

用 HPLC-FLU 法测定人血浆中双嘧达莫的浓度及其药动学

周燕文¹, 刘倩², 李新春³, 石全¹, 黄静玲⁴ (1. 广西医科大学第一附属医院国家药品临床研究基地, 广西 南宁 530021; 2. 2004 级研究生, 3. 2001 级研究生, 4. 2004 届药理学毕业实习生)

[摘要] 目的: 建立测定人血浆中双嘧达莫浓度的 HPLC-FLU 分析方法, 并对其在人体内的药动学进行研究。方法: 采用 HPLC-FLU 法, 色谱柱为 Kromasil C₁₈, 流动相为乙腈-20 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钠(含 0.4% 三乙胺, pH 6.5) (50: 50), 流速 1.0 mL·min⁻¹。激发波长为 290 nm, 发射波长为 485 nm。用乙腈沉淀蛋白后取上清液进样, 测定双嘧达莫血药浓度。结果: 血浆中双嘧达莫在 50.0~4 000.0 μg·L⁻¹ 浓度范围内线性良好($r=0.9998$), 最低检测浓度为 25.0 μg·L⁻¹, 低、中、高 3 个浓度的平均回收率分别为 95.53%, 109.54%, 105.04%, 日内、日间 RSD 均小于 9%。结论: 本方法简便、准确、干扰少, 检出灵敏度高, 可用于双嘧达莫的药动学研究。

[关键词] 双嘧达莫; HPLC-FLU 法; 血药浓度; 药动学

[中图分类号] R969.1 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2006)03-0273-03

HPLC-FLU determination and pharmacokinetics study of dipyridamole in human Plasma

ZHOU Yanwen¹, LIU Qian², LI Xinchun³, SHI Quan¹, HUANG Jingling⁴ (Base of Drug Clinical Test of The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Guangxi Nanning 530021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC-FLU method for determination and pharmacokinetics study of dipyridamole in human plasma. **METHODS** The HPLC-FLU was adopted with a Kromasil C₁₈ column. A mobile phase consisting of acetonitrile-20 mmol·L⁻¹ sodium phosphate monobasic (containing Triethylamine 0.4%, pH 6.5) (50: 50) was used with a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, Ex was 290 nm, Em was 485 nm. The proteins were precipitated with acetonitrile, the sample was injected to determine the plasma concentration of dipyridamole. **RESULTS** The linear ranges of dipyridamole was 50.0-4 000.0 μg·L⁻¹ ($r=0.9998$), the detection limit was 25.0 μg·L⁻¹, the average recoveries of low, middle and high concentration were 95.53%, 109.54%, 105.04% respectively, the RSD for intraday and interday were both less than 9%. **CONCLUSION** The method was simple, accurate and sensitive, and suitable for the study of pharmacokinetics of dipyridamole.

KEY WORDS: dipyridamole; HPLC-FLU; drug concentration in human plasma; pharmacokinetics

双嘧达莫(dipyridamole), 又名潘生丁, 具有扩张冠状动脉作用, 长期以来在临床上用于防治心绞痛; 因其具有抗血小板凝聚作用, 亦被用于预防心肌梗死复发及血栓形成等。随着双嘧达莫的广泛应用, 对其研究也不断增多, 本文建立 HPLC-FLU 法测定双嘧达莫血药浓度, 可用于双嘧达莫的药动学、生物等效性研究。

1 材料

日本 Shimadzu LC-10A 高效液相色谱仪, RF-535 荧光检测器, 威玛色谱工作站; Shimadzu RF-5301pc 荧光分光光度计。双嘧达莫片(江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号 0212252, 规格: 25 mg/片); 双嘧达莫对照品(江苏恒瑞医药股份有限公司, 含量 99.5%); 乙腈(HPLC 级, 美国 Tedia 公司, 批号 305102)、甲醇(HPLC 级, 美国 Tedia 公司, 批号 304013); 磷酸二氢钠、三乙胺、磷酸(国产分析纯), 水为二次纯化水。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温为室温(约 25 ℃), 流动相: 乙腈-20 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钠(含 0.4% 三乙胺, pH 6.5) (50: 50), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 激发波长 290 nm, 发射波长 485 nm, 衰减 16。

