

HPLC 同时测定大鼠血浆中克泻灵片的生物碱

汤浩^{1,2}, 闵光涛³, 李玉民³, 蒋生祥^{1*} (1:中国科学院兰州化物所, 兰州 730000; 2:中国科学院研究生院, 北京 100039; 3:兰州大学第一医院普外科, 兰州 730000)

摘要:目的 建立克泻灵片中生物碱成分的大鼠血浆 HPLC 同时测定方法。方法 灌胃克泻灵片, 以乙酰苯胺为内标, RP-HPLC-UV 法在 220 nm 波长处进行血药浓度测定。结果 槐定碱和苦参碱在大鼠血浆中定量准确, 最低检测限分别为 350 ng · mL⁻¹ 和 100 ng · mL⁻¹, 回收率大于 98%。结论 该方法简便、准确、重复性好, 可为克泻灵片的体内药动学研究提供方法学参考。

关键词:槐定碱; 苦参碱; 高效液相色谱法; 大鼠血浆; 克泻灵片

中图分类号: R917. 101, R917. 78

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2009)02-0158-04

Simultaneous Determination of Alkaloids by HPLC in Rat Plasma after Kexieling Tablets Administration

TANG Hao^{1,2}, MIN Guangtao³, LI Yumin³, JIANG Shengxiang^{1*} (1. *Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China*; 2. *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China*; 3. *First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China*;)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for simultaneously determining the alkaloids of Kexieling tablets in rat plasma. **METHODS** The plasma samples were determined at 220 nm wavelength by reversed-phase HPLC and ultraviolet detection following oral administration of Kexieling tablets. **RESULTS** Sophoridine and matrine with 350 and 100 ng · mL⁻¹ of limits of quantitation in plasma, respectively, can be accurately quantitated, and the recovery of both analytes was greater than 98%.

CONCLUSION The method is simple, accurate and can be referenced for pharmacokinetic study of Kexieling tablets.

KEY WORDS: sophoridine; matrine; HPLC; rat plasma; Kexieling tablets

作者简介: 汤浩, 女, 博士, 主管药师 Tel: (0931) 4968271
Tel: (0931) 4968266 E-mail: sxjiang@126.com

E-mail: jjiwwo@yahoo.com.cn

* 通信作者: 蒋生祥, 男, 研究员

克泻灵片系用豆科槐属植物苦豆子提取的苦豆子总生物碱制备的纯中药制剂,具有抗菌消炎功效,临床上用于急、慢性菌痢、肠炎。据文献报道^[1],其有效成分主要为苦参碱类生物碱,且槐定碱和苦参碱的含量较高。槐定碱具有独特的抗肿瘤效果^[2],为该片剂临床适应证的扩展提供了基础。由于抗肿瘤药物治疗谱窄,最大用药剂量与中毒剂量接近,监测药物体内含量,对临床用药指导和药物作用机制研究意义重大。现有的苦参碱类生物碱体内分析方法有 HPLC, HPLC-MS, CE, GC 等^[3-7],克泻灵片的苦参碱类生物碱体内同时分析方法国内未见报道。本研究用 HPLC,同时测定大鼠血浆中生物碱成分含量,为克泻灵片的药动学研究提供参考。

1 仪器与试药

高效液相系统包括 Waters Delta 600 泵、Waters 2487 双波长检测器、Millennium 32 色谱工作站 (Waters, USA)。氧化苦参碱、槐定碱、苦参碱和乙酰苯胺对照品 (中国药品生物制品检定所);乙腈 (色谱纯,中国科学院上海脑研究所);醋酸铵和三乙胺 (分析纯,天津试剂三厂);纯净水每日用 Milli-Q 水净化器 (Millipore Corp, Bedford, MA, USA) 制备;克泻灵片购自宁夏紫荆花药业公司。

2 方法

2.1 色谱条件

分析柱: AT Chrom C₁₈ 填充柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm 中国科学院兰州化物所色谱中心)。以文献为基础^[1],考察 0.02 mol · L⁻¹ 醋酸铵水溶液中,不同含量乙腈 (15%, 20%, 25%, 30%, 35%) 和是否添加 0.035 mL 三乙胺,对氧化苦参碱、槐定碱、苦参碱保留时间的影响。流动相用微孔滤膜 (0.45 μm) 过滤,并脱气后使用。检测波长: 220 nm;流速: 0.8 mL · min⁻¹;室温进样;进样量: 25 μL。

