

尼索地平对单硝酸异山梨酯在小鼠体内组织分布的影响

徐翀¹, 刘茜², 赵辉², 刘艳芳² (1.中国医科大学附属第一医院药学部, 沈阳 110001; 2.沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

摘要: 目的 考察尼索地平对单硝酸异山梨酯在小鼠体内组织分布的影响。方法 30 只健康昆明种小鼠, ♂, 随机分成 2 组, 分别为单独给药组和联合给药组, HPLC 测定组织中单硝酸异山梨酯的浓度。结果 小鼠组织中单硝酸异山梨酯浓度在给药后 0.083 h 为小肠>胃>心>肝>肾, 给药后 0.5 h 为胃>小肠>肾>心>肝。胃中最大浓度出现时间因给药方案不同而异: 单独给药组在给药后 0.5 h 单硝酸异山梨酯浓度最大, 联合给药组在给药后 0.083 h 浓度最大。胃中单硝酸异山梨酯最大浓度, 2 组具有显著性差异($P<0.05$)。结论 尼索地平对单硝酸异山梨酯在小鼠组织中的分布具有一定影响。

关键词: 单硝酸异山梨酯; 尼索地平; 组织分布; 高效液相色谱法

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)01-0046-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.01.012

Influence of Nisoldipine on Distribution of Isosorbide-5-mononitrate in Mice Tissue

XU Chong¹, LIU Qian², ZHAO Hui², LIU Yanfang² (1.Department of Pharmacy, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China; 2.School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the influence of nisoldipine on distribution of isosorbide-5-mononitrate in mice tissue. **METHODS** Healthy male mice were divided into isosorbide-5-mononitrate group and isosorbide-5-mononitrate combined with nisoldipine group. The content of isosorbide-5-mononitrate in tissues was detected by HPLC. **RESULTS** Tissue concentrations of isosorbide-5-mononitrate at 0.083 h post-dosing were in the order of small intestine>stomach>heart>liver>kidney, and stomach>small intestine>kidney>heart>liver at 0.5 h post-dosing. The highest concentration time of isosorbide-5-mononitrate in stomach was 0.083 h after combined administration; the highest concentration time of isosorbide-5-mononitrate in stomach was 0.5 h after single administration. There were significant differences in highest concentrations of isosorbide-5-mononitrate in stomach of 2 groups($P<0.05$). **CONCLUSION** Nisoldipine has some influence on distribution of isosorbide-5-mononitrate in mice tissue.

KEY WORDS: isosorbide-5-mononitrate; nisoldipine; tissue distribution; HPLC

单硝酸异山梨酯(isosorbide-5-mononitrate, 5-ISMN)为长效硝酸酯类血管扩张药,是硝酸异山梨酯的主要活性代谢产物,用于冠心病的长期治疗和预防心绞痛发作等^[1]。由于硝酸酯类药物的应用可导致血容量扩张,削弱药物的作用,临床上多与利尿剂,β肾上腺素能受体阻滞剂,钙通道阻滞剂等合用纠正硝酸酯类耐药性的情况。尼索地平作为新一代中长效钙拮抗剂,其扩张血管作用特异性强,且具有选择性扩张冠状动脉的作用,适用于高血压、稳定期心绞痛、冠心病,尤其适用于高血压合并冠心病^[2]。有研究表明,5-ISMN合并尼索地平治疗冠心病疗效显著^[3],并且笔者前期研究中证实了尼索地平对5-ISMN体内药动学行为确有影响^[4]。本实验通过建立5-ISMN体内含量测定的HPLC方法,考察尼索地平对5-ISMN在小鼠体内组织分布的影响,为两者指导临床用药

提供进一步的理论依据。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

5-ISMN对照品(山东鲁南贝特制药有限公司,批号:1104031,含量:100.30%);尼索地平对照品(中国药品生物制品检定所,批号:100574-200401,含量:100%);替硝唑对照品(扬州制药有限公司,批号:20081001,含量:99.63%);甲醇、乙腈(天津市康科德科技有限公司,色谱纯);磷酸二氢钾(沈阳化学试剂厂,分析纯);正己烷、乙酸乙酯(天津市大茂化学试剂厂,分析纯)。

