

LC/MS 测定大鼠灌胃黄连提取物后血浆中小檗碱、 巴马汀及其药物动力学研究

鲍天冬, 李玉洁, 杨庆, 翁小刚, 张英丰, 董宇, 王怡薇, 朱晓新*

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立 LC/MS 测定大鼠血浆中小檗碱、巴马汀含量的方法, 并探讨其在大鼠体内的药动学过程。方法: 大鼠 ig 黄连提取物后不同时间点采血, LC-MS 法测定血药浓度, 并用 Win Nonlin 5.1 软件求算其药动学参数。结果: 小檗碱、巴马汀质量浓度分别在 $5 \sim 1\,000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.998\,9$), $2.5 \sim 500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\,4$) 线性关系良好。平均回收率大于 85%, 日内、日间 RSD 均小于 15%。大鼠 ig 黄连提取物 1.2, 2.4, 4.8 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后, 用非房室模型计算药动学参数, 小檗碱的 AUC 平均值为 $707.91, 1\,220.32, 2\,424.62 \text{ h}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; $T_{1/2}$ 平均值为 1.89, 2.29, 4.79 h; C_{max} 平均值为: $315.78, 501.58, 584.57 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; T_{max} 均为 1 h; 巴马汀的 AUC 平均值为: $130.29, 348.61, 872.76 \text{ h}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; $T_{1/2}$ 平均值为 1.71, 2.64, 5.89 h; T_{max} 均为 1 h; 小檗碱和巴马汀的 AUC 与给药剂量之间呈现良好的线性关系。结论: 该法专属性强, 灵敏度高, 可用于小檗碱、巴马汀的体内定量分析, 小檗碱与巴马汀体内过程均符合一级速率过程。

[关键词] LC-MS; 小檗碱; 巴马汀; 药物动力学

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0186-04

LC/MS Determination of Berberine and Palmatin in Rats Plasma after Oral Administration of Extracts Rhizoma Coptidis and its Pharmacokinetics Study

BAO Tian-dong¹, LI Yu-jie, YANG Qing¹, WENG Xiao-gang,
ZHANG Ying-feng, DONG Yu¹, WANG Yi-wei, ZHU Xiao-xin^{1*}

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an LC-MS method to determine berberine and palmatin in rats plasma simultaneously. The method was employed to investigate pharmacokinetics of berberine and palmatin. **Method:** Blood samples were collected at different time after oral administration of extracts Rhizoma Coptidis, The plasma concentration of berberine and palmatin was determined by LC-MS. Pharmacokinetic parameters were calculated by WinNonlin 5.1 software. **Result:** The linear range of berberine and palmatin was $5 \sim 1\,000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.998\,9$), $2.5 \sim 500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\,4$) respectively. The average recovery of berberine and palmatin was exceeded 85% ($n=5$), the precision of inner-day and inter-day was less than 15%. The pharmacokinetics parameters calculated by noncompartment model, such as AUC, $T_{1/2}$, C_{max} of berberine were: $707.91 \text{ h}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $1\,220.32 \text{ h}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $2\,424.62 \text{ h}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 1.89 h, 2.29 h, 4.79 h; $315.78 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $501.58 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $584.57 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; T_{max} was all 1 h. The pharmacokinetics parameters AUC, $T_{1/2}$, C_{max} of palmatin were: $130.29 \text{ h}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $348.61 \text{ h}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $872.76 \text{ h}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 1.71 h, 2.64 h, 5.89 h; T_{max} was all 1 h. The relationship between dose and AUC showed good linearity. **Conclusion:** The method described in this report has high sensitivity and selectivity,

[收稿日期] 2010-05-18

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(30930114); 国家自然科学基金项目(90709017); 国家“十一五”科技支撑计划课题(2006BAI08B04-4)

[通讯作者] * 朱晓新, Tel: 010-64056154, E-mail: zhuxiaoxin@mail.cintcm.ac.cn

and was suitable for pharmacokinetic studies of berberine and palmatin. The kinetic process of berberine in rats *in vivo* was fitted to a one-compartment model at low dosage, while it was fitted to two-compartment model at middle and high dosages; the kinetic process of palmatine was all fitted to a one-compartment model.

