

文章编号: 1671- 7554(2008) 10- 1016- 04

HPLC 测定人尿液三苯双脒次级代谢物对苯二甲酸浓度

徐洁^{1,2}, 袁桂艳¹, 魏春敏¹, 王本杰¹, 郭瑞臣¹

(1. 山东大学齐鲁医院临床药理研究所, 济南 250012;

2. 淄博职业学院生物工程系, 山东 淄博 255013)

摘要: 目的 建立测定人尿液三苯双脒次级代谢物对苯二甲酸(TPA)浓度的高效液相色谱法(HPLC)。方法 以阿魏酸为内标(internal standard, IS), 志愿者尿样稀释后经Ultimate XB-C₁₈柱(4.6 mm×200 mm, 5 μm)、流动相甲醇-1%醋酸(35:65, V/V)分离, 在检测波长为240 nm、流速为0.8 mL/min、柱温为30 ℃条件下采用HPLC分析。结果 在1~400 μg/mL内, TPA与IS的峰面积比值与浓度线性关系良好($r=0.9954$), 定量下限为1 μg/mL, 低、中、高浓度的相对回收率分别为(106.0±4.4)%、(107.4±4.2)%和(108.5±2.4)%, 批内和批间相对标准偏差(RSD)小于8%。结论 方法符合生物样品分析要求, 可用于三苯双脒次级代谢物TPA尿液浓度的测定。

关键词: 三苯双脒; 对苯二甲酸; 高效液相色谱法; 尿

中图分类号: R917; R969

文献标志码: A

Determination of urinary tribendimidine metabolite-terephthalic acid by HPLC

XU Jie^{1,2}, YUAN Gui-yan¹, WEI Chun-min¹, WANG Ben-jie¹, GUO Rui-chen¹

(1. Institute of Clinical Pharmacology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China;

2. Department of Biengineering, Zibo Vocational Institute, Zibo 255013, Shandong, China)

Abstract: Objective To develop a HPLC method for determination of tribendimidine metabolite terephthalic acid (TPA) concentration in human urine. **Methods** Diluted urine was separated on the Ultimate XB-C₁₈ column (4.6 mm×200 mm, 5 μm), eluted with methanol and 1% glacial acetic acid (35:65, V/V) at 0.8 mL/min and 30 ℃, and detected at 240 nm with ferulic acid as an internal standard (IS). **Results** A good linearity was obtained from 1 to 400 μg/mL ($r=0.9954$). The lower limit of quantitation (LLOQ) was 1 μg/mL. The relative recoveries were (106.0±4.4)%, (107.4±4.2)% and (108.5±2.4)% at 3, 25 and 200 μg/mL, and the intra- and inter-batch relative standard deviations (RSD) were less than 8% for all quality control samples. **Conclusion** The developed HPLC method is proved to meet the requirements of biological sample analyses, and is appropriate for determination of urinary tribendimidine metabolite-TPA in human urine.

Key words: Tribendimidine; Terephthalic acid; High performance liquid chromatography; Urine

三苯双脒(tribendimidine)是新型广谱驱肠虫药^[1-3], 化学名为N,N'-双[4-(1-二甲氨基乙亚氨基)苯基]-1,4-苯二甲亚胺, *po*后于体内迅速分解为对-(1-二甲氨基乙亚氨基)苯胺(*p*-(1-dimethylamino ethylimino) aniline, dADT)和对苯二甲醛(1,4-phthalade-

hyde), 对苯二甲醛经过体内酶氧化, 迅速转化为对苯二甲酸(terephthalic acid, TPA)自尿中排泄; 血中无对苯二甲醛检出。国内外文献多报道三苯双脒临床应用或药效学, 鲜有其人体内处置过程^[4]。文献报道^[5-6]人尿液对苯二甲酸测定中, 尿样需经高氯酸沉

收稿日期: 2008-03-04

作者简介: 徐洁(1974-), 女, 硕士研究生, 主要从事药动力学研究。

通讯作者: 郭瑞臣(1953-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事临床药理学研究。E-mail: grc7636@126.com