2.2 血样采集 18 名男性健康受试者[体重(62.0±5.2) kg] 禁食 12 h 后, 于清晨口服 200 mg 药物, 于服药前和服药后 0.33, 0.67, 1, 1.5, 2, 3, 4, 4.5, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 24, 36 h 抽取静脉血各 3 mL。血样置含有肝素的离心管中, 立即离心, 分离出血浆, 置-20 ℃冰箱中保存至测定。

2.3 血样处理与测定 取 0.2 mL 血浆置入 2 mL 塑料具塞离心管中, 加入 0.4 mL 乙腈, 涡旋混合 1 min, 高速离心 5 min(13 000 r·min⁻¹), 取 20 μL 上清液进样分析。

2.4 数据处理 t_{max} , C_{max} 均用实测值, K_n : 以消除

[作者简介] 周燕文, 女, 硕士, 主任药师, 电话: 0771-5356080, E-mail: zyw7789@sina.com

相时间对浓度的对数进行线性回归, 得斜率乘以 -2.303 , $t_{1/2} = 0.693/K_n$, $AUC_{0-\infty}$: 以梯形面积法求得, $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_t/K_n$, $CL/F = X_0/AUC_{0-\infty}$, $V_d/F = X_0/(K_n \cdot AUC_{0-\infty})$ 。

3 结果

3.1 色谱行为 图 1(A、B、C、D) 分别为空白血浆、药物标准品、空白血浆中加入药物标准品和受试者服药后血浆色谱图, 双嘧达莫的保留时间约为 5.4 min。

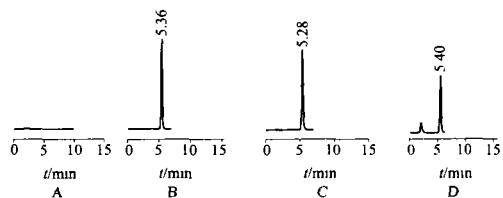


图 1 双嘧达莫高效液相色谱图

A. 空白血浆; B. 药物标准品; C. 空白血浆加药物标准品; D. 受试者服药后血浆色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of dipyridamole

A. blank plasma; B. standard; C. blank plasma with standard; D. plasma obtained from a volunteer

3.2 线性关系与检测限 取双嘧达莫对照品精密称定 5.0 mg, 置于 25 mL 的棕色量瓶中, 加甲醇溶解, 并定容至刻度, 配成 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准储备液, 置于 4 °C 冰箱中保存。在空白血浆中加入双嘧达莫标准液, 准确配成 50.0, 100.0, 250.0, 500.0, 1 500.0, 3 000.0, 4 000.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准血浆浓度系列。取上述标准血浆各 0.2 mL 于 2 mL 塑料离心管中, 余照“血浆样品的处理”项下操作。测定双嘧达莫的峰面积。当 $S/N \geq 3$ 时, 血浆中双嘧达莫的最低检测浓度为 $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。血浆中双嘧达莫在 $50.0 \sim 4 000.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内线性良好, 回归方程为: $C = 0.005 04 + 1.498 2 \cdot r = 0.999 8$ 。

3.3 回收率及精密度试验 配制浓度为 100.0, 500.0, 2 000.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的双嘧达莫人血浆样品标准管, 按“血浆样品的处理”项下操作, 按回归方程计算实测浓度, 分别在同一天内测定 5 次和每天 1 次连续测定 5 d, 分别考察方法的日内、日间精密度和回收率。日内 RSD 为 1.73% ~ 8.11% ($n = 5$); 日间 RSD 为 3.40% ~ 3.92% ($n = 5$)。回收率在 95.53% ~ 109.54% 之间 ($n = 5$)。见表 1。

3.4 稳定性试验 根据研究的具体情况, 进行了双嘧达莫测定的稳定性研究。方法如下: 采用空白血浆, 加入适当的双嘧达莫标准液, 配制双嘧达莫浓度为 100.0, 500.0, 2 000.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血浆各 5 mL, 然后各取 0.2 mL 分装于 2 mL 的塑料管中, 分别进行即时测定、室温放置 2 h、室温放置 6 h; 冻融 1 次、

