

·化学与分析·

# HPLC 同时测定大鼠血浆中马钱子碱和土的宁的浓度

肖寒露<sup>1</sup>, 陈军<sup>1\*</sup>, 蔡宝昌<sup>1</sup>, 侯婷<sup>1</sup>, 方芸<sup>2</sup>

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046; 2. 南京大学医学院附属鼓楼医院药剂科, 南京 210008)

[摘要] 目的: 建立能同时测定大鼠血浆中马钱子碱和土的宁浓度的 HPLC 分析方法。方法: 大鼠血浆样品以石杉碱甲为内标, 液液萃取法处理后用 Kromasil C<sub>18</sub> 柱分离, 以乙腈-0.01 mol·L<sup>-1</sup> 庚烷磺酸钠与 0.02 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾等量混合后用 10% 磷酸调体系 pH 2.8(24:76) 作流动相, 检测波长 264 nm。结果: 血浆中杂质不干扰样品的含量测定, 马钱子碱和土的宁在 50~2 000 μg·L<sup>-1</sup> 线性良好, 平均提取回收率均大于 86%, 日内、日间精密密度均小于 8%, 稳定性符合体内药物分析要求。结论: 方法灵敏度高、精密密度好, 可应用于马钱子总生物碱中主要成分的药动力学研究。

[关键词] 马钱子碱; 土的宁; 体内药物分析; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)11-0026-04

## Simultaneous Determination of Brucine and Strychnine in Rat Plasma by HPLC

XIAO Han-lu<sup>1</sup>, CHEN Jun<sup>1\*</sup>, CAI Bao-chang<sup>1</sup>, HOU Ting<sup>1</sup>, FANG Yun<sup>2</sup>

(1. Department of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;  
2. Institution of Clinical Pharmacology, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an effective method for simultaneously determining the concentration of brucine and strychnine in rat plasma by HPLC. **Method:** The processed rat plasma samples were separated on a Kromasil C<sub>18</sub> column. The mobile phase consisted of acetonitrile-0.01 mol·L<sup>-1</sup> sodium heptane sulfonate and 0.02 mol·L<sup>-1</sup> potassium dihydrogen phosphate, adjusted pH to 2.8 with 10% phosphonic acid (24:76). The detection wavelength was set at 264 nm. **Result:** Chromatograms showed endogenous peaks not interfering with the analysis. The calibration curves of brucine and strychnine were both in good linearity within the range of 50-2 000 μg·L<sup>-1</sup>. The mean extraction recoveries were more than 86% while the precisions were less than 8%. The results of stability experiment meet certain requirements for the biopharmaceutical analysis. **Conclusion:** The method with good sensitivity and precision is applicable to the pharmacokinetic studies of the main compounds in total alkaloids from seeds of *Strychnou nux-vomica*.

[Key words] brucine; strychnine; biopharmaceutical analysis; HPLC

[收稿日期] 20100428(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30701111)

[第一作者] 肖寒露, 硕士研究生, 研究方向: 中药新剂型, Tel: 15850539325, E-mail: xiaohanlu1987@126.com

[通讯作者] \* 陈军, 博士, 副教授, 主要从事中药新剂型与药动力学研究, Tel: 025-85811517, E-mail: chenjun75@163.com

马钱子又名番木鳖, 始载于《本草纲目·卷十八》, 是马钱科植物马钱 *Strychnou nux-vomica* L. 的干燥成熟种子。总生物碱为其主要有效部位, 其中又以土的宁(strychnine)和马钱子碱(brucine)含量为最高。目前, 马钱子碱和土的宁的体内分析多以单独进行<sup>[1-4]</sup>, 关于两者在生物样品中同时检测的报

道尚不多见<sup>[5]</sup>。本研究以石杉碱甲(huperzine a)为内标,建立了 HPLC 同时测定马钱子碱和土的宁血药浓度的分析方法,研究马钱子总生物碱脂质体在大鼠体内的药动学。

