

# HPLC-荧光法测定大鼠微量血浆中酒石酸唑吡坦的含量<sup>Δ</sup>

苗彩云<sup>1\*</sup>, 陈江飞<sup>2</sup>, 朱素燕<sup>2</sup>, 徐萍<sup>2</sup>(1.宁波市妇女儿童医院药剂科, 浙江宁波 315012; 2.宁波市第一医院药剂科, 浙江宁波 315010)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)04-0468-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.04.11

**摘要** 目的:建立微量血浆中酒石酸唑吡坦的含量测定方法。方法:取大鼠,ig酒石酸唑吡坦溶液3 mg/kg,给药后取血0.2 ml,分离后取血浆50 μl经甲醇沉淀蛋白,取上清液采用高效液相色谱-荧光法测定,以外标法进行定量。色谱柱为Agilent HC-C<sub>18</sub>,流动相为0.03 mol/L磷酸二氢钾溶液(含0.2%三乙胺)-甲醇(33:67, V/V),流速为1.0 ml/min,激发波长为254 nm,发射波长为390 nm,进样量为20 μl。结果:酒石酸唑吡坦检测质量浓度的线性范围为2~200 μg/L( $r=0.9997$ ),定量下限为2 μg/L;方法回收率为(96.96±1.35)%~(105.0±5.36)% (RSD为2.20%~4.88%,  $n=5$ );提取回收率为(79.72±0.01)%~(80.77±0.02)% (RSD为1.34%~3.90%,  $n=5$ );日内RSD为1.40%~5.10%,日间RSD为3.22%~9.25% ( $n=5$ )。结论:本法简便、灵敏,可用于微量血浆中唑吡坦的含量测定。

**关键词** 高效液相色谱法;酒石酸唑吡坦;微量血浆;血药浓度;大鼠

## Content Determination of Zolpidem Tartrate in Microsamples of Rat Plasma by HPLC-fluorescence Method

MIAO Caiyun<sup>1</sup>, CHEN Jiangfei<sup>2</sup>, ZHU Suyan<sup>2</sup>, XU Ping<sup>2</sup>(1.Dept. of Pharmacy, Ningbo Women and Children's Hospital, Zhejiang Ningbo 315012, China; 2.Dept. of Pharmacy, Ningbo Municipal First Hospital, Zhejiang Ningbo 315010, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of zolpidem tartrate in microsamples of rat plasma. METHODS: Rats were given zolpidem tartrate solution 3 mg/kg intragastrically, and 0.2 ml blood sample were collected and isolated. 50 μl plasma was precipitated by methanol, and the supernatant was determined by HPLC-fluorescence combined with external method. Agilent HC-C<sub>18</sub> column was used with mobile phase consisted of 0.03 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> solution (containing 0.2% triethylamine)-methanol (33:67, V/V) at flow rate of 1.0 ml/min. The excitation and emission wavelengths were 254 nm and 390 nm, respectively. The sample size was 20 μl. RESULTS: The linear ranges of zolpidem tartrate in plasma was 2-200 μg/L ( $r=0.9997$ ), and the limit of quantification was 2 μg/L. The method recoveries of zolpidem were (96.96±1.35)%-(105.0±5.36)% (RSD=2.20%-4.88%,  $n=5$ ), and extraction recoveries were (79.72±0.01)%-(80.77±0.02)% (RSD=1.34%-3.90%,  $n=5$ ). The intra-day and inter-day RSDs were 1.40%-5.10% and 3.22%-9.25% ( $n=5$ ), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, sensitive and suitable for the content determination of zolpidem tartrate in microsamples of plasma.