2.2 供试药品制备

将 15 片克泻灵研磨粉碎,精密加入 25 mL 蒸馏水,超声溶解 20 min, 6 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,以相同色谱条件 10 μL 进样,测得槐定碱、苦参碱的含量分别为 6, 3 mg · mL⁻¹。此浓度混悬液以 1 mL · (100 g)⁻¹ 给大鼠灌胃,分别相当于 60 mg · kg⁻¹ 的槐定碱及 30 mg · kg⁻¹ 的苦参碱。

2.3 动物及血样采集

雄性 Wistar 大鼠 5 只 (体重: 180 ~ 230 g) 购自于兰州医学院动物实验中心 (证书号: 医动字 14-006)。大鼠实验前禁食 12 h, 在乙醚麻醉下, 将聚

乙烯管 (0.28 mm i. d., 0.61 mm o. d.) 插入其右股动脉, 待其苏醒 1 h 以后, 再以克泻灵片混悬液灌胃给药。在给药后 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 480, 720, 1 200 及 1 440 min 通过动脉插管抽取 0.25 mL 血样。每次取样后为了补充减少的血量, 通过插管注入同体积的肝素钠 (100 u · mL⁻¹) 生理盐水。在用药后 1 h 给大鼠供水。

2.4 血浆样品的制备

将每次采集的血样立刻转入涂过肝素的 0.5 mL 离心试管中, 在 3 000 r · min⁻¹ 下离心 10 min。取血浆 0.1 mL, 加入含有内标 3 μg · mL⁻¹ 乙酰苯胺的乙腈液 0.2 mL 后用旋涡振荡器振荡混合 30 s, 静置 15 min 后将此混合液在 3 000 r · min⁻¹ 下离心 5 min, 除去蛋白质。将上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 滤液 25 μL 直接进样。

3 结果

3.1 色谱条优化与方法学验证结果

3.1.1 流动相选择 如图 1 所示, 0.02 mol · L⁻¹ 醋酸铵水溶液中, 氧化苦参碱保留时间受乙腈含量和三乙胺的影响不大, 始终维持在 3 min 左右。槐定碱在乙腈 15% 时, 保留时间为 4.7 min, 当乙腈含量大于 20% 后, 保留时间随乙腈含量增高而减少 (6.33 到 2.86 min)。苦参碱保留时间随乙腈含量不同, 变化显著。乙腈由 15% 升到 25% 时, 保留时间由 13.51 min 升到 16.88 min, 而乙腈含量继续升高时, 保留时间又降至 5.6 min (35% 乙腈)。同时由图 1 看出, 当乙腈含量为 30% 时, 三乙胺的加入会使槐定碱和苦参碱的保留时间延长。

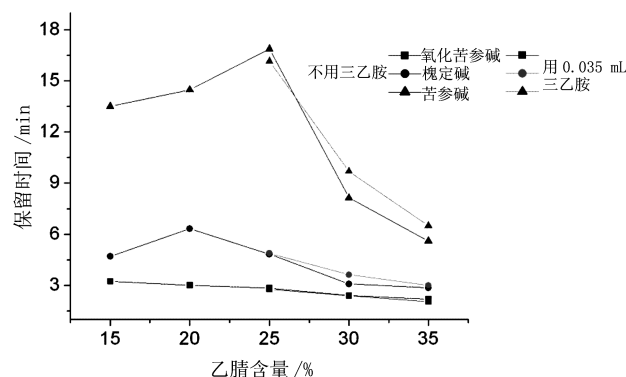


图 1 不同流动相组成对氧化苦参碱、槐定碱和苦参碱色谱保留时间的影响

Fig 1 Influence of different mobile phase on the retention time of oxymatrine, sophoridine and matrine

由于氧化苦参碱的保留时间始终在 3 min 左右, 分析样品时, 受大鼠血浆中内源性物质干扰, 因此放弃对其的测定。为了保证良好的色谱峰形和避

免血浆中内源性物质对测定的干扰,曾选乙腈30%,三乙胺0.048 mL,进行分析,但槐定碱与内标乙酰苯胺分离度不好(<1.2),因此最终确定以乙腈-0.02 mol·L⁻¹醋酸铵水溶液-三乙胺(25:75:0.048);流速1.2 mL·min⁻¹;检测波长:220 nm;室温进样;进样量:25 μL 为色谱条件。