[Key words] LC/MS; berberine; palmatin; pharmacokinetics

小檗碱、巴马汀为黄连中主要的生物碱成分,其中小檗碱在黄连中含量最高^[1],具有抗炎和免疫调节作用、抗心律失常、正性肌力作用、降血糖、抗脑缺血、保肝以及抗肿瘤作用等^[2]。对小檗碱的药代动力学研究报道较多,涉及到单体、复方给药等形式。对黄连中的其他生物碱类成分药代动力学报道较少,本文以黄连提取物大鼠 ig 后,建立 LC/MS 法测定小檗碱、巴马汀在血浆中的浓度,进而探讨二者在大鼠的体内动力学过程。

1 材料

1.1 药品与试剂 盐酸小檗碱(批号 110713-200208,含量测定用),盐酸巴马汀(批号 110732-200506,含量测定用),均购自中国药品生物制品检定所;黄连(为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎,经本所何希荣主管药师鉴定)醇提取物(委托中日友好医院制剂室提取制备,经 HPLC 含量测定,小檗碱和巴马汀在提取物中的含量分别为 23.05% 和 5.52%);甲酸(分析纯,北京化学试剂公司);水为超纯水。

1.2 仪器 Agilent 1100LC-MSD 液相质谱联用仪以及 Agilent ChemStation 色谱工作站(美国安捷伦公司),含在线真空脱气机,四元梯度泵,自动进样器,电喷雾(ESI)或大气压化学(APCI)离子源;Super T21 高速冷冻离心机(美国索福公司);NA-5L 氮气空气一体机(北京中兴汇利科技发展有限公司)。

1.3 动物 健康 Wistar 大鼠,雄性,体重(250 ± 20)g,北京维通利华实验动物中心提供,合格证号 SCXK(京)2002-2003。

2 方法学考察

2.1 色谱与质谱条件 液相色谱条件:Agilent SBC₁₈ 柱(2.1 mm × 150 mm, 5 μm),小檗碱、巴马汀流动相:乙腈-水(0.1% 甲酸) = 45 : 55;流速:0.2 mL · min⁻¹;柱温:室温。

质谱条件:ESI; Mode: SIM; Polarity: positive; 小檗碱: *m/z* 336 [M+H]⁺; 巴马汀: *m/z* 352 [M+H]⁺; Fragmentou: 小檗碱、巴马汀 150; 流速 8 mL · min⁻¹; 雾化压力 40; 载气温度 350 ; 理论塔板数

4 000。

2.2 血浆样品预处理 以微量加样器精密吸取待测血浆 100 μL,置 1 mL 试管内,加入 3 倍体积乙腈,涡旋混匀 30 s,以 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,吸取全部上清液,分别置于另一 1 mL 试管内,氮气发生仪上吹干样品,加入 100 μL 甲醇,涡旋混匀 60 s,再次 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,取上清液进样分析,进样 10 μL。

2.3 专属性试验 分别配制一定浓度的标准品液、标准品液 + 空白血浆、空白血浆样品及给药后 2h 含药血浆,进样分析,对比色谱图。

2.4 标准曲线的制备 配制小檗碱与巴马汀对照品血浆混标不同浓度溶液,使质量浓度分别为 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500, 1 000 ng · mL⁻¹ 和 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500 ng · mL⁻¹,按 2.1 项处理后,LC-MS 检测,记录峰面积。

2.5 精密度、回收率及基质效应考察 将样品测得的峰面积与空白基质加入对照品溶液峰面积之比,计算方法的绝对回收率;上述空白基质加入对照品溶液峰面积与对应浓度的对照品对照溶液测得的峰面积之比,计算方法的基质效应。

