

泮托拉唑钠在大鼠体内药动学研究

王欣¹, 谭明芬², 黄莉莉^{1*}

1. 南京大学医学院附属鼓楼医院 药剂科, 江苏 南京 210008

2. 连云港市赣榆区畜牧兽医站, 江苏 连云港 222100

摘要: **目的** 建立 HPLC 法测定大鼠血浆中泮托拉唑钠对映体, 研究泮托拉唑钠在大鼠体内药动学特征。**方法** 血浆用醋酸乙酯提取, 以非那西丁为内标, Chiralcel OJ-RH 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 20 mmol/L 磷酸二氢钠 (含 0.01%磷酸) - 乙腈 (78 : 22), 紫外检测波长为 288 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温 40 °C。大鼠尾 iv 消旋体 16 mg/kg, HPLC-UV 法测定血浆中左旋和右旋泮托拉唑钠浓度, 并采用 DAS 2.0 软件计算药动学参数。**结果** 左旋泮托拉唑钠、右旋泮托拉唑钠线性范围均为 0.156~40.000 μg/mL, 定量限为 0.156 μg/mL。泮托拉唑钠左旋体与右旋体的主要药动学参数分别为: C_{max} (38.13±3.33)、(40.52±3.69) μg/L; $AUC_{0-\tau}$ (1 688.45±302.38)、(1 399.88±376.44) min·μg/mL; $AUC_{0-\infty}$ (1 710.61±309.40)、(1 417.29±383.21) min·μg/mL; $t_{1/2}$ (30.92±6.41)、(22.37±7.59) h。**结论** 泮托拉唑钠对映体在大鼠体内的药动学存在立体选择性特征, 为临床合理应用手性药物泮托拉唑钠提供参考。

关键词: 泮托拉唑钠; 对映异构体; 高效液相色谱; 药动学

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2016)08-1141-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2016.08.004

Pharmacokinetics of pantoprazole sodium in rats

WANG Xin¹, TAN Ming-fen², HUANG Li-li¹

1. Department of Pharmacy, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China

2. Lianyungang Ganyu Animal Husbandry & Veterinary Station, Lianyungang 222002, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method to determine pantoprazole sodium enantiomers in plasma, and study its pharmacokinetics in rats. **Methods** Pantoprazole sodium and phenacetin internal standard were extracted by liquid-liquid extraction and separated on Chiralcel OJ-RH column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), with 20 mmol/L sodium biphosphoricum (containing 0.01% phosphoric acid) - acetonitrile (22 : 78) as mobile phase. The column temperature was set at 40 °C, and the analytical wavelength was 288 nm with flow rate as 1.0 mL/min. Rats were tail iv administered with racemic pantoprazole sodium 16 mg/kg, and *L*- and *D*-pantoprazole sodium in plasma were determined by HPLC-UV method. DAS 2.0 software was used to calculate the pharmacokinetic parameters. **Results** The calibration curve was linear over the concentration range of 0.156 — 40.00 μg/mL with a sensitivity of 0.156 μg/mL as the limit of quantification. Main pharmacokinetic parameters were as following: C_{max} for *L*- and *D*-pantoprazole sodium were (38.13 ± 3.33) and (40.52 ± 3.69) μg/L; $AUC_{0-\tau}$ were (1 688.45 ± 302.38) and (1 399.88 ± 376.44) min·μg/mL; $AUC_{0-\infty}$ were (1 710.61 ± 309.40) and (1 417.29 ± 383.21) min·μg/mL; $t_{1/2}$ were (30.92 ± 6.41) and (22.37 ± 7.59) min. **Conclusion** Pharmacokinetics of pantoprazole enantiomers has a stereoselective character in rats, which provide reference for clinical rational application of chiral drug pantoprazole sodium.