表 1 血浆中双嘧达莫回收率和日内、日间精密度测定 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Tab 1 Recovery rate, precision of dipyridamole in human plasma ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	回收率 / %	日内 RSD / %	日间 RSD / %
100.00	95.5 ± 1.8	1.94	3.40
500.00	109.5 ± 8.9	8.11	3.92
2 000.00	105.0 ± 1.8	1.73	3.74

冻融 2 次、冻融 3 次; $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻 8, 25, 90 d。同时考察双嘧达莫标准品溶液冷藏条件下 ($4 \text{ }^{\circ}\text{C}$) 的稳定性。结果表明在上述测定条件下, 双嘧达莫基本稳定。

3.5 药动学研究 18 名健康受试者口服双嘧达莫 200 mg 后的主要药动学参数计算结果见表 2。平均血药浓度-时间曲线图见图 2。

表 2 口服 200 mg 双嘧达莫后的药动学参数 ($n = 18$)

Tab 2 Pharmacokinetics parameters of dipyridamole after a single oral dose 200 mg ($n = 18$)

参数	测定值	参数	测定值
K_n / h^{-1}	0.12 ± 0.07	$AUC_{0-36} / \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	$11 890.2 \pm 504.0$
$C_{\text{max}} / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$2 498.3 \pm 817.9$	$AUC_{0-\infty} / \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	$12 827.6 \pm 5 836.5$
$t_{\text{max}} / \text{h}$	1.3 ± 0.8	$CL/F / \text{L} \cdot \text{h}^{-1}$	17.8 ± 5.8
$t_{1/2} / \text{h}$	8.2 ± 4.4	$V_d / F / \text{L}$	208.21 ± 143.8

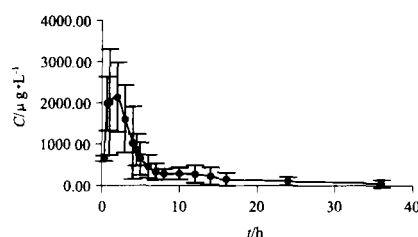


图 2 18 名健康受试者口服 200 mg 双嘧达莫后的平均药时曲线图
Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of dipyridamole after a single oral administration of 200 mg

4 讨论

双嘧达莫的血药浓度测定方法国内外相关文献^[1~3]报道大多采用 HPLC-UV 法, 也有报道采用 HPLC-ESI-MS 法^[4]。我们曾采用 HPLC-紫外法测定, 但在实验过程中发现紫外法灵敏度较低, 不能满足药动学研究或生物等效性研究的要求。本实验建立了 HPLC-FLU 法测定人血浆中双嘧达莫的浓度, 该法有较高的灵敏度和选择性, 且出峰时间适宜, 无杂质峰干扰。

文献报道的双嘧达莫血样处理方法^[1~3]为提取浓集法, 操作过程复杂。本实验血样处理采用乙腈沉淀蛋白法简便、易行、相对回收率高。该法重现性好, 日内、日间误差均小于 9%。

有关双嘧达莫人体药动学研究国内未见报道。我们的研究结果发现: 双嘧达莫在人体吸收快, 消除

快; 其中几例受试者的血药浓度- 时间曲线呈现双峰现象, $t_{\max}$ 值个体间差异较大; 在单剂量给药 10 h 左右呈现普遍的血药浓度回升的现象, 这与国外文献^[6,7] 报道相类似。由于有 2 例受试者在消除相末期血药浓度有回弹现象, 导致由此计算的 $t_{1/2}$ 值个体间差异也较大。这些现象估计与双嘧达莫血浆蛋白结合率高有关^[6~8], 双嘧达莫与血浆蛋白结合率高达 99. 24%, 双嘧达莫进入体内与血浆蛋白结合, 其游离型与结合型间的动态再分布致双峰现象以及在消除相的血药浓度回升。个体间血浆蛋白的差异导致了双嘧达莫体内过程的较大个体差异。这提示: 必要时双嘧达莫应个体化给药; 另外联合用药时还应注意潜在的药物相互作用。

参考文献:

[1] Wolfram KM, Bjornsson TD. High performance liquid chromatographic analysis of dipyridamole in plasma and whole blood [J]. J Chromatogr, 1980, 183(1): 57.

[2] 王文刚, 崔光华, 王睿, 等. 双嘧达莫缓释微丸的药动学及相对生物利用度研究[J]. 中国新药杂志, 2002, 11(8): 612-615.

