学

梁颖彬、马小亚、武国杰、王莉芳、刘登科[1]、邢建峰、赵更生
(西安医科大学临床药理研究所、西安 710004、中国)

Determination of *m*-nifedipine and its pharmacokinetic study in rabbits by high-pressure liquid chromatography

LIANG Ying-Bin, MA Xiao-Ya, WU Guo-Jie, WANG Li-Fang, LIU Deng-Ke[1], XING Jian-Feng, ZHAO Geng-Sheng (*Institute of Clinical Pharmacology, Xi'an Medical University, Xi'an 710004, China*)

ABSTRACT A high-pressure liquid chromatographic method was developed for determination of *m*-nifedipine in plasma using a chemical bonded C-18 phase column (YWG-C_{18} 10 μm, made in China) with nitrendipine as internal standard. To increase life of the YWG-C_{18} column a mixture of methanol and 5 mmol · L^{-1} phosphate buffer (70:30 vol / vol) was selected as mobile phase with a flow rate of 0.8 ml · min^{-1}. The method was sensitive to *m*-nifedipine 3 ng · ml^{-1} plasma and the standard curve was linear from 10 to 1000 ng · ml^{-1} with correlation coefficient of 0.99. The within-day and day-to-day precisions (CV) of this method were 4.5% and 7.0%, respectively, with recoveries of 95-102% (10-1000 ng · ml^{-1}). There was no interference with nifedipine, amiodarone, propranol, and verapamil.

A pharmacokinetic study on *m*-nifedipine was carried out in 8 rabbits. A better computer fitted to a two-compartment model was observed using 3P87 program. The parameters obtained were as follow: V_c 6.3 L · kg^{-1}, Cl 0.021 L · kg^{-1} · min^{-1}, $T_{\frac{1}{2}\alpha}$ 30 min, $T_{\frac{1}{2}\beta}$ 230 min, AUC 102 μg · min · ml^{-1}.

KEY WORDS high pressure liquid chromatography; *m*-nifedipine; pharmacokinetics

提要 为分析生物样本中的间硝苯啶，作者建立了用国产 YWG-C_{18} 填充柱、以含低浓度磷酸盐缓冲液和甲醇作流动相的 HPLC 法。方法准确、简捷、选择性高，最低检测浓度 3 ng · ml^{-1}，且色谱柱寿命大为延长，间硝苯啶在兔体内代谢符合二室开放模型：V_c 6.3 L · kg^{-1}, Cl 0.021 L · kg^{-1} · min^{-1}, $T_{\frac{1}{2}\alpha}$ 230

Received 1990 Sep 22 Accepted 1991 Dec 20

[1]Now in *Tianjin Institute of Pharmaceutical Industry, Tianjin 300090, China.*

min, $T_{\frac{1}{2}\beta}$ 30 min, AUC 102 μg · min · ml^{-1}.

关键词 高压液相色谱法; 间硝苯啶; 药物动力学

间硝苯啶(*m*-nifedipine, *m*-Nif)化学名4-(3′硝基苯基)-2,6-二甲基-3,5-二乙氧基羰基-1,4-二氢吡啶，近年经我国学者系统地研究[1-4]，表明是一很强的钙通道阻滞剂，心血管作用较硝苯啶(nifedipine, Nif)强而持久，而抑制心肌作用却较弱；推测 *m*-Nif 治疗心力衰竭、抗高血压和抗心绞痛较 Nif 为优. 有关 *m*-Nif 在生物样本中的测定及药物动力学研究未见文献报道. 本文报告测定 *m*-Nif 的简便、准确、选择性高的高压液相色谱法及用于兔体内药物动力学研究结果，为临床监测、人体药动学及生物利用度研究提供参考.

MATERIALS AND METHODS

药品和动物 *m*-Nif 和内标物尼群地平(nitrendipine, Nit)，均由天津医药工业研究院提供. 二氯甲烷、甲醇、磷酸氢二钠和磷酸均为 AR. 家兔 8 只，♀♂各半，体重 2.2 ± *s* 0.1 kg，由西安医科大学动物场提供.