Key words: pantoprazole sodium; enantiomers; chiral; HPLC; pharmacokinetics

泮托拉唑钠属于典型的质子泵抑制剂, 临床上主要用于十二指肠溃疡、Zollinger-Ellison 综合征以及其他与高胃酸相关的疾病。其结构中含有一个手

性中心硫原子, 存在一对对映异构体^[1-2]。文献报道泮多拉唑的代谢动力学存在显著的立体选择性, 且存在种属差异, 目前临床使用的为消旋体^[3-4]。在大

收稿日期: 2016-05-14

基金项目: 中华医学会医学教育研究课题资助项目 (2012-SY-44)

作者简介: 王欣, 男, 主要从事药剂和药房管理研究。Tel: (025) 83304616 E-mail: 20031269@qq.com

*通信作者 黄莉莉, 女, 主要从事药剂和药房管理研究。E-mail: zhaobao911@126.com

鼠体内右旋优先代谢, 导致服用消旋体后, 右旋体泮托拉唑钠的血药浓度和 AUC 低于左旋体泮托拉唑钠。在人体中, 参与右旋体的代谢可能主要是 CYP2C9, 表现在快代谢人群中 (+)-右旋体的 C_{\max} 和 AUC 均小于 (-)-左旋体, 相反在慢代谢人群中右旋体的 C_{\max} 和 AUC 均显著高于左旋体。近来研究显示左旋泮托拉唑钠为泮托拉唑钠的消旋单体, 为优映体, 具有比泮托拉唑钠更高的疗效^[5]。为开发泮托拉唑钠单一对映体, 有必要了解对映体在体内的构型转化。本文建立了手性固定相 HPLC-UV 法测定大鼠血浆中两种泮托拉唑钠对映体, 并探讨大鼠体内静脉注射消旋体泮托拉唑钠后 2 种泮托拉唑钠对映体在大鼠体内药动学规律, 为研究手性药物泮托拉唑钠提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂

Shimadzu 高效液相色谱仪, 包括 LC-20AD 送液泵 (双泵)、DGU-20A3 在线脱气机、SIL-20A 自动进样器、CTO-20A 柱温箱、SPD-20A 紫外检测器、CBM-20A 系统控制器和 Shimadzu Labsolutions 色谱工作站; Milli-Q Gradient A10 超纯水器 (Millipore 公司); Thermo Sorvall Stratos 台式高速冷冻离心机 (Thermo 公司); Vortex-2 旋涡混合器 (Scientific Industries 公司)。

1.2 试剂

甲醇 (色谱纯) 和乙腈 (色谱纯) 均为 Merck 公司产品, 水为超纯水, 其余试剂均为市售分析纯。

1.3 动物

SD 大鼠 6 只, 雌雄各半, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 动物生产许可证号 SCXK (沪) 2013-0016。

1.4 试药

泮托拉唑钠对照品, 规格 100 mg/支, HPLC 法测定质量分数为 95.8%, 中国食品药品检定研究院提供, 批号 100575-201505; 左旋泮托拉唑钠、右旋泮托拉唑钠对照品, HPLC 法测定质量分数分别为 98.4%、97.8%, 均由济南康和医药科技有限公司提供; 非那西丁对照品, 批号 100095-201505, 中国食品药品检定研究院提供。

2 方法与结果

2.1 对照品储备液和内标溶液的配制

2.1.1 对照品储备液的制备 精密称取左旋泮托拉唑钠、右旋泮托拉唑钠和消旋泮托拉唑钠对照品各

20.0 mg, 用甲醇溶解, 并定容至 25 mL, 均配制成 0.8 mg/mL 贮备液。临用时用甲醇稀释到相应的质量浓度。

2.1.2 非那西丁内标液的制备 精密称取非那西丁对照品 10.0 mg, 用甲醇溶解, 并定容至 10 mL, 配制成 1.0 mg/mL 贮备液。临用时用甲醇稀释到 50 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 色谱条件

