

大鼠血浆中伊伐布雷定及其活性代谢物的 HPLC 测定法和药动学研究

李纳 施孝金* 张在丽 钟明康 (复旦大学附属华山医院临床药理学研究室 ,上海 200040)

摘要: 目的 建立 HPLC-荧光检测法来同时测定大鼠血浆中伊伐布雷定及其活性代谢物 *N*-去甲基伊伐布雷定的浓度,研究单剂量口服伊伐布雷定在大鼠体内的药动学。方法 以盐酸曲马多为内标,采用 C₂ 柱固相萃取法处理血浆。色谱条件: 色谱柱: Kromasil-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm 5 μm); 流动相: 乙腈-10 mmol·L⁻¹ 的磷酸二氢钾溶液(含 0.1% 的 1.2 mol·L⁻¹ 盐酸)(22:78); 流速: 1.8 mL·min⁻¹; 柱温: 25℃; 荧光检测波长: 激发波长 λ_{ex}=283 nm, 发射波长 λ_{em}=328 nm。大鼠灌胃给予伊伐布雷定水溶液 1.5 mg·kg⁻¹ 后,按规定时间点取血并测定血浆中的伊伐布雷定及代谢物 *N*-去甲基伊伐布雷定的浓度,绘制药-时曲线,采用 DAS 2.0 软件计算药动学参数。结果 伊伐布雷定及其活性代谢物 *N*-去甲基伊伐布雷定的血药浓度线性范围分别为 0.5~80 μg·L⁻¹、0.8~100 μg·L⁻¹; 相关系数(*r*) 均大于 0.999,最低定量限分别为 0.5 和 0.8 μg·L⁻¹; 方法回收率分别为 96.67%~103.47%、90.5%~101.25%; 批内精密度分别为 9.34%~13.73%、9.14%~12.35%; 批间精密度分别为 5.9%~10.42%、4.18%~11.39%。伊伐布雷定及其活性代谢物 *N*-去甲基伊伐布雷定在大鼠体内的血药浓度-时间曲线符合二室模型,其主要药动学参数: *t*_{1/2} 分别为(2.84±1.43) 和 (5.732±2.89) h, ρ_{max} 分别为(217.83±86.04) 和 (9.76±2.79) μg·L⁻¹, *t*_{max} 分别为(0.57±0.16) 和 (0.54±0.13) h, AUC₀₋₄ 分别为(534.46±179.20) 和 (25.93±4.34) μg·h·L⁻¹。结论 本实验所建立的同时测定血浆中伊伐布雷定及其活性代谢物 *N*-去甲基伊伐布雷定的 HPLC-固相萃取-荧光测定的方法简便、快速、灵敏、准确、可靠,能够满足血药浓度和药动学研究的需要。

关键词: 伊伐布雷定; *N*-去甲基伊伐布雷定; 高效液相色谱法; 固相萃取; 药动学

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)15-1195-05

Determination of Ivabradine and Its Active Metabolite *N*-desmethyliyabradine in Rat Plasma by HPLC and Their Pharmacokinetic Study

