

胍丁胺的衍生化 GC-NPD 测定及大鼠药动学研究

阮志鹏(莆田学院医学院药学系, 福建 莆田 351100)

摘要: 目的 建立衍生化气相色谱法测定大鼠血浆中胍丁胺浓度方法并研究其在大鼠体内的药动学。方法 应用六氟乙酐丙酮(HFAA)衍生化气相色谱氮磷检测器(GC-NPD)分析血浆样品中的胍丁胺浓度。结果 胍丁胺在大鼠血浆中的线性范围为 $0.1 \sim 50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 最低检测浓度为 $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。高、中、低三种浓度的平均方法回收率分别为 87.7%, 90.7%, 101%。日内、日间精密度(RSD)均小于 12%。大鼠灌胃胍丁胺符合二室模型, $t_{1/2}$ 为 109 min, $t_{\max}$ 为 26 min, $C_{\max}$ 为 $1.91 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-300 \text{ min}}$ 为 $145 \mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结论 本方法稳定、可靠, 可用于胍丁胺的血药浓度分析及大鼠灌胃药代动力学研究。

关键词: 胍丁胺; 衍生化; 气相色谱法; 药代动力学

中图分类号: R965.1; R917.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)01-0063-04

Derivative GC-NPD Determination of Agmatine and Its Pharmacokinetics Study in Rat

RUAN Zhipeng(Department of Pharmacy, Putian University, Putian 351100, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a derivative GC-NPD method for the determination of agmatine in rat plasma and to study its pharmacokinetics in rats. **METHODS** GC-NPD analysis method was used to determine agmatine in rat plasma after derivative with HFAA. **RESULTS** The calibration curve of agmatine in rat plasma was linear ($r=0.998\ 0$) in the range of $0.1\text{--}50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The lowest detectable concentration was $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The recoveries at the concentration of 0.2, 2 and $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ were 87.7%, 90.7%, 101%, respectively. The inter- and intra-day RSDs were all less than 12%. Pharmacokinetics parameters of agmatine in rats after i.g were fit to the two-compartment model. Fitting with the two-compartment model, the pharmacokinetics parameters of agmatine in rats after ig showed that the half-life of agmatine was 109 minutes, $t_{\max}$ was 26 min, $C_{\max}$ was $1.91 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and $\text{AUC}_{0-300 \text{ min}}$ was $145 \mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. **CONCLUSION** This method is proved to be precise and reliable enough to be applied to the pharmacokinetics studies of agmatine in rats via i.g.

KEY WORDS: agmatine; derivative; GC; pharmacokinetics

胍丁胺(AGM)是精氨酸在左旋精氨酸脱羧酶(L-ADC)催化下的脱羧产物, 目前研究认为它是咪唑啉受体的内源性配体^[1], 内源性胍丁胺及其相应的受体可能在中枢神经系统内构成了阿片功能的调节系统^[2]。同时, 国内外对外源性胍丁胺的药理

作用研究也形成了另一个热点。初步药理学研究已证明: 外源性胍丁胺有增强吗啡镇痛、降低其成瘾性及耐受作用, 还有明显抗抑郁和焦虑等作用, 生物学作用比较广泛^[3]。

研究胍丁胺体内代谢有助于进一步研究其药

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(C0540025)

作者简介: 阮志鹏, 男, 副教授

Tel: 13003858801

E-mail: Rzp611@yahoo.com.cn

理作用。胍丁胺极性较大,脂溶性差,外源性胍丁胺是否具有好的体内代谢特性,也是新药开发中的一个重要问题。另外,胍丁胺由于结构中没有吸收基团,难以汽化,较难检测。因此笔者采用六氟乙酰丙酮(HFAA)衍生化使其能汽化,经毛细管气相色谱氮磷检测(GC-NPD)的方法,实现了对大鼠血浆中外源性胍丁胺的检测,并对胍丁胺大鼠灌胃药动学进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 仪器

HP 6890 大体积进样气相色谱仪,带安捷伦化学工作站;TLL-C 台式高速冷冻离心机(北京四环科技仪器厂);LD5-2A 台式高速离心机(北京离心机厂)。

1.2 药品与试剂

胍丁胺(agmatine, 1-amino-4-guaninobutane),购自 SIGMA 公司,纯度:99%,批号:063K3764;六氟乙酰丙酮(hexafluoroacetylacetone, HFAA),购自 ACROS 公司,纯度:99%,批号:080750;高氯酸、正丁醇、乙醚均为分析纯,购自北京化学试剂公司。