**KEYWORDS** HPLC; Zolpidem tartrate; Microsamples of plasma; Plasma concentration; Rat

唑吡坦(Zolpidem)为咪唑吡啶类催眠药,能选择性地与中枢神经系统γ-氨基丁酸A(GABA<sub>A</sub>)受体ω<sub>1</sub>亚型结合,具有较强的镇静、催眠作用,但抗惊厥、抗焦虑和肌肉松弛作用较弱。唑吡坦具有起效快、半衰期短的特点,不良反应轻微,临床主要用于短暂性、偶发性失眠症的治疗或慢性失眠症的短期治疗。

采用气相或液相色谱法测定生物样本中唑吡坦浓度国内外已有较多文献报道<sup>[1-3]</sup>。对于高效液相色谱法,采用荧光检测器比紫外检测器具有更高的灵敏度<sup>[2-3]</sup>。由于一般人体生物样本分析可采用0.5~1 ml,但对于小体型动物(如大鼠)需多次采血试验时,有必要考虑每次的采血量小于0.5 ml,因为采血量大会对动物体内的药物浓度产生影响,甚至导致动物死亡。对此,笔者建立了高效液相色谱-荧光法测定大鼠微量血浆中酒石酸唑吡坦含量的方法,结果表明,该方法快速、简便、灵敏度高,可用于体内药动学的研究。

## 1 材料

### 1.1 仪器

HP-1100 高效液相色谱仪,包括 G1322A 脱气装置、G1311A 四元泵、G1313A 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1321A 荧光检测器、HP 化学工作站(美国 Agilent 公司);FA2004 电子天平(上海光正医疗仪器有限公司);TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂,离心半径:6 cm);XW-80A 漩涡混合器(上海医科大学仪器厂)。

### 1.2 药品与试剂

酒石酸唑吡坦片[赛诺菲(杭州)制药有限公司,批号:2T066,规格:每片 10 mg];酒石酸唑吡坦对照品(江苏豪森药业股份有限公司,批号:40246RS111019,纯度:99.5%);甲醇为色谱纯,磷酸二氢钾、三乙胺为分析纯,水为灭菌注射用水。

### 1.3 动物

[16] 张俊.自噬在肺缺血再灌注损伤中的作用及其机制研究[D].武汉:华中科技大学,2013.

Δ 基金项目:2013年浙江省医学会临床科研基金项目(No.2013ZYC-A68)

\* 副主任药师,硕士。研究方向:临床药学。E-mail: miaocy1979@163.com

[17] Lee SJ, Ryter SW, Xu JF, *et al.* Carbon monoxide activates autophagy via mitochondrial reactive oxygen species formation[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 45 (4):867.

(收稿日期:2015-09-14 修回日期:2015-11-09)

(编辑:邹丽娟)

SD大鼠, ♂, 体质量为(264±10) g, 购自浙江省实验动物中心, 合格证号为SCXK(浙)20140001。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Agilent HC-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.03 mol/L 磷酸二氢钾溶液(含0.2%三乙胺)-甲醇(33:67, V/V), 流速: 1.0 ml/min; 荧光检测器, 激发波长: 254 nm, 发射波长: 390 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20 μl。同时考察大鼠空白血浆、空白血浆+酒石酸唑名坦对照品和血浆样品。结果在该色谱条件下, 唑名坦色谱峰分离良好, 保留时间约为7.17 min, 血浆内源性杂质对样品测定无干扰, 色谱图见图1。

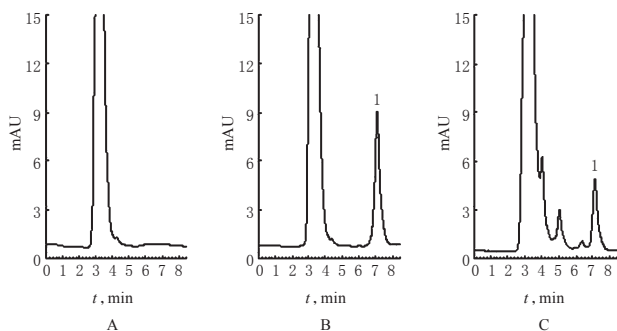


图1 高效液相色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+对照品; C. 样品血浆; 1. 唑名坦

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma+substance control; C. plasma sample; 1. zolpidem