Chiralcel OJ-RH 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 20 mmol/L 磷酸二氢钠 (含 0.01% 磷酸) - 乙腈 (78:22), 紫外检测波长为 288 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3 血浆样品处理

取血浆样品 100 μL , 加 50 $\mu\text{g/mL}$ 非那西丁内标 10 μL , 混均后, 加 1 mL 醋酸乙酯, 振荡 10 min, 8 000 r/min 离心 5 min, 分取上层有机层 800 μL , 45 $^{\circ}\text{C}$ 真空浓缩挥干, 100 μL 甲醇复溶, 振荡 10 min, 14 000 r/min 离心 10 min, 即得。

2.4 专属性试验

在试验条件下, 泮托拉唑钠对映体之间有较好的分离度, 血浆和组织中的杂质不干扰样品峰, 基线噪音小, 内标、左旋泮托拉唑钠和右旋泮托拉唑钠的保留时间分别约为 6.7、7.9、9.8 min, 方法专属性较高, 见图 1。

2.5 标准曲线的制备

取空白大鼠血浆 90 μL , 加 10 μL 不同质量浓度对照品溶液, 使血浆中单一对映体质量浓度分别为 0、0.156、0.312、0.625、1.25、2.50、5.00、10.000、20.00、40 $\mu\text{g/mL}$, 按血浆样品处理项下操作, 记录样品和内标峰面积, 利用样品质量浓度对样品与内标峰面积比进行线性回归, 得左旋泮托拉唑钠回归方程为 $Y=0.777X+0.023$ ($r=0.9993$), 线性范围为 0.156~40.000 $\mu\text{g/mL}$ 。右旋泮托拉唑钠回归方程为 $Y=0.772X+0.026$ ($r=0.9990$), 线性范围为 0.156~40.000 $\mu\text{g/mL}$ 。以信噪比大于 10 确定本方法的定量限为 0.156 $\mu\text{g/mL}$ 。

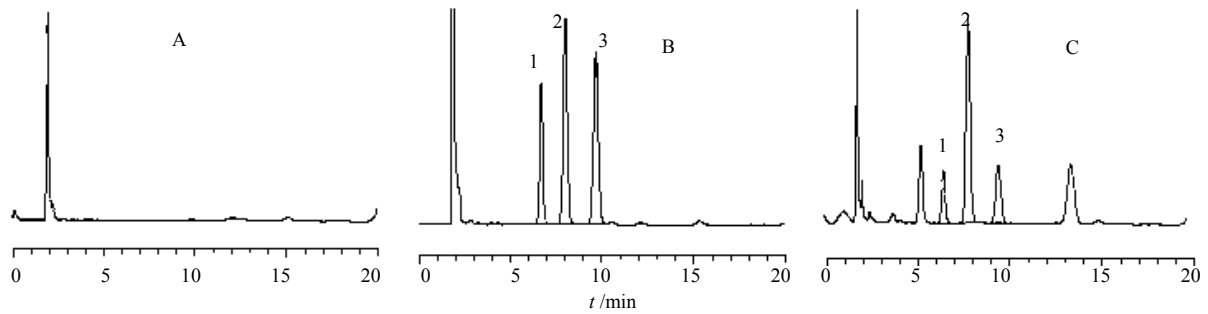
2.6 稳定性试验

取洁净的 Eppendoff 管, 加 100 μL 空白血浆和对映体对照品使相应质量浓度分别为 0.312、2.50、20.00 $\mu\text{g/mL}$, 分别考察血浆样品室温放置 6 h、进样器放置 24 h、-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻 14 d、反复冻融 3 次的稳定性, 结果表明样品在储存及测定过程中均稳定, 见表 1。

