

LC-MS/MS 法测定大鼠口服延胡索提取物后延胡索乙素和脱氢紫堇碱的药代动力学

林 力, 刘建勋*, 张 颖, 林成仁, 段昌令

(中国中医科学院 西苑医院, 北京 100091)

摘要: 建立检测大鼠血浆中延胡索乙素和脱氢紫堇碱分析方法, 并应用有机溶剂沉淀法提取含药血浆中的生物碱类成分, 色谱采用 SB-C₁₈ 反相柱, 流动相为乙腈-乙酸铵(0.1% 乙酸)梯度洗脱, 质谱采用多反应监测(MRM)方式进行正离子检测, 用于定量分析的例子对分别为 m/z 356.2 \rightarrow m/z 191.9 (延胡索乙素) 和 m/z 366.2 \rightarrow m/z 350.2 (脱氢紫堇碱)。测定血浆中这两种成分的线性范围均为 1.0~1 000 ng·mL⁻¹, 定量下限为 1.0 ng·mL⁻¹, 相关系数分别为 0.994 和 0.992, 延胡索乙素的回收率为 71.71%~91.59%, 脱氢紫堇碱的回收率为 83.27%~103.15%, 方法的精密度、准确度和稳定性均符合要求。结果显示, 该法选择性强、灵敏度高、操作简便, 适用于血浆延胡索乙素和脱氢紫堇碱的药代动力学研究。

关键词: 延胡索乙素; 脱氢紫堇碱; 药代动力学; 液质联用

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2008)11-1123-05

Pharmacokinetic studies of tetrahydropalmatine and dehydrocorydaline in rat after oral administration of Yanhusuo extraction by LC-MS/MS method

LIN Li, LIU Jian-xun*, ZHANG Ying, LIN Cheng-ren, DUAN Chang-ling

(Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

Abstract: A sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) method was developed and validated for the quantification of tetrahydropalmatine (THP) and dehydrocorydaline (DHC) in rat plasma. The compounds were simply pretreated by protein precipitation using acetone. Chromatographic separation was achieved on a reversed-phase SB-C₁₈ column with the mobile phase of acetonitrile- ammonium acetate (0.1% acetic acid) and step gradient elution resulted at a flow rate of 0.80 mL·min⁻¹. A tandem mass spectrometer equipped with electrospray ionization source was used as detector and operated in the positive ion mode. Quantification was performed using multiple reaction monitoring (MRM) of the transitions m/z 356.2 \rightarrow m/z 191.9 and m/z 366.2 \rightarrow m/z 350.2 for THP and DHC respectively. The method showed excellent linearity over the concentration range 1-1 000 ng·mL⁻¹ of two components ($r=0.994$ for THP and $r=0.992$ for DHC). The low limits of quantification were both 1 ng·mL⁻¹. The extract recoveries of analytes were from 71.71% to 91.59% for THP and from 83.27% to 103.15% for DHC. The precisions, the accuracy and the stability of the analytes meet the requirements. The method was applied to a pharmacokinetic study of THP and DHC after oral

收稿日期: 2008-05-23.

基金项目: 国家科技支撑计划(2006BAI08B04-08); 国家中医药管理局课题(06-07ZP49); 北京市优秀人才(20061D1600100402)资助项目.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-62874049, E-mail: liujx03423@sina.com

administration of the total alkaloid extraction of *Rhizoma Corydalis* (*Yanhusuo*). The AUC were (1.90 ± 0.04) , (2.58 ± 0.08) and $(4.34 \pm 0.19) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$ for low, medium and high doses of THP, respectively. While the DHC concentrations in plasma of low dose and medium dose were too lower to be detected, the AUC of high dose was $(0.0896 \pm 0.0002) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$.

