

乌头碱皮肤微透析体内回收率研究

郭丽蓉*, 闫俊岭, 黎艳刚, 徐松

(云南白药集团股份有限公司云南白药研究院, 昆明 650500)

[摘要] **目的:**建立乌头碱的液相色谱-质谱联用(LC-MS-MS)含量测定方法,测定乌头碱微透析体内回收率并考察其稳定性。**方法:**采用反透析法测定回收率,考察流速、浓度、时间对回收率的影响。**结果:**反透析法测定的回收率与浓度、时间无关,稳定性良好,随流速增加回收率降低。**结论:**微透析取样技术可用于乌头碱的药动学研究,体内研究的反透析法可作为微透析研究中乌头碱回收率的测定方法。

[关键词] 液相色谱-质谱联用; 乌头碱; 微透析; 体内回收率

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)01-0044-03

[doi] 10.11653/syjf2014010044

Study on *in vivo* Recovery of Aconitine in Microdialysis Probes

GUO Li-rong*, YAN Jun-ling, LI Yan-gang, XU Song

(Yunnan Baiyao Institute of Yunnan Baiyao Group Co. Ltd., Kunming 650500, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an LC-MS-MS method to determine the *in vivo* recovery of aconitine in microdialysis probes and study its stability. **Method:** The recovery of aconitine was detected by retrodialysis method. The effect of flow rates, concentrations and time on recovery was studied. **Result:** At the same concentration, the recovery decreased with the increase of the flow rate. Aconitine recovery was independent of aconitine concentration in the external medium by using retrodialysis method. Aconitine recovery had good stability. **Conclusion:** Microdialysis sampling can be used for the pharmacokinetic study of aconitine and retrodialysis method can be used for the determination of aconitine recovery *in vivo*.

[Key words] LC-MS-MS; aconitine; microdialysis; *in vivo* recovery

乌头碱是毛茛科乌头属植物中普遍含有的一种双酯型生物碱^[1],具有麻醉止痛等作用,临床上主要用于各种痛症^[2]。它既是活性成分又是毒性成分^[3],人口服2~5 mg 乌头碱即可致死亡^[4]。很多中药止痛贴膏都含乌头碱,研究表明,乌头碱经皮给药后,可以降低药物的毒性和不良反应,维持较长的作用时间。

微透析(microdialysis, MD)技术是从神经化学领域发展起来的可以对内源性物质及体内药物进行实时取样的新型膜采样技术^[5]。利用微透析技术,可以在基本不干扰正常体内生命过程的情况下,实

现活体的连续、动态取样及定量分析,从而达到动态监测体内局部药物浓度的目的^[5]。为了保证含乌头碱类经皮制剂的用药安全性,以及考察将微透析采样技术应用用于乌头碱的透皮药动学研究的可行性,本文进行了乌头碱皮肤微透析探针体外回收率及影响因素研究,为制剂评价、优化体内药动学研究参数提供了参考。

1 材料

1.1 仪器 岛津 LCMS8030 型液相色谱-质谱联用仪, Lab solution 工作站, AG135 型电子天平(瑞士梅特勒公司), KH-250B 超声波清洗仪(南京科尔仪器设备有限公司), CMA 微透析系统(CMA 402 Syringe Pump with accessory kit, Syringe 1.0 mL, CMA 30 Linear MD Probe, 瑞典 CMA 公司)。

1.2 试药 乌头碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110720-200410), 娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司), 甲酸(HPLC 级, ROE

[收稿日期] 20130201(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30672669)

[通讯作者] * 郭丽蓉, 硕士, 工程师, 从事药物制剂的新剂型与新技术研究, Tel: 0871-65934569, E-mail: guolirong@foxmail.com

SCIENTIFIC INC. T8124-0500), 乙腈 (HPLC 级, 德国 Merck 公司), 其他试剂为分析纯。

1.3 动物 SD 大鼠, 雄性, 广州中医药大学实验动物中心, SPF 级许可证号 SCXK(粤)2010-003。

2 方法与结果

2.1 乌头碱 LC-MS-MS 检测方法的建立

2.1.1 液相条件 Shim-pack VP-ODS column 色谱柱 (2.0 mm × 150 mm, 4.6 μm) (日本岛津公司, Serial No. 1052247), 流动相乙腈-0.1% 甲酸 (60:40), 流速 0.2 mL·min⁻¹, 进样量 5 μL, 柱温 40 °C, 运行时间 1.9 min。

2.1.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子源 (ESI); Neulizing Gas Flow (N₂): 3.0 L·min⁻¹; Drying Gas Flow (N₂): 15.0 L·min⁻¹; 正离子方式检测; 多反应 MRM 扫描; Interface Voltage: 4.5 kv; DL Temperature: 250 °C; Heat Block Temperature: 400 °C; 碰撞诱导解离电压: 35 eV; Dwell time: 200 msed。

2.1.3 离子对确定 取乌头碱对照品适量, 加乙腈溶解定容, 按上述色谱条件, 进行 Scan +, MRM + 模式扫描, 结果如图 1, 2 所示。

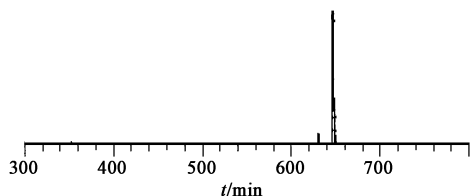


图 1 乌头碱对照品 MS (Scan +)