1.2 仪器

L-7110 泵, L-7420 紫外可见检测器, L-2200 自动进样器均购自日本日立公司; N3000 色谱工作站(浙江大学智能信息研究所); SG2200HE 超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司); Vortex-

Genie2 型漩涡混合器(美国思伯明仪器有限公司); BS124S 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); LG10-2.4A 型高速离心机(北京雷勃尔离心机有限公司); Turbo Vap LV 蒸发仪(美国 Caliper 公司)。

1.3 动物

健康昆明种小鼠, ♂, 沈阳药科大学实验动物室提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(辽)2010-0001, 体质量为 18~22 g。

1.4 给药方案

昆明种小鼠 30 只按体质量随机分成 2 组, 分别为单独给药组和联合给药组。给药前禁食 12 h, 自由饮水。单独给药组给药方案: 取 5-ISMN 约 5.2 mg, 溶于生理盐水 20 mL 中($0.26\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), $13\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃给药。联合给药组给药方案: 分别取 5-ISMN 和尼索地平约 5.2 mg, 混悬于 0.5% 羧甲基纤维素钠 20 mL 中(浓度均为 $0.26\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), $13\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃给药。

1.5 生物样品采集与处理

每组分别于给药后 0.083, 0.5 和 2.0 h 处死, 每组每个时间点处死 5 只。立即解剖采集心、肝、肾、胃和小肠, 用生理盐水冲净表面血液及内容物后, 称重, 加 10 倍甲醇-水(1:1)匀浆, 超声 15 min, 离心 5 min($3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$), 上清液于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用(整个过程均在暗室内进行)。

1.6 组织样品测定

1.6.1 溶液的制备 5-ISMN 溶液的配制: 精密称取 5-ISMN 10.0 mg, 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 配成浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储备液。以甲醇溶液依次稀释 5-ISMN 储备液, 获得浓度依次为 0.60, 1.50, 3.00, 6.00, 15.0, 30.0, $60.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品系列溶液。

内标替硝唑溶液的配制: 精密称取替硝唑 10.0 mg, 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 获得浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储备液; 用甲醇稀释替硝唑储备液, 获得 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的内标溶液。

各储备液, 对照品系列溶液均以相应体积, 经过校正的量瓶配制, 并在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存备用。

1.6.2 组织样品处理 取小鼠组织匀浆 150 μL , 加入内标溶液($4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的替硝唑溶液)50 μL , 甲醇 50 μL , 混匀; 加提取溶剂乙醚 2.5 mL, 涡旋混合

10 min, 离心 10 min($10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$), 取上层有机相于另一离心管中, 于 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 空气流下吹干, 残留物加流动相 100 μL 溶解, 涡流混合, 取 20 μL 进行色谱分析。

1.6.3 色谱条件 DiamonsilTM C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm), C₁₈ 保护柱(4 mm×3.0 mm), 流动相: 乙腈-0.02 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾(15:85), 流速: $0.8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量: 20 μL , 检测波长: 220 nm。

2 结果

2.1 专属性

取小鼠空白组织匀浆 150 μL , 除不加内标外, 按“1.6.2”项下方法操作, 进样 20 μL , 记录色谱图; 将一定浓度 5-ISMN 和内标溶液加入空白组织匀浆, 同法操作, 记录色谱图; 取灌胃给药后的组织匀浆, 同法操作, 记录色谱图。结果表明, 空白组织中内源性物质不干扰 5-ISMN 和内标替硝唑的测定。结果见图 1。

2.2 标准曲线与定量下限

取小鼠空白组织匀浆 150 μL , 加入 5-ISMN 对照品系列溶液 50 μL , 制成相当于 5-ISMN 浓度为 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100 和 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 的模拟组织样品, 除不加 50 μL 甲醇外, 按“1.6.2”项下方法操作, 每一浓度进行双样本分析, 记录色谱图。以待测物浓度(X)为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值(Y)为纵坐标, 用加权($W=1/x^2$)最小二乘法进行回归运算^[5]。结果表明, 心、肝和肾中 5-ISMN 在 $2.0\sim100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 内线性关系良好; 胃和小肠中 5-ISMN 在 $2.0\sim200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 内线性关系良好, 结果见表 1。对 $2.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 对照品进行样本分析, 并根据当日标准曲线求得每一样本测定浓度。准确度为 8.8%, 精密度 RSD 为 1.5%。组织中 5-ISMN 的定量下限为 $2.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

