

UPLC 测定大鼠血浆中土的宁的含量

陈天朝^{1*}, 程伟², 宋薇², 康冰亚¹, 曹英杰¹, 梁启超²

(1. 河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000; 2. 河南中医学院药学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的:建立能测定大鼠血浆中通脉丸浓缩液中土的宁含量的 UPLC 分析方法。方法:大鼠血浆样品以液液萃取法处理后用 BEH C₁₈ 色谱柱分离,流动相乙腈-酸水(23:77),酸水为 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾与 0.01 mol·L⁻¹ 庚烷磺酸钠等量混合,并用 10% 磷酸调体系 pH 2.5;流速 0.18 mL·min⁻¹,检测波长 260 nm,柱温 30 ℃。结果:血浆中内源性物质不干扰土的宁的测定,土的宁在 0.043 2~10.8 mg·L⁻¹ 线性良好,日内、日间精密度均 <10%,平均回收率均 >85%,稳定性符合体内药物分析要求。结论:该方法灵敏度高、紧密度好,可应用于通脉丸浓缩液中土的宁的药物动力学研究。

[关键词] 土的宁; 体内药物分析; 超高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1;R284.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)24-0127-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240127

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141106.1436.013.html>

[网络出版时间] 2014-11-06 14:36

Determination of Strychnine in Rat Plasma by UPLC

CHEN Tian-chao^{1*}, CHENG Wei², SONG Wei², KANG Bing-ya¹, CAO Ying-jie¹, LIANG Qi-chao²

(1. First Affiliated Hospital of Chinese Traditional Medical of Henan University, Zhengzhou 450000, China;
2. Chinese Traditional Medical of Henan University, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an effective method for determining the strychnine of Tongmai pill concentrate (TPC) in rat plasma by UPLC. **Method:** The rat plasma samples were processed by liquid-liquid extraction and separated on a BEH C₁₈ column. The mobile phase consisted of 23% acetonitrile and 77% water containing 0.02 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate and 0.01 mol·L⁻¹ sodium heptanes sulfonate (adjusting pH 2.5 with 10% phosphonic acid. The flow rate was 0.18 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 260 nm and the column temperature was 30 ℃. **Result:** The determination of strychnine was not interfered by the endogenous in the rat plasma. The calibration curve of strychnine was in good linearity within the range of 0.043 2-10.8 mg·L⁻¹. The mean extraction recoveries were more than 85% and intra-and inter-day precisions were less than 10%. The stability results meet the requirements for the biopharmaceutical analysis. **Conclusion:** This sensitive and precise analytical method is applicable to the pharmacokinetic study of strychnine of TPC in rat plasmas.

[Key words] strychnine; biopharmaceutical analysis; UPLC

通脉丸为国家级名老中医、中国中西医结合学会周围血管疾病专业委员会主任委员崔公让教授的临床经验处方,有制附子、黄芪、两头尖、马钱子、赤芍、丹参、洋金花等 10 数味中药组合而成,主治风寒

湿痹、四肢痉挛、骨节疼痛、痲肿、动脉硬化闭塞性脉管炎等动脉缺血性疾病所致寒凝脉络型脱疽^[1]。通脉丸方中毒性药材如马钱子是影响通脉丸安全有效的关键,故对方中的毒性成分进行分析研究能够

[收稿日期] 20140808(006)

[基金项目] 河南省科技厅自然科学基金项目(102102310185);河南省教育厅科技攻关项目(2011A360003)

[通讯作者] * 陈天朝,主任药师,硕士生导师,从事中药新剂型研究, Tel:13700845011, E-mail:13700845011@163.com

促进通脉丸新制剂的开发,使患者能早日服用上新开发的通脉丸制剂。

马钱子的主要成分为生物碱,其中土的宁占总生物碱的 35%~50%,其次为马钱子碱。马钱子碱是其镇痛的主要成分,土的宁是其毒性成分^[2]。马钱子与肉桂配伍后其中土的宁及马钱子碱的含量与马钱子单独提取相比均明显下降^[3]。另外,马钱子(生马钱子、制马钱子)配伍洋金花后,土的宁、马钱子碱的含量呈现降低的趋势。目前,已建立了不同配伍关系中有毒或有效成分的化学库,确定了马钱子配伍常用药对洋金花的毒效反应物质基础^[4]。本研究以通脉丸浓缩液中成分土的宁为研究对象,建立了 UPLC 测定土的宁血药浓度的分析方法。

1 材料

1.1 仪器 超高效液相色谱仪(Waters), Sartorius-CP225D 型电子天平(德国赛多利斯公司), TGL-16B 型离心机(上海安亭科学仪器厂), QL-901 型混匀仪(海门市其林贝尔仪器公司), BF-2000 型氮气吹干仪(北京八方世纪科技公司), 摩尔智能超纯水器(重庆摩尔水处理设备公司), KQ-100DE 型数控超声波清洗器(昆山超声仪器公司)。