1.3 试验动物

二级 Wistar 大鼠 5 只,♂,180~220 g,来自军事医学科学院实验动物中心,实验动物合格证号:SCXK(军)2009-023 号。按二级实验动物标准化饲养。

1.4 色谱条件

HP 6890 气相色谱仪带有化学工作站,手动不分流进样,进样量 1 μL ;进样口温度:210 $^{\circ}\text{C}$;ValcoBond-1 30 m 毛细管柱,柱流速为 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒流;炉温:100 $^{\circ}\text{C}$ (1.0 min),以 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 230 $^{\circ}\text{C}$ (1 min);NP 检测器。

1.5 血浆样品前处理及衍生化

100 μL 血浆加 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高氯酸 50 μL 充分振荡终止反应及沉淀蛋白,-4 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻条件下,10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,吸取上清,加入 5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 饱和 NaCl 的 KOH 150 μL 进行碱化后,加入 0.5 mL 正丁醇提取 2 次,6 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后取上层有机层,合并提取液转移到安瓿,用氮气吹干,分别加入 50 μL 的 HFAA 及乙酸乙酯后,安瓿封口,120 $^{\circ}\text{C}$ 油浴衍生化反应 1 h,取出后用氮气

吹干,加 50 μL 乙醚重悬,1 μL 进样分析。

1.6 标准曲线的制备

配制不同浓度的胍丁胺标准水溶液加入空白大鼠血浆中,使终浓度分别 0.1, 0.2, 0.5, 2, 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 血浆,按“1.5”项下方法操作。

1.7 方法回收率试验

分别于 100 μL 空白血浆中加入高、中、低 3 种不同浓度的胍丁胺溶液,混匀得到 0.2, 2, 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 3 种不同浓度的胍丁胺血浆样品,按“1.5”项下方法操作;同时配以上 3 种不同浓度的胍丁胺标准品水溶液,直接加入安瓿,用氮气吹干,后续衍生化反应及 GC 测定步骤同血浆样品,用标准品胍丁胺衍生化 GC 测定的峰面积比同样浓度的经过样品前处理的血浆样品的峰面积来计算提取方法的回收率。

1.8 方法精密度试验

分别于 100 μL 空白血浆中加入高、中、低 3 种不同浓度的胍丁胺溶液,混匀得到 0.2, 2, 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 3 种不同浓度的胍丁胺血浆样品,按“1.5”项下方法操作;依法测定日内与日间(5 d 内)精密度。

1.9 大鼠体内药动力学试验

大鼠灌胃给药,剂量:40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,体积:5 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,给药后 0, 10, 20, 30, 45 min 和 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5 h 各时间点由眼眶后静脉丛取血约 250 μL , -4 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻条件下,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min,分离血浆 100 μL 进行色谱分析。同时分离空白血浆作标准曲线。

2 结果

2.1 专属性试验

在上述的气相条件下胍丁胺衍生物的保留时间在 11.1 min,分离状况良好,并且没有杂峰干扰。色谱图见图 1。

2.2 大鼠血浆中胍丁胺测定的标准曲线

按血浆样品前处理及衍生化方法及标准曲线制备方法,以血浆中胍丁胺药物浓度为横坐标(X),GC-NPD 测定峰面积为纵坐标(Y)作回归分析,在 0.1~50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内,线性关系良好,回归方程为: $Y = -6.965\ 05 + 73.054\ 52\ X$, $r = 0.998$ 。