LI Na, SHI Xiao-jin*, ZHANG Zai-li, ZHONG Ming-kang(Department of Clinical Pharmacology, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a HPLC method with fluorescence detection for the simultaneous determination of ivabradine and its active metabolite *N*-desmethyliyabradine in rat plasma, and to investigate their pharmacokinetic behaviors after single oral dose in rat. **METHODS** Tramadol hydrochloride was used as internal standard, and the drugs were extracted from plasma by SPE method with C₂ column. Separation was achieved on a C₁₈ reversed-phase analytical column(4.6 mm×250 mm 5 μm) at 25℃. The mobile phase consisted of acetonitrile-10 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄ (containing 0.1% 1.2 mol·L⁻¹ hydrochloride) (22:78) and delivered at 1.8 mL·min⁻¹. The excitation and emission wavelengths were 283 and 328 nm, respectively. The rats were given ivabradine solution at 1.5 mg·kg⁻¹ via ig. The plasma concentrations of ivabradine and its metabolite were determined, and their pharmacokinetic parameters were processed by DAS 2.0 pharmacokinetic software. **RESULTS** A good linearity was obtained over the range of 0.5~80 μg·L⁻¹ for ivabradine and 0.8~100 μg·L⁻¹ for its metabolite *N*-desmethyliyabradine with both the correlation coefficient (*r*) > 0.999. The lower limits of quantitation of ivabradine and its metabolite were 0.5 and 0.8 μg·L⁻¹, respectively. The recoveries of method were 96.67%~103.47% for ivabradine and 90.5%~101.25% for *N*-desmethyliyabradine. The precisions of intra-batch were 9.34%~13.73% and 9.14%~12.35%, respectively. The precisions of inter-batch were 5.9%~10.42% and 4.18%~11.39%, respectively. The results indicated that the *in vivo* kinetic processes of ivabradine and *N*-desmethyliyabradine in rats were all fitted to a two-compartment model. The main pharmacokinetic parameters of ivabradine and *N*-desmethyliyabradine were as follows: *t*_{1/2} (2.84±1.43) and (5.732±2.89) h, ρ_{max} (217.83±86.04) and (9.76±2.79) μg·L⁻¹, *t*_{max} (0.57±0.16) and (0.54±0.13) h, AUC₀₋₄ (534.46±179.20) and (25.93±4.34) μg·h·L⁻¹, respectively. **CONCLUSION** The established method is proved to be simple, sensitive, exclusive and reliable, which meets the requirements of the plasma concentration determination and pharmacokinetic study.

基金项目: 国家科技部"国家科技重大新药创制"专项资助(2008ZX09312-010)

作者简介: 李纳,女,硕士研究生在读 研究方向: 新药药动学与临床药学研究 * 通讯作者: 施孝金,男,副主任药师,硕士生导师 研究方向: 新药药动学与临床药学研究 Tel: (021) 52889303 Fax: (021) 32120059 E-mail: xiaojin_shi@online.sh.cn

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net
中国药学杂志 2011 年 8 月第 46 卷第 15 期 Chin Pharm J 2011 August, Vol. 46 No. 15 • 1195 •

伊伐布雷定 (ivabradine, S16257) 是一种新开发出来的抗心绞痛药, 并且是第一个窦房结 I_f 电流选择特异性抑制剂。已经被欧盟批准用于禁用或不耐受 β 受体阻断剂、伴有正常窦性心律的慢性稳定型心绞痛患者的对症治疗。该药的主要优点是单纯减缓心率, 降低心肌耗氧量, 增加冠状动脉的血流灌注量, 同时对心肌收缩、房室传导及心室复极化无影响, 从而可改善耐受性^[1-2]。伊伐布雷定在体内主要经由细胞色素 P450 CYP 3A4 酶代谢, 生成多种代谢物, 其中 *N*-去甲基代谢物 (S18982) 同样具有相同的药理活性, 也有抑制 I_f 起搏电流, 降低心率的作用^[3]。因此, 临床血药浓度监测、药动力学和药效学研究有必要同时测定原药和代谢物。

国外文献报道的测定体内伊伐布雷定及其代谢物的分析方法有 HPLC-荧光检测法^[4]和质谱法^[5], 但是这两种方法均采用了不易获得的结构类似物作为内标, 而且质谱法的成本较高, 需要昂贵的仪器费用, 这些都不利于分析方法的推广应用。国内报道的仅有 HPLC-荧光法检测血浆中伊伐布雷定的浓度^[6], 但是该分析方法因未取得活性代谢物标准品, 仅检测了原药而没有检测其活性代谢产物。本实验在参考上述文献的基础上^[4-6], 在国内首次建立一种 HPLC-荧光-固相萃取法来同时测定大鼠血浆中伊伐布雷定及其 *N*-去甲基活性代谢物 (S18982), 该方法采用廉价易得的盐酸曲马多为内标, 简单、灵敏、快速、重复性好, 并且在此基础上研究了伊伐布雷定单次灌胃给药后在大鼠体内的药动力学过程, 为临床研究和应用提供参考依据。

1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 2475 型荧光检测器, Millennium³² 液相色谱工作站 (美国 Waters 公司); BP211 型分析天平 (德国 Sartorius 公司); 3K15 型低温高速冷冻离心机 (德国 Sigma 公司); WH-861 漩涡混合器 (江苏太仓市科教器材厂); Milli-Q 超纯水仪 (美国 Millipore 公司); SB5200 超声仪 (上海 Branson 公司); Varian Bond Elut C₂ 固相萃取柱 (Varian 公司, 100 mg, 1 mL)。

