

毛细管气相色谱—电子捕获法测定人血清中 5-单硝酸异山梨醇酯的浓度和药代动力学参数

夏桂珠 傅贻柯* 董善年 李 然

(北京医科大学分析化学教研室; 北京医科大学应用药物研究所, 北京 100083)

5-单硝酸异山梨醇酯(isosorbide-5-mononitrate, IS-5-MN)是抗心肌缺血药物二硝酸异山梨醇酯(isosorbide dinitrate, ISDN)的活性代谢产物,特别适用于冠心病和心绞痛的防治^(1~3)。

本文建立了毛细管气相色谱⁶³Ni电子捕获检测法分离测定 IS-5-MN 血药浓度的方法。以两种药片在 8 位男性健康受试者交叉服药,测定了 5 个半衰期内(24 h)的血药浓度,测得数据经处理得生物利用度及有关药代动力学参数;达峰时间小于 1 h,消除半衰期为 6 h,属一房室模型;两种药片的生物利用度与主要药代动力学参数无显著性差异。

本分析方法用量少、内标易得、分析耗时短、萃取率高,且血样中其它组分不干扰,优于文献^(4,5)报道的方法。

实 验 部 分

仪器试剂

仪器 SQ-207 气相色谱仪-⁶³Ni 电子捕获检测器(北京分析仪器厂,本室改装毛细柱用设备);C-R1B 色谱数据处理机(日本岛津公司);GZ-1 型多用振荡器(北京冰箱电机厂)。

试剂 水、乙醚、乙酸乙酯、无水乙醇、苯、甲苯等溶剂均经纯制;IS-5-MN 纯品(北京医科大学应用药物研究所提供,并经 TLC 检查);含内标的萃取液(乙醚:乙酸乙酯为 4:1, ISDN 100 ng/ml);正常人血清(北京医科大学第三附属医院提供);IS-5-MN 片剂 20 mg/片(A);IS-5-MN 片剂 20 mg/片(B)。

分离分析步骤

分析方法

取试样 0.20 ml 置 5 ml 具塞试管中,精密加含内标的萃取液 1 ml,振荡 3 min,经离心分离后,再次同法萃取一份,合并萃取液,在纯制的氮气流下浓缩至约 100 μ l,取 1 μ l 进样,记录色谱图,以 $h_{\text{样}}/h_{\text{内标}}$ 和标准血样浓度作线性回归,计算血药浓度。

色谱条件

毛细柱:弹性石英毛细柱 OV-101, 24 m \times 0.30 mm,液膜厚度 0.25 μ m,涂布效率 94.3% (本室自制);Tc: 120 $^{\circ}$ C;Td: 250 $^{\circ}$ C;柱前压:0.08 MPa,尾吹:0.06 Mpa。在选定的色谱条件下, $t_{\text{m}} = 47$ s; $t_{\text{R(样品)}} = 5.36$ min; $t_{\text{R(内标)}} = 8.12$ min;有关色谱图如图 1,用色谱数据处理机测量峰高。

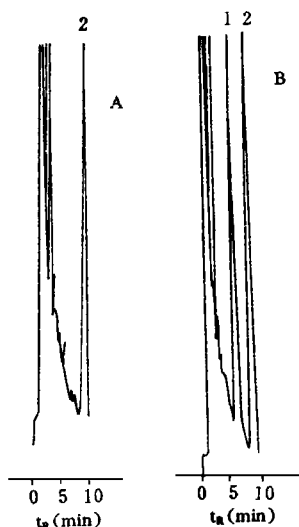


Fig 1 Chromatograms of IS-5-MN (peak 1) in human serum. A. Blank sample containing internal standard ISDN (peak 2) 250 ng/ml; B. Sample containing ISDN 250 ng/ml and IS-5-MN 170 ng/ml.

