

高灵敏度 HPLC 测定大鼠血浆中益母草碱浓度及其药动学研究

尹丽娜¹, 周云琍², 张雅雯¹, 陈晓晓², 陈燕², 郑高利^{1*} (1.浙江省医学科学院, 杭州 310013; 2.浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

摘要: 目的 建立一种高灵敏度 HPLC 测定大鼠血浆中益母草碱浓度, 并研究益母草碱在大鼠体内的药动学特征。方法 大鼠口服益母草碱混悬液(50 mg·kg⁻¹)后, 不同时间点尾静脉采血, 以苯甲酰精氨酸乙酯为内标, 血浆样品经酸化后乙酸乙酯萃取, 采用 HPLC 进行测定。色谱条件: 采用 Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱, 以乙腈-0.02 mol·L⁻¹磷酸二氢钾缓冲溶液(pH 3.0)(22 : 78)为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 277 nm。并利用 PKS 1.0 软件计算药动学参数。结果 益母草碱血浆浓度在 0.05~1.5 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好($r=0.999\ 1$)。方法的定量下限(LLOQ)为 0.05 μg·mL⁻¹(RSD=12.8%, $n=5$); 提取回收率为 76.5%~82.5%; 批内、批间准确度为 96.9%~104.9%; 日内、日间精密密度均<10%; 质控样品经反复冻融 3 次及-20 °C 放置 1 个月后均较稳定。大鼠口服益母草碱后, 药-时曲线符合二室开放模型, 主要药动学参数为 $t_{\max}=0.95\ \text{h}$, $C_{\max}=0.51\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $t_{1/2}=3.64\ \text{h}$, $\text{AUC}_{0-t}=1.56\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-\infty}=1.78\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。**结论** 该方法准确度、灵敏度高, 重复性好, 可用于生物样品中益母草碱浓度的测定。

关键词: 益母草碱; 高效液相色谱法; 血浆浓度; 药动学

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)07-0816-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.07.009

引用本文: 尹丽娜, 周云琍, 张雅雯, 等. 高灵敏度 HPLC 测定大鼠血浆中益母草碱浓度及其药动学研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(7): 816-819.

Determination and Pharmacokinetic Study of Leonurine in Rat Plasma by Sensitive HPLC

YIN Lina¹, ZHOU Yunli², ZHANG Yawen¹, CHEN Xiaoxiao², CHEN Yan², ZHENG Gaoli^{1*} (1.Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China; 2.Department of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determination of plasma concentration of leonurine (LE) and investigate its pharmacokinetics in rats. **METHODS** After oral administration of LE suspension (50 mg·kg⁻¹), plasma samples were collected at different points. After extracted from plasma by ethyl acetate, the plasma concentrations of LE and its internal standard (IS) *n*-benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) were determined by HPLC. Chromatographic separation was performed on a Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with UV detection at 277 nm, using acetonitrile-0.02 mol·L⁻¹ monopotassium phosphate (pH 3.0) (22 : 78) as mobile phase at 1.0 mL·min⁻¹ flow rate, and the column temperature was 35 °C. The pharmacokinetic parameters were calculated by PKS 1.0 software program. **RESULTS** The linear calibration curve of LE was obtained in the concentration range of 0.05~1.5 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 1$), and the lower limit of quantitation(LLOQ) was 0.05 μg·mL⁻¹(RSD=12.8%, $n=5$); The absolute recovery in plasma was 76.5%~82.5%; Intra-day and inter-day relative standard deviations were both below 10%, with accuracy in the range 96.9%~104.9%. The QC plasma samples were stable through repeated three freeze/thaw cycles and under the frozen condition at -20 °C for 30 d. The process of LE in rat fit two-compartment open model, and the main pharmacokinetic parameters obtained were $t_{\max}=0.95\ \text{h}$, $C_{\max}=0.51\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $t_{1/2}=3.64\ \text{h}$, $\text{AUC}_{0-t}=1.56\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-\infty}=1.78\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. **CONCLUSION** The assay method is proved to be simple, sensitive, precise and reliable enough for the pharmacokinetics study of LE in rat after oral administration.