淀蛋白,乙酸乙酯提取,流动相中加入离子对试剂进行分离,操作较复杂。本研究建立了一个方便可行、定量准确的人尿液TPA浓度的HPLC测定方法,适合人体三苯双脒次级代谢物对苯二甲酸排泄动力学研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂 TPA对照品(批号WF20070717,含量 $\geq 99\%$)购自国药集团化学试剂有限公司;内标阿魏酸(ferulic acid,批号0773-9910,供含量测定用)购自中国药品生物制品检定所;三苯双脒肠溶片(200 mg/片,批号0505226),由山东新华制药股份有限公司提供;甲醇购自美国Baker公司(色谱纯,含量100.0%);冰醋酸购自美国TEDIA公司(色谱纯,含量 $\geq 99.7\%$);氢氧化钠购自山东化工研究院(分析纯,含量 $\geq 96.0\%$);水为市售娃哈哈纯净水。

1.1.2 仪器 美国Waters Alliance高效液相色谱仪,配有Waters 2695 Separation Module, Waters 2996二极管阵列检测器, Empower Build 1154 色谱工作站; SORVALL Biofuge Primo 离心机,购自美国科峻仪器公司; XW-80A型旋涡混合器,购自上海精科实业有限公司。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱 Ultimate XB-C₁₈柱(4.6 mm $\times$ 200 mm, 5 μ m);流动相甲醇-1%醋酸(35:65, V/V);检测波长240 nm;流速0.8 mL/min;柱温30 $^{\circ}$ C。

1.2.2 TPA系列对照品溶液 取TPA对照品约0.1 g,精密称定,加1%氢氧化钠溶液溶解并稀释制成浓度为2 mg/mL的对照品储备液,4 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。以水稀释配成1000、500、100、20和10 μ g/mL的

TPA系列对照品溶液。

1.2.3 IS溶液 取阿魏酸约0.25 g,精密称定,加甲醇溶解并稀释制成浓度为0.5 mg/mL的IS溶液,4 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

1.2.4 尿样处理 取人尿液适量,5 000 r/min离心5 min,0.45 μ m针筒过滤器过滤,取滤液60 μ L,加入IS溶液70 μ L和水770 μ L,涡旋1 min,取20 μ L进样。以内标法计算尿液中TPA浓度。

1.2.5 受试者选择及尿样采集 选择符合入选标准的16名男性健康志愿者,试验前签署知情同意书。志愿者随机分为3组,试验前禁食一夜,于次日早晨7点分别空腹口服200 mg(5人)、400 mg(6人)和600 mg(5人)三苯双脒肠溶片,200 mL温开水送服,服药1 h后定时定量(100 mL/h)饮水,2 h后进统一低蛋白、低脂肪早餐。早、中、晚餐统一进食。收集服药前和服药后0~2, 2~4, 4~6, 6~8, 8~10, 10~12, 12~24 h的尿液,记录尿液体积,取10 mL离心后-20 $^{\circ}$ C保存,备测。

1.3 统计学处理 分析方法精密度和准确度试验数据经Excel 2003软件计算得到。志愿者不同时间段的尿药浓度及尿液体积经DAS2.0实用药代动力学程序(残余尿药量法)计算三苯双脒次级代谢物TPA经尿排泄速率常数(elimination rate constant, k_e)和半衰期(half life time, $t_{1/2}$)。

2 结果

2.1 专属性 取尿液,按“1.2.4”项下操作。TPA和IS保留时间分别为9.8 min和12.0 min,尿中内源性物质不干扰TPA测定。对照品溶液、空白尿样、空白尿样加对照品和IS及志愿者给药后尿样加IS色谱图见图1。

