

佳药物浓度进行观察,这将是今后在实验中需要进一步探讨的问题。

多年来,口服或动、静脉给药一直是治疗心脏病药物的主要途径,经心包腔给药尚局限于动物实验研究,这主要是因为临床上缺乏一种足够安全的心包穿刺技术^[14]。我们相信,随着新技术的发明,该领域的研究会逐渐增多,将成为一个新的研究方向。

参考文献:

- [1] 刘丽娟,王强,高修仁. 磷酸二酯酶Ⅲ抑制剂的临床应用及进展[J]. 新医学,2006,37(10):677-679.
- [2] Miyamoto MI, del Monte F, Schmidt U, et al. Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(2):793-798.
- [3] Nagy A, Sax B, Entz Jr, et al. Comparison of elimination and cardiovascular effect of adenine nucleosides administered intrapericardially or intravenously in anesthetized dog[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2009, 54(4):341-347.
- [4] Waxman S, Moreno R, Rowe KA, et al. Persistent primary coronary dilation induced by transatrial delivery of nitroglycerin into the pericardial space: a novel approach for local cardiac drug delivery[J]. J Am Coll Cardiol, 1999, 33(7):2073-7.
- [5] Carvas M, Nascimento BC, Acar M, et al. Intrapericardial ranolazine prolongs atrial refractory period and markedly reduces atrial fibrillation inducibility in the intact porcine heart[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2010, 55(3):286-291.
- [6] Moreno R, Waxman S, Rowe K, et al. Intrapericardial [beta]-adrenergic blockade with esmolol exerts a potent antitachycardic effect without depressing contractility[J]. Lipp Willi, 2000, 36: 722-727.
- [7] Van Brakel TJ, Hermans JJ, Accord RE, et al. Effects of intrapericardial totalol and flecainide on transmural atrial electrophysiology and atrial fibrillation[J]. J Cardiovasc Electrophysiol. 2009, 20(2):207-215.
- [8] 关怀敏,刘鹏,解金红,等. 重组腺病毒血管内皮生长因子 165 基因心包腔与冠状动脉转染猪心肌效果比较[J]. 郑州大学学报(医学版), 2006, 41(2):260-263.
- [9] Fleming GA, Murray KT, Yu C, et al. Milrinone use is associated with postoperative atrial fibrillation after cardiac surgery[J]. Circulation, 2008, 118(16):1619-1625.
- [10] Lamarche Y, Malo O, Thorin E, et al. Inhaled but not intravenous milrinone prevents pulmonary endothelial dysfunction after cardiopulmonary bypass[J]. J Thorac Cardiovasc Surg 2005, 130(D): 83-92.
- [11] 李家泰. 临床药理学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2007: 1481.
- [12] Zewail AM, Nawar M, Vrtovec B, et al. Intravenous milrinone in treatment of advanced congestive heart failure [J]. Tex Heart Inst J, 2003, 30(2): 109-110.
- [13] 徐衍梅,李淑芬,王树水,等. 米力农对小儿先天性心脏病并心力衰竭术前血液动力学干预的研究[J]. 小儿急救医学, 2005, 12(6): 464-467.
- [14] Ota T, Patronik NA, Schwartzman D, et al. Minimally invasive epicardial injections using a novel semiautonomous robotic device[J]. Circulation, 2008, 30;118(14 suppl): S115-120.

[收稿日期]2010-12-20

液-质联用法测定大鼠血浆中咪达普利及其代谢产物咪达普利拉的浓度

刘东,高萍,张程亮,任秀华 (华中科技大学同济医学院附属同济医院药学部,湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的:建立大鼠血浆中咪达普利及其代谢产物咪达普利拉的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)测定方法。方法:用 2 倍于血浆样品的乙腈沉淀蛋白,色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 5 μm),以乙腈-0.1% 甲酸水溶液(1:2)为流动相,流速 0.3 mL·min⁻¹,通过电喷雾离子化三重四级杆串联质谱,多反应离子检测模式进行检测,检测离子:咪达普利(*m/z* 406.2→234.2)、咪达普利拉(*m/z* 378.1→206.1)和内标西替利嗪(*m/z* 389.2→201.1)。结果:咪达普利的线性范围为 2~200 μg·L⁻¹,咪达普利拉的线性范围为 1~100 μg·L⁻¹,回收率及精密度经测定均符合生物样品分析的要求。结论:该方法操作简便、测定快速、准确,可用于咪达普利的药动力学研究。

[关键词] 咪达普利;咪达普利拉;液-质联用

[中图分类号] R927.2 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2011)13-1055-04