KEYWORDS: Leonurine; HPLC; plasma concentration; pharmacokinetics

益母草碱是传统活血化瘀中药益母草 [*Leonurus ja ponicus* Houtt.] 中的主要活性成分之一, 具有扩张外周血管、增加血流量、保护大脑缺血和心肌缺血的作用^[1-3], 并能明显减少脑缺血

造成的大脑皮质梗死面积, 改善心肌功能缺损症状^[4], 是一个非常有前景的心血管活性药物。目前, 益母草碱还处于临床前期研究阶段^[5], 要研究其药动学, 必须建立测定生物样品中益母草碱浓度的

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LQY18H300002); 浙江省医药卫生科技计划项目(2018KY349)

作者简介: 尹丽娜, 女, 硕士, 助理研究员 Tel: (0571)88215622 E-mail: yln23@163.com

*通信作者: 郑高利, 男, 博士, 教授 Tel: (0571)88215620 E-mail: gaoli-z@163.com

方法。虽然已有 HPLC 检测益母草碱血药浓度的报道,但存在专属性不强、检测灵敏度低的缺陷(定量下限 $0.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),仅可用于高剂量静脉给药后的药物浓度检测,无法检测口服给药后的血药水平^[6]。也有采用 LC/MS/MS 测定口服益母草碱的血药浓度,极大地提高了检测灵敏度(定量下限可达到 $4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$),但检测成本较高,应用较局限^[7]。

为便于今后益母草碱新型口服制剂体内特性的考察,本实验室建立了一种灵敏度高(定量下限 $0.05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、专属性强、检测简便的 HPLC 测定益母草碱血药浓度的方法,并对其口服给药后大鼠体内药动学特征进行探讨,为益母草碱新剂型的进一步开发和应用提供参考。

1 仪器与试剂

LC-2010 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); AL104 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; Anke TGL-16C 离心机(上海安亭科学仪器厂); UGC-12T 氮吹仪(北京优晟联合科技有限公司)。

益母草碱(郑州九势化工产品有限公司,含量:99.5%); 苯甲酰精氨酸乙酯(*n*-benzoyl-L-arginine ethyl ester, BAEE, 阿拉丁,批号: H1531007; 含量:98%); 甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

清洁级 SD 大鼠,♂,体质量为 180~220 g,由浙江省实验动物中心提供,动物合格证号: SCXK(浙)2014-0001。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: DIKMA Diamonsil C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾缓冲溶液(pH 3.0)(22 : 78); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 35 °C; 检测波长: 277 nm; 进样量: 20 μL 。

2.2 标准溶液的制备

精确称取益母草碱 10 mg,加适量甲醇溶解并定容于 100 mL 量瓶中,得益母草碱储备液($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),4 °C 冰箱保存,1 个月内稳定;精密称取 BAEE 对照品 10 mg,加适量甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中,得 BAEE 储备液($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),-80 °C 冰箱保存,1 个月内稳定。

精密量取益母草碱储备液适量,用甲醇依次稀释成 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列标

准溶液备用。

2.3 血浆样品的制备

精密移取内标溶液 25 μL 于干燥试管中,氮气吹干,残渣加入大鼠血浆样品 0.25 mL,加 0.1 mL 6% 高氯酸沉淀蛋白,加乙酸乙酯 2 mL,涡旋 5 min,离心,取上清液,氮气吹干,加流动相 100 μL 复溶,离心,取上清液 20 μL 进样。同法制备质控样品。

2.4 分析方法的验证

2.4.1 方法专属性 取大鼠空白血浆、质控样品、大鼠口服益母草碱后血浆样品,按“2.3”项下方法操作,进样分析,考察干扰情况。结果显示,益母草碱的保留时间约为 5.5 min,理论板数 >10 000,空白血浆的内源性物质对益母草碱和内标均无干扰,显示专属性良好。结果见图 1。

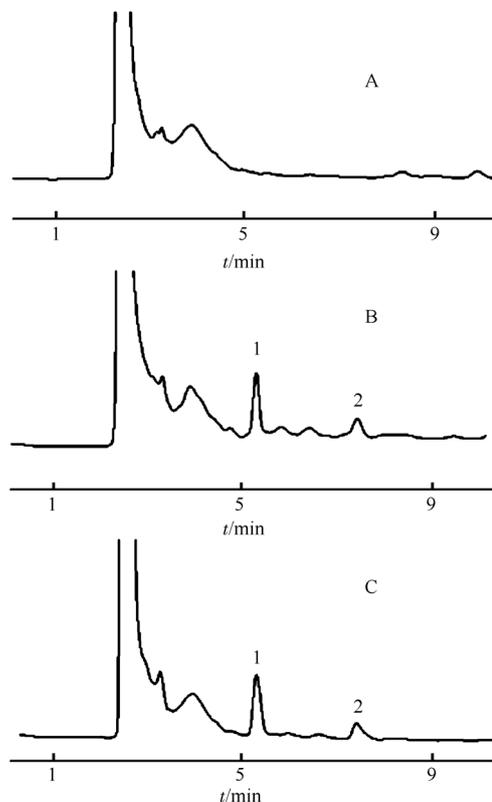


图 1 大鼠血浆中益母草碱的代表图谱

A-大鼠空白血浆; B-质控样品($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); C-大鼠口服灌胃益母草碱血浆样品(15 min); 1-益母草碱; 2-BAEE(IS)。

