

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00303

## HPLC 法测定大鼠组织中的桂利嗪

刘 燕, 娄子洋\*

第二军医大学药学院药物分析测试中心, 上海 200433

**[摘要]** **目的:**建立大鼠组织中桂利嗪的 HPLC 测定法,用于小剂量尾静脉注射给药后测定桂利嗪在大鼠组织中分布。**方法:**组织样品加 NaOH 碱化,以甲基叔丁基醚提取,采用 Hypersil C<sub>18</sub> 柱,甲醇-水-冰醋酸-三乙胺(70:30:0.6:0.4)为流动相,254 nm 波长处检测,测定了尾静脉给药 2 mg/kg 桂利嗪注射液后在 SD 大鼠心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠、脑、脂肪、睾丸等 10 个组织脏器中的分布情况。**结果:**肝组织样品最低检测限 0.02 μg/ml,线性范围 0.05~2 μg/ml,小肠组织样品最低检测限 0.02 μg/ml,线性范围 0.05~1 μg/ml,符合生物样品分析要求。桂利嗪广泛地分布于大鼠的多个组织脏器中,其中肺部浓度最高。**结论:**本法简便、准确、灵敏,适合桂利嗪临床前药代动力学组织分布研究。

**[关键词]** 桂利嗪;高压液相色谱法;组织分布

**[中图分类号]** R 917.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)03-0303-03

### HPLC in determination of tissue distribution of cinnarizine in rats

LIU Yan, LOU Zi-yang\*

Pharmaceutical Analysis Center, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To develop a HPLC method for the determination of tissue distribution of cinnarizine in rats. **Methods:** Cinnarizine (2 mg/Kg) was injected into the tail vein of rats. Tissue sample was alkalinized with sodium hydroxide solution and extracted with methyl tert-butyl ether. The separation was performed on a Hypersil C<sub>18</sub> column using methanol-water-glacial acetic acid-triethylamine (70:30:0.6:0.4) as the mobile phase at UV 254 nm. The distribution of cinnarizine in the heart, liver, spleen, lung, kidney, stomach, small intestine, brain, fat and testes was determined. **Results:** The limit of detection of cinnarizine in the hepatic tissue was 0.02 μg/ml and the linear range was 0.05-10 μg/ml. The limit of detection in the intestine tissue was 0.02 μg/ml and the linear range was 0.05-1 μg/ml, which meets the requirement for the analysis of biological samples. Cinnarizine was extensively distributed in rat body, with highest concentration found in the lung. **Conclusion:** Our method is easy to perform, accurate and sensitive, which makes it suitable for preclinical pharmacokinetic research of cinnarizine.

**[KEY WORDS]** cinnarizine; high pressure liquid chromatography; tissue distribution

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(3):303-305]

桂利嗪(cinnarizine, 1-双苯甲基-4-反式肉桂基哌嗪)为钙通道阻滞剂,系扩张脑血管周围血管的药物,临床用于治疗动脉硬化和脑血管、前庭功能失调、偏头痛等<sup>[1-2]</sup>。通常给药剂量为每日 20 mg<sup>[3]</sup>,因此血药浓度较低。桂利嗪及氟桂利嗪片剂口服后人血药浓度的测定方法主要有 HPLC 法(荧光<sup>[3-4]</sup>或紫外法<sup>[4]</sup>检测),还有采用薄层色谱法测定的<sup>[5]</sup>,但是桂利嗪注射液的临床前药代动力学组织分布情况研究的未见报道。文献报道的血浆预处理较复杂,需用混合溶剂,且运用到组织样品时对其测定有干扰。本方法中,组织样品经碱化后以叔丁基甲醚

一次提取,简化了提取步骤,且不干扰样品的测定,提取回收率在 70%以上,符合临床前药代动力学的研究要求。本实验旨在建立快速、简便、灵敏的分析方法,用于测定组织中桂利嗪的浓度,此法适合于静脉给药后的临床前药代动力学组织分布研究。

### 1 材料和方法

1.1 仪器、药品与试剂 DIONEX 高效液相色谱仪;DIONEX P680 泵;ASI-100 自动进样器;TCC-100 柱温箱;PAD-100 多波长光电二极管阵列检测器;Chromeloen 色谱工作站。