[3] 黄雪梅, 项光剑, 郭晓春, 等. 反相高效液相色谱法测定双嘧达莫的血药浓度[J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(11): 668.

[4] 彭慧, 王峰, 朱荣华, 等. HPLC-ESI/MS 测定中国健康人体内血浆中的双嘧达莫[J]. 中南药学, 2004, 2(3): 146.

[5] 国家药典委员会. 附录 XIXB 药物制剂人体生物利用度和生物等效性试验指导原则. 中华人民共和国药典 2000 年版二部, 北京: 化学工业出版社, 2000. 附录 193-197.

[6] Mahony C, Wolfram KM, Cocchetto DM, *et al.* Dipyridamole kinetics in man[J]. Clin Pharmacol Ther, 1982, 31: 33-38.

[7] Bjornsson TD, Mahony C. Clinical pharmacokinetics of dipyridamole[J]. Thromb Res Suppl, 1983, 4: 93-104.

[8] Janos Szebeni, John N. Weinstein. Dipyridamole binding to proteins in human plasma and tissue culture media[J]. J Lab Clin Med, 1991, 6: 485-492.

[收稿日期] 2005-08-22

替罗非班治疗急性冠状动脉综合症的疗效和安全性评价

杨晓燕¹, 龚培力¹, 王琳², 李芳², 王朝晖³, 王秋芬³, 陈健³, 党瑜华⁴, 赵洛沙⁴, 许爱国⁴, 刘鹏⁴ (1. 华中科技大学同济医学院临床药理研究所, 湖北 武汉 430030; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院, 湖北 武汉 430030; 3. 华中科技大学同济医学院附属协和医院, 湖北 武汉 430022; 4. 郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450000)

[摘要] 目的: 在应用肝素和阿司匹林的基础上, 研究替罗非班治疗急性冠状动脉综合症的疗效和安全性。方法: 本试验是一项多中心、随机、双盲、安慰剂对照临床研究。入选急性冠状动脉综合症患者 200 例。在均使用阿司匹林和肝素的基础上, 试验组 101 例给予替罗非班(负荷量 $0.4 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \times 30 \text{ min}$, 然后 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 静脉滴注), 对照组 99 例给予安慰剂, 疗程 2~5 d。结果: 试验组 30 d 内复合终点事件(顽固性心绞痛/新的心肌梗死/死亡)的发生率较对照组显著降低($P < 0.01$); 试验组 ST 段下移程度和缺血导联数明显减少, 血小板聚集率明显降低, 两组比较均有显著差异($P < 0.01$)。5 d 内和 30 d 内试验组死亡、新的心肌梗死和顽固性缺血等终点事件的发生率亦有降低趋势, 但两组比较无显著差异($P > 0.05$)。替罗非班组主要不良反应为出血(发生率 13%), 与对照组(发生率 7%)比较无统计差异($P > 0.05$)。结论: 在阿司匹林和肝素治疗基础上, 替罗非班可明显降低急性冠状动脉综合症患者心肌缺血相关事件的发生率, 改善心电图心肌缺血表现, 且安全性较好。

[关键词] 替罗非班; 阿司匹林; 肝素; 急性冠状动脉综合症

[中图分类号] R969.4 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2006)03-0275-04

Effect and safety of tirofiban in the treatment of acute coronary syndromes

YANG Xiao-yan¹, GONG Pei-li¹, WANG Lin², LI Fang², WANG Zhao-hui³, WANG Qiu-fen³, CHEN Jian³, DANG Yu-hua⁴, ZHAO Luo-sa⁴, XU Ai-guo⁴, LIU Peng⁴ (1. Institute of Clinical Pharmacology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan 430030, China; 2. Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan 430030, China; 3. Xiehe Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan 430022, China; 4. First Affiliated Hospital, Henan University, Henan Zhengzhou 450000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the efficacy and safety of tirofiban in the treatment of acute coronary syndromes (unstable angina or non-Q-wave myocardial infarction) on a background of heparin and aspirin therapy. **METHODS** This was a multicenter, randomized, double blind and placebo-controlled trial. Received concomitant heparin and aspirin, 200 patients

[作者简介] 杨晓燕, 女, 硕士, 讲师, 电话: 027-83657702