1.2 试药 通脉丸浓缩液(课题组成员徐丽军提供), 土的宁对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 110705-200306), 磷酸二氢钾(天津市永大化学试剂有限公司), 庚烷磺酸钠(山东禹王实业有限公司); 甲醇、乙腈、磷酸均为色谱纯(迪马)。

1.3 动物 清洁级 Wistar 大鼠, 雌雄各半, 体重(300±30)g, 山东鲁抗医药股份有限公司提供, 合格证号 SCXK(鲁)20080002。

2 方法与结果

2.1 血浆样品处理方法 取大鼠全血 450 μL, 置于肝素化离心管中, 轻轻转动使其与肝素钠充分接触, 4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 精密吸取上层血浆 200 μL(或血浆+对照品), 转移至 10 mL 带盖尖头离心管中, 加入氨水 100 μL, 涡旋混合 30 s, 再加入甲基叔丁基醚 1.5 mL, 涡旋 1 min, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集甲基叔丁基醚液。剩余物再次加入甲基叔丁基醚 1 mL 重复以上液液萃取操作 1 次, 合并 2 次萃取液后 40 ℃ 氮气流吹干。残渣加入甲醇 100 μL 复溶, 涡旋 1 min, 15 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液测定。

2.2 色谱条件 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), 流动相 乙腈-酸水

(23:77), 酸水为 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾与 0.01 mol·L⁻¹ 庚烷磺酸钠等量混合, 并用 10% 磷酸调体系 pH 2.5, 流速 0.18 mL·min⁻¹, 检测波长 260 nm, 柱温 30 ℃, 进样量 1 μL。

2.3 土的宁对照品溶液配制 精密称取土的宁对照品 2.7 mg, 甲醇定容至 25 mL 量瓶中, 配成 0.108 g·L⁻¹ 的对照品储备液, 然后分别稀释不同倍数, 得到 0.043 2, 0.864 0, 1.296, 1.728, 6.480, 10.80 mg·L⁻¹ 的土的宁对照品溶液。精密称取土的宁对照品 1.41 mg, 甲醇定容至 25 mL 量瓶中, 配成 0.056 4 g·L⁻¹ 的对照品储备液, 然后分别稀释不同倍数, 得到 2.82, 0.564, 0.202 mg·L⁻¹ 高、中、低 3 个土的宁对照品溶液。

2.4 专属性考察 采用上述的血浆样品预处理方法和色谱条件, 测得大鼠空白血浆、空白血浆加土的宁对照品溶液和大鼠灌胃有效组分配伍浓缩液后获取的血浆色谱图, 见图 1~3。结果表明, 血浆中的内源性物质不干扰土的宁的测定, 土的宁的保留时间约为 2.4 min。

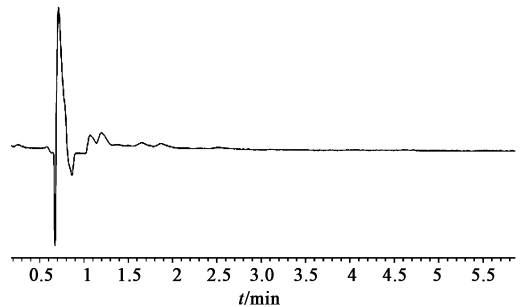
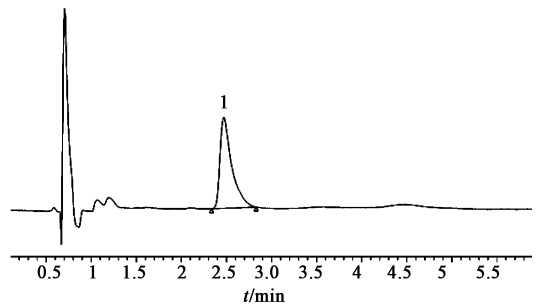


图 1 大鼠空白血浆液相色谱



1. 土的宁(图 3 同)

图 2 大鼠空白血浆加土的宁对照品液相色谱

2.5 线性关系考察及检测限测定 取 10 mL 尖底具盖塑料离心管 6 支, 精密加入大鼠空白血浆 200 μL, 分别加入标准系列的土的宁对照品溶液, 按照血浆处理方法处理样品, 得到含土的宁质量浓度分别为 0.043 2, 0.864 0, 1.296, 1.728, 6.480, 10.80 mg·L⁻¹ 的血浆质控样品溶液。吸取上述一系列不