### 2.2 系列标准溶液的制备

精密称取酒石酸唑名坦对照品50 mg, 置于50 ml量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 混匀, 得1.00 mg/ml的贮备液; 再用甲醇稀释制成1、10、100、1 000 μg/L的系列标准溶液, 4℃冰箱保存备用。

### 2.3 样品的处理

取待测血浆50 μl, 置于塑料离心管(1.5 ml)中, 加入甲醇0.3 ml, 旋涡混合30 s, 以离心半径6 cm、13 000 r/min离心5 min, 精密移取上清液0.3 ml, 50℃水浴下氮气吹干, 残渣用50 μl甲醇复溶, 进样测定。

### 2.4 标准曲线的制备

在塑料离心管中分别精密加入酒石酸唑名坦系列标准溶液适量, 再加入空白血浆50 μl, 涡旋混匀, 制成2、10、50、100、200 μg/L的系列标准血浆样品, 按“2.3”项下方法处理后进样测定, 记录峰面积。以血浆中酒石酸唑名坦的质量浓度(x)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程为 $y=1.8648x+2.3808$ ( $r=0.9997, n=5$ )。结果表明, 酒石酸唑名坦检测质量浓度的线性范围为2~200 μg/L, 定量下限为2 μg/L(信噪比≥10)。

### 2.5 方法回收率与精密度试验

取空白血浆, 按“2.4”项下方法制备成酒石酸唑名坦质量浓度为2、50、100 μg/L的血浆样品各5份, 按“2.3”项下方法处理, 分别于同日内连续测定5次及5 d内每天测定1次。将峰面积代入回归方程计算质量浓度, 计算方法回收率及日内、日间精密度, 结果见表1。

### 2.6 提取回收率试验

取空白血浆, 按“2.4”项下方法制备成酒石酸唑名坦质量浓度为2、50、100 μg/L的血浆样品各5份, 按“2.3”项下方法处理, 进样测定; 另取用甲醇制备的相应质量浓度的酒石酸唑名坦标准溶液, 直接进样。将两组峰面积进行比较, 计算提取回收率, 结果见表2。

表1 方法回收率与精密度试验结果(n=5)

Tab 1 Results of method recovery and precision tests(n=5)

加入量, μg/L	测得量, μg/L	方法回收率		精密度	
		$\bar{x} \pm s$	RSD, %	日内RSD, %	日间RSD, %
2	2.10	105.0±5.36	4.88	5.10	9.25
50	49.18	98.36±2.82	3.21	2.86	5.52
100	96.96	96.96±1.35	2.20	1.40	3.22

表2 提取回收率试验结果(n=5)

Tab 2 Results of extraction recovery test(n=5)

加入量, μg/L	提取回收率, %	RSD, %
2	79.72±0.01	1.34
50	80.60±0.03	3.90
100	80.77±0.02	3.17

### 2.7 稳定性试验

将低、中、高质量浓度(2、50、100 μg/L)的血浆样品分别在室温下放置6 h、冻融3个周期和冷冻保存10 d, 然后按“2.3”项下方法处理, 进样测定, 考察稳定性。结果显示, 峰面积的RSD均小于10%, 表明血浆样品稳定性良好。

### 2.8 血药浓度的测定

取7只大鼠, 服药前禁食12 h但不禁水, 次日早晨空腹ig酒石酸唑名坦溶液(酒石酸唑名坦片用生理盐水溶解), 给药剂量为3 mg/kg。分别于给药后0.5 min和0.25、0.5、1、2、3、4、6、8 h断尾取血约0.2 ml, 置于肝素化塑料离心管(1.5 ml)中, 以离心半径6 cm、5 000 r/min离心10 min, 取血浆样品, 按“2.3”项下方法处理后进样测定。记录峰面积, 代入回归方程计算血药浓度, 绘制药-时曲线, 结果见图2。