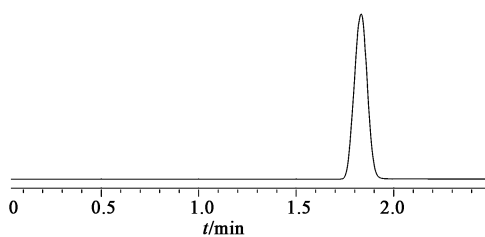


图 2 乌头碱对照品 MRM + (m/z 646.4 → 586.25)

结果表明, 离子反应 m/z 646.4 → 586.25 信号强, 稳定性较好, 将选其为定量离子对; 离子反应 m/z 646.4 → 586.25, 646.4 → 368.10 为定性离子反应。

2.2 方法学考察

2.2.1 专属性考察 分别取皮肤透析空白样品、皮肤透析样品适量, 按上述色谱条件进样, 记录色谱图。结果表明, 方法专属性较好。

2.2.2 线性考察 精密称取干燥至恒重的乌头碱对照品适量, 置于 100 mL 量瓶中, 加 30% 乙醇林格

氏液溶解定容, 制成 100 mg·L⁻¹ 的乌头碱对照品储备液。分别吸取对照品储备液 2, 5, 10, 20, 40 μL 于 10 mL 量瓶中, 加 30% 乙醇林格氏液定容, 制得 23.6, 59, 118, 236, 472 μg·L⁻¹ 的系列对照品溶液, 按上述色谱条件进样。以色谱峰面积 (A) 为纵坐标, 样品质量浓度 (μg·L⁻¹) 为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程 $Y = 1\ 679.04X + 14\ 975.9$ ($r = 0.999\ 7$), 表明乌头碱在 23.6 ~ 472 μg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.2.3 精密度考察 分别取 23.6, 118, 472 μg·L⁻¹ 的低、中、高 3 种质量浓度的乌头碱对照品溶液, 在 1 d 内各进样 5 次, 得日内精密度 < 3%; 连续 3 d 进样测定, 得日间精密度 < 3%。结果表明本试验精密度良好。

2.2.4 稳定性考察 取同一供试品溶液分别在 0, 2, 8, 12, 24, 48 h 进样, 按上述色谱条件测定峰面积, RSD 为 1.29%, 结果表明成分 48 h 内稳定。

2.2.5 检测限和定量限考察 分别配制不同浓度的对照品溶液, 各进样 5 μL, 其检测限为 0.23 μg·L⁻¹ (S/N = 3); 定量限为 1.84 μg·L⁻¹ (S/N = 10)。

3 体内回收率影响因素考察

3.1 探针的植入 SD 大鼠实验前一天腹部脱毛, 注射 25% 乌拉坦麻醉, 腹部向上固定好, 使其体温维持在 37 °C 左右, 将皮肤微透析探针引导针平行植入皮下, 然后小心将引导针抽回而微透析探针滞留于大鼠皮下组织中, 保证探针的半透膜全部位于大鼠皮下, 然后将皮肤探针与微透析装置相连。微透析以 30% 乙醇林格氏液为灌流液, 平衡 1 h 后接样, 作为空白透析样品。

3.2 流速的影响 灌流速度是影响回收率大小的重要因素之一, 流速越快, 其流经半透膜时, 膜内外药物的平衡时间就越短, 导致回收率降低。

将探针植入平衡约 1 h, 用乌头碱 23.6 μg·L⁻¹ 的 30% 乙醇林格氏液以 0.5, 1, 2, 3 μL·min⁻¹ 的流速灌注探针。每个流速采样前平衡 1 h, 各收集 5 份微透析样品, 每份 30 μL。LC-MS-MS 测定透析样品中乌头碱浓度 (C_{dialysis}) 和灌注前林格氏液中乌头碱质量浓度 ($C_{\text{perfusate}}$), 按公式 $R_L = (C_{\text{perfusate}} - C_{\text{dialysis}}) / C_{\text{perfusate}} \times 100\%$ 按上述色谱条件测定其中乌头碱质量浓度, 计算回收率。见图 3。

结果表明, 随着灌流速度的增加, 探针回收率呈下降趋势。考虑到取样量及取样间隔时间, 最终确定本实验研究的灌流速度为 1 μL·min⁻¹。

3.3 质量浓度的影响 在进行体内药动学研究实

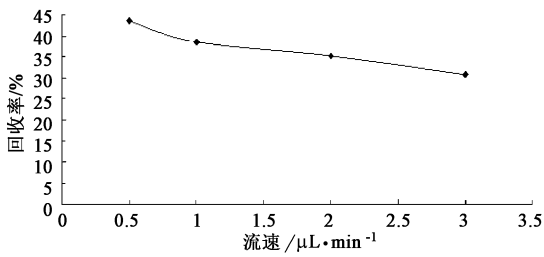


图 3 灌注速度对回收率的影响

验过程中,探针周围细胞外液中的药物质量浓度是动态变化的,为了保证透析液中药物质量浓度的变化能准确反应组织中药物质量浓度的变化,探针的回收率大小必须与质量浓度无关,这是微透析技术应用的理论前提。