实验结果

线性范围

分别取含 50, 100, 200, 250, 300, 400, 500 ng/ml IS-5-MN 的标准血样及空白血清各 0.20 ml。按分析方法项下步骤, 萃取并浓缩进样, 记录色谱图, 计算峰高比, 以 $h_{\text{峰}}/h_{\text{内标}}$ 为 Y 值、血清浓度 (ng/ml) 为 X 值作线性回归, 得回归方程 $Y = 2.787 \times 10^{-3}X - 0.0273$, $r = 0.9957$ ($n = 7$), 线性良好。

回收率

分别取 6 个水平的 IS-5-MN 标准血样, 按分析方法项下步骤测定与标准液直接进样不经萃取所得结果进行比较, 计算回收率, 结果见表 1。

Tab 1 Recovery of IS-5-MN (n = 3)

| Concentration (ng/ml) | 50 | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Recovery (%) ($\bar{x} \pm s$) | 84 ± 6.2 | 74 ± 5.0 | 80 ± 5.0 | 84 ± 4.3 | 85 ± 3.5 | 75 ± 3.1 |

精密度(日内、日间相对标准偏差)

配制高、中、低 3 种浓度水平的血清标准液, 一天内测定 3 次, 计算日内相对标准偏差; 隔天测 1 次, 共测 3 次, 计算日间相对标准偏差。结果见表 2。

Tab 2 Precision of the method (n=3)

| Concentration (ng/ml) | RSD(%) | |
|--------------------------|------------|-------------|
| | Within-day | Between-day |
| 50 | 6.2 | 7.8 |
| 200 | 5.0 | 4.8 |
| 500 | 3.1 | 8.8 |

方法最小测定浓度

经测定,本方法最小测定浓度为 5 ng/ml(S/N=2)。

药代动力学参数及生物利用度测定

8 名健康志愿者(年龄 20~45, 体重 49~70 kg, 男性), 清晨口服 IS-5-MN 片剂 20 mg, 服药 2.5 h 后可进食。分别在服药后 0.333, 0.666, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 8.0, 12.0, 24.0 h 时, 取静脉血, 离心分离取血清, 经处理后, 用毛细柱气相色谱—电子捕获方法测定 IS-5-MN 血浓。交叉口服两种不同来源的片剂, 两次给药间隔一周。测得两种药片的平均药一时数据。

以同一时间间隔同一种药片的 8 名受试者的平均血浓的对数值对给药后时间分别绘制两种药片的药一时曲线(图 2, A 及 B)。

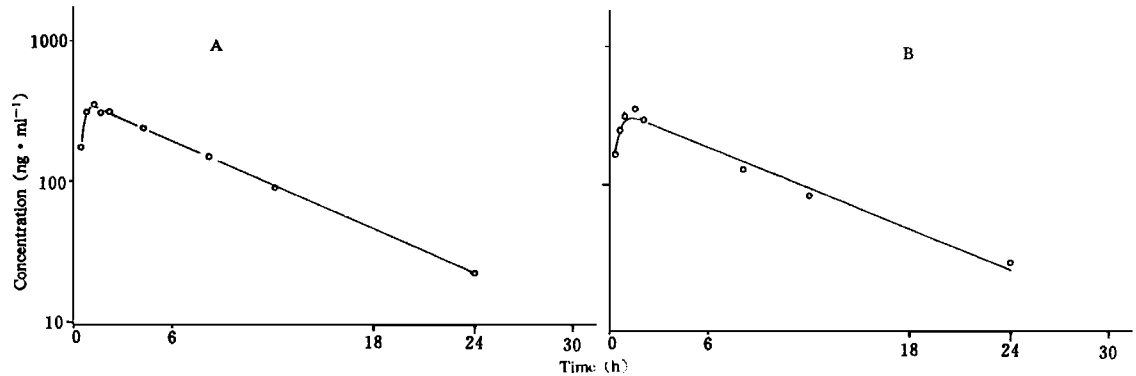


Fig 2 Concentration-time curves of two kinds of IS-5-MN tablets (A and B) in serum.

○ Observed; — Calculated. Logarithmic scale.