在标准曲线范围内以大鼠血浆配制小檗碱与巴马汀高、中、低 3 个不同质量浓度的样品,按 2.2 项内处理样品,在 1 d 内分别测定 5 份样品,计算日内精密度;每天各测定 1 份样品,连测 5 d,计算日间精密度。

3 动物给药试验

大鼠给药前禁食 12 h,自由饮水,试验中随机分为黄连提取物高、中和低剂量组,每组 3 只,给药量分别为 1.2, 2.4, 4.8 g · kg⁻¹(小檗碱和巴马汀在提取物中的含量分别为 23.05% 和 5.52%)。按 20 mL · kg⁻¹ ig 黄连提取物,给药后 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 480, 600, 720 min 眼眶取血 0.3 mL,肝素抗凝,4 ℃ 下以 3 000 r · min⁻¹ 离心 15 min,分离血浆,置 - 20 ℃ 保存待用。

所得血药浓度数据由 Winnonlin 5.1 药动学软件(美国 Pharsight 公司)进行拟合求解药动学参数。

4 结果

4.1 方法学试验

4.1.1 标准曲线及专属性试验 比较了大鼠空白血浆、小檗碱、巴马汀对照品和 ig 黄连提取物后大鼠血浆的色谱行为, 见图 1, 表明在小檗碱、巴马汀色谱峰处内源性杂质不干扰测定。以色谱峰面积为

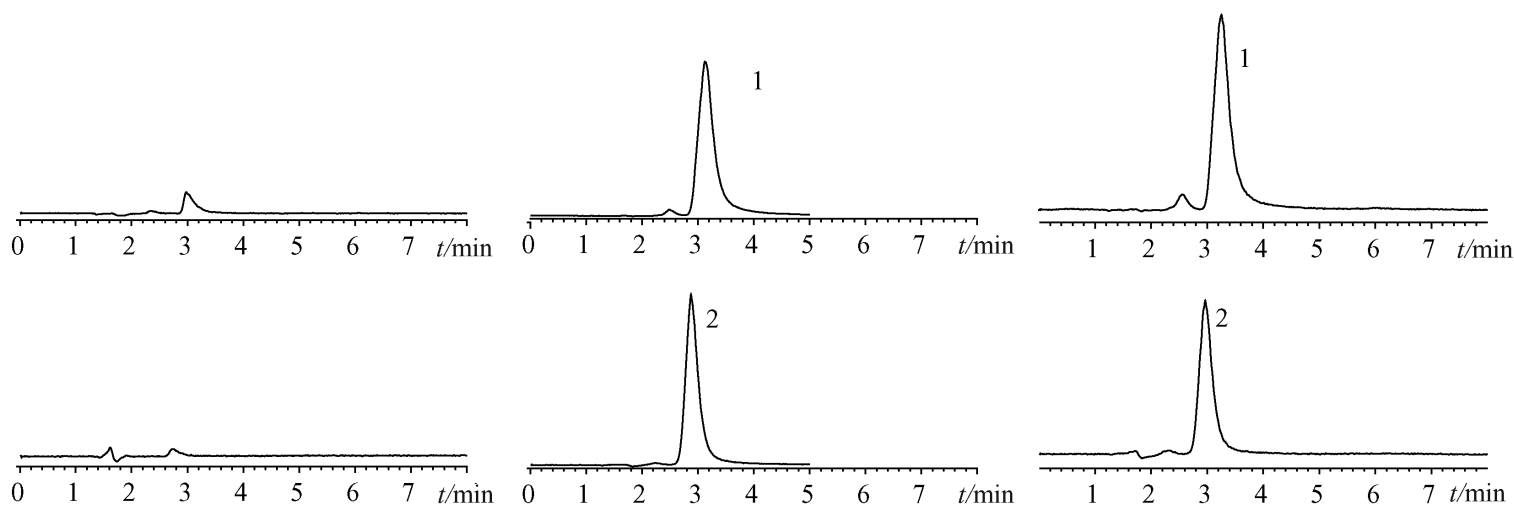


图 1 大鼠空白血浆、对照品及真实含药血浆色谱图

1. 小檗碱; 2. 巴马汀

4.1.2 精密度、回收率试验 结果表明仪器精密度良好, 回收率 > 80%, 基质效应较小, 精密度试验结果见表 1 ~2, 回收率试验结果见表 3。

表 1 小檗碱血浆样品精密度 (n = 5)