Determination of imidapril and its metabolite imidaprilat in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LIU Dong, GAO Ping, ZHANG Cheng-liang, REN Xiu-hua (Department of Pharmacy, Tongji Hospital Affiliated with Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan 430030, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS)-based method for determining imidapril and its metabolite imidaprilat in rat plasma. **METHODS** The plasma samples were treated with acetonitrile pre-

[基金项目] 中央高校基础科研业务费资助项目(编号:2010JC057) [作者简介] 刘东,男,副主任药师,电话:027-83663643, E-mail: ld_2069@yahoo. cn

cipitation. The Diamonsil C₁₈ (5 μ m, 150 $\times$ 2.1 mm) was used as the analytical column with acetonitrile-0.1% (v/v) formic acid (1:2, v/v) as the mobile phase at the flow rate of 0.3 mL $\cdot$ min⁻¹. The samples were ionized by electrospray ionization source in the triple quadrupole tandem mass spectrometer, and the plasma concentration of imidapril, imidaprilat and internal standard were determined with a multiple reaction monitoring mode of m/z 406.2 $\rightarrow$ 234.2, m/z 378.1 $\rightarrow$ 206.1 and m/z 389.2 $\rightarrow$ 201.1, respectively. **RESULTS** The linearity was confirmed in the concentration range of 2-200 μ g $\cdot$ L⁻¹ and 1-100 μ g $\cdot$ L⁻¹ for imidapril and imidaprilat in rat plasma. The variability and relative recovery rate were suitable for biological analysis. **CONCLUSION** The method is convenient, rapid, accurate and can be used for pharmacokinetic studies of imidapril.

KEY WORDS: imidapril; imidaprilat; liquid chromatography-tandem mass spectrometry

咪达普利 (imidapril), 化学名 (-)-(4S)-3-[(2S)-2-[[[(1S)-1-乙氧羰基-3-苯丙基]氨基]丙酰基]-1-甲基-2-氧翁咪唑-4-羧酸], 为抗高血压药, 是血管紧张素转换酶 (ACE) 抑制剂^[1]。在体内, 咪达普利的乙酯基团被羧酸酯酶-1 (hCE-1)^[2] 水解而形成其活性代谢产物咪达普利拉 (imidaprilat)。盐酸咪达普利临床给药剂量是 2.5~10 mg $\cdot$ d⁻¹。单次口服给药 10 mg 时, 咪达普利和咪达普利拉的最大血药浓度 $C_{\max}$ 分别是 (39.3 $\pm$ 10.1) μ g $\cdot$ L⁻¹ 和 (15.7 $\pm$ 9.8) μ g $\cdot$ L⁻¹^[3]。所以需要建立一种高灵敏度、高特异性的方法来测定咪达普利和其活性代谢产物咪达普利拉。对于这两种药物测定方法的研究, 国内尚未见报道, 国外文献报道的测定方法有放射免疫测定法 (RIA)^[4]、LC-MS 测定法^[5]、HPLC 测定法^[6]。放射免疫测定法的灵敏度很高, 但是需要¹²⁵I 放射性配体和一些特殊的设备; LC-MS 测定法处理血浆样品时需要固相萃取柱; HPLC 测定法的血浆样品处理方法繁琐。而 LC-MS/MS 测定法在药物及其代谢产物生物样品的定量分析中具有显著优势, 其高的专属性和灵敏度都是其他方法所不能及的。此外, 液-质联用进样量少, 仅需少量的血样即可。

本研究建立了咪达普利和咪达普利拉的 LC-MS/MS 测定法, 该方法快速、灵敏、专属性高, 血浆样品处理简单, 能满足药动学研究需要。

1 材料

Agilent 1100 液相色谱-API3000 质谱联用仪, 含四元泵、自动进样器、柱温箱, 配备电喷雾离子化源 (美国 AB 公司); SCL-10Avp 系统控制器; 色谱工作站: Analyst 1.4.1。

咪达普利 (纯度 98%, 批号 13-ANR-18-1, Toronto Research Chemicals Inc.); 咪达普利拉 (纯度 98%, 批号 4-JQW-176-4, Toronto Research Chemicals Inc.); 内标西替利嗪 (纯度 98.6%, 山西津华晖星制药有限公司); 乙腈为色谱纯; 甲醇和甲酸为分析纯; 所有用水均为纯净水。SD 雄性大鼠, 体质量 (220 $\pm$ 30) g, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供, 许可证号: SCXK (鄂) 2004-0007, 合格证