## 1 材料

**1.1 仪器** 日本岛津 LC-10A 型高效液相色谱仪,包括 SPD-10A 型紫外-可见检测仪,LC-10A 型高压恒流泵;上海安亭 TGL-16G 型高速离心机;天津恒奥 HSC-12A 型氮吹仪。

**1.2 试剂** 马钱子(南京药业股份有限公司提供,经南京中医药大学蔡宝昌教授鉴定为马钱科植物马钱的干燥成熟种子);马钱子碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110706-200505);土的宁对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110705-200506);石杉碱甲对照品(中国药品生物制品检定所,批号 100243-200601);庚烷磺酸钠(山东禹王实业有限公司);乙腈(色谱纯,美国 TEDIA 公司);甲醇(色谱纯,山东禹王实业有限公司);大豆磷脂(德国 Lipoid 公司,批号 790549-1);胆固醇(分析纯,中国慧兴生化试剂有限公司);其他试剂均为分析纯。

酸水:0.01 mol·L<sup>-1</sup>庚烷磺酸钠与 0.02 mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钾等量混合后用 10% 磷酸调体系 pH 2.8,

再抽滤脱气即得。

**1.3 动物** 健康 SD 大鼠,雄性,体重 200 ~ 230 g,上海斯莱克实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(沪)2007-0005。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱 Kromasil C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-酸水(24:76),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 264 nm,进样量 20 μL,柱温 35 °C。

**2.2 血浆样品处理** 大鼠血浆样品加入 40 mg·L<sup>-1</sup>石杉碱甲甲醇溶液 20 μL 及 1/5 血浆体积的氨水,涡旋混合 30 s。再加入 5 倍血浆体积的氯仿,涡旋混合 3 min,超声 20 min,室温下静置 1 h,4 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,收集下层清液。剩余物再以 4 倍血浆体积的氯仿重复以上液液萃取操作 1 次,合并萃取液后于 50 °C 水浴下氮气流吹干。残渣用 100 μL 甲醇复溶,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心后进样。

**2.3 专属性考察** 空白大鼠血浆(不加内标)、马钱子碱和土的宁混合标准血样以及给药后的大鼠血样适量,按 2.2 项下处理后进样,色谱图见图 1。结果表明,内标和待测物的峰形良好,分离完全,血浆中内源性杂质不干扰马钱子碱和土的宁的含量测定。

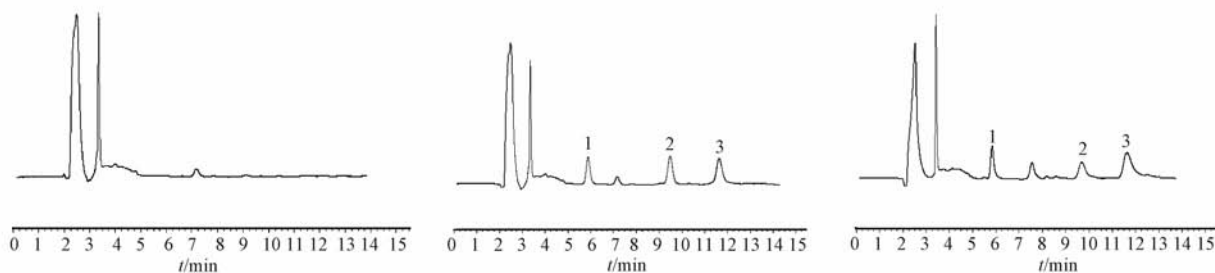


图 1 大鼠血浆中马钱子碱和土的宁的高效液相色谱

A. 空白大鼠血浆;B. 马钱子碱和土的宁混合标准血样;C. 给药后的大鼠血样;

1. 石杉碱甲;2. 马钱子碱;3. 土的宁。

**2.4 线性范围和灵敏度** 空白大鼠血浆中加入适量马钱子碱和土的宁混合标准溶液(甲醇为溶剂),混匀配制相当于马钱子碱和土的宁浓度同为 50, 100, 150, 300, 600, 1 000, 2 000 μg·L<sup>-1</sup>的混合标准血样(500 μL),按 2.2 项下处理后进样。以浓度(C)为横坐标,以马钱子碱和土的宁对石杉碱甲的峰高比值(Y)为纵坐标,进行线性回归,马钱子碱  $Y = 0.0034C - 0.0159, r = 0.9997$ ;土的宁  $Y = 0.0037C - 0.0232, r = 0.9994$ 。两者在 50 ~ 2 000 μg·L<sup>-1</sup>线性良好。按 S/N = 3 求算马钱子碱