3.1.2 专属性 在上述分析条件下,空白血浆、用空白血浆配制的标准品溶液(分别含槐定碱及苦参碱为8 000 ng·mL⁻¹和4 000 ng·mL⁻¹)及以大鼠口服灌胃克泻灵水溶液,30 min 时所取血样的色谱图,见图2。

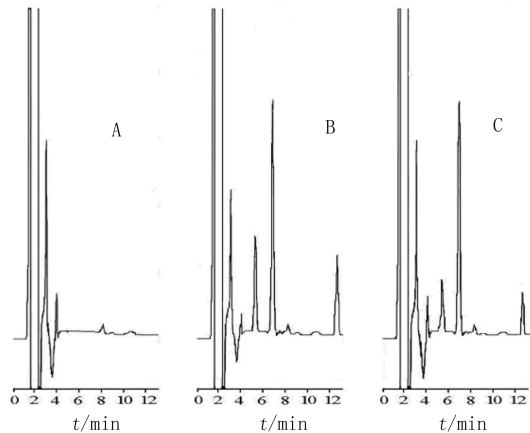


图2 槐定碱及苦参碱血样的色谱图
A - 空白血浆;B - 加样血浆;C - 样品

Fig 2 Chromatograms of sophoridine and matrine in rat plasma
A - blank plasma; B - plasma spiked with sophoridine and matrine; C - plasma sample

由图2可见,槐定碱、乙酰苯胺(内标)及苦参碱的保留时间分别为:5.27、7.02和12.50 min,出峰位置无内源性物质干扰,色谱峰尖锐、对称,并得到了基线分离且几乎无拖尾,因此有利于峰面积比

表1 槐定碱的精密度与准确度($n = 3$)

Tab 1 Results of precision and accuracy of the HPLC assay for sophoridine in rat plasma ($n = 3$)

槐定碱加入量 /ng·mL ⁻¹	日内			日间		
	测量值	准确度	RSD	测量值	准确度	RSD
	/ng·mL ⁻¹	/%	/%	/ng·mL ⁻¹	/%	/%
500	506.75 ± 73.64	101.4	14.5	496.40 ± 69.56	99.3	14.0
1 000	926.39 ± 110.76	92.6	12.0	943.66 ± 82.79	94.4	8.8
2 000	1 908.64 ± 149.35	95.4	7.8	1 906.87 ± 137.28	95.3	7.2
4 000	3 855.22 ± 188.37	95.4	4.9	3 746.13 ± 189.91	95.9	5.1
8 000	8 065.81 ± 255.69	100.8	3.2	7 879.41 ± 163.33	98.5	2.1

3.4 样品测定

给大鼠灌胃克泻灵片后,对槐定碱或苦参碱在给药后0,15,30,45,60,90,120,240,480,720,1 200和1 440 min 的血浆浓度进行了同时测定。经

的准确测定。

3.2 标准工作曲线、线性范围及定量限

溶于乙腈的槐定碱、苦参碱标准品储备液,进一步稀释得一系列浓度的标准溶液(槐定碱:500,1 000,2 000,4 000,8 000 ng·mL⁻¹;苦参碱:125,250,500,1 000,2 000,4 000 ng·mL⁻¹),再分别与空白大鼠血浆混合得到血浆样本。按“2.4”项下方法处理后,在上述色谱条件下,进样,测其峰面积。以槐定碱或苦参碱峰面积对内标的峰面积之比对应其血浆浓度进行线性回归分析,结果槐定碱和苦参碱的回归方程分别为 $Y = 30.021X + 0.4079$, ($r = 0.9986$)和 $Y = 15.279X + 0.1073$, ($r = 0.9988$);线性范围分别为500 ~ 8 000 ng·mL⁻¹和125 ~ 4 000 ng·mL⁻¹。以信噪比为10 确定定量限,和信噪比为3 确定检测限,槐定碱和苦参碱定量限分别为350 ng·mL⁻¹和100 ng·mL⁻¹;检测限分别为170 ng·mL⁻¹和70 ng·mL⁻¹。