**[收稿日期]** 2007-09-03 **[接受日期]** 2007-11-08

**[作者简介]** 刘 燕,硕士生, E-mail: wdmmlly2004@126.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25070400, E-mail: louziyang@126.com

桂利嗪对照品(上海东明医药科技有限公司提供,纯度99.2%);桂利嗪注射剂(批号:060609,规格20 mg/2 ml);甲醇(色谱纯,上海星可试剂厂);三乙胺(分析纯,国药集团上海化学试剂有限公司);冰醋酸(分析纯,国药集团上海化学试剂有限公司);叔丁基甲醚(色谱纯,Sigma公司);氢氧化钠(分析纯,国药集团上海化学试剂有限公司);实验用水为市售娃哈哈纯净水。

1.2 实验动物 雄性清洁级SD大鼠,体质量180~220 g。18只大鼠随机分成6组,每组3只。

1.3 色谱条件 分析柱:Hypersil ODS<sub>2</sub>(5 μm,250 mm×4.6 mm,大连依利特科学仪器有限公司);检测波长:254 nm;流动相:甲醇-水-三乙胺-冰醋酸(70:30:0.4:0.6);流速:1 ml/min;柱温:25℃。

1.4 组织样品给药方案及桂利嗪含量测定 SD大鼠尾静脉给药2 mg/kg桂利嗪注射液,分别于给药后5、20、40、60、180和300 min处死动物,解剖取心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠、脑、脂肪、睾丸等组织脏器,用0.9%生理盐水冲去表面浮血,滤纸吸干。取各脏器组织0.5~1 g。按1:2的比例定量加入0.9%生理盐水研磨成匀浆,涡旋混匀后吸取组织匀浆液500 μl,置于10 ml具塞玻璃离心管中,加入0.5 mol/L NaOH溶液200 μl,涡旋混匀后加入提取溶剂叔丁基甲醚4 ml,涡旋3 min,于2 325×g离心10 min,分取有机相约3 ml,45℃下氮气吹干,残留物加入100 μl流动相溶解,涡旋混和,取40 μl进行HPLC分析。

## 2 结果

2.1 方法专属性 采用本实验的分离测定方法,得到的色谱图中桂利嗪峰形良好,基线平稳,桂利嗪出峰时间在9.5 min左右,组织样品中的内源性物质不干扰待测物的测定(图1)。

2.2 标准曲线和线性范围 取玻璃离心管数支,分别精密量取不同量的桂利嗪对照品系列溶液后以氮气吹干,加入空白肝组织样品500 μl,涡旋混合,配成含桂利嗪分别为0.05、0.1、0.2、0.5、1、2 μg/ml的标准肝组织样品系列,按“1.4”项下操作,以峰面积A对桂利嗪在肝组织中的浓度C作回归计算,得肝组织回归方程: $A=6.1517C+0.5117$ ( $r=0.9997$ ),线性范围为0.05~2 μg/ml,定量限为0.05 μg/ml。

另取玻璃离心管数支,同上述肝组织配制方法,配成含桂利嗪分别为0.05、0.1、0.2、0.5、1 μg/ml的小肠组织样品系列,按“1.4”项下操作,以峰面积A对桂利嗪在小肠组织中的浓度C作回归计算,得小肠组