Fig. 1 Representative HPLC chromatograms of samples in rat plasma

A-blank plasma of rat; B-sample of blank plasma spiked with leonurine($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and IS of BAEE; C-rat plasma sample after intravenous administration of leonurine at 15 min spiked with IS of BEAA; 1-leonurine; 2-BAEE(IS)。

2.4.2 残留考察 在高浓度样品($1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)进样后,再进一针空白样品,结果益母草碱与 BAEE

位置均无峰,说明本方法残留符合要求,不影响准确度和精密度。

2.4.3 线性关系考察 分别精密移取益母草碱标准溶液 25 μL 和内标 25 μL 至干燥试管中,室温下氮气吹干,残渣用 0.25 mL 空白血浆混合均匀,最终制成益母草碱 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆样品,按“2.3”项下方法操作,以药物与内标的峰高比值(Y)对益母草碱浓度(X)进行线性回归,结果显示在 0.05~1.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好,线性回归方程为 $Y=4.5051X+0.2054$, $r=0.9991$,定量下限为 0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $\text{RSD}=12.8\%$, $n=5$ 。

2.4.4 提取回收率 分别取空白血浆 0.25 mL,配成益母草碱浓度为 0.1, 0.5, 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质控样品($n=5$),按“2.3”项下方法操作,通过比较相应浓度纯溶剂样品的峰高计算提取回收率,结果显示平均提取回收率为 76.5%~82.5%,内标回收率 $>70\%$,结果见表 1。

2.4.5 日内、日间精密度 取 0.1, 0.5, 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质控样品($n=5$),按“2.3”项下方法操作,分别考察日内和日间精密度,采用标准曲线求算,结果显示该方法的日内、日间精密度均 $<10\%$,结果见表 1。

表 1 日内、日间精密度和提取回收率($\bar{x}\pm s, n=5$)

Tab. 1 Intraday, interday precision and extraction recovery ($\bar{x}\pm s, n=5$)

浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	提取回收率/ %	精密度/%	
		日内	日间
0.1	78.7 \pm 5.4	6.0	9.8
0.5	82.5 \pm 3.8	4.9	5.3
1.0	76.5 \pm 2.0	1.9	4.3

2.4.6 准确度试验 取 0.05(定量下限), 0.1, 0.5, 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质控样品($n=5$),平行制备 3 批,按“2.3”项下方法操作,分别考察批内和批间准确度,采用标准曲线求算,以标示值的百分比表示,结果显示,定量下限准确度为 103.1%~104.8%,其余浓度准确度为 96.9%~104.9%,说明该方法准确度良好。结果见表 2。

2.4.7 稳定性试验 取益母草碱质控样品(0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),连续进样 6 针,考察自动进样器的稳定性,结果显示,连续 6 针样品峰面积 RSD 为 1.7%,说明该方法稳定性良好。

表 2 益母草碱的准确度($\bar{x}\pm s, n=5$)

Tab. 2 Accuracy for assay of leonurine in rats plasma ($\bar{x}\pm s, n=5$)

浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	准确度/%	
	批内	批间
0.05	103.1 \pm 6.0	104.8 \pm 13.8
0.1	96.9 \pm 5.8	97.2 \pm 7.6
0.5	97.9 \pm 4.8	98.9 \pm 6.2
1.0	104.9 \pm 1.9	102.2 \pm 3.9

分别取空白血浆 0.25 mL,配成高、低浓度的质控样品(0.1, 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),按“2.3”项下方法处理。考察室温放置 24 h、3 次反复冻融和 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 1 个月稳定性,结果用所测的浓度与初始浓度比值来表示。结果显示 1 个月后高、低浓度质控样品的浓度比值均 $>95\%$,说明样品稳定性良好。

2.5 药动学试验

取 SD 大鼠 5 只,实验前禁食 24 h,自由饮水。以 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 口服灌胃益母草碱混悬溶液(以 0.5% CMC-Na 为溶剂,药物浓度为 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。给药 5, 20, 30, 45 min 和 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12 h 后尾静脉采血 0.5 mL,离心后取 0.25 mL 血浆,按“2.3”项下方法操作,测定血浆中药物浓度。平均血药浓度-时间曲线见图 2。