3.3 精密度和回收率

用空白血浆配制500,2 000和4 000 ng·mL⁻¹的槐定碱样品及500,1 000和2 000 ng·mL⁻¹苦参碱样品($n = 5$)。将它们测定后所得的与内标的峰面积之比与直接用乙腈配制的同浓度标准品与内标的峰面积之比的比值作为回收率。槐定碱的回收率分别99.10%、106.51%和100.16%。苦参碱的回收率分别98.10%、105.13%和101.42%。以日内和日间变异考察重复性。精确度和准确度实验结果见表1和表2。实验证明,槐定碱和苦参碱的RSD小于15%,符合国际推荐的生物样品日内和日间分析标准^[8],该方法准确、灵敏、重复性好。

DAS2.0 药动力学数据处理软件拟合,槐定碱及苦参碱的平均血药浓度时间曲线见图3($n = 5$)。表3,4中分别列出了槐定碱和苦参碱药动力学统计矩参数。

表 2 苦参碱的精密性与准确度($n = 3$)

Tab 2 Results of precision and accuracy of the HPLC assay for matrine in rat plasma ($n = 3$)

苦参碱加入量 / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	日内			日间		
	测量值	准确度	RSD	测量值	准确度	RSD
	/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	/%	/%	/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	/%	/%
500	256.33 ± 38.14	102.5	14.9	260.28 ± 37.26	104.3	14.4
1 000	496.28 ± 52.80	99.2	10.6	483.71 ± 47.81	96.7	9.9
2 000	947.45 ± 74.81	94.8	7.9	927.97 ± 56.45	92.8	6.1
4 000	$1\,955.70 \pm 120.54$	97.8	6.2	$1\,813.43 \pm 120.73$	90.6	6.7
8 000	$4\,115.95 \pm 227.34$	102.9	5.5	$4\,011.59 \pm 127.87$	100.3	3.2

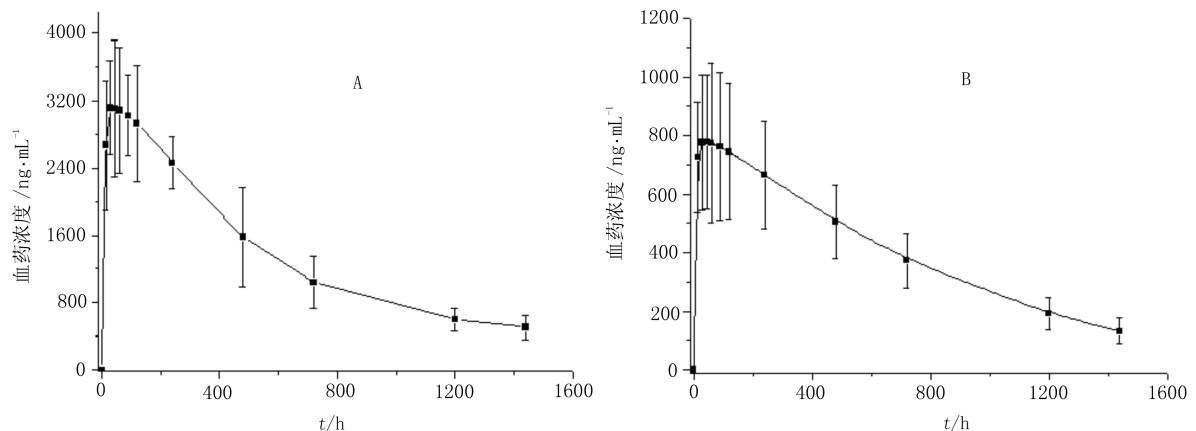


图 3 大鼠口服灌胃克泻灵片水溶液,槐定碱(A)与苦参碱(B)的药时曲线图($n = 5$)

Fig 3 Plasma concentration-time curve of sophoridine (A) and matrine (B) in rat after oral administration of Kexieling tablets($n = 5$).

槐定碱和苦参碱的平均最大血药浓度 $C_{\max}$ 分别为 $3\,407.23$ 和 $812.08 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,其达峰时间 $T_{\max}$ 分别在 30 min 和 $60 + 35 \text{ min}$ (表 3,4)。提示槐定碱和苦参碱吸收迅速,但其代谢非常缓慢,其半衰期均达到 8 h ($481 + 58, 487 + 176 \text{ min}$)。而文献报道,口服给药 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 苦参碱纯品, 4 h 时大鼠血药浓度迅速减至 $C_{\max}$ 的 $1/4$ ^[3];静脉注射 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 槐定碱纯品,免血浆 $t_{1/2}$ 只有 70.9 min ^[9]。药物的吸收、分布、代谢或排泄可能会被另一种药物所改变,且药物互相作用的发生,随患者服用药物种类的增多而增大^[10]。口服克泻灵片后,槐定碱和苦参碱在体内的清除不同于其纯品单独给药,这不仅与动物种属有关,与多种生物活性成分在体内的相互作用也有关系,且后者有可能是减慢槐定碱和苦参碱代谢的主要因素。