| 质量浓度 /ng·mL ⁻¹ | 日内 | | 日间 | |
|------------------------------|--------|-------|--------|-------|
| | 平均值 | RSD/% | 平均值 | RSD/% |
| 10 | 7.85 | 11.39 | 7.55 | 13.57 |
| 200 | 192.74 | 6.82 | 194.22 | 7.63 |
| 500 | 500.26 | 4.32 | 486.89 | 5.09 |

表 2 巴马汀血浆样品精密度 (n = 5)

| 质量浓度 /ng·mL ⁻¹ | 日内 | | 日间 | |
|------------------------------|--------|-------|--------|-------|
| | 平均值 | RSD/% | 平均值 | RSD/% |
| 10 | 7.90 | 12.65 | 7.50 | 10.82 |
| 200 | 184.59 | 8.14 | 177.69 | 8.29 |
| 500 | 493.69 | 3.67 | 477.56 | 4.65 |

表 3 小檗碱、巴马汀血浆样品回收率 (n = 5)

| 质量浓度 /ng·mL ⁻¹ | 日内 | | 日间 | |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 平均值 | RSD/% | 平均值 | RSD/% |
| 10 | 89.10 | 9.38 | 87.61 | 9.89 |
| 200 | 92.63 | 5.17 | 90.35 | 6.59 |
| 500 | 96.18 | 3.22 | 97.84 | 2.44 |

4.2 药动力学试验 3 种剂量给药后, 小檗碱与巴马汀血药浓度-时间曲线见图 2 ~3, 用 WinNonlin 5.1 药动力学软件非房室模型估算二者在大鼠体内的主要药动力学参数, 结果见表 4 ~5。

纵坐标, 样品浓度为横坐标进行线性回归, 得回归方程:

$$Y_{\text{小檗碱}} = 2\,623.93X + 82\,894.56, r = 0.998\,9$$

$$Y_{\text{巴马汀}} = 4\,470.27X + 56\,195.01, r = 0.999\,4$$

表明小檗碱与巴马汀在 5 ~1 000 ng·mL⁻¹ 和 2.5 ~ 500 ng·mL⁻¹ 范围内线性良好。

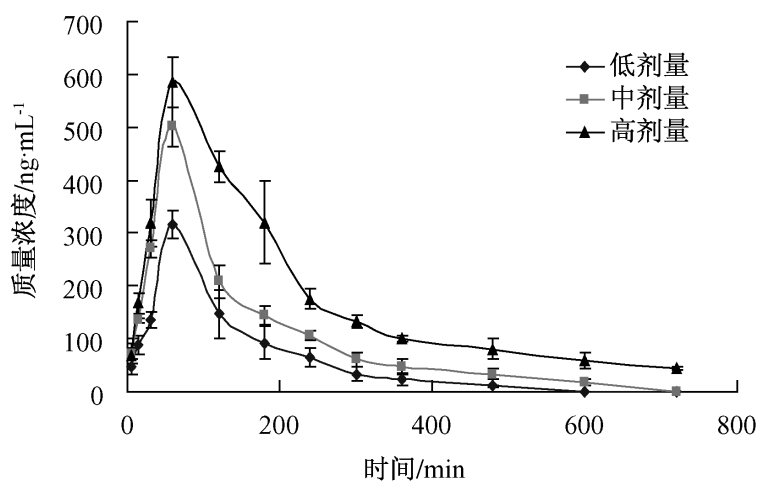


图 2 小檗碱药时曲线 (均 ± s, n = 3)