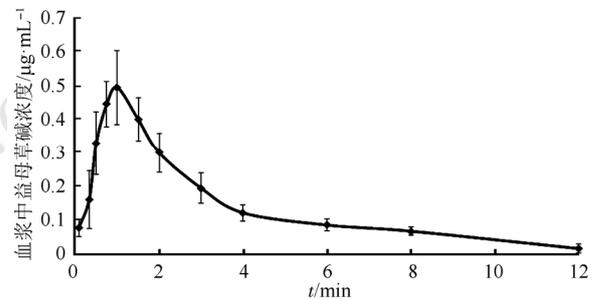


图 2 大鼠口服给药益母草碱(50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)后血药浓度-时间曲线($\bar{x}\pm s, n=5$)

Fig. 2 Plasma concentration-time curve of leonurine in rats after oral administration of leonurine($\bar{x}\pm s, n=5$)

2.6 药动学数据分析^[8]

利用药物统计软件(PKS 1.0, Shanghai Magnsoft Consulting)计算药动学参数。峰浓度(C_{max})和达峰时间(t_{max})为实测值;药物浓度-时间曲线下面积(AUC_{0-t})由软件计算得到。结果表明大鼠药-时曲线符合二室开放模型,主要药动学参数如下: $t_{\text{max}}=0.95\text{ h}$, $C_{\text{max}}=0.51\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $t_{1/2}=3.64\text{ h}$, $AUC_{0-t}=1.56\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, $AUC_{0-\infty}=1.78\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

3 讨论

本实验考察了多种流动相比比例及缓冲液的 pH 对药物及内标色谱行为的影响, 结果发现当流动相比比例为 78:22, 水相 pH 为 3.0 时, 药物出峰时间适宜, 峰型良好且不受血浆中杂质的干扰。

本实验分别考察了固相柱提取和有机溶剂萃取处理血浆样品的方法, 结果发现采用固相柱法药物不易被洗脱, 回收率较低($\leq 50\%$)。因此采用常规有机溶剂法, 并经不同溶剂萃取(甲基叔丁基醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、石油醚等), 结果表明血浆经 6%高氯酸沉淀蛋白结合乙酸乙酯萃取, 药物的回收率高($>70\%$), 内源性物质无干扰。

药动学结果表明, 大鼠口服灌胃益母草碱后, 在大鼠体内分布呈二级开放模型。益母草碱在大鼠体内达峰时间为 0.95 h, 消除半衰期为 3.64 h, 具有吸收快和代谢快的特点, 与文献[6-7]报道接近。

本方法操作简单, 灵敏度高、重复性好, 与现有 LC/MS/MS 相比, 更加简便且成本更低, 适合于血浆中益母草碱药物浓度的检测及其药动学研究, 可为益母草碱的临床应用和后续制剂研发提供方法和实验依据。

REFERENCES

- [1] CHAO Z, MA L L, ZHOU X J. The diuretic effect of alkaloids from yimu cao (herba leonuri) on rat [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2005, 16(1): 11-12.
- [2] LIU X H, XIN H, HOU A J, et al. Protective effects of leonurine in neonatal rat hypoxic cardiomyocytes and rat infarcted heart [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2009, 36(7): 696-703.
- [3] LIU X H, CHEN P F, PAN L L, et al. 4-Guanidino-*n*-butylsyringate (leonurine, SCM 198) protects H9c2 rat ventricular cells from hypoxia-induced apoptosis [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2009, 54(5): 437-444.
- [4] QI J, HONG Z Y, XIN H, et al. Neuroprotective effects of leonurine on ischemia/reperfusion-induced mitochondrial dysfunctions in rat cerebral cortex [J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(12): 1958-1964.
- [5] ZHANG J L, LIU H R, MAO Y, et al. Toxicokinetics of leonurine and its metabolite in rats [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2012, 43(6): 451-454, 474.
- [6] CHAO Z. Pharmacokinetics of leonurine in rats [J]. Chin Pharm(中国药理学杂志), 2002, 37(1): 39-41.
- [7] LIB H, WUJ D, LI X L. Simultaneous determination and pharmacokinetic study of stachydrine and leonurine in rat plasma after oral administration of Herba Leonuri extract by LC-MS/MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 76(25): 192-199.
- [8] ZHANG Y W, YIN L N, LIANG Z H, et al. Study on pharmacokinetics of Asiatic acid in rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2015, 32(3): 314-317.

收稿日期: 2018-05-29

(本文责编: 曹粤锋)