4 讨论

4.1 本文用乙酰苯胺为内标,用高效液相色谱法,同时测定了克泻灵片中两种生物碱活性成分(槐定碱和苦参碱)的血浆浓度。该方法不仅简单、有效、具有良好的准确度、精密性、灵敏度和重现性,可为该片剂的药动力学研究作参考。

4.2 口服克泻灵片后,槐定碱与苦参碱的代谢规

表 3 槐定碱药动力学参数($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab 3 Pharmacokinetics parameter of sophoridine($\bar{x} \pm s, n = 5$)

参数	槐定碱
$AUC_{(0-t)}/\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$	$2\,281\,252.66 \pm 708\,615.33$
$AUC_{(0-\infty)}/\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$	$2\,631\,827.16 \pm 848\,525.08$
$t_{1/2}/\text{min}$	481 ± 58
$T_{\max}/\text{min}$	30 ± 0
$CL/F/L \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.03 ± 0.01
$V_d/F/L \cdot \text{kg}^{-1}$	16.90 ± 4.90
$C_{\max}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$3\,407.23 \pm 1\,241.53$

表 4 苦参碱药动力学参数($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab 4 Pharmacokinetics parameter of matrine($\bar{x} \pm s, n = 5$)

参数	苦参碱
$AUC_{(0-t)}/\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$	$587\,551.83 \pm 125\,818.60$
$AUC_{(0-\infty)}/\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$	$670\,805.88 \pm 95\,692.68$
$t_{1/2}/\text{min}$	487 ± 176
$T_{\max}/\text{min}$	60 ± 35
$CL/F/L \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.05 ± 0.01
$V_d/F/L \cdot \text{kg}^{-1}$	32.86 ± 15.85
$C_{\max}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	942.65 ± 358.59

律,不同于它们分别的纯品给药,代谢时间都有延长,此药代动力学特征,可作为临床用药参考。

4.3 中药制剂多数成分复杂,主要利用它们的协同作用发挥疗效,但同时增加临床未期待事件的发生几率,建立有效的体内多成分监测方法,有利于保证临床用药安全,和作用机制的深入研究。

REFERENCES

- [1] ZONG L, LI K L, MA Y Z, et al. The determination of matrine alkaloids in kexieling tablets by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学杂志), 1998, 15(6):38-40.
- [2] LI X M, WU Y G, CHEN S L, et al. Anti tumor action of sophoridine [J]. Acta Pharm Sin, 1987, 8(2): 153-158.
- [3] Wu X A, YAMASHITA F, HASHIDA M, et al. Determination of matrine in rat plasma by high performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetic studies [J]. Talanta, 2003, 59(5):965-971.
- [4] WU Y J, CHEN J J, CHENG Y Y. A sensitive and specific HPLC-MS method for the determination of sophoridine, sophocarpine and matrine in rabbit plasma [J]. Anal Bioanal Chem, 2005, 382(7):1595-1600.
- [5] CHEN Y F, TIAN S J, SONG J Z, et al. Study on pharmacokinetics of sophora flavescens injection in rabbit [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2002, 37(7):524-526.
- [6] TAN B Y, ZHENG W H, TANG L F, et al. Determination of sophoridine in human serum by capillary gas chromatography [J]. Chin J Chromatogr (色谱), 1996, 14(6):473-477.
- [7] WANG Y, MENG G D L, ZHENG W Y, et al. Pharmacokinetics of oxymatrine injection healthy volunteers [J]. Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志), 2003, 19(4):301-305.
- [8] SHAH V P, MIDHA K K, DIGHE S, et al. Analysis methods validation: bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetics studies[J]. J Pharm Sci, 1992, 81(3):309-312.
- [9] HUANG S K, CHEN J F, XIE Y X, et al. Method of GC determination and pharmacokinetics of sophoridine in rabbits [J]. Acta Pharma Sin 1988, 23(8):561-565.
- [10] HANSTEN P H, HORN J R. Drug interactions and updates [M]. Applied Therapeutics: Vancouver, 1990:1.

收稿日期:2007-11-27