表 1 组织中 5-ISMN 的回归方程、相关系数与线性范围
Tab.1 Regression equation, correlation coefficients and linear range of 5-ISMN in mice tissue

组织	回归方程	r	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
心	$Y=0.626X-0.035$	0.999 6	2.0~100
肝	$Y=0.623X-0.025$	0.998 0	2.0~100
肾	$Y=0.735X-0.061$	0.999 0	2.0~100
胃	$Y=0.806X-0.066$	0.998 0	2.0~200
小肠	$Y=0.765X-0.035$	0.999 0	2.0~200

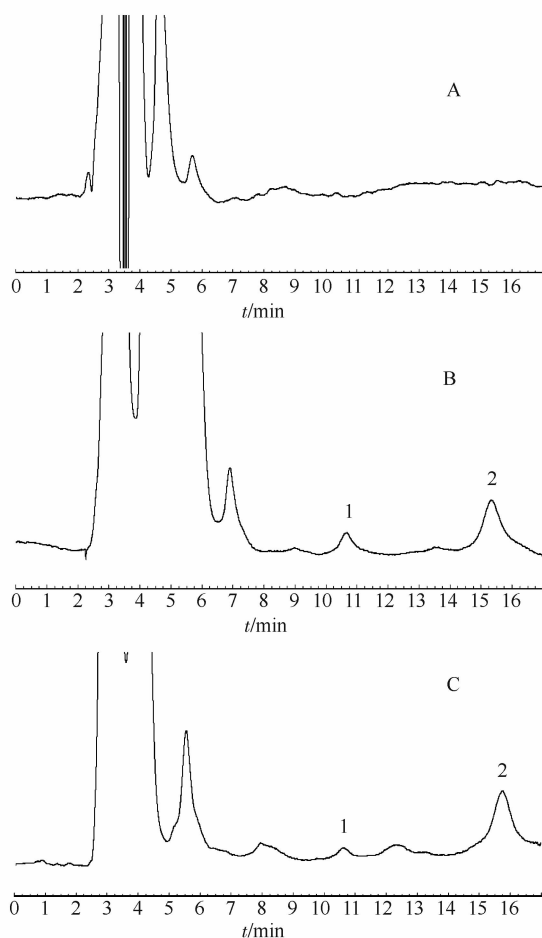


图1 小鼠心组织的高效液相色谱图

A-空白心组织匀浆; B-空白心组织匀浆加入 5-ISMN($5.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)和内标替硝唑($4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); C-小鼠灌胃给予 5-ISMN 2.0 h 时心组织样品; 1-5-ISMN; 2-替硝唑。

Fig. 1 HPLC chromatograms in mice heart

A-blank heart; B-blank tissue spiked with 5-ISMN ($5.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and tinidazole($4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); C-2.0 h heart sample after oral administration of 5-ISMN ($13 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and spiked with tinidazole ($4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); 1-5-ISMN; 2-tinidazole.

2.3 精密度与回收率

取小鼠空白组织匀浆 $150 \mu\text{L}$, 按“2.2”项下方法配制各组织低、中、高 3 个浓度的质控(quality control, QC)样品(胃和小肠 5-ISMN 浓度分别为 5.0 , 20 和 $160 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 心、肝和肾 5-ISMN 浓度分别为 5.0 , 20 和 $80 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), 每一浓度进行 6 样本分析, 连续测定 3 d, 根据当日的标准曲线, 计算 QC 样品的测得浓度, 并根据 QC 样品结果计算日内精密度, 日间精密度, $\text{RSD}<15\%$; 准确度, 相对误差 $<\pm 15\%$, 结果表 2。

2.4 稳定性考察

本试验考察了低、中、高 3 个浓度的 QC 样品(胃和小肠 5-ISMN 浓度分别为 5.0 , 20 和 $160 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,