将探针植入平衡约 1 h,分别用乌头碱质量浓度为 23.6,59,236 μg·L⁻¹ 的 30% 乙醇林格氏液以 1 μL·min⁻¹ 的流速灌注探针。每个浓度采样前平衡 1 h,各收集 5 份微透析样品,每份 30 μL。LC-MS-MS 测定透析样品中乌头碱质量浓度 (C_{dialysis}) 和灌注前林格氏液中乌头碱质量浓度 (C_{perfusate}),按公式 R_L = (C_{perfusate} - C_{dialysis}) / C_{perfusate} × 100% 按上述色谱条件测定其中乌头碱质量浓度,计算回收率。见表 1。

结果表明,在 3 种不同质量浓度的透析媒介中,所得的回收率很接近,表明在 23.6 ~ 472 μg·L⁻¹ 乌头碱回收率稳定,其大小与质量浓度无关。

表 1 不同质量浓度灌流液对回收率的影响 (x̄ ± s)

No.	灌流液质量浓度/μg·L ⁻¹	回收率/%
1	23.6	38.42 ± 1.31
2	236	36.87 ± 1.06
3	472	37.69 ± 1.43

3.4 体内回收率稳定性考察 体内微透析实验常中,一根探针往往需要连续取样多个小时,如果取样过程中,探针的回收率发生变化,则会失去微透析技术本身的意义,因此有必要考察其回收率随时间的变化关系。

将探针植入平衡约 1 h,用乌头碱质量浓度为 23.6 μg·L⁻¹ 的 30% 乙醇林格氏液以 1 μL·min⁻¹ 的流速灌注探针。采样前平衡 1 h,每 30 min 收集 1 份微透析样品,连续灌流 10 h。LC-MS-MS 测定透析样品中乌头碱质量浓度 (C_{dialysis}) 和灌注前林格氏液中乌头碱浓度 (C_{perfusate}),按公式 R_L = (C_{perfusate} - C_{dialysis}) / C_{perfusate} × 100% 按上述色谱条件测定其中乌头碱质量浓度,计算回收率。见图 4。

结果表明,当灌流速度为 1 μL·min⁻¹ 时,乌头碱体内回收率在 10 h 内基本保持稳定,说明探针的

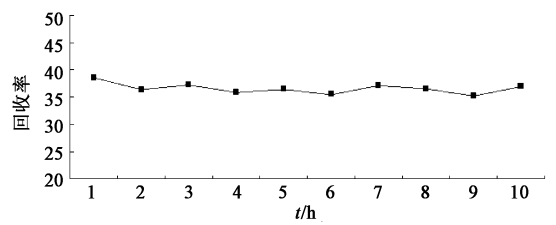


图 4 回收率稳定性考察

体内回收率具有良好的稳定性。

4 讨论

乌头碱生理活性强,既是毒性成分,又是活性成分,准确检测其含量能反映药品的毒性水平,有利于临床用药安全。较常用的是 HPLC 法检测,但乌头碱临床用量较低,且经皮肤给药后,透由于皮肤的屏障作用,使得透过量更少,采用 HPLC 法不能准确反映其透皮的药动学过程,透过量甚至低于检测限,故本实验采用 LC-MS-MS,专属性较好,能准确测定其含量。

温度也是影响回收率大小的因素之一,考虑到在体外回收率实验已考察温度对回收率的影响,且本实验为在体研究,实验动物体温波动不大,故不再考察。

有研究发现乌头碱在甲醇溶液中不稳定,常温下放置一段时间即可产生新物质^[6-7]。且甲醇毒性较大,故选择乙醇作为灌流液改性剂,体外实验表明 30% 乙醇林格氏液回收率结果较为理想。

[参考文献]

[1] 汪星,孙卫,张铁军. 乌头类有毒中药配伍减毒增效的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (18): 327.

[2] 符华林. 我国乌头属药用植物的研究概况[J]. 中药材, 2004, 27(2): 149.

[3] 李丽敏,王欣美,王柯,等. RP-HPLC 测定镇痛活络酊中 3 种乌头类生物碱含量[J]. 中成药, 2008, 30 (12): 1785.

[4] 孙兰,周海燕,赵润怀,等. HPLC 法同时测定附子中 6 种单酯和双酯型生物碱[J]. 中草药, 2009, 40 (1): 131.

[5] XU Ting-sheng, LIANG Xiu-lan. Prevention and cure of the toxic aconitine medicament. Henan[J]. Tradit Chin Med, 2005, 25(6): 65.

[6] 肖凤霞,周莉玲,李锐. 大鼠血清中乌头类生物碱含量测定方法的研究[J]. 食品与药品, 2005, 7 (10A): 47.

[7] 马鸿雁,李楠,杨明. 乌头碱水解实验和热力学研究[J]. 成都中医药大学学报, 2005, 28(3): 57.

[责任编辑 邹晓翠]