盐酸伊伐布雷定 (S16257) 对照品 (上海优拓医药科技有限公司, Utopharm Company Limited, 批号 148849-67-6, 纯度 $\geq 99.9\%$), *N*-去甲基伊伐布雷定 (S18982) 对照品 (上海优拓医药科技有限公司, Uto-

pharm Company Limited, 批号: 20100101, 纯度 $\geq 98\%$), 盐酸曲马多对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 171242-200302, 纯度 $\geq 98\%$)。甲醇、乙腈为色谱纯, 盐酸、乙酸、磷酸二氢钾为分析纯。

SPF 级 SD 大鼠 9 只, δ , 体重 (214 \pm 10) g [复旦大学医学院动物科学部, 实验动物使用许可证号码: SYXK(沪) 2009-0082]。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Kromasil-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-10 mmol \cdot L⁻¹ 的磷酸二氢钾溶液 (含 0.1% 的 1.2 mol \cdot L⁻¹ 的盐酸) (22:78); 流速: 1.8 mL \cdot min⁻¹; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 荧光检测波长: 激发波长 λ_{ex} = 283 nm, 发射波长 λ_{em} = 328 nm。

2.2 溶液配制

对照品储备液配制: 精密称定盐酸伊伐布雷定, 盐酸 *N*-去甲基伊伐布雷定 10.8 mg (相当于含伊伐布雷定 10 mg, 含 *N*-去甲基伊伐布雷定 10 mg), 分别置于 10 mL 棕色量瓶中, 用超纯水溶解并定容, 得质量浓度均为 1 g \cdot L⁻¹ 的伊伐布雷定和 *N*-去甲基伊伐布雷定储备液, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。使用时用超纯水进一步稀释至浓度适当的工作液。

内标工作液配制: 精密称定盐酸曲马多 11.4 mg (相当于含曲马多 10 mg), 置于 10 mL 量瓶, 超纯水溶解并定容, 摇匀, 得质量浓度为 1 g \cdot L⁻¹ 的盐酸曲马多储备液。进一步用超纯水稀释至 2 mg \cdot L⁻¹ 的内标工作液, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

2.3 血浆样品预处理

精密吸取血浆 0.5 mL, 加入内标工作液溶液 100 μ L、超纯水 400 μ L, 涡旋 30 s 混匀, 上 C₂ 固相萃取柱 (依次用 1 mL 甲醇、1 mL 水活化), 然后依次用 1 mL 水、0.5 mL 的 50% 甲醇水溶液洗涤。另换干净的 4.5 mL 接收试管, 用 500 μ L 2% 的乙酸甲醇溶液洗脱 2 次, 充分抽干, 收集洗脱液。在 40 $^{\circ}$ C 水浴下氮气流干后, 用 100 μ L 超纯水复溶, 涡旋 30 s 充分混合均匀, 进样 30 μ L。

2.4 色谱行为

大鼠空白血浆, 大鼠空白血浆加伊伐布雷定、*N*-去甲基伊伐布雷定及盐酸曲马多以及大鼠灌胃后的血浆样品色谱图见图 1。内标盐酸曲马多、伊伐布雷定及 *N*-去甲基伊伐布雷定的色谱峰保留时间分

别为 4. 67 9. 74 ,11. 28 min ,无内源性杂质峰及伊伐布雷定其他代谢产物干扰。

2. 5 标准曲线及最低定量限

于空白血浆中加入适量的含伊伐布雷定和 *N*-去甲基伊伐布雷定的系列混合标准工作液 ,配成含伊伐布雷定的质量浓度为 0. 5 ,1 ,2. 5 ,5 ,20 ,40 ,80 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;含 *N*-去甲基伊伐布雷定的质量浓度为 0. 8 ,1. 6 ,4 ,10 ,25 ,50 ,100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准血浆样品 ,按“2. 3”项下操作 ,进样测定。以待测物与内标峰面积比值为纵坐标 (*Y*) ,血浆中样品的质量浓度 (ρ) 为横坐标 ,用加权 ($w = 1/c$) 最小二乘法作线性回归 ,得回归方程为伊伐布雷定: $Y = 0. 027\ 3\rho + 0. 031\ 3$ ($r = 0. 999\ 4$) ;*N*-去甲基伊伐布雷定:

$Y = 0. 029\ 4\rho - 0. 014\ 8$ ($r = 0. 999\ 5$) 。结果显示血浆中伊伐布雷定在 (0. 5 ~ 80) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、*N*-去甲基伊伐布雷定在 0. 8 ~ 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 内呈现良好的线性 ,*r* 值均大于 0. 999。本方法测定的血浆中伊伐布雷定和 *N*-去甲基伊伐布雷定的最低定量限分别为 0. 5 和 0. 8 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2. 6 萃取回收率

取空白血浆加入适量的含伊伐布雷定和 *N*-去甲基伊伐布雷定的混合对照品工作液 ,配成低、中、高 3 种质量浓度的标准血浆样品各 6 份 ,其中含伊伐布雷定的质量浓度为 1. 5 ,15 ,65 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,含 *N*-去甲基伊伐布雷定的质量浓度为 2 ,20 ,80 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,按“2. 3”项下处理测定 ,所得的待测物与内标峰面积比 ,与未经提取的 6 份含同量的伊伐布雷定和 *N*-去甲基伊伐布雷定的混合对照品工作液比较 ,以计算方法的萃取回收率。结果血浆样品中伊伐布雷定的低、中、高 3 个浓度的萃取回收率分别为 (87. 09 ± 8. 53) % , (90. 43 ± 6. 16) % , (91. 23 ± 7. 29) % ($n = 6$) ;*N*-去甲基伊伐布雷定的低、中、高 3 个浓度的萃取回收率分别为 (89. 43 ± 9. 74) % , (91. 39 ± 5. 34) % , (92. 74 ± 6. 23) % ($n = 6$) 。按照同样方法得内标物盐酸曲马多的萃取回收率为 (83. 22 ± 4. 57) % ($n = 6$) 。

2. 7 精密度和准确度

配制含伊伐布雷定的质量浓度为 1. 5 ,15 ,65 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,含 *N*-去甲基伊伐布雷定的质量浓度为 2 ,20 ,80 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的低、中、高 3 个浓度的标准血浆质控样品 ,每一浓度进行 6 个样本测定 ,连续测定 3 批 ,计算批内及批间的精密度和准确度 ,结果见表 1。

2. 8 稳定性实验

2. 8. 1 室温稳定性 配制含伊伐布雷定的质量浓度为 1. 5 ,15 ,65 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,含 *N*-去甲基伊伐布雷定的质量浓度为 2 ,20 ,80 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的低、中、高 3 个浓

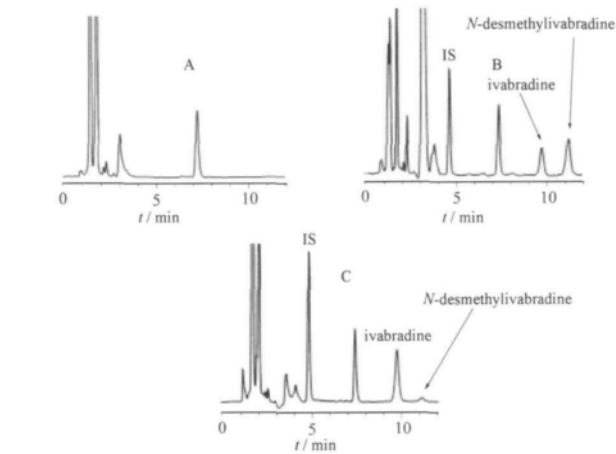


图 1 血浆中伊伐布雷定及其代谢物 *N*-去甲基伊伐布雷定的典型色谱图

A - 大鼠空白血浆图; B - 大鼠空白血浆 + 伊伐布雷定、*N*-去甲基伊伐布雷定及内标物盐酸曲马多图; C - 大鼠给药后 1 h 血浆色谱图

Fig. 1 Typical HPLC chromatograms of ivabradine and *N*-desmethyivabradine in plasma

A - rat blank plasma; B - rat blank plasma spiked with ivabradine ,*N*-desmethyivabradine and tramadol hydrochloride (internal standard) ; C - plasma sample collected at 1 h after oral administration of ivabradine in rat