由图 2 可知 IS-5-MN 在人体内的药代动力学过程以 AIC 判别符合一室模型, 用 3p87 药代动力学程序和 AFTI 486DX 微机处理, 由药一时数据, 推算两种药片的药代动力学参数见表 3。

Tab 3 Average values of pharmacokinetic parameters of two kinds of tablets after oral administration to 8 volunteers

| Tablet | $t_{1/2}(K_a)$ (h) | $t_{1/2}(K_e)$ (h) | T_{max} (h) | C_{max} (ng/ml) | AUC (ng/ml · h) | V/F(c) (mg/ng · ml) |
|--------|-----------------------|-----------------------|------------------|----------------------|--------------------|------------------------|
| A | 0.4392 | 6.0033 | 1.4639 | 337.87 | 3376.6 | 0.0548 |
| B | 0.6748 | 6.1974 | 1.3015 | 327.15 | 3737.7 | 0.0506 |

表 3 的吸收相半衰期 $t_{1/2}(K_a)$ 为 0.4392~0.6748 说明 IS-5-MN 在人体内较快达到分布平衡; 消除相半衰期 $t_{1/2}(K_e)$ 为 6.0033~6.1974 属于长效消除速度。

数据检验

以同一志愿者的两种片剂所得值配对,共得两种药的药时曲线下面积 AUC,血浓达峰时间 T_{\max} 和最大浓度 C_{\max} 的 8 对数据,进行成对比较的 t 检验,分别计算出 $t=1.812, 0.865$ 和 0.83 ,而以置信系数 $\alpha=0.05$,自由度 $\nu=7$ 查 t 表得 $t_{1-0.05/2}=2.365$,显然,两种片剂的以上三种参数均无显著性差异,说明两种片剂的生物利用度无显著性差异。

讨 论

文献⁽⁵⁾中报道了鼠血浆中 IS-5-MN 的毛细柱气相色谱电子捕获测定方法,但强调要加 AgNO_3 溶液作稳定剂,我们实验结果表明无此需要。萃取溶剂的极性过大或用量过多都将给色谱分析带来干扰峰,而使测定结果不准确,极性过小则萃取回收率低。我们没有对玻璃衬管进行硅烷化,而是经常注意直接在仪器上沾有乙醇或乙酸乙酯的毛刷清洗衬管,这比每天换硅烷化玻璃衬管要简便易行。

关键词 5-单硝酸异山梨醇酯;毛细柱气相色谱—电子捕获检测

参 考 文 献

- 1 刘北平,等. 新一代硝酸酯类药单硝酸异山梨醇酯. 国外医药—合成药、生化药、制剂分册 1990;11: 218.
- 2 Laufen H, et al. Oral absorption and disposition of isosorbide dinitrate and isosorbide mononitrates in man. *Arzneimittelforsch* 1983;(7): 980.
- 3 焦晓虹. 5-单硝酸异山梨醇酯的药理和临床应用. 新药与临床 1991;10: 212.
- 4 Marzo A, et al. Gas-liquid chromatographic determination of isosorbide-5-mononitrate derivatized with perfluorinated anhydrides for pharmacokinetic and bioavailability investigations. *J Chromatogr* 1985;345: 390.
- 5 Tzeng TB, et al. Gas chromatographic analysis of isomeric organic mononitrates in plasma. *Ibid* 1991;571: 109.

GAS CHROMATOGRAPHIC METHOD WITH EC DETECTION TO DETERMINE ISOSORBIDE-5-MONONITRATE (IS-5-MN) IN HUMAN SERUM AND ITS PHARMACOKINETIC PARAMETERS

GZ Xia, YK Fu* , SN Dong and R Li

*(Department of Analytical Chemistry, *Institute of Applied Medicines, Beijing Medical University, Beijing 100083)*

ABSTRACT A simple, sensitive and precise capillary GC-ECD method was developed for the determination of isosorbide-5-mononitrate in human serum. Pharmacokinetic parameters of the drug was obtained from the human serum level-time curve measured.

Serum samples were extracted with a mixture of ethyl ether-ethyl acetate (4 : 1), the upper phase was collected and evaporated to about 100 μ l under a gentle nitrogen stream. Isosorbide dinitrate was used as internal standard. With a human serum sample size of 200 μ l, the detection limit of IS-5-MN was found to be about 5 ng/ml, and the absolute recovery from 74% to 85%. The within-day and between-day relative standard deviation were less than 7% and 9%, respectively.

This method was applied to the pharmacokinetic studies of IS-5-MN tablets from two different sources. Two sets of $t_{1/2}(Ke)$, T_{max} and AUC values obtained from 8 volunteers were tested statistically and no significant difference was found.

Key words Isosorbide-5-mononitrate; Capillary GC-ECD