编号: No. 00008775。

2 方法与结果

2.1 储备液的配制 精密称取咪达普利和咪达普利拉, 以水-乙腈 (50:50) 为溶剂, 配制成 10 mg $\cdot$ L⁻¹ 的储备液。吸取该储备液, 用乙腈稀释至 1 mg $\cdot$ L⁻¹, 备用。内标西替利嗪用甲醇配制成 10 mg $\cdot$ L⁻¹ 的储备液。吸取该储备液, 用甲醇稀释至 200 μ g $\cdot$ L⁻¹ 作为内标溶液。所有储备液均置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

2.2 LC-MS/MS 条件

2.2.1 色谱 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (5 μ m, 150 mm $\times$ 2.1 mm); 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 流动相: 乙腈-0.1% 甲酸水溶液 (1:2); 流速: 0.3 mL $\cdot$ min⁻¹; 进样量: 10 μ L。

2.2.2 质谱 离子化方式: 电喷雾离子化 (ESI); 正离子方式检测; 扫描方式: 多反应离子检测 (MRM); 喷雾电压 5 500 V; 温度 450 $^{\circ}$ C; GAS1 和 GAS2 流速均是 50 mL $\cdot$ min⁻¹; 用于定量分析的离子反应分别为咪达普利 (m/z 406.2 $\rightarrow$ m/z 234.2) DP: 40, EP: 5.0, CE: 25, CXP: 3.5; 咪达普利拉 (m/z 378.1 $\rightarrow$ m/z 206.1) DP: 45, EP: 6.0, CE: 25, CXP: 3; 内标西替利嗪 (m/z 389.2 $\rightarrow$ m/z 201.1) DP: 38, EP: 5.0, CE: 25, CXP: 3.7。

2.3 血浆样品处理 取大鼠血浆样品 200 μ L, 精密加入内标 20 μ L, 再加 400 μ L 乙腈以沉淀蛋白, 涡旋混匀 3 min, 15 000 r $\cdot$ min⁻¹ 低温离心 10 min, 取上清 100 μ L, 进样 10 μ L。

2.4 方法学考察

2.4.1 方法特异性 将空白血浆和加对照品 (咪达普利+咪达普利拉+内标西替利嗪) 的空白血浆分别按“2.3”项方法操作后进样分析。上述色谱条件下测得空白血浆、加对照品的空白血浆的色谱图见图 1, 咪达普利、咪达普利拉和内标西替利嗪的出峰时间分别为 2.09, 2.40, 3.93 min。与空白血浆的色谱图比较, 血浆中的内源性物质不干扰待测物及内标的测定。

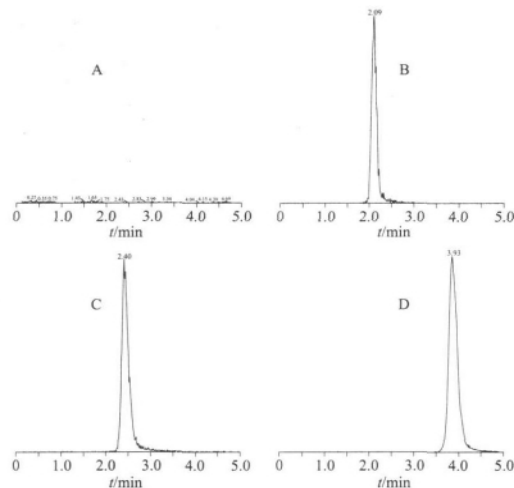


图 1 空白血浆中的咪达普利、咪达普利拉和内标的 MRM 图
A. 空白血浆; B. 咪达普利; C. 咪达普利拉; D. 内标
Fig 1 chromatograms of imidapril, imidaprilat and internal standard in blank plasma
A. blank plasma; B. imidapril; C. imidaprilat; D. internal standard

2.4.2 线性和定量下限 配制系列浓度的咪达普利和咪达普利拉标准溶液。取空白血浆 160 μL , 加咪达普利标准溶液、咪达普利拉标准溶液各 20 μL , 再加入内标西替利嗪溶液 20 μL , 配制成相当于咪达普利质量浓度为 200, 100, 40, 20, 8, 4, 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 咪达普利拉质量浓度为 100, 50, 20, 10, 4, 2, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血浆样品, 按“2.3”项操作后进样分析。以待测物浓度为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值 f 为纵坐标, 用加权 ($W=1/x^2$) 最小二乘法进行回归运算, 求得标准曲线。根据标准曲线得咪达普利的标准曲线为: $Y=0.0167X+0.000106$ ($r=0.9989$), 线性范围为 2~200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 定量下限为 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 检测下限为 0.6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 咪达普利拉的标准曲线为: $Y=0.00464X+0.00813$ ($r=0.9991$), 线性范围为 1~100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 定量下限为 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 检测下限为 0.3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.4.3 方法精密度 精密配制含咪达普利质量浓度为 6.7, 33.3, 166.7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和咪达普利拉质量浓度为 3.3, 16.7, 83.3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的低、中、高 3 个浓度的血浆样品各 6 份, 按“2.3”项操作后进样分析。计算药物峰面积和内标峰面积的比值 f , 代入当天的标准曲线求得实测浓度, 计算精密度, 结果见表 1。