表 1 伊伐布雷定及其代谢物的批内、批间精密度和准确度 . $n = 6\ \bar{x} \pm s$

Tab. 1 Intra-batch and inter-batch precision and accuracy of the method for determination of ivabradine and its metabolite. $n = 6\ \bar{x} \pm s$

Compound	Added concentration $/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Intra-batch			Inter-batch		
		Measured concentration	Precision	Accuracy	Measured concentration	Precision	Accuracy
		$/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD/%	/%	$/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD/%	/%
Ivabradine	0. 5	0. 51 ± 0. 07	13. 73	102. 00	0. 48 ± 0. 05	10. 42	96. 00
	1. 5	1. 48 ± 0. 15	10. 14	98. 67	1. 45 ± 0. 14	9. 66	96. 67
	15	14. 61 ± 1. 41	9. 65	97. 40	15. 52 ± 1. 57	10. 12	103. 47
	65	64. 68 ± 6. 04	9. 34	99. 51	64. 27 ± 3. 79	5. 90	98. 88
<i>N</i> -Desmethyivabradine	0. 8	0. 81 ± 0. 10	12. 35	101. 25	0. 79 ± 0. 09	11. 39	98. 75
	2	1. 81 ± 0. 16	8. 84	90. 50	1. 94 ± 0. 12	6. 19	97. 00
	20	19. 48 ± 1. 78	9. 14	97. 40	19. 88 ± 0. 83	4. 18	99. 40
	80	80. 31 ± 7. 74	9. 64	100. 39	79. 22 ± 3. 72	4. 70	99. 03

度的标准血浆质控样品各 3 份,在室温下放置 0,6,12 h 后,按“2.3”项下操作,进样测定。结果伊伐布雷定所测各浓度的 RSD(%) 分别为 7.69,3.43,3.61;*N*-去甲基伊伐布雷定所测各浓度的 RSD(%) 分别为 5.62,8.97,3.76。表明样品在室温下放置 12 h 内稳定。

2.8.2 提取后稳定性 配制含伊伐布雷定的质量浓度为 1.5,15,65 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,含 *N*-去甲基伊伐布雷定的质量浓度为 2,20,80 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的低、中、高 3 个浓度的标准血浆质控样品各 3 份,按“2.3”项下方法处理血样后,室温下置自动进样器中放置,分别在 0,24 h 进样测定,结果伊伐布雷定所测各浓度的 RSD(%) 分别为 5.08,5.48,8.61;*N*-去甲基伊伐布雷定所测各浓度的 RSD(%) 分别为 4.52,4.69,5.29。表明样品经提取后 24 h 内稳定。

2.8.3 冻融稳定性 配制含伊伐布雷定的质量浓度为 1.5,15,65 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,含 *N*-去甲基伊伐布雷定的质量浓度为 2,20,80 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的低、中、高 3 个浓度的标准血浆质控样品各 6 份,按“2.3”项下方法处理血样,即时测定;再于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存 24 h 后解冻测定,连续 3 次。结果伊伐布雷定所测各质量浓度的 RSD(%) 分别为 8.73,6.13,7.51;*N*-去甲基伊伐布雷定所测各浓度的 RSD(%) 分别为 5.34,6.43,5.46。表明血浆样品经历 3 次冻融循环后稳定性良好。

2.9 稀释实验

配制含伊伐布雷定的质量浓度为 160 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,含 *N*-去甲基伊伐布雷定的质量浓度为 200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准血浆样品 6 份,用空白血浆稀释 5 倍后,按“2.3”项下方法处理血样后测定,测得浓度再乘以 5 后与实际配制浓度进行比较,结果测得的伊伐布雷定浓度的方法回收率为 93.59%,RSD 为 4.52%;*N*-去甲基伊伐布雷定浓度的方法回收率为 98.26%,RSD 为 2.9%。

2.10 大鼠体内药动学实验

取 SD 雄性大鼠 9 只,实验前禁食 12 h,实验过程中自由饮水。每只实验大鼠以 1.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃给予伊伐布雷定溶液,分别于给药前和给药后 10,20,30,45 min,1,2,4,6,8,10,12,24 h 于眼眶后静脉丛取血约 500 μL ,置肝素化的离心管中,3 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,分离血浆 200 μL ,用空白血浆稀释至 500 μL ,按“2.3”项下血浆样品处理方法操作,测定血浆中伊伐布雷定及其代谢物 *N*-去甲基伊伐布雷定的浓度,得到平均血药浓度-时