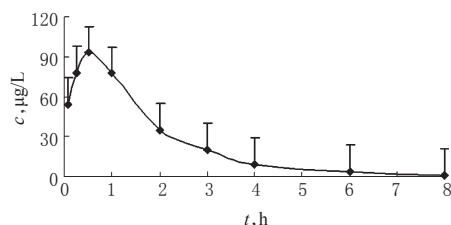


图2 唑名坦在大鼠体内的药-时曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time profiles of zolpidem

## 3 讨论

本文建立了高效液相色谱-荧光法测定微量血浆(50 μl)中唑名坦的浓度的方法, 该法样品预处理操作简便, 且灵敏度高、专属性强。Wang Q等<sup>[3]</sup>报道采用高效液相色谱-紫外检测法测定同样血浆量的唑名坦浓度, 本文与其比较定量下限更低, 这表明荧光检测器比紫外检测器具有更高的检测灵敏度。有文献报道可通过氯仿<sup>[3]</sup>、乙醚<sup>[4-5]</sup>等有机溶剂提取或固相萃取法<sup>[6]</sup>处理血浆样品, 但这些方法均处理成本高且过程复杂; 本实验通过甲醇沉淀蛋白后取上清液直接氮气吹干, 操作方法简便, 通过样品浓缩使定量下限降低, 这表明通过外标法定量测定微量血浆(50 μl)中唑名坦浓度具有较好的准确性。

由于一般人体生物样本分析可采用0.5~1 ml, 而在小体型动物(如大鼠)需多次采血进行药理学试验时, 每次采集量多小于0.5 ml。本文建立的高效液相色谱-荧光法测定大鼠微量血浆中酒石酸唑名坦的浓度, 定量下限低至2 μg/L, 样本处理方法简便, 灵敏度高、专属性好, 符合生物样本测定的要求, 可满足体内药理学研究的要求。

## 参考文献

- [1] Lewis JH, Vine JH. A simple and rapid method for the identification of zolpidem carboxylic acid in urine[J]. *J Anal Toxicol*, 2007, 31(4): 195.

# 滋肾育胎丸对电磁辐射大鼠卵巢组织氧化损伤和Nrf2蛋白表达的影响<sup>Δ</sup>

刘云肖<sup>1\*</sup>, 马惠荣<sup>2#</sup>, 陈景伟<sup>2</sup>, 马雪莲<sup>2</sup>, 曹晓慧<sup>3</sup>, 陈杰<sup>3</sup>, 张国红<sup>3</sup>(1.河北中医学院护理学院, 石家庄 050091; 2.河北中医学院中西医结合学院, 石家庄 050091; 3.河北医科大学研究生院, 石家庄 050011)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)04-0470-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.04.12

**摘要** 目的:研究滋肾育胎丸对电磁辐射大鼠卵巢组织氧化损伤和卵巢颗粒细胞中核因子E<sub>2</sub>相关因子2(Nrf2)蛋白表达的影响。方法:将30只SD大鼠按体质量随机分为正常组、辐射组和辐射治疗组,每组10只。正常组大鼠不辐射,另两组置于900 MHz辐射箱中每天辐射4 h。辐射治疗组每天辐射后ig滋肾育胎丸混悬液[0.25 g(生药)/0.1 kg],正常组和辐射组ig等体积生理盐水,连续20 d后于动情期处死大鼠。采用免疫组化法检测各组大鼠卵巢颗粒细胞中Nrf2蛋白的表达,生化法检测卵巢组织总超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性和丙二醛(MDA)含量。结果:与正常组比较,辐射组大鼠卵巢颗粒细胞中Nrf2蛋白表达增强,卵巢组织中T-SOD和GSH-Px活性降低、MDA含量增加( $P<0.05$ );与辐射组比较,辐射治疗组大鼠卵巢颗粒细胞中Nrf2蛋白表达无显著变化( $P>0.05$ ),卵巢组织中T-SOD和GSH-Px活性升高、MDA含量降低( $P<0.05$ )。结论:滋肾育胎丸对900 MHz电磁辐射所致的大鼠卵巢组织氧化损伤有一定的防治作用,对Nrf2蛋白表达无明显影响。