2.3 方法回收率测定

高、中、低(5, 2, 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 3 种浓度的平

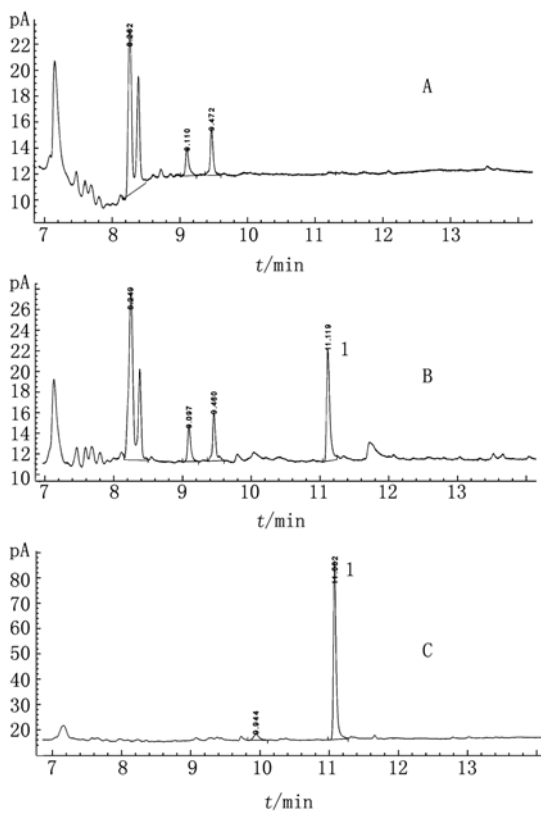


图 1 胍丁胺六氟乙酰丙酮衍生化气相色谱
A-空白血浆; B-空白血浆+50 ng 胍丁胺; C-大鼠灌胃 40 mg·kg⁻¹ 胍丁胺 20 min 后血浆样品; 1-胍丁胺

Fig 1 Gas chromatogram of agmatine-HFAA derivatives
A-blank plasma; B-blank plasma spiked with 50 ng agmatine; C-plasma sample 20 min after single i.g 40 mg·kg⁻¹ agmatine; 1-agmatine

均回收率分别均大于 85%，符合药动力学测定要求，结果见表 1。

表 1 GC-NPD 检测大鼠血浆胍丁胺的回收率 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Recoveries of the GC-NPD method to determine agmatine in rat plasma(n=5, $\bar{x} \pm s$)

加入量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	测得量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/%	RSD/%
0.2	0.18±0.01	87.71±5.32	6.1
2	1.81±0.13	90.67±9.53	10.5
5	5.04±0.38	100.88±7.67	7.6

2.4 精密度测定

日内、日间精密度均小于 12%，符合药动力学测定要求，结果见表 2。

2.5 大鼠胍丁胺灌胃给药的药动力学

取大鼠 5 只，按“1.9”项下方法操作，分离出血浆，按“1.5”项下方法操作，药时曲线见图 2。

表 2 GC-NPD 检测大鼠血浆胍丁胺的方法日内、日间 RSD(n=5, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Precision of the GC-NPD method to determine agmatine in rat plasma(n=5, $\bar{x} \pm s$)

加入量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	日内精密度		日间精密度	
	测得量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD/%	测得量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD/%
0.2	0.24±0.02	11.7	0.26±0.01	5.2
2	1.76±0.05	2.6	1.64±0.18	10.9
5	5.09±0.15	2.9	4.79±0.12	2.4

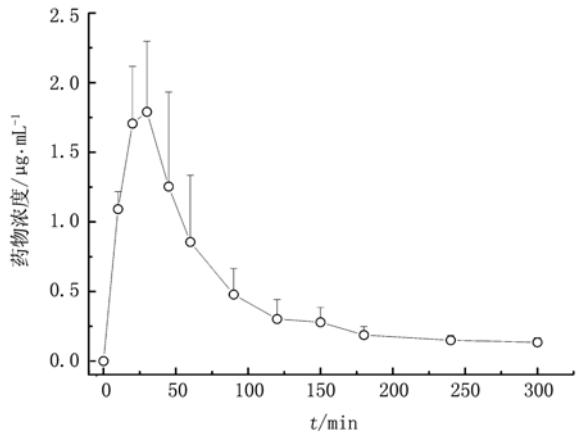


图 2 大鼠灌胃 40 mg·kg⁻¹ 胍丁胺后的药-时曲线(n=5, $\bar{x} \pm s$)

Fig 2 Pharmacokinetics of agmatine in rats plasma after administration agmatine via i.g.(n=5, $\bar{x} \pm s$)

代谢动力学参数用 3p87 程序进行拟合与计算，以 AIC 最小法选择合适的房室模型进行拟合， t_{max} 、 C_{max} 用实测值，AUC 值用梯形法计算。结果表明：胍丁胺灌胃给药后动力学过程符合一级动力学过程及二室模型，吸收很快，且消除也较快，具体参数见表 3。

表 3 大鼠灌胃 40 mg·kg⁻¹ 胍丁胺后的药动力学参数(n=5, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Pharmacokinetic parameters of agmatine in rats plasma after administration agmatine via i.g.(n=5, $\bar{x} \pm s$)

药动力学参数	平均值	标准差
A/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	4.23	2.28
α/min^{-1}	0.050	0.017
B/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.42	0.09
B/ min^{-1}	0.007 3	0.003 6
$T_{1/2\alpha}/\text{min}$	16.1	8.4
$T_{1/2\beta}/\text{min}$	109	37
V_d/mL	13.0	2.7
CL/ $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	0.28	0.08
$T_{\text{max}}/\text{min}$	26	5.5
$C_{\text{max}}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1.91	0.34
AUC _{0-300 min} / $\mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$	145	51.1