间曲线图,见图 2。

药动学数据处理采用 DAS 2.0 程序软件按 AIC 最小原则,结合相关指数等指标选择最佳房室模型,计算出主要的药动学参数,其中 ρ_{max} 和 t_{max} 为实测值,AUC 为统计矩计算值。结果显示,伊伐布雷定在大鼠体内的药动学过程呈一级吸收的二房室模型,代谢物占原药的百分比为 7.2% (以 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 计算)。主要药动学参数见表 2。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

在实验初期,我们曾比较了不同比例的乙腈-水、甲醇-水、乙腈-水-磷酸等多种流动相系统。在乙腈-水系统中加入 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸二氢钾可以有效的改善峰形和分离度。用磷酸调节 pH 至 3.3 可以进一步改善峰形的拖尾现象,但是容易造成基线波动较大,难以达到有效的基线平衡,影响了方法的灵敏度。后考虑在流动相中加入 0.1% 1.2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液,基线波动较小,峰形的拖尾现象也得到明显改善。最终确定以乙腈-10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸二氢钾溶液(含 0.1% 的 1.2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸)(22:78) 作为流动相,色谱图峰形好,出峰时间适宜,可以与血浆干扰物分开,各待测物之间的分

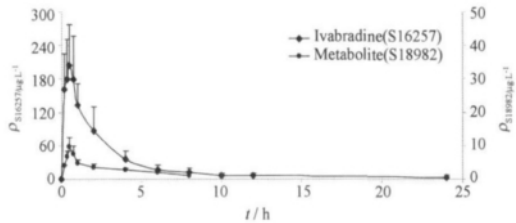


图 2 大鼠单剂量灌胃给予伊伐布雷定 1.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后原药及其代谢物的平均血药浓度-时间曲线图。 $n=9$ $\bar{x} \pm s$

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves of ivabradine and *N*-desmethyivabradine after a single oral dose of ivabradine 1.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ in rats. $n=9$ $\bar{x} \pm s$

表 2 大鼠单剂量灌胃给予伊伐布雷定 1.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后的主要药动学参数。 $n=9$ $\bar{x} \pm s$

Tab. 2 Main pharmacokinetic parameters of ivabradine after a single oral dose of 1.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ in rats. $n=9$ $\bar{x} \pm s$

Parameters	Ivabradine	<i>N</i> -desmethyivabradine
$t_{1/2}/\text{h}$	2.84 ± 1.43	5.732 ± 2.89
$\rho_{\text{max}}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	217.83 ± 86.04	9.76 ± 2.79
t_{max}/h	0.57 ± 0.16	0.54 ± 0.13
$\text{AUC}_{0-t}/\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	534.46 ± 179.20	25.93 ± 4.34
$\text{AUC}_{0-\infty}/\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	553.156 ± 172.46	39.82 ± 12.93
$\text{MRT}_{0-t}/\text{h}$	3.27 ± 1.15	3.04 ± 0.14

离效果较好。当流动相流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时,各待测物的出峰时间较晚,分析时间较长;后改流动相流速为 $1.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 各待测物的出峰时间都有所提前,使整个样品分析时间缩短至 12 min 以内,比文献报道的 20 min^[4-5] 分析时间明显缩短。

3.2 内标的选择

已报道的文献^[4-5] 采用伊伐布雷定的结构类似物(S16070)为内标,此物质在国内不易获得。参考文献^[6],选用普萘洛尔为内标,但是在本色谱条件下,普萘洛尔的保留时间偏长,影响了样品的分析速度。卡马西平、地西泮、氯氮平、格列苯脲、格列吡嗪等物质在此色谱条件下均无色谱峰出现,不能选做内标。本实验最后采用盐酸曲马多作内标,在此荧光波长下响应值高,具有合适的保留时间,对测定物质无干扰,经过固相萃取后回收率高且稳定。