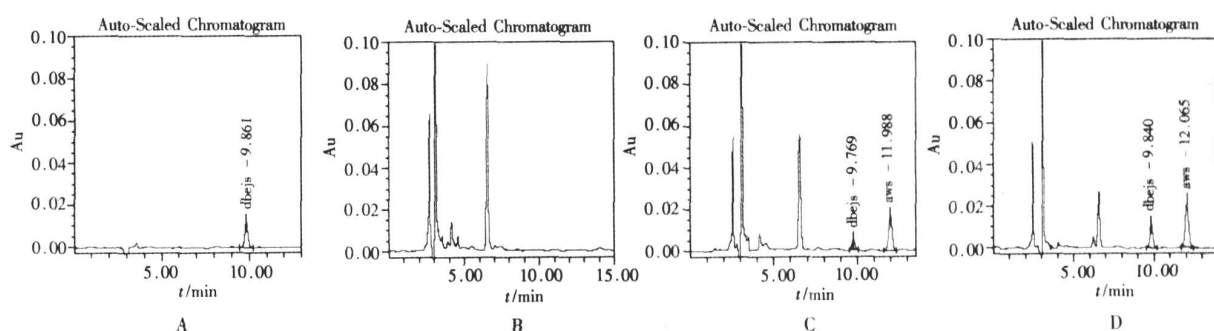


图1 分析方法专属性试验色谱图

A: 1 μ g/mL TPA; B: 空白尿样; C: 空白尿样加TPA和IS; D: 志愿者单次 po 三苯双脒200 mg 0~2 h尿样加IS

Fig. 1 Analytical method specificity test chromatograms

A: 1 μ g/mL TPA solution; B: Blank urine; C: Blank urine spiked with TPA and IS;

D: 0-2 h volunteer urine after a single dose of 200 mg tribendimidine spiked with IS

2.2 标准曲线 取空白尿液, 分别加入 TPA 系列对照品溶液适量, 配制浓度为 1、2、10、25、100、250、400 $\mu\text{g/mL}$ 的 TPA 尿样系列。按“1.2.4”项下操作, 每个浓度测定 5 次。以尿样中 TPA 浓度 ($X, \mu\text{g/mL}$) 为横坐标, TPA 与 IS 峰面积比值 Y 为纵坐标, 采用加权($1/c^2$) 最小二乘法^[7] 进行线性回归运算, 得回归方程 $Y = 2.68e^{-002} X^{-1.47} e^{-003}$, $r = 0.9954$, $r^2 = 0.9909$ 。在 1~400 $\mu\text{g/mL}$ 内, TPA 与 IS 的峰面积比值与浓度线性关系良好, 定量下限为 1 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3 精密度和准确度 分别用空白尿液配制浓度

为 3、25 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 的低、中、高 3 个浓度的质控样品, 按“1.2.4”项下操作, 每个浓度 5 样本于 1 d 内测定, 或每日测定 1 次, 连续 3 d (每日为一批)。质控样品与标准曲线同时进行, 以当日标准曲线计算质控样品浓度, 计算批内、批间相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD), 评价方法精密度。根据测定浓度计算相对回收率, 评价方法准确度。精密度的结果见表 1。低、中、高 3 个浓度相对回收率分别为 (106.0 $\pm$ 4.4) %、(107.4 $\pm$ 4.2) % 和 (108.5 $\pm$ 2.4) %; RSD 分别为 4.1%、3.9% 和 2.2%。

表 1 低、中、高 3 个浓度的精密度 ($n = 5$)

		3		25		200	
		精密度($\rho/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD(%)	精密度($\rho/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD(%)	精密度($\rho/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD(%)
批内	第一批	2.90±0.16	5.37	25.47±1.03	4.04	196.77±7.05	3.58
	第二批	3.07±0.15	5.05	25.36±1.56	6.15	211.18±4.28	2.03
	第三批	2.87±0.20	7.13	23.80±1.08	4.56	203.22±4.65	2.29
批间		2.95±0.18	6.24	24.88±1.40	5.62	203.72±7.93	3.89