**关键词** 电磁辐射;滋肾育胎丸;卵巢组织;核因子E<sub>2</sub>相关因子2;氧化损伤;大鼠

## Impacts of Zishenyutai Pills on the Ovarian Tissue Oxidative Damage and Nrf2 Protein Expression in Rats Exposed by Electromagnetic Radiation

LIU Yunxiao<sup>1</sup>, MA Huirong<sup>2</sup>, CHEN Jingwei<sup>2</sup>, MA Xuelian<sup>2</sup>, CAO Xiaohui<sup>3</sup>, CHEN Jie<sup>3</sup>, ZHANG Guohong<sup>3</sup>(1. Nursing College, Hebei University of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China; 2. College of Integrated Traditional and Western Medicine, Hebei University of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China; 3. The Graduate School, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the impacts of Zishenyutai pills on the ovarian tissue oxidative damage and Nrf2 protein expression in rats exposed by electromagnetic radiation (EMR). METHODS: According to their weight, 30 SD rats were randomly divided into normal group, radiated group and radiated-treated group with 10 rats in each group. Normal group were not radiated, and other 2 groups were exposed by 900 MHz radiation for 4 h every day; radiated-treated group was given Zishenyutai pills suspension [0.25 g intragastically (medicinal materials)/ml] after radiation; normal group and radiated group were given constant volume of normal saline intragastically for consecutive 20 d. The rats were killed when they were at the estrum. The Nrf2 proteins expression of ovary were detected by immunohistochemical method, the content of ovary MDA (malondialdehyde), and activity of total superoxide dismutase (T-SOD) and superoxide dismutase (GSH-Px) were detected by biochemical method. RESULTS: Compared with the rats in normal group, the Nrf2 protein expression was higher in the rats of the radiated group; the content of ovary MDA was higher and activity of ovary T-SOD and GSH-Px were lower significantly ( $P<0.05$ ). While compared with the rats in radiated group, the Nrf2 protein expression didn't obviously change in the rats of the radiated-treated group ( $P>0.05$ ), the content of ovary MDA was lower and activity of ovary T-SOD and GSH-Px were higher significantly ( $P<0.05$ ). CONCLUSIONS: Zishenyutai pills can prevent and cure ovary tissue oxidative injury induced by 900 MHz radiation, but have no effect on the expression of Nrf2 protein.

**KEYWORDS** Electromagnetic radiation; Zishenyutai pills; Ovary tissue; Nrf2; Oxidative stress; Rats

[2] 徐家根, 初立梅, 许静, 等. 酒石酸唑吡坦口溶片的药动学及生物等效性[J]. 中国药房, 2010, 21(34): 320.

[3] Wang Q, Sun L, Lau CE. Determination of zolpidem in serum microsamples by high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetics in rats[J]. *J Chromatogr B*, 1999, 734(2): 299.

Δ 基金项目:河北省科技计划项目(No.13277762D);河北省高等学校科学技术研究项目(No.2009146)

\* 讲师, 硕士。研究方向:中医药防治电磁辐射对生殖的损伤。电话:0311-67665525。E-mail:liuyunxiao1199@163.com

# 通信作者:教授, 博士。研究方向:中医药防治电磁辐射对生殖的损伤。电话:0311-89926716。E-mail:mahuirong@126.com

[4] 宋洪杰, 李珍, 石晶, 等. 高效液相色谱-荧光检测法测定人血浆中酒石酸唑吡坦的浓度[J]. 中国药理学杂志, 2001, 36(5): 333.

[5] 郭涛, 杨磊, 夏东亚, 等. 单剂量口服酒石酸唑吡坦在中国朝鲜族和汉族健康人体内的药代动力学[J]. 中国临床药理学杂志, 2010, 26(10): 753.

[6] 刘治军, 殷琦, 李可欣, 等. 国产酒石酸唑吡坦的生物利用度和生物等效性研究[J]. 中国新药杂志, 2005, 14(8): 1 036.

(收稿日期:2015-04-23 修回日期:2015-06-15)

(编辑:邹丽娟)