2.4.4 方法回收率及提取回收率 分别配制低、中、高 3 种浓度的对照品溶液各 6 份, 按“2.3”项方法及 LC-MS/MS 条件进行处理和分析, 计算方法回收率。同法, 分别配制低中高 3 种浓度的对照品血浆各 6 份, 按上述“2.3”项方法及 LC-MS/MS 条件进行处理和分析, 以提取后的色谱峰面积与未经提取直接进样的相应浓度的对照品溶液的色谱峰面

积之比, 考察方法的提取回收率。结果见表 1。
表 1 咪达普利和咪达普利拉在大鼠血浆中的回收率与精密度 ($n=6$)

Tab 1 Precision and recovery of imidapril and imidaprilat in rat plasma ($n=6$)

样品	质量浓度 $/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	日内精 密度/%	日间精 密度/%	方法回 收率/%	提取回 收率/%
咪达普利	6.7	4.9	6.5	92.8 $\pm$ 7.9	109.1 $\pm$ 8.2
	33.3	5.2	5.8	95.0 $\pm$ 5.2	93.8 $\pm$ 6.8
	166.7	3.0	5.5	96.1 $\pm$ 4.8	95.5 $\pm$ 5.0
咪达普利拉	3.3	5.1	5.6	94.5 $\pm$ 6.0	93.1 $\pm$ 6.9
	16.7	3.2	6.1	100.5 $\pm$ 3.2	107.2 $\pm$ 7.4
	83.3	3.9	7.0	97.8 $\pm$ 5.8	93.6 $\pm$ 8.0

2.4.5 样品稳定性考察及冻融试验 分别配制低、中、高 3 种浓度的对照品血浆各 2 份, 按上述“2.3”方法处理后测定。同法, 配制低中高 3 种浓度的对照品血浆各 6 份, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 冻融 3 次, 并分别测定。结果见表 2。

表 2 样品稳定性及冻融稳定性 ($n=6$)

Tab 2 The results of stability ($n=6$)

样品	质量浓度 $/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	稳定性 /%	冻融	
			测定值/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%
咪达普利	6.7	4.2	6.3 $\pm$ 0.4	6.35
	33.3	4.8	33.5 $\pm$ 1.8	5.43
	166.7	3.9	160.5 $\pm$ 5.2	3.26
咪达普利拉	3.3	4.1	3.6 $\pm$ 0.2	5.83
	16.7	5.6	17.3 $\pm$ 1.0	5.84
	83.3	3.1	82.5 $\pm$ 3.1	3.77

3 讨论

本实验所建立的 LC-MS/MS 方法血浆样品处理仅用一步乙腈沉淀蛋白即可, 且本实验条件下咪达普利和咪达普利拉的最低定量限分别是 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 最低检测限分别为 0.6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 0.3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 能够满足研究需要。本测定方法具有很好的特异性和线性, 精密度、回收率和稳定性均符合方法学要求, 少量的血样便能测出待测物的浓度, 适合于体内血药浓度测定。

参考文献:

[1] Yajima K, Shimada A, Hirose H, *et al.* Effect on the atherogenic marker plasminogen activator inhibitor type-1 of addition of the ACE inhibitor imidapril to angiotensin II type 1 receptor antagonist therapy in hypertensive patients with abnormal glucose metabolism: a prospective cohort study in primary care [J]. Clin Drug Investig, 2009, 29(12): 811-819.
[2] Takahashi S, Katoh M, Saitoh T, *et al.* Different inhibitory effects in rat and human carboxylesterases [J]. Drug Metab Dispos, 2009, 37(5): 956-961.
[3] Robinson DM, Curran MP, Lyseng-Williamson KA. Imidapril: a review of its use in essential hypertension, Type 1 diabetic nephropathy and chronic heart failure [J]. Drugs, 2007, 67(9): 1359-1378.
[4] Yamanaka K, Morikawa S, Murata K, *et al.* Radioimmunoassay for imidapril, a new angiotensin-converting enzyme inhibitor, and imidaprilat, its active metabolite, in human plasma and u-

- rine[J]. J Pharm Biomed Anal, 1996, 14(3): 281-287.
- [5] Yun JH, Myung JH, Kim HJ, *et al.* LC-MS determination and bioavailability study of imidapril hydrochloride after the oral administration of imidapril tablets in human volunteers[J]. Arch Pharm Res, 2005, 28(4): 463-468.
- [6] Mabuchi M, Kano Y, Fukuyama T, *et al.* Determination of imidapril and imidaprilat in human plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1999, 29, 734(1): 145-153.