2.7 精密度和准确度试验

用空白大鼠血浆配制 0.312、2.500、20.000 $\mu\text{g/mL}$ 样品各 5 份, 连续测定 3 d, 用随行标准曲线

计算相应的药物浓度, 结果表明, 批内和批间 RSD 值均小于 10%, 准确度为 90.07%~98.96%, 结果见表 2。



A-空白血浆 B-空白血浆加入消旋泮托拉唑钠和内标非那西丁 C-iv 消旋泮托拉唑钠 1 h 后的血浆样品 1-内标非那西丁 2-左旋泮托拉唑钠 3-右旋泮托拉唑钠
A-blank plasma B-blank plasma added racemic pantoprazole sodium and phenacetin C-plasma samples of intravenous racemic pantoprazole sodium after 1 h 1-phenacetin 2-L-pantoprazole sodium 3-D-pantoprazole sodium

图 1 泮托拉唑钠血浆测定的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of pantoprazole sodium

表 1 稳定性试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)
Table 1 Results of stability test ($\bar{x} \pm s, n=5$)

加入质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	室温放置 6 h		进样器放置 24 h		-20 °C 冷冻 14 d		反复冻融 3 次	
	测得质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD%	测得质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD/%	测得质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD/%	测得质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD/%
左旋泮托拉唑钠								
0.312	0.291 \pm 0.005	2.082	0.283 \pm 0.006	3.204	0.284 \pm 0.007	2.619	0.272 \pm 0.018	7.360
2.500	2.369 \pm 0.045	2.075	2.344 \pm 0.039	1.999	2.363 \pm 0.039	2.028	0.292 \pm 0.047	2.145
20.000	19.112 \pm 0.509	3.183	20.590 \pm 0.186	1.924	19.622 \pm 0.279	1.497	19.437 \pm 0.628	3.231
右旋泮托拉唑钠								
0.312	0.272 \pm 0.003	1.082	0.294 \pm 0.002	0.784	0.278 \pm 0.007	2.637	0.271 \pm 0.013	4.831
2.500	2.369 \pm 0.041	1.904	2.356 \pm 0.044	1.886	2.361 \pm 0.051	2.169	2.289 \pm 0.045	1.971
20.000	19.197 \pm 0.615	3.203	20.610 \pm 0.400	1.940	19.668 \pm 0.297	1.508	18.772 \pm 0.579	3.085

表 2 精密度和准确度试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)
Table 2 Results of precision and accuracy ($\bar{x} \pm s, n=5$)

加入质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	日内精密度			日间精密度		
	测得质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD/%	RE/%	测得质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	RSD/%	RE/%
左旋泮托拉唑钠						
0.312	0.283 \pm 0.006	2.774	90.38	0.283 \pm 0.010	3.444	90.07
2.500	2.330 \pm 0.074	3.016	94.00	2.362 \pm 0.046	1.940	94.48
20.000	19.730 \pm 0.792	4.996	98.51	19.793 \pm 0.285	1.439	98.96
右旋泮托拉唑钠						
0.312	0.284 \pm 0.006	2.634	91.02	0.294 \pm 0.004	1.487	94.23
2.500	2.327 \pm 0.075	3.297	93.72	2.364 \pm 0.042	1.780	94.56
20.000	19.790 \pm 0.680	4.969	98.63	19.789 \pm 0.308	1.554	98.94

2.8 回收率试验

EP管加入90 μL空白血浆，加入10 μL对照品溶液，使单一对映体质量浓度分别为0.312、2.500、20.000 μg/mL，按血浆样品处理项下的方法操作，记录样品和内标峰面积(A₁)；另取EP管加入10 μL 6.250、50.000、400.000 μg/mL消旋泮托拉唑钠对照品溶液，再加入内标10 μL，挥干后甲醇100 μL复溶，离心，取上清进样，记录样品和内标峰面积(A₂)。以峰面积的比值 A₁/A₂ 计算得血浆中左旋泮托拉唑钠、右旋泮托拉唑钠和内标的回收率，结果见表3。

表3 回收率试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)
Table 3 Results of recovery test ($\bar{x} \pm s, n=5$)