表 2 小鼠组织中 5-ISMN 的精密度与回收率

Tab. 2 Accuracy and precision of 5-ISMN in mice tissue

组织	配制浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	测得浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	回收率/%	日内 RSD/%	日间 RSD/%
心	5.0	5.05 ± 0.20	100.9	3.27	8.42
	20.0	19.3 ± 0.95	96.7	4.51	7.93
	80.0	81.4 ± 3.00	101.8	3.89	3.12
肝	5.0	5.00 ± 0.20	100.0	4.46	4.57
	20.0	19.1 ± 0.63	95.5	3.27	3.92
	80.0	81.4 ± 2.91	101.7	2.90	7.65
肾	5.0	5.10 ± 0.26	102.0	4.03	10.69
	20.0	19.3 ± 0.58	96.3	3.14	1.79
	80.0	80.2 ± 3.62	100.3	4.40	7.10
胃	5.0	5.25 ± 0.22	104.9	4.14	5.16
	20.0	19.6 ± 0.81	98.0	3.84	5.39
	160.0	158.9 ± 6.71	99.3	4.66	3.80
小肠	5.0	5.18 ± 0.22	103.6	3.38	8.42
	20.0	19.4 ± 0.92	96.8	4.14	7.84
	160.0	160.7 ± 7.31	100.4	4.68	3.03

心、肝和肾 5-ISMN 浓度分别为 5.0 , 20 和 $80 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 在不同条件下的稳定性, 每一浓度进行 3 样本分析。数据表明, 处理后的组织样品室温放置 8 h, 组织样品经历 2 次冷冻-解冻循环, 组织样品 -20°C 冷冻放置 7 d 稳定(相对误差均 $<\pm 15\%$)。

2.5 提取回收率

取小鼠空白组织匀浆液 $150 \mu\text{L}$, 按“2.2”项下方法制备低、中、高 3 个浓度(胃和小肠 5-ISMN 浓度分别为 5.0 , 20 和 $160 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 心、肝和肾 5-ISMN 浓度分别为 5.0 , 20 和 $80 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)的 QC 样品, 每一浓度进行 6 样本分析。以提取后的色谱峰面积与未经提取获得的峰面积之比计算提取回收率。5-ISMN 3 种浓度下 QC 样品的提取回收率均 $>75\%$, 内标溶液经同样提取处理, 其回收率均 $>80\%$ 。本方法回收率符合测定要求。

2.6 5-ISMN 小鼠组织分布研究

小鼠以单独给药和联合给药方式灌胃给予 5-ISMN 后, 未知组织样品按“1.6.2”项下方法操作, 并制备随行标准曲线, 测定低、中、高 3 个浓度的 QC 样品, 每个浓度进行 3 样本分析。根据每一分析批的标准曲线计算 QC 样品和未知样品的浓度。小鼠单独给予 5-ISMN 及联合给予 5-ISMN 和尼索地平后 3 个时间点各组织中 5-ISMN 浓度见表 3。

表 3 2 种不同给药方案小鼠组织中 5-ISMN 的浓度

Tab. 3 Concentration of 5-ISMN in mice tissue after a single oral administration of 5-ISMN and 5-ISMN combined with nisoldipine

组织	t/h	5-ISMN 浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	
		5-ISMN	5-ISMN+尼索地平
心	0.083	8.12±0.88	9.24±2.42
	0.5	5.76±1.07	5.44±1.63
	2	4.30±2.09	3.56±0.36
肝	0.083	4.14±1.06	5.20±1.17
	0.5	4.52±0.27	4.32±0.58
	2	未测出	未测出
肾	0.083	4.12±1.29	4.96±0.79
	0.5	6.68±1.20	6.40±1.17
	2	5.00±1.22	3.88±0.63
胃	0.083	15.72±1.65	27.00±2.02
	0.5	21.36±3.14	19.60±2.99
	2	3.88±1.32	3.08±0.36
小肠	0.083	46.08±17.02	50.80±24.56
	0.5	14.06±4.70	13.40±1.40
	2	3.76±0.74	3.56±0.71