[收稿日期] 2010-08-15

胆石六号汤剂的镇痛作用及对肝功能的影响

刘龙忠¹, 陈泽慧², 田应彪¹ (遵义医学院附属医院, 1. 药剂科, 2. 医学实验科, 贵州 遵义 563000)

[摘要] 目的: 研究胆石六号汤剂的镇痛作用, 并观察其对肝功能的影响。方法: 取小鼠分为生理盐水空白对照组、阳性对照组、胆石六号汤剂高、中、低剂量组, 采用化学刺激方法, 观察胆石六号汤剂的镇痛作用; 通过对小鼠的眼球采血, 观察胆石六号汤剂对血液生化指标的影响。结果: 胆石六号汤剂对醋酸所致小鼠扭体反应有明显的抑制作用; 在小鼠血液生化指标中, 胆石六号汤剂降低丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸转移酶(AST), 增加血清总蛋白(TP), 但对白蛋白(ALB)及球蛋白(GLO)未见明显影响。结论: 胆石六号汤剂具有镇痛作用, 而且具有保护肝功能的潜在作用。

[关键词] 胆石六号汤剂; 镇痛; 肝功能; 小鼠

[中图分类号] R969 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-5213(2011)13-1058-03

Study on analgesic effect of Bilestone 6th Decoction and its influence on liver function

LIU Long-zhong¹, CHEN Ze-hui², TIAN Ying-biao¹ (1. Department of Pharmacy, 2. Department of Medical Experiment, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the analgesic effect of Bilestone 6th Decoction and its influence on liver function. **METHODS** The mice were divided into saline control group, positive control group, gallstones on Bilestone 6th Decoction of high, medium and low dose groups. By using the chemical stimulation to observe the analgesic effect of decoction of Bilestone 6th Decoction; and using mice eye blood, the blood biochemical indexes were observed. **RESULTS** The data showed that Bilestone 6th Decoction significantly attenuated writhing induced by acetic acid. Meanwhile, Bilestone 6th Decoction decreased alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities, but increased total protein (TP) in serum in mice. However, Bilestone 6th Decoction did not affect albumin (ALB) and globulin (GLO) levels. **CONCLUSION** Bilestone 6th Decoction may own analgesic effect, and have liver-protective potential effect.

KEY WORDS: Bilestone 6th Decoction; analgesia; liver function; mouse

胆石六号汤剂由大黄、木香、栀子、金钱草等组成的我院自制制剂, 具有利胆、消炎、排石、镇痛、攻下等作用, 临床上应用多年, 治疗急性胆囊炎、胆囊结石、重症胆囊炎等效果较好^[1-2]。但是对该药在镇痛作用, 及在应用过程中是否会引起肝功能损伤尚不清楚。因此, 本研究通过小鼠扭体试验观察胆石六号汤剂镇痛效果, 并通过检测小鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸转移酶(AST)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、球蛋白(GLO)等观察了其肝功能的影响, 旨在为临床应用该制剂的临床适应证提供基础药理学依据。

1 材料

RE-2000 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), 圆底烧瓶(2 000 mL); 回流冷凝装置, AU5400 全自动生化分析仪及配套试剂(日本 Olympus 公司); XS-800i 全自动血球计数仪及配套试剂(日本 Sysmex 公司); 贝诺酯片(0.4 g/片, 地奥集团成都药业股份有限公司, 批号 090306); 冰醋酸(分析纯); 消石利胆胶囊(每粒装 0.4 g, 保定步长天浩制药有限公司, 批号 090501)等; 昆明种小鼠, 体质量 18~22 g, ♀♂兼用, 重庆医科大学实验动物中心提供。

2 方法

2.1 处方 木香 165 g, 金钱草 333 g, 枳壳 100 g,

[基金项目] 贵州省科学技术基金项目(编号: 黔科合 J 字[2008]2151 号) **[作者简介]** 刘龙忠, 男, 副主任药师, 电话: 13087874566, E-mail: llzzyq_20071118@163.com **[通讯作者]** 田应彪, 男, 主任药师, 电话: 0852-8608517, E-mail: tybczh@163.com