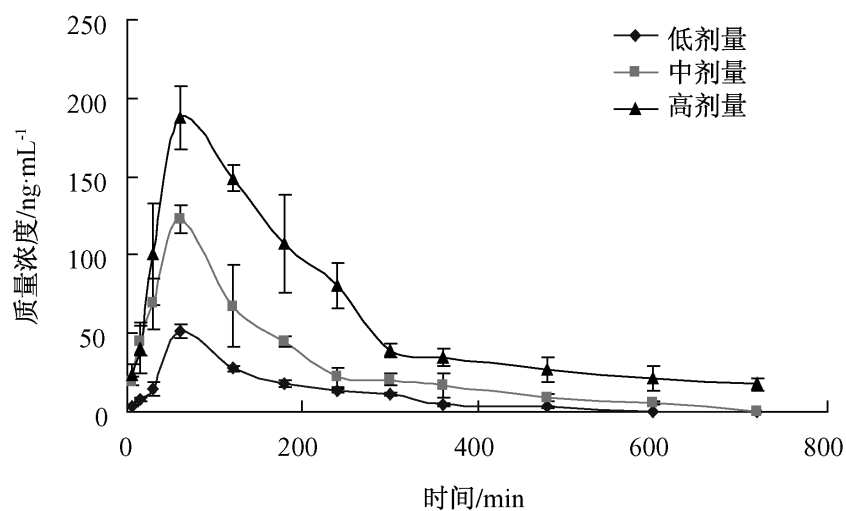


图 3 巴马汀药时曲线 (均 ± s, n = 3)

5 讨论

5.1 根据最小 AIC 判断法和曲线拟合优度原则, 采用 WinNonlin 5.1 软件对血药浓度数据进行拟合, 结果表明: 小檗碱与巴马汀体内的药时过程随剂量不同而略有波动; 根据判别线性与非线性原理, 可以看出小檗碱与巴马汀的 AUC 增长与剂量之间具有较

表 4 小檗碱主要药动学参数平均值 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 药动学参数 | 剂量 / $g \cdot kg^{-1}$ | | |
|---|------------------------|-----------|----------|
| | 1.2 | 2.4 | 4.8 |
| $C_{max} / ng \cdot mL^{-1}$ | 315.78 | 501.58 | 584.57 |
| T_{max} / h | 1 | 1 | 1 |
| $AUC_{last} / h \cdot ng^{-1} \cdot mL^{-1}$ | 677.79 | 1 162.28 | 2 112.37 |
| $AUC_{extra} / h \cdot ng^{-1} \cdot mL^{-1}$ | 30.12 | 58.043 72 | 312.25 |
| $AUC_{tot} / h \cdot ng^{-1} \cdot mL^{-1}$ | 707.91 | 1 220.32 | 2 424.62 |
| L_z / h^{-1} | 0.36 | 0.31 | 0.14 |
| $AUMC_{last} / h^2 \cdot ng^{-1} \cdot mL^{-1}$ | 1 574.41 | 3 182.71 | 7 654.7 |
| $AUMC_{extra} / h^2 \cdot ng^{-1} \cdot mL^{-1}$ | 323.34 | 772.08 | 5 904.1 |
| $AUMC_{tot} / h^2 \cdot ng^{-1} \cdot mL^{-1}$ | 1 897.75 | 3 954.79 | 13 558.8 |
| t_{half} / h | 1.89 | 2.29 | 4.79 |
| MRT/h | 2.68 | 3.24 | 5.59 |
| Clearance/ $ng \cdot h^{-1} \cdot (ng \cdot mL)^{-1}$ | 97 681.30 | 113 331 | 114 080 |
| $V_z / ng \cdot (ng \cdot mL)^{-1}$ | 267 017 | 267 017 | 788 087 |
| $V_{ss} / ng \cdot (ng \cdot mL)^{-1}$ | 261 860 | 367 281 | 637 950 |