仪器与色谱条件 岛津 LC-4A 色谱仪串联 ERC-3520 脱气装置、C-R3A 数据处理机、可变波长紫外检测器(均为日本岛津公司产品). 不锈钢柱 4× 250 mm，固定相 YWG-C_{18}，10 μm(天津化学试剂二厂)，流动相：甲醇-磷酸盐缓冲液 5 mmol · L^{-1} (70 : 30, vol / vol) pH 6.1，检测波长 237 nm，柱温 45℃，流速 0.8 ml · min^{-1}. 流动相用前通过 0.5 μm 漏斗过滤.

贮备液及标准溶液 *m*-Nif 溶于甲醇制备贮备液 0.1 mg · ml^{-1}，用前稀释成标准溶液 10-1000 ng · ml^{-1}. Nit 溶于甲醇制成内标溶液 0.1 mg · ml^{-1}，用前稀释为 2 μg · ml^{-1}. 两种贮备液置于 4℃冰箱中，使用期 1 周.

血浆样本预处理 血浆 0.5 ml，置于 10 ml 离心管中，肝素抗凝，加入内标稀释液 50 μl (含 Nit 100 ng)，继加 NaOH 0.5 mol · L^{-1} 0.2 ml 及二氯甲烷 5 ml，旋涡振荡提取 1 min，共 2 次，离心(500 × *g*) 5 min，移取有机层于 50℃氮气流下挥干，残渣加甲醇 50 μl 溶解，取 15-25 μl 进样.

血浆中提取 *m*-Nif 的标准曲线 离心管中各加入 *m*-Nif 标准溶液 0.5 ml，浓度分别为 10，50，100，200，300，500，700，1000 ng · ml^{-1}，在氮气流下挥干，加入空白血浆 0.5 ml，按前述方法处理测定. 每份样本测 3 次. 计算 *m*-Nif 色谱峰高对内标峰高之比，以峰高比(H_m / H_i)对浓度(C)进行回归计算.

日内精密度及日间精密度 日内精密度与日间精密度各用 3 种 *m*-Nif 浓度的血浆样本进行测定，各测定 5 次，日间精密度为连续 5 d 测定的结果.

回收率 6 种不同浓度的 *m*-Nif 标准溶液分别移入各离心管中，在氮气流下挥干后，加入空白血浆 0.5 ml 按前述方法进行预处理，但内标含于最后溶解残渣的甲醇中，如同外标. 算出 H_m / H_i 峰高之比后，由血浆中提取 *m*-Nif 的标准曲线回归方程计算结果.

血浆 *m*-Nif 最低检测浓度 制备含不同浓度 *m*-Nif 的血浆样本，每种浓度 3 份，如前处理后，残渣加甲醇 50 μl 溶解，进样 15 μl，取分析信号与噪音信号之比为 2 时的浓度为最低检测浓度.

药物动力学研究 兔 8 只禁食过夜，以 30%聚乙二醇-400 作溶媒，制备 *m*-Nif 溶液 0.5 mg · ml^{-1}，经耳缘 iv，单剂量 2.5 mg · kg^{-1}，缓缓于 5 min 注完. iv 后 10，30，50，70，100，220，340，460 min，由另一耳采集静脉血样，肝素抗凝，立即离心(500 × *g*)分取血浆、贮于-10℃冰室中供分析用.