和土的宁的最低检测限分别为 11.25, 10.71 μg·L<sup>-1</sup>;按 S/N = 10 求算两者的定量限则分别为: 37.50, 35.71 μg·L<sup>-1</sup>。

**2.5 回收率与精密度试验** 低、中、高(50, 300, 2 000 μg·L<sup>-1</sup>)浓度的混合标准血样,按 2.2 项下处理后进样,计算日内及日间精密度。以同浓度下马钱子碱和土的宁对石杉碱甲的峰高比值除以混合标准溶液直接进样所得的峰高与内标峰高的比值计算提取回收率,以实测浓度除以理论浓度计算方法回收率。见表 1。

表 1 大鼠血浆中马钱子碱和土的宁的回收率与精密度 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

成分	加入量 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	提取 回收率/%	方法 回收率/%	RSD/%	
				日内	日间
马钱子碱	50	101.02 $\pm$ 4.33	102.54 $\pm$ 1.59	4.66	7.14
	300	88.26 $\pm$ 4.91	103.13 $\pm$ 3.83	1.13	4.63
	2 000	95.42 $\pm$ 4.11	103.99 $\pm$ 4.26	1.20	2.92
土的宁	50	86.01 $\pm$ 8.63	101.51 $\pm$ 6.52	2.30	3.58
	300	90.63 $\pm$ 1.40	97.16 $\pm$ 6.06	0.74	3.79
	2 000	100.94 $\pm$ 2.33	100.38 $\pm$ 6.83	1.15	1.24

2.6 稳定性试验 中浓度的混合标准血样 4 份,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻存, 分别于 0, 5, 10, 15 d 取出解冻, 并按 2.2 项下处理后进样, 测得马钱子碱 RSD 7.10%, 土的宁 RSD 1.47%。另配制中浓度的混合标准血样 4 份, 按 2.2 项下处理所得残渣均用 100  $\mu\text{L}$  甲醇复溶, 高速离心后室温放置, 并分别于 0, 4, 8, 12 h 进样, 测得两者 RSD 分别为 5.68%, 5.57%。表明样品在该实验条件下稳定性良好。

### 2.7 药物动力学研究

#### 2.7.1 马钱子总生物碱脂质体的制备与含量测定

按文献[6]方法进行马钱子总生物碱的提取纯化及其脂质体(大豆磷脂为膜材)的制备, 凝胶柱层析法<sup>[7]</sup>除去未包封的总生物碱后, HPLC<sup>[6]</sup>测定脂质体中马钱子碱和土的宁所占比例分别为(26.01  $\pm$  3.24)%, (44.43  $\pm$  6.07)% ( $n = 5$ )。

#### 2.7.2 药物动力学试验

取大鼠 6 只, 实验前禁食 12 h, 不禁水, 尾静脉注射 2.0  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  的马钱子总生物碱脂质体, 折算成马钱子碱和土的宁的剂量分别为(0.52  $\pm$  0.06), (0.89  $\pm$  0.12)  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。于给药前和给药后 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90, 120 min 眼球后静脉丛取血, 置肝素化离心管中, 4 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min, 分取血浆,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存, 解冻后按 2.2 项下处理并测定其中马钱子碱和土的宁的浓度, 绘制血药浓度-时间曲线见图 2。

将所得数据用 3P97 药物动力学程序处理, 结果表

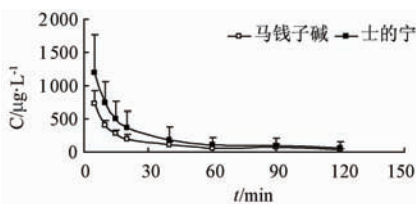


图 2 大鼠尾静脉注射马钱子总生物碱脂质体后的血药浓度-时间曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

明, 大鼠尾静脉注射马钱子总生物碱脂质体后, 其主要成分马钱子碱和土的宁的体内过程均符合三室模型, 统计矩方法计算所得相关药物动力学参数见表 2。

表 2 大鼠尾静脉注射马钱子总生物碱脂质体后的药物动力学参数 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