2.4 志愿者尿中 TPA 累积排泄量及排泄动力学参数 16 名志愿者分别口服 200 mg (5 人)、400 mg (6 人) 和 600 mg (5 人) 三苯双脒肠溶片, 三苯双脒次级代谢物 TPA 的 k_e 分别为 (0.24 $\pm$ 0.06)/h、(0.19 $\pm$ 0.16)/h 和 (0.21 $\pm$ 0.11)/h, $t_{1/2}$ 分别为 (3.0 $\pm$ 0.7) h、(2.4 $\pm$ 0.8) h 和 (3.4 $\pm$ 1.4) h, 尿中 24 h 累积排泄率分别为 (37 $\pm$ 9) %、(29 $\pm$ 12) % 和 (38 $\pm$ 14) %, 尿液累积排泄量-时间曲线见图 2。

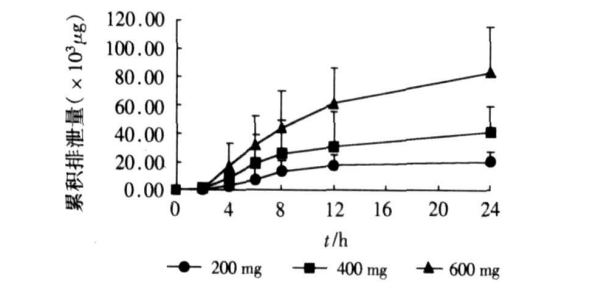


图 2 三苯双脒次级代谢物 TPA 尿液累积排泄量-时间曲线

Fig. 2 Cumulative urine excretion amount-time curves of tribendimidine sub-metabolite-TPA

3 讨 论

本研究建立了阿魏酸为 IS 的人尿液 TPA 浓度 HPLC 测定法, 该法简便、快速、灵敏、准确, 符合生物样品分析要求, 适合人体三苯双脒次级代谢物 TPA 排泄动力学研究。

本研究尿样无须沉淀蛋白, 经离心、过滤和稀释后直接进样, 预处理方法简单, 回收率高, 干扰少, 重复性好, 分离机制采用离子抑制色谱, 流动相为甲

醇-1%醋酸(35:65, V/V), 无需特殊离子对试剂, 杂质峰与 TPA 分离效果良好。本研究用内标法定量, 较文献报道^[36] 的外标法误差小。IS 曾试用阿司匹林、苯甲酸、水杨酸和甘草次酸, 分离效果或分析时间不理想。以阿魏酸为 IS, 尿液中杂质峰与 TPA 和 IS 分离良好, 且保留时间适中, 有利于提高测定效率。

三苯双脒口服后于体内迅速分解为 dADT 和对苯二甲醛, 对苯二甲醛经体内酶迅速氧化成 TPA 自尿中排泄, 血中无对苯二甲醛检出。作为国家一类新药, 三苯双脒体内处置过程尚未完全清楚, 其参与酶类、肠道菌群或反应类型有待进一步研究。文献报道^[8] TPA 经肾排泄存在分泌和重吸收机制, 可能导致 TPA 尿累积排泄率有较大个体差异, 但尚需进一步研究证实。

参考文献:

[1] Xiao Shu-hua, Wu Hu+ming, Marcel T, et al. Tribendimidine: a promising, safe and broad-spectrum anthelmintic agent from China[J]. Acta Tropica, 2005, 94(3): 1-14.
[2] 曹汉钧, 孙凤华, 钱益新, 等. 新药三苯双脒治疗钩虫感染临床观察[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2000, 13(3): 184-186.
[3] 吴中兴, 方悦怡, 刘宜升. 新药三苯双脒肠溶片治疗肠道线虫感染的效果观察[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24(1): 23-26.
[4] Yuan Gui-yan, Wang Ben-jie, Wei Chun-min, et al. LG-MS determination of p-(1-Dimethylamino ethylimino) aniline: A metabolite of tribendimidine in human plasma[J]. Chromatog,

2008, 68(7): 139-142.