3 讨论

国内外目前对胍丁胺的主要检测方法有柱前衍生化高效液相色谱(HPLC)、柱前衍生化气相色谱(GC)或气质联用(GC-MS)等^[4-9]。笔者采用的HFAA衍生化,GC-NPD检测方法,线性范围较合适,其最低检测限大于血浆内源性胍丁胺浓度。另外,由于动物外源性胍丁胺药理作用剂量较大,上述所建检测方法可满足药动学研究需要,并且其检测不受内源性胍丁胺的影响,可较准确地反映其动力学过程。

胍丁胺在碱性条件下可被有机溶剂提取。在选择溶剂时,曾试用正丁醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、乙醚、苯、环己烷。结果表明:正丁醇提取效果最好,但不易吹干,其他溶剂提取效果不好,故均未采用。

胍丁胺为白色粉末状化合物,难以汽化,但分子结构中含有多个氨基,可用酰氯和酸酐等衍生化试剂对其进行衍生化,使具有更高的挥发性,便于GC或GC-MS测定。Kawabata等^[9]选用了乙酰丙酮(AA)、三氟乙酰丙酮(TFAA)及六氟乙酰丙酮(HFAA)等衍生化试剂对胍丁胺进行了衍生化,结果发现,HFAA的衍生物产率最高、最易挥发并且最稳定,加入吡啶作催化剂,衍生化率可以达到97.4%。笔者曾试用此法,但产物杂质较多,易损坏毛细管柱,后改用乙酸乙酯作催化剂,六氟乙酰丙酮作衍生化,减少操作步骤,并反复优化了衍生化条件,色谱分离效果得到较大改善。

动力学研究表明:外源性胍丁胺灌胃给药后,吸收很快,血药浓度在30 min内达峰,符合此类药物的药理作用快的特点,但消除也较快,半衰期在1.5 h左右,属于短半衰期药物。因此,进行外源性胍丁胺的药理作用研究时,应考虑其

作用的持续时间可能较短,对药理学效应观察的影响。同时应用胍丁胺的衍生化GC-NPD测定方法,可进一步了解外源性胍丁胺的体内分布特点,也可了解组织器官的内源性胍丁胺的含量,有助于全面了解胍丁胺的生物学作用,有关其体内代谢情况将作进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] LI G, REGUNATHAN S, BARROW C J, et al. Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain [J]. *Science*, 1994, 266(5184): 462-464.
- [2] SU R B, LI J, LI X, ET A L. Down-regulation of MAO-B activity and imidazoline receptors in rat brain following chronic treatment of morphine[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(7): 639-644.
- [3] SU R B, QIN B Y. Agmatine and its major biological effects [J]. *Foreign Med Sci (Pharm)*(国外医学 药学分册), 2001, 8(2): 65-69.
- [4] STICKLE D, BOHRER A, BERGER R, et al. Quantitation of the putative neurotransmitter agmatine as the hexafluoroacetylacetonate derivative by stable isotope dilution gas chromatography and negative-ion chemical ionization mass spectrometry [J]. *Anal Biochem*, 1996, 238(2): 129-136.
- [5] GOLDSCHMIDT M C, LOCKHART B M. Simplified rapid procedure for determination of agmatine and other guanidino-containing compounds [J]. *Anal Chem*, 1971, 43(11): 1475-1479.
- [6] ZHAO S L, FENG Y Z, LEBLANC M H, et al. Quantitation of agmatine by liquid chromatography with laser-induced fluorescence detection [J]. *Anal Chim Acta*, 2002, 470(2): 155-161.
- [7] FENG Y, HALARIS A E, PILETZ J E. Determination of agmatine in brain and plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *J Chromatogr B*, 1997, 696(1): 277-286.
- [8] ARICIOGLU-KARTAL F, REGUNATHAN S. Effect of chronic morphine treatment on the biosynthesis of agmatine in rat brain and other tissues [J]. *Life Sci*, 2002, 71(14): 1695-1701.
- [9] KAWABATA T, OHSHIMA H, ISHIBASHI T, et al. Gas chromatographic determination of methylguanidine, guanidine and agmatine as their hexafluoroacetylacetonates [J]. *J Chromatogr*, 1977, 140(1): 47-56.