表 5 巴马汀主要药动学参数平均值 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 药动学参数 | 剂量 / $g \cdot kg^{-1}$ | | |
|--|------------------------|-----------|-----------|
| | 1.2 | 2.4 | 4.8 |
| $C_{max} / ng \cdot mL^{-1}$ | 51.39 | 122.6 | 187.32 |
| T_{max} / h | 1 | 1 | 1 |
| $AUC_{last} / h \cdot ng^{-1} \cdot mL^{-1}$ | 123.02 | 326.63 | 725.62 |
| $AUC_{extra} / h \cdot ng^{-1} \cdot mL^{-1}$ | 7.27 | 21.98 | 147.13 |
| $AUC_{tot} / h \cdot ng^{-1} \cdot mL^{-1}$ | 130.29 | 348.61 | 872.76 |
| L_z / h^{-1} | 0.40 | 0.26 | 0.117 717 |
| $AUMC_{last} / h^2 \cdot ng^{-1} \cdot mL^{-1}$ | 324.72 | 921.76 | 2 692.34 |
| $AUMC_{extra} / h^2 \cdot ng^{-1} \cdot mL^{-1}$ | 76.08 | 303.37 | 3 015.46 |
| $AUMC_{tot} / h^2 \cdot ng^{-1} \cdot mL^{-1}$ | 400.81 | 1 225.14 | 5 707.81 |
| t_{half} / h | 1.71 | 2.64 | 5.89 |
| MRT/h | 3.08 | 3.51 | 6.54 |
| Clearance/ $ng \cdot h \cdot (ng \cdot mL)^{-1}$ | 127 105 | 95 005.20 | 75 897.52 |
| $V_z / ng \cdot (ng \cdot mL)^{-1}$ | 314 126 | 361 272 | 644 743 |
| $V_{ss} / ng \cdot (ng \cdot mL)^{-1}$ | 391 012 | 333 879 | 496 367 |

好的线性关系,因此可以判断为黄连提取物高、中、低剂量给药后小檗碱与巴马汀在体内属于线性动力学过程。房室模型因严重依赖药代数据的多寡与质量优劣,所揭示的药动学信息可靠性略低,故本研究

放弃房室模型拟合,采用国际通用的非房室模型拟合, C_{max} 和 T_{max} 采用实测值,从药代参数看出,半衰期和平均滞留时间随剂量增加而增加,达峰时间则趋于一致。

5.2 本试验得出的小檗碱、巴马汀在体内的药动学过程与文献报道有异同之处^[3-9],分析其原因可能为药物组成、剂型、给药途径以及种属差异等。

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [2] 王本祥. 现代中药药理与临床[M]. 天津: 天津科技翻译出版公司, 2004.
- [3] 赵玉男, 邢东明, 丁怡, 等. 解热药 YL2000 中小檗碱在正常和发热大鼠体内的药物动力学比较[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(10): 1170.
- [4] 林志平, 林力, 郑晓鹤, 等. 不同粒径黄连粉在大鼠体内药代动力学的研究[J]. 中医药学刊, 2004, 22, (5): 835.
- [5] 厉将斌, 张壮, 李曰庆, 等. 中药新药前列栓给药途径选择的药动学依据[J]. 北京大学学报: 自然科学版, 2004, 40(4): 557.
- [6] 厉将斌, 张壮, 李曰庆, 等. 家兔肛塞前列栓的药动学研究[J]. 中草药, 2004, 35(2): 190.
- [7] Wang X, Wang R, Xing D, et al. Kinetic difference of berberine between hippocampus and plasma in rat after intravenous administration of Coptidis rhizoma extract[J]. Life Sci, 2005, 77(24): 3058.
- [8] Lu T, Liang Y, Song J, et al. Simultaneous determination of berberine and palmatine in rat plasma by HPLC-ESI-MS after oral administration of traditional Chinese medicinal preparation Huang-Lian-Jie-Du decoction and the pharmacokinetic application of the method[J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 40(5): 1218.
- [9] Zuo F, Nakamura N, Akao T, et al. Pharmacokinetics of berberine and its main metabolites in conventional and pseudo germ-free rats determined by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry[J]. Drug Metab Dispos, 2006, 34(12): 2064.

[责任编辑 何伟]