质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	A ₁	A ₂	A ₁ /A ₂ /%
左旋泮托拉唑钠			
0.312	10 721 ± 345	14 263 ± 191	75.18
2.500	83 250 ± 2 942	118 917 ± 1 063	70.01
20.000	713 860 ± 38 145	977 412 ± 32 670	73.04
右旋泮托拉唑钠			
0.312	10 270 ± 500	14 200 ± 209	72.32
2.500	82 461 ± 2 959	118 830 ± 1 142	69.39
20.000	711 018 ± 37 936	977 441 ± 32 680	72.74
内标			
4.000	45 347 ± 2 307	72 569 ± 1 699	62.49

2.9 在大鼠体内药动学研究

取大鼠6只，雌雄各半，体质量(229 ± 39) g，禁食但可自由饮水12 h后，尾iv消旋体，给药剂量为16 mg/kg。于给药后2、5、10、20、40、60、90、120、180、240 min眼底静脉丛取血，于肝素处理的试管中，离心后取相应体积的血浆于-20 °C冰箱保存。HPLC法测定血浆中左旋泮托拉唑钠、右旋泮托拉唑钠的浓度，结果见图2。

利用药动学数据处理软件Data Analysis System 2.0版本(DAS2.0，中国药理学会定量药理学专业委员会)按统计矩法和一房室模型法计算主要的药动学参数，见表4。

3 讨论

在建立本分析方法的过程中，对色谱柱以及提取条件等进行了优化。文献报道显示泮托拉唑钠消旋体的测定多采用HPLC法^[6-7]。若采用手性柱HPLC法测定生物样品中泮托拉唑钠对映体时，手性柱的立体选择性强。对色谱柱进行选择时，比较

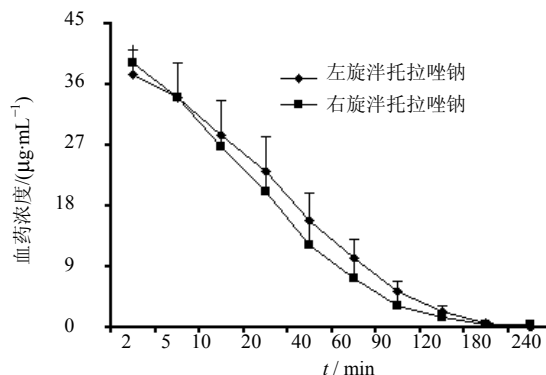


图2 大鼠血浆中泮托拉唑钠左旋体和右旋体的平均浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Plasma concentration-time curves of pantoprazole sodium L-isomer and D-isomer ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表4 泮托拉唑钠左旋体与右旋体的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Major pharmacokinetic parameters of pantoprazole sodium L-isomer and D-isomer ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	单位	左旋泮托拉唑钠	右旋泮托拉唑钠
AUC _{0-t}	min·μg·mL ⁻¹	1 688.45 ± 302.38	1 399.88 ± 376.44
AUC _{0-∞}	min·μg·mL ⁻¹	1 710.61 ± 309.40	1 417.29 ± 383.21
K ₁₀	min ⁻¹	0.023 ± 0.006	0.037 ± 0.019
V	mL·kg ⁻¹	211.30 ± 18.21	198.37 ± 1986
CL	mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	4.82 ± 0.98	6.23 ± 2.58
C _{max}	μg·mL ⁻¹	38.13 ± 3.33	40.52 ± 3.69
t _{1/2}	min	30.92 ± 6.41	22.37 ± 7.59
MRT	min	44.57 ± 9.12	32.27 ± 10.88

了Chiralcel OJ-RH、Welch Ultimate Cellu-J手性色谱柱，结果表明在Chiralcel OJ-RH手性色谱柱上可以获得峰形较好的色谱峰。在试验中发现甲醇为流动相的色谱图中杂质峰不能与泮托拉唑钠对映体很好地分离，柱效也没有乙腈体系高，所以实验中采用了磷酸二氢钠水溶液-乙腈体系，流动相中加入0.01%的H₃PO₄，可以显著改善峰形。本实验比较醋酸乙酯、氯仿、正丁醇和正己烷等有机溶剂从血浆样品提取泮托拉唑对映体的回收率以及纯净度，结果发现醋酸乙酯的提取效率最高达到70%以上，并且提取得到的样本杂质干扰最少。