- [5] 姚宏伟, 邱清, 吴仲华, 等. 紫外分光光度法测定尿中对苯二甲酸[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1995, 13(6): 367-368.
- [6] 戴建国, 王沐沂, 龚楠, 等. 高效液相色谱法测定作业工人尿中对苯二甲酸含量[J]. 中国公共卫生, 1999, 15(9): 844-845.

- [7] 钟大放. 以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题[J]. 药物分析杂志, 1996, 16(5): 343-346.
- [8] Tremaine L M, Quebbemann A J. The renal handling of terephthalic acid[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1985, 77(1): 165-174.

(编辑: 张彩凤)

(上接第 1006 页) 门脉高压。出生后很快出现门脉高压和胃肠道出血, 死亡率极高。

肝静脉曲张易伴多发畸形, 以消化道、心脏、颅脑和四肢畸形多见, 并羊水过多, 另外持续性右脐静脉比率较高。虽持续性右脐静脉为一解剖变异, 但不除外为一畸形信号, 有待更多病例进一步探讨。

本组 12 例先天性门静脉血管畸形, 均经彩色多普勒首先诊断。二维超声技术能清晰、连续地显示整个门脉系统, 彩色多普勒可确定门静脉血管畸形的大体类型、发生部位, 还可提供血流动力学改变的信息。脉冲多普勒可获取门脉血流频谱, 测定正常门脉或门脉高压时的血流动力学参数。胎儿血管检查需要无创伤性、无致畸影响并可重复性强的检查, 彩色多普勒超声符合此多项要求, 能够在胎儿出生前做出正确诊断, 对优生优育有着重要的临床使用价值。

参考文献:

- [1] 夏建国, 董胜翔, 李凤华, 等. 先天性门静脉畸形的彩色多普勒超声诊断[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(6): 1376-1379.
- [2] Sciaky-Tamir Y, Cohen S M, Hochner-Celnikier D, et al. Three-dimensional power Doppler(3DPD) ultrasound in the Diagnosis and follow-up of fetal vascular anomalies[J]. Obstet Gynecol, 2006, 194(1): 274-281.

- [3] Stringer M D. The clinical anatomy of congenital portosystemic venous shunts[J]. Clin Anat, 2008, 21(2): 147-157.
- [4] 李玉华, 王向东. 彩超诊断肝门静脉-动脉瘘一例[J]. 中国医学影像技术, 1998, 14(12): 949.
- [5] Yang P Y, Wu J L, Yeh G P, et al. Prenatal diagnosis of persistent right umbilical vein using three-dimensional sonography with power Doppler[J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2007, 46(1): 43-46.
- [6] Watanabe A. Portal-systemic encephalopathy in non-cirrhotic patients: classification of clinical types, diagnosis and treatment (Review)[J]. Gastroenterol Hepatol, 2000, 15(9): 969-979.
- [7] 陈国庭. 先天性肝外门腔分流 Abernethy 畸形[J]. 国外医学外科学分册, 2002, 29(2): 86-87.
- [8] Keiji T, Kunio N, Yoshiro T. A case of congenital absence of the portal vein[J]. Hepatol Res, 2005, 31(1): 43.
- [9] 胡昌益. 门静脉左右支反位 1 例[J]. 中国超声医学杂志, 1998, 14(10): 22.
- [10] Duncan N D, Trotman H, Seepersaud M, et al. Obstruction of the duodenum by a preduodenal portal vein in situs inversus[J]. West Indian Med J, 2007, 56(3): 1285-1287.
- [11] 张翔, 于长鹿, 经翔. 先天性肝内动脉瘤样门静脉-肝静脉瘘一例[J]. 临床放射学杂志, 2008, 27(1): 26-27.
- [12] 陈红武, 姚英民, 陈勇. 儿童肝-门静脉分支瘘血管造影诊断及其临床意义[J]. 中国实用儿科杂志, 2003, 18(9): 553-554.

(编辑: 刘霞)