RESULTS AND DISCUSSION

血浆 *m*-Nif 的测定 在建立分析 *m*-Nif 的色谱条件时，曾试用磷酸盐缓冲液 0.02 和

0.01 mol · L^{-1} 的浓度[5,6]，但因柱效迅速下降和容易招致色谱系统阻塞而放弃，经多次系统试验后找出用磷酸盐 5 mmol · L^{-1} 和甲醇作流动相，能显著延长色谱柱寿命，且不出现阻塞。典型色谱图 Fig 1 显示本法对血浆内源物及结构十分类似的 Nif 分离良好。

Fig 1. Chromatogram of control plasma spiked with 500 ng · ml^{-1} nifedipine (peak 1. Rt 6.13 min) and internal standard (peak 2, Rt 8.94 min) and *m*-nifedipine (peak 3, Rt 11.37 min)

m-Nif 的标准曲线 10-1000 ng · ml^{-1} 范围内为一直线(Fig 2)，$r=0.99$ ($n=3$)。

本文方法的重复性符合血药浓度测定要求[7] (Tab 1)：

用二氯甲烷提取的回收率为 95-102%，$n=4$，(Tab 2)。实测的最低检测浓度为 3 ng · ml^{-1}，$n=3$。

干扰试验 血浆中加入硝苯啶、胺碘酮、尼群地平、普萘洛尔、维拉拍米 5 种常用于治疗心血管病的药物，按前述方法提取测定。Tab 3 显示这些药物对测定无干扰。

药物动力学研究 8 只兔 iv *m*-Nif 后，各时间点的血样用本文方法测定。每只兔的血药浓度-时间数据分别用中国数学药理专业委员会提供的"3P87"程序，在 IBM-pc 机上拟合曲线。根据 F 检验、γ^2 值比较[7]及 AIC

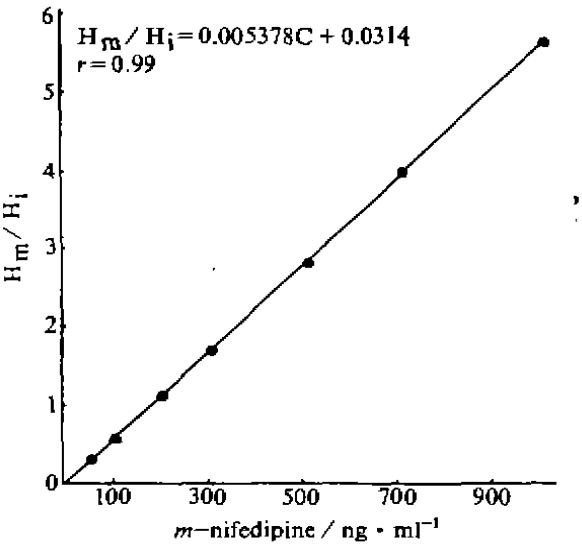

Fig 2. Standard curve of *m*-nifedipine in plasma H = peak high, i = internal standard, m = *m*-nifedipine

Tab 1. Precision of *m*-Nif in plasma by HPLC, $n=5$, $\bar{x} \pm s$.

Theoretical, ng · ml^{-1}	Within-day experiment, ng · ml^{-1}	CV, %	Day-to-day experiment, ng · ml^{-1}	CV, %
10	9.7 ± 0.4	4.5	9.9 ± 0.7	7.0
500	506 ± 20	3.9	493 ± 33	6.7
1000	992 ± 41	4.1	997 ± 63	6.3

Tab 2. Recovery of *m*-Nif from plasma. $n=4$.

Added, ng · ml^{-1}	Found, ng · ml^{-1}	Recovery, % $\bar{x} \pm s$	CV
10	9.5 ± 0.5	95 ± 5	5.3
50	47.7 ± 2.1	95 ± 4	4.2
100	102 ± 4	102 ± 4	3.9
200	191 ± 7	96 ± 4	4.1
500	510 ± 24	102 ± 5	4.9
1000	1017 ± 41	102 ± 4	3.9

Tab 3. Relative HPLC retention times of 5 drugs (nitrendipine = 1).

Drug	Relative retention time
Nifedipine	0.68
Amiodarone	0.82
Nitrendipine	1.00
m-Nifedipine	1.27
Propranolol	2.15
Verapamil	no peak

法[8]判定均为二房室开放模型. 药物动力学参数列于 Tab 4. 由中央室 V_c 6.3 L · kg^{-1} 远高于(体水 / kg)值, 可知 *m*-Nif 容易进入组织并与组织"固体"成份"结合"[9]. *m*-Nif 在兔体内的 $T_{\frac{1}{2}\beta}$ (Tab 4)与Nif人体 $T_{\frac{1}{2}\beta}$ (3.5 ± 0.2 h)[10] 一致, 此外兔二房室模型也与人体药物动力学模型相同.