药物动力学参数	马钱子碱	土的宁
$\text{AUC}_{0-\infty}/\text{ng}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$	20 225.01 $\pm$ 5 987.47	32 437.58 $\pm$ 10 984.10
$\text{AUC}_{0-t}/\text{ng}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$	18 331.77 $\pm$ 5 082.91	26 602.31 $\pm$ 15 462.06
MRT/min	44.42 $\pm$ 29.34	38.10 $\pm$ 32.48
$V_{\text{SS}}/\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$	1 123.44 $\pm$ 496.50	1 051.32 $\pm$ 707.68
$\text{CL}/\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	31.74 $\pm$ 15.46	33.64 $\pm$ 11.95
$k/\text{min}$	0.037 $\pm$ 0.030	0.046 $\pm$ 0.034
$t_{1/2}/\text{min}$	30.78 $\pm$ 20.33	26.40 $\pm$ 22.51

以上结果表明: 马钱子总生物碱脂质体静脉注射给药后, 其主要成分的药物动力学参数均比较接近(AUC 除外), 提示这 2 种结构基本相同的生物碱(马钱子碱仅比土的宁多 2 个甲氧基)在体内具有相似的药物动力学特征。

### 3 讨论

本研究参照 2005 年版《中国药典》的色谱条件, 但检测波长选为 264 nm, 主要是考虑到马钱子总生物碱中含量相对较低的马钱子碱在 264 nm 处有最大吸收。另外, 通过对流动相中的有机相比例的考察, 发现随乙腈比例的增加, 出峰时间提前。当乙腈比例调整为 24% 时, 马钱子碱与土的宁分离良好, 峰形改善。同时, 血浆中内源性杂质不干扰样品的含量测定。

马钱子碱与土的宁均为碱性药物, 宜在碱性环境下用有机溶剂提取。故本研究采用氨水碱化血样, 并测得当氨水用量为血浆体积量的 1/5 时溶液体系的 pH 约为 14。在此条件下, 马钱子碱与土的宁主要以游离分子形式存在, 在有机相中的分配增加, 从而提高了提取效率。

本研究选择氯仿作为提取溶剂, 所得血浆样品的色谱图中内源性杂峰干扰少。同时, 其对于石杉碱甲的提取回收率高达(84.63  $\pm$  8.45)% ( $n = 5$ )。

本研究采用内标法, 并以峰高比进行定量, 在消除血浆内源性杂质对实验结果造成干扰的同时, 还可以减轻因药物在提取过程中损失对实验结果造成的影响, 使测定结果准确, 并呈现良好的重现性, 适用于马钱子总生物碱中主要成分的药物动力学研究。

[参考文献]

- [1] 高颖,陈军,蔡宝昌,等. HPLC 法测定大鼠血浆中马钱子碱的浓度[J]. 药物分析杂志,2008,28(12):2036.
- [2] 张婷,陈军,王玮,等. 马钱子碱脂质体在大鼠体内的药物动力学研究[J]. 中华中医药学刊,2010,28(1):69.
- [3] 邹龙,桂卉,黄世超,等. 不同粒径马钱子粉体中土的宁在大鼠体内的药物动力学研究[J]. 中华中医药杂志,2009,24(12):1568.
- [4] 王春英,范丽芳,王伟,等. RP-HPLC 法测定生物体内土的宁的浓度[J]. 河北医科大学学报,2007,28(1):28.
- [5] 王朝虹,果德安,胡春华. 反相高效液相色谱法测定全血中马钱子碱和土的宁的含量[J]. 色谱,2003,21(4):382.
- [6] 杨希雄,陈军,胡君寅,等. 高效液相色谱法同时测定马钱子总生物碱脂质体中土的宁和马钱子碱的含量[J]. 中国医院药学杂志,2008,28(19):1641.
- [7] 陈军,蔡宝昌,胡敏敏,等. 马钱子碱脂质体包封率测定方法的考察[J]. 南京中医药大学学报,2007,23(6):371.

[责任编辑 邹晓翠]

## 欢迎订阅 2011 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、“中国中文核心期刊”;“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月,本着提高为主,提高与普及相结合的办刊方针,主要设置:工艺与制剂、化学与分析、药理、临床、综述、经验交流、基层园地、消息等栏目,交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。本刊的读者对象是从事中西医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊为半月刊,16 开本,224 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价 25 元,全年 600 元。国内外公开发行人,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:BM4655。欢迎订阅。本编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:czd@vip.sina.com,网址:www.syfjxzz.com