织回归方程: $A=5.0845C+0.8385$ ( $r=0.9986$ ),线性范围为0.05~1 μg/ml,定量限为0.05 μg/ml。

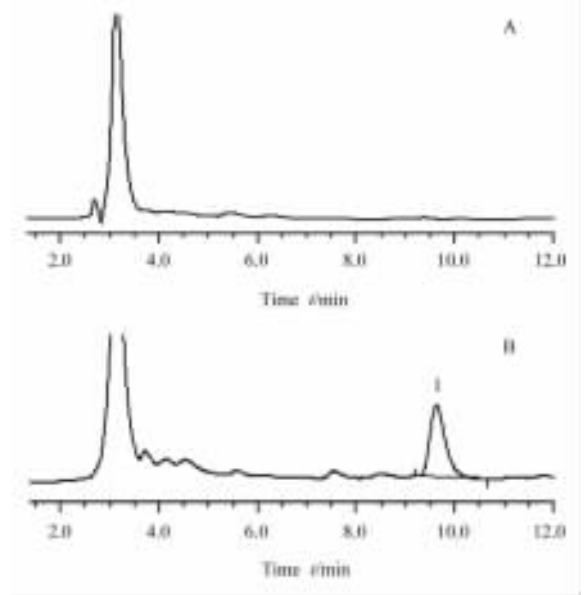


图1 空白组织样品(A)及大鼠单剂量静注2 mg/kg后组织样品(B)色谱图  
Fig 1 HPLC of blank tissue(A) and tissue sample after a single dose of 2 mg/kg (B)

1: Cinnarizine

2.3 精密度实验 按“2.2”项下方法配制桂利嗪低、中、高3个浓度(分别为0.1、0.5、2 μg/ml)的肝组织样品,每个浓度3份,连续测定3 d,按“1.4”项下操作,记录峰面积为A,求出日内和日间RSD分别为7.37%、1.25%、5.7%;8.58%、3.7%、3.54%。精密度结果符合临床前药代学的研究要求。

2.4 相对回收率实验 配制含桂利嗪0.1、0.5、2 μg/ml的低、中、高3个浓度的肝组织样品,每个浓度各3份,按“1.4”项下操作,计算所得浓度和试剂浓度的比值即相对回收率分别为109.6%、96.16%、102.1%。相对回收率结果符合临床前药代动力学研究要求。

2.5 提取回收率实验 取玻璃离心管数支,精密量取不同量的桂利嗪对照品溶液适量,以氮气吹干后,加入空白组织样品500 μl,涡旋1 min,配成含桂利嗪0.1、0.5、2 μg/ml的肝组织样品,每种浓度各5份样品,同“1.4”项下方法进行提取测定,记录桂利嗪的峰面积A。另取上述3个浓度的桂利嗪对照品溶液各500 μl,分置3个离心管中,以氮气吹干后,用100 μl流动相溶解残留物,进样40 μl测定,记录桂利嗪峰面积A<sub>s</sub>。肝组织样品中桂利嗪的提取回收率(%)=4A/3A<sub>s</sub>×100%。提取回收率结果分别为(76.11±5.20)%、(73.30±0.09)%、(73.31±1.87)%。提取回

收率实验结果符合临床前药代动力学研究要求。

2.6 组织样品的测定 测定结果中心、肝、脾、肺、肾脑、脂肪、睾丸代入肝标准曲线计算各时间点桂利

嗪的浓度,胃、小肠代入小肠标准曲线计算各时间点桂利嗪的浓度(图2)。结果表明桂利嗪在10个组织脏器中均有分布,其中肺组织中药物浓度最高。

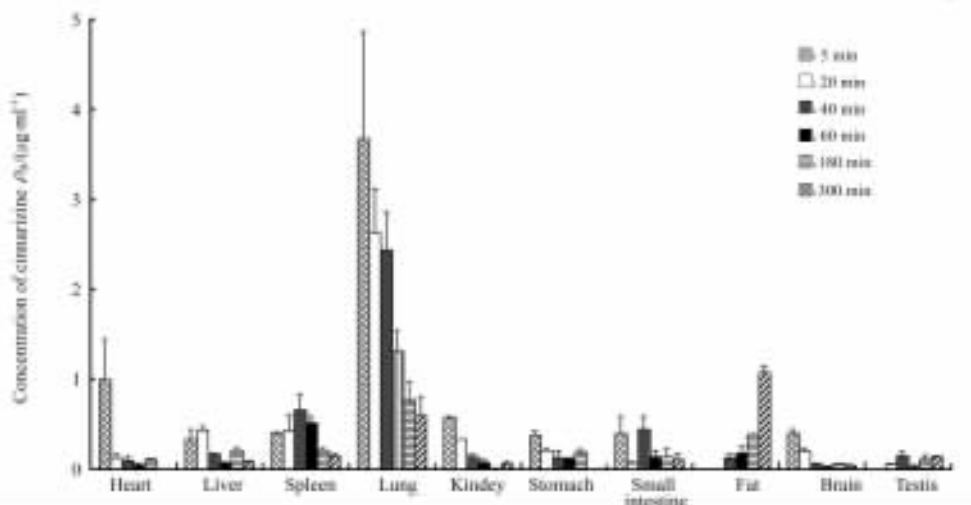


图2 SD大鼠尾静脉给药2 mg/kg桂利嗪注射液后不同时间的组织分布图

Fig 2 Tissue distribution of cinnarizine in rats at different periods after a single dose of 2 mg/kg (i. v.)