Tab 4. Pharmacokinetic parameters after iv *m*-Nif 2.5 mg · kg^{-1} in 8 rabbits.

Parameter	$\bar{x} \pm s$
A / ng · ml^{-1}	73 ± 26
α / min^{-1}	0.021 ± 0.008
B / ng · ml^{-1}	299 ± 105
β / min^{-1}	0.0031 ± 0.001
V_c / L · kg^{-1}	6.3 ± 2.0
$T_{\frac{1}{2}\alpha}$ / min	30 ± 11
$T_{\frac{1}{2}\beta}$ / min	230 ± 53
K_{21} / min^{-1}	0.017 ± 0.004
K_{10} / min^{-1}	0.0046 ± 0.0018
K_{12} / min^{-1}	0.0040 ± 0.0017
AUC / μg · min · ml^{-1}	102 ± 35
Cl / L · kg^{-1} · min^{-1}	0.021 ± 0.005

m-Nif 有优异的药效学特点, 而且合成简便; 我们在另外的工作中曾证明 *m*-Nif 对光稳定[11]而 Nif 光解迅速. 本文作者认为进一步研究 *m*-Nif 的人体药动学有重要意义. 本文方法灵敏、简捷、选择性高, 由于分析是用国产固定相完成的, 故方法适合国情也较经济; 在药物动力学研究中又证明本方法稳定, 可靠, 可用于临床血药浓度监测.

REFERENCES

1 Rao MR, Liang MD, Liu GY, Liu F, Zhang HQ. Effects of *m*-nifedipine, a calcium antagonist, on cardiac performance and oxygen consumption in anesthetized animal: a comparison with nifedipine. *Acta Pharm Sin* 1984; **19** : 101-7.

2 Rao MR, Liang MD, Liu F, Shen XH, Zou X. Effects of *m*-nifedipine on contractile responses in the isolated atria and coronary vessels: a comparison with nifedipine. *Acta Pharm Sin* 1986; **21** : 321-5.

3 Wu XD, Rao MR. Comparison of actions of *m*-nifedipine and nifedipine on isolated guinea pig atria and rabbit aortic strips. *Acta Pharmacol Sin* 1989; **10** : 58-61.

4 Chen NH, Rao MR. Protective effects of *m*-nifedipine and nifedipine on ischemic-reperfused injury in working guinea pig hearts. *Acta Pharmacol Sin* 1989; **10** : 156-61.

5 Pietta P, Rava A, Biondi P. High-performance liquid chromatograph of nifedipine, its metabolites and photochemical degradation products. *J Chromatogr* 1981; **210** : 516-21.

6 Kleinbloesem CH, Van Harten J, Ven Brummlen P, Breimer DD. Liquid chromatographic determination of nifedipine in plasma and of its main metabolite in urine. *J Chromatogr Biomed Appl* 1984; **308** : 209-16.

7 Zeng YL. Two aspects about curve fitting in pharmacokinetics; weighting of experimental data and discrimination between linear compartmental models. *Acta Pharm Sin* 1980; **15** : 571-6.

8 Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J Pharmacokinet Biopharm* 1978; **6** : 165-75.

9 Yu YW. Pharmacokinetic parameters and knowledge: which are necessary in clinic. *Chin J Clin Pharmacol* 1987; **3** : 219-28.

10 Yang TH, Zhang JS, Liu GJ, Chen G. Studies on the controlled-release pellets of nifedipine. *Acta Pharm Sin* 1989; **24** : 622-28.

11 Liang YB, Wu GJ, Ma XY, Wang LF. Studies on photochemical degradation of nifedipine analogs and the new photodegradation-assay method under fluorescent lamp. *Kexue Tongbao* 1991; **36** : 1263-6.