3.3 血浆样品的预处理方法

血浆样品处理方法曾采用蛋白沉淀法,但是此预处理方法难以达到较高的灵敏度。伊伐布雷定及其代谢物都易溶于水,采用乙醚等有机溶剂进行液液萃取时,其提取回收率低。最后采用 C_2 小柱固相萃取的方法,血浆样品经提取后得到富集和浓缩,萃取回收率高,可以提高分析灵敏度;而且还可以有效的排除内源性物质的干扰,操作简便,有机溶剂污染小。

3.4 标准曲线范围的确定

在确定代谢物标准曲线范围时,我们做过 1 只大鼠的预实验,代谢物峰浓高于 $70 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,因此确定了文中的标曲范围 $0.8 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,并根据标曲范围确定质控样本浓度。实际实验结果没有预实验的高,而且大部分大鼠血样浓度在 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下,仅有 2 只大鼠的峰浓度接近 $12 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在完成 3 只大鼠血样测定后,在后面的 6 只大鼠测定中我们增加了 1 个 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的质控样本(即 1 个 $2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、2 个 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、1 个 $80 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的质控),所有质控样本测定结果均符合要求(RSD 均小于 $\pm 15\%$)。从实验的最终结果看最初确定的代谢物标曲范围是偏大,但大鼠实验的采血量很少,基本仅够 2 次测定,如果重做标曲的话,等于需要重做动物实验。根据后来增加的质控样本测定结果我们认为本实验测定结果虽有瑕疵但还是可以接受的。

3.5 方法学应用

大鼠灌胃给予 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 伊伐布雷定后,实验结果表明,伊伐布雷定及其代谢物 *N*-去甲基伊伐布雷定的体内药动学过程均呈线性,且为一级吸收的二室模型。伊伐布雷定原药在大鼠体内的达峰浓度为 $217.83 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,达峰时间为 34 min,说明其吸收速度快;半衰期为 2.84 h,其消除速度也快。其代谢物 *N*-去甲基伊伐布雷定的达峰浓度很低,仅为 $9.76 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;代谢物占原药的百分比为 7.2% (以 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 计算);达峰时间跟原药一致,但其半衰期为 5.73 h,消除速度相对较慢。我们建立的分析方法在药物 5 个半衰期后,仍可以检测到血浆中伊伐布雷定的浓度,证实本方法灵敏度适合于伊伐布雷定在大鼠体内的药动学研究。

4 结 论

本实验在国内首次建立了同时测定大鼠血浆中伊伐布雷定及其活性代谢物 *N*-去甲基伊伐布雷定的高效液相荧光检测方法。此方法回收率高,重现性好,专属性强,所用的血浆量少,内标物廉价易得,分析速度快,灵敏度高,对仪器设备要求低,易于普及推广,为伊伐布雷定的药动学研究和生物利用度研究提供了一种简便可靠的分析方法。

REFERENCES

- [1] VILAINE J P, THOLLON C, VILLENEUVE N. Procoralan, a new selective I(f) current inhibitor[J]. *Eur Heart J* 2003 24(suppl G): 26-35.
- [2] DIFRANCESCO D, CAMM J A. Heart rate lowering by specific and selective I(f) current inhibition with ivabradine: a new therapeutic perspective in cardiovascular disease[J]. *Drugs* 2004 64(16): 1757-1765.
- [3] RAGUENEAU I, LAVEILLE C, JOCHEMSEN R *et al*. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the effects of ivabradine, a direct sinus node inhibitor, on heart rate in healthy volunteers[J]. *Clin Pharmacol Ther* 1998 64(2): 192-203.
- [4] KLIPPERT P, JEANNIOT J P, POLVE S *et al*. Determination of ivabradine and its *N*-desmethylated metabolite in human plasma and urine and in rat and dog plasma by a validated high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection[J]. *J Chromatogr B* 1998 719(1-2): 125-133.
- [5] FRANCOIS-BOUCHARD M, SIMONIN G, BOSSANT M J *et al*. Simultaneous determination of ivabradine and its metabolites in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B* 2000 745(2): 261-269.
- [6] CUI X Y, SHI X J, LI Z D *et al*. Determination of ivabradine in rat plasma by a validated HPLC with fluorescence detector[J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志) 2010 45(4): 87-90.

(收稿日期: 2010-12-30)