有文献研究了泮托拉唑钠对映体在大鼠体内的药动学，结果发现灌胃消旋体泮托拉唑5 mg/kg后左旋体在血中的清除速度较右旋体慢，二者的t_{1/2}、K_e差异具有显著性(P < 0.05)^[8]。但也有文献报

道采用高液相色谱串联质谱方法测定犬体内泮托拉唑钠对映体, 结果表明泮托拉唑钠中左旋体与右旋体 AUC_{0-6h} 的比值是 0.94, 未发现左旋体与右旋体之间存在明显的相互转化^[9]。此外, 还有文献报道右旋泮托拉唑钠在健康人体不发生构型转化^[8]。本研究发现, 静脉注射泮托拉唑钠消旋体后左旋和右旋对映体在大鼠体内的 AUC_{0-t} 相差不大, 无统计学差异, 并且主要的药动力学参数平均驻留时间、半衰期、清除率和表观分布容积在两种泮托拉唑钠对映体中无显著性差异, 提示左旋和右旋泮托拉唑在大鼠体内未发生相互转化。

本文建立了手性固定相 HPLC-UV 法同时测定大鼠血浆中两种泮托拉唑钠对映体, 并探讨大鼠体内静脉注射消旋体泮托拉唑钠后两种泮托拉唑钠对映体在大鼠体内药动力学规律, 为研究手性药物泮托拉唑钠提供参考依据。

参考文献

- [1] Mano N, Oda Y, Takakuwa S, *et al.* Plasma direct injection high-performance liquid chromatographic method for simultaneously determining E3810 enantiomers and their metabolites by using flavoprotein- conjugated column [J]. *J Pharm Sci*, 1996, 85(9): 903-907.
- [2] Stenhof H, Blomqvist A, Lagerstrom P O. Determination of the enantiomers of omeprazole in blood plasma by normal-phase liquid chromatography and detection by atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 1999, 734(2): 191.
- [3] Thacker D L, Modak A, Flockhart D A, *et al.* Is (+)-[13C]-pantoprazole better than (±)-[13C]-pantoprazole for the breath test to evaluate CYP2C19 enzyme activity [J]. *J Breath Res*, 2013, 7(1): 016001.
- [4] Shin J M, Kim N. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the proton pump inhibitors [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2013, 19(1): 25-35.
- [5] 刘淑平, 王东凯, 王 坤, 等. RP-HPLC 法测定左旋泮托拉唑钠肠溶片的含量及有关物质 [J]. *药物分析杂志*, 2007, 27(2): 180-182.
- [6] 曹继军. 泮托拉唑钠肠溶胶囊在健康人体的药动力学和生物等效性 [J]. *中国药学杂志*, 2008, 43 (8): 617-620.
- [7] 陈灵芳, 沈卫阳, 刘东博, 等. 手性固定相 HPLC 法分离测定泮托拉唑钠对映体 [J]. *海峡药学*, 2013, 25(5): 31-33.
- [8] 唐淑含, 王学娅, 武 野, 等. 泮托拉唑钠对映体在大鼠体内的药动力学研究 [J]. *药物分析杂志*, 2006, 26(6): 730-733.
- [9] 程艳玲, 张昊然, 张莉莉, 等. 泮托拉唑钠对映体在犬体内的药代动力学研究 [J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(12): 2145-2149.
- [10] 谢智勇, 杨炳华, 张逸凡, 等. 右旋泮托拉唑在人体内构型转化的研究 [J]. *药化学报*, 2004, 39(5): 370-373.