3 讨论

本研究以♂昆明种小鼠为对象,研究灌胃给药后尼索地平对 5-ISMN 在 小鼠体内组织分布的影响。由表 3 可知,灌胃给予 5-ISMN 13 mg·kg⁻¹ 后,5-ISMN 在 小鼠组织中分布迅速、广泛,0.083 h 时在 各组织中均能检出,浓度为小肠>胃>心>肝>肾,0.5 h 时为胃>小肠>肾>心>肝。给药后 2.0 h,5-ISMN 在 小鼠各组织中基本消除完全。2 种给药方案,心,肝,小肠在 0.083 h 浓度最大,肾在 0.5 h 浓度最大。胃中最大浓度出现时间因给药方案不

同而异:单独组在 0.5 h 5-ISMN 浓度最大,联合组在 0.083 h 浓度最大。说明尼索地平可能会加快 5-ISMN 的吸收,推测两者在胃中的转运存在协同作用。在 小鼠胃中,单独给药组最大浓度为(21.36±3.14) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,联合给药组最大浓度为(27.00±2.02) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,经 SPSS 软件单因素方差分析和独立样本 *t* 检验,结果表明,2 组 5-ISMN 浓度具有显著性差异(*P*<0.05)。推测尼索地平血浆蛋白结合率高达 99%,可竞争 5-ISMN 血浆蛋白结合部位,增加后者游离型数量,使分布在胃中的最大浓度增大,实验结果与 大鼠血浆结果^[4]基本相符。本实验进一步验证了两者联用时的体内相互作用,建议临床用药时可适当错开给药时间,或调整给药间隔。

REFERENCES

[1] LAN M. Observation and analysis of isosorbide-5-mononitrate in treatment of angina pectoris of coronary heart disease [J]. Shanxi Med J(山西医药), 2010, 39(11): 1077.

[2] JIN Y, ZHANG Y Y, WANG Y L. Effect of nisoldipine in Prinzmetal's variant angina pectoris [J]. Chin J Cardiol(中国心血管杂志), 2005, 10(4): 304-305.

[3] WANG Z Q, YU S L. Curative effect observation of isosorbide-5-mononitrate combined with nisoldipine on coronary heart disease [J]. Hebei Med J(河北医学), 2011, 7(2): 262-263.

[4] LIU Q, XU C, ZHAO H, et al. Effect of nisoldipine on pharmacokinetics of isosorbide-5-mononitrate in rats [J]. Chin Pharm(中国药房), 2012, 23(45): 4235-4237.

[5] ZHONG D F. Some problems of establishing bioanalytical standard curve with weighted least square method [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析), 1996, 16(5): 343-346.

收稿日期: 2014-03-25

拉曼光谱快速检测酚磺乙胺注射液

贺赅¹, 张雁^{2,3*} (1.湖北省老河口市第一医院, 湖北 老河口 441800; 2.中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 3.湖南省湘潭市食品药品检验所, 湖南 湘潭 411100)

摘要: 目的 建立一种用拉曼光谱技术快速鉴别和测定酚磺乙胺注射液的方法。方法 以酚磺乙胺注射液为研究对象,运用拉曼光谱技术对酚磺乙胺注射液进行快速鉴别和含量测定,测定条件:显微拉曼光谱仪,激发光波长为 785 nm,物镜为 50×,激光功率为 3 mW,信号采集时间为 60 s。结果 拉曼光谱法可以鉴别酚磺乙胺注射液。此类注射液中酚磺乙胺含量分别为 98.29%, 97.56%, 100.21%(规格: 2 mL : 0.5 g)和 98.75%, 94.98%, 96.25%(规格: 2 mL : 0.25 g),测定结果与 HPLC 测定的结果无显著性差异。结论 本方法操作简便、快速无损,可作为酚磺乙胺注射液快速检测的分析方法。关键词: 拉曼光谱; 快速检测; 酚磺乙胺注射液

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2015)01-0049-06

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09303-001)
作者简介: 贺赅,男,副主任药师 Tel: 18086128808 E-mail: 550179065@qq.com *通信作者: 张雁,女,硕士,主管药师 Tel: 18075860508 E-mail: 14299875@qq.com