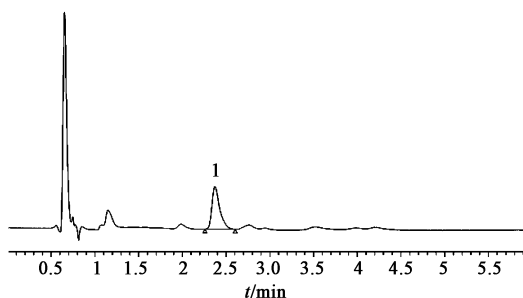


图3 灌胃通脉丸浓缩液后血浆液相色谱

同浓度血浆质控样品溶液 $1 \mu\text{L}$ 进样测定峰面积,以含士的宁血浆浓度(C)为横坐标,峰面积 $Y(A)$ 为纵坐标,得标准曲线为 $Y = 10\,336\,665X + 148.822\,5$, $R^2 = 0.999\,9$ 。士的宁在进样量 $0.000\,043\,2 \sim 0.010\,800\,0 \mu\text{g}$ 与峰面积呈良好线性关系。按 $S/N = 3$ 计算,血浆中士的宁最低检测质量浓度为 $0.043\,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.6 回收率与精密度试验 按照标准曲线制备方法,取大鼠空白血浆 $200 \mu\text{L}$,分别加入高、中、低浓度士的宁对照品溶液 $100 \mu\text{L}$,按 2.1 项下处理,得到高、中、低浓度血浆质控样品,分别平行处理 5 份,进样测定,计算日内及日间精密度。由标准曲线回归方程计算出士的宁检出量,士的宁的检出量与加入量的比值即为方法回收率;以血浆质控样品所得峰面积为 $A_{\text{测}}$,用纯品溶剂溶解并稀释使浓度与前者处理后浓度一致,进样所得峰面积为 $A_{\text{真}}$ 。见表 1。

$$\text{提取回收率} = A_{\text{测}} / A_{\text{真}} \times 100\%$$

表1 大鼠血浆中士的宁的回收率与精密度

加入量 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	方法回收率 /%	提取回收率 /%	RSD/%	
			日内	日间
2.82	99.31	87.94	2.3	1.0
0.564	94.36	85.48	4.5	2.6
0.202	105.54	87.04	6.4	9.6

2.7 稳定性考察 分别进行常温稳定性试验和冻融稳定性试验。常温稳定性试验:高、中、低浓度的混合标准血样,按 2.1 项下血浆样品处理方法处理,得到高、中、低浓度血浆质控样品,分别在 0, 6, 12, 24 h 分别进样测定;冻融稳定性试验:高、中、低浓度的混合标准血样,每一浓度 3 份,置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中放置 24 h,取出在室温下自然融解,完全融化后再置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中,此过程重复 3 次,取出后按 2.1 项下方法处理,得到高、中、低浓度血浆质控样品,测定士的宁的浓度有无明显的变化。见表 2。

2.8 样品含量测定 取 5 只大鼠在灌胃给药后 2,

表2 大鼠血浆中士的宁稳定性考察($\bar{x} \pm s, n = 5$)

加入量 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	室温峰面积	冻融峰面积	RSD/%	
			室温	冻融
2.82	$40\,248 \pm 617$	$44\,618 \pm 673$	1.5	1.5
0.564	$10\,253 \pm 469$	$9\,131 \pm 455$	4.5	4.9
0.202	$2\,849 \pm 131$	$2\,879 \pm 156$	4.6	5.4

4, 6 h 血浆,按 2.1 项血浆样品处理方法,对士的宁进行含量测定,士的宁均值分别为 $0.059\,9, 0.079\,6, 0.140\,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, RSD 分别为 4.2%, 2.7%, 5.4%。

结果表明,所选的通脉丸浓缩液士的宁在大鼠血浆中的含量测定方法灵敏度高、精密度好,且稳定性良好,可用于通脉丸进一步的释药机制研究以及处方中毒性药的毒代动力学的研究。

3 讨论

通过对流动相中有机相比例的考察发现,当乙腈的比例从药典规定的 21% 调整至 23% 时,出峰时间提前且峰形较好,同时血浆中内源性杂质不干扰样品的含量测定。UPLC 是一种新型的基于小颗粒填料的分析色谱技术,它的管路内径更细,色谱柱填料粒径只有 $1.7 \mu\text{m}$,从而提高分析能力和灵敏度,缩短了分析时间^[5]。士的宁为碱性药物,易于在碱性环境下用有机提取溶剂,故本研究采用了氨水碱化血样,使得士的宁主要以游离的分子态存在,在有机相中的分配增加,从而提高了提取效率^[6]。

[参考文献]

- [1] 陈天朝,宋薇,王丽,等. 通脉丸方浓缩液的急性毒性实验[J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(8): 132.
- [2] 陈天朝,宋薇,徐丽军. 通脉丸中毒性药材毒性及配伍减毒研究进展[J]. 中医学报, 2012, 27(12): 1628.
- [3] 闫雪生,朱建伟,江波,等. 马钱子与肉桂配伍前后士的宁和马钱子碱的分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 77.
- [4] 杨嵩虹. 马钱子配伍洋金花的物质基础研究[J]. 江西中医药, 2013, 44(11): 45.
- [5] 颜晓丹,高明,蔡振华,等. HPLC、UPLC 测定利培酮片中有关物质的比较研究[J]. 安徽医药, 2012, 16(11): 1604.
- [6] 肖寒露,陈军,蔡宝昌,等. HPLC 同时测定大鼠血浆中马钱子碱和士的宁的浓度[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11): 26.

[责任编辑 邹晓翠]