$n=3, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

3.1 血浆预处理条件的选择 预处理方法采用一次液-液萃取法,由于桂利嗪为碱性药物,所以在组织样品提取过程中加入一定量的NaOH溶液,使其在碱性条件下以分子状态存在,再以有机溶剂提取。实验中对不同组成配比的提取试剂和不同浓度的NaOH溶液进行考察,以优化提取条件。在选择提取溶剂时,我们曾使用乙醚-环己烷(2:1)、乙醚-环己烷(1:1)、正己烷-异丙醇(9:1)<sup>[6]</sup>、环己烷<sup>[7]</sup>和叔丁基甲醚5种提取溶剂,结果表明前四种溶剂提取后均有干扰,而用叔丁基甲醚提取的组织样品则干扰较少,提取回收率在70%以上。我们还考察了0.5、1、2 mol/L共3个浓度的NaOH溶液作为提取前的碱化试剂,发现用0.5 mol/L NaOH溶液碱化时峰面积响应时最高,而提高NaOH溶液浓度时响应降低25%。最终定预处理条件为加0.5 mol/L NaOH溶液碱化后以叔丁基甲醚提取。

3.2 色谱条件的选择 桂利嗪是一个非极性化合物,与反向固定相作用较强,所以使用的流动相中甲醇比例较高,加入冰醋酸是为了调节pH值,三乙胺是为了减少拖尾现象。用甲醇:水:三乙胺:冰醋酸(80:20:0.4:0.6)时,药物在6.0 min左右出峰,会受到组织样品中内源性物质的干扰。用甲醇:醋酸钠缓冲盐为流动相时基线易漂移。最终本实验确定流动相为甲醇:水:三乙胺:冰醋酸

(70:30:0.4:0.6),在此条件下桂利嗪出峰时间适宜且不受内源性物质的干扰。

3.3 组织分布特点 对桂利嗪在大鼠体内的组织分布研究表明该药物广泛的分布于各组织脏器,但是浓度均不高。其中在各个时间点肺中的浓度均最高,这可能和肺部的血流量丰富有关。该药在脑中也有分布,原因在于桂利嗪是非极性药物,能够通过血脑屏障而达到脑部。在脂肪组织中,随着时间的增加药物浓度也增大,这说明桂利嗪能在该组织中蓄积。

### [参考文献]

- [1] 刘玉真,田兰,戎欣玉,聂新永. 桂利嗪口腔崩解片的质量研究[J]. 药物分析杂志,2006,26:699-700.
- [2] 郭平,刘玉真,戎欣玉,聂新永. 桂利嗪原料药及有关物质的HPLC分析[J]. 河北科技大学学报,2006,27:214-216.
- [3] Rosseel M T, Lefebvre R A. Sensitive determination of cinnarizine in human plasma by high performance liquid chromatography and fluorescence detection[J]. Chromatographia,1993,36:356-358.
- [4] 刘振胜,赵艳,闫美兴,陈安进,王少华. HPLC法测定盐酸氟桂利嗪分散片的血药浓度及药动学研究[J]. 中国新药杂志,2005,14:1041-1044.
- [5] Hassan S S, Elmosallamy M A, Abbas A B. LC and TLC determination of cinnarizine in pharmaceutical preparations and serum[J]. Pharm Biomed Anal,2002,28:711-719.
- [6] 于华玲,陈晓艳,朱林,钟大放. 液相色谱-串联质谱法测定人血浆中氟桂利嗪[J]. 中国药学杂志,2006,41:463-466.
- [7] 李丽敏,郝欣恩,蔡信民,邹建军,张胜强,丁黎. 盐酸氟桂利嗪人体血药浓度的HPLC测定法[J]. 中国药科大学学报,2001,32:290-292.

[本文编辑] 尹茶