Key words: dehydrocorydaline; tetrahydropalmatine; pharmacokinetics; LC-MS/MS

我国药典(2005年版)收载延胡索为罂粟科紫堇属植物延胡索(*Corydalis yanhusuo* W. T. Wang)的干燥块茎,具有活血、利气、止痛的功效。现代药理研究认为延胡索具有抗血栓、抗心律失常、改善心肌供氧和增加心输出量,用于治疗冠心病^[1]。化学研究^[2]表明延胡索的主要成分是生物碱类,目前已从延胡索中分得4种异喹啉型生物碱近20个,其中多数属原小檗碱型。

目前国内外关于延胡索的药代动力学研究不多,仅有的文献也多以延胡索乙素(tetrahydropalmatine, THP)为检测指标^[3-5],对于其所含的季胺型生物碱脱氢紫堇碱(dehydrocorydaline, DHC)的药代动力学测定未见文献报道。本实验应用LC-MS/MS方法建立了同时检测大鼠血浆中延胡索乙素和脱氢紫堇碱的方法,并应用该法研究大鼠口服延胡索总生物碱后体内指标成分的药代动力学特征,为下一步进行复方配伍对延胡索生物碱在大鼠体内的药代参数影响奠定了基础。

材料与方法

药品和试剂 延胡索乙素对照品,中国药品生物制品检定所,编号为110726-200409;脱氢紫堇碱对照品,自制,纯度大于98%;胡索总生物碱均由中国中医科学院西苑医院药学室提供(其中THP和DHC的含量分别为6.11%和29.65%),批号为060927。乙酸、乙酸铵和乙腈均为色谱纯,分别购自美国Fisher公司和J. T. BAKER公司;其他试剂均为市售分析纯。

实验动物 SPF级雄性Wistar大鼠,体重为 $(220 \pm 20) \text{ g}$,中国医学科学院动物实验研究中心提供,许可证号SCXY(京)2004-0001。

仪器 API 4000 Q-TRAP型三重四极杆串联质谱仪,配有离子喷雾离子源以及Analysis 1.4数据处理系统,美国Applied Biosystem公司;Agilent 1200高效液相色谱输液泵,自动进样器,美国Agilent公司;色谱柱为Agilent ZORBAX SB-C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm ID, 5 μm),美国Agilent公司。Micro 22R台式高速冷冻离心机,德国Hettich公司;Biomedical

Freezer超低温冰箱,日本Sanyo公司;AG-245分析天平和320 pH计,美国Mettler Toledo公司;M18780氮吹仪,美国Pierce公司;MS1 Minishaker涡流混合器,德国IKA公司。

给药与样品采集 大鼠随机分成3个剂量组,实验前12 h禁食不禁水,实验期间自由饮水,实验12 h后进食。按延胡索总生物碱125、250和500 mg · kg⁻¹的剂量灌胃给药(10 mL · kg⁻¹),分别于给药后0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12和24 h经大鼠眼球后静脉丛采血约0.5 mL,置肝素化试管中,4 000 r · min⁻¹离心10 min,分离血浆,待测。

血浆样品的处理 取大鼠血浆样品200 μL,加入丙酮400 μL,涡流混合1 min,离心(15 000 r · min⁻¹) 10 min,分离上清液400 μL于40 °C氮气流下吹干,残留物用流动相100 μL溶解,涡流1 min,15 000 r · min⁻¹离心10 min,取上清液待测。

色谱条件 色谱柱为Agilent ZORBAX SB-C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm ID, 5 μm),流动相为乙腈-0.01 mol · L⁻¹乙酸铵(含0.1%乙酸),梯度洗脱(0~5 min, 47%乙腈;5.01~6 min, 60%乙腈;6.01 min, 47%乙腈)。流速为0.80 mL · min⁻¹,柱温为5 °C。

质谱条件 离子喷射电压(IS) 5.5 kV,源内气体1(GS1)为41.4 kPa,源内气体2(GS2) 310.5 kPa,气帘气体103.5 kPa,碰撞气(CAD) High,源内温度600 °C。检测方式为正离子检测,扫描方式为选择反应监测(MRM)方式,用于定量分析的离子对(*m/z*): 356.2/191.9(THP), 366.2/350.2(DHC),相应的二级全扫描质谱如图1所示。

数据处理 采用DAS 1.0药动学软件处理统计数据统计矩方法计算大鼠给药后药动学参数。由于实验采用非连续取样,因此AUC的方差按文献^[6]计算。

结果

1 LC-MS-MS方法学确证

1.1 方法的专属性 取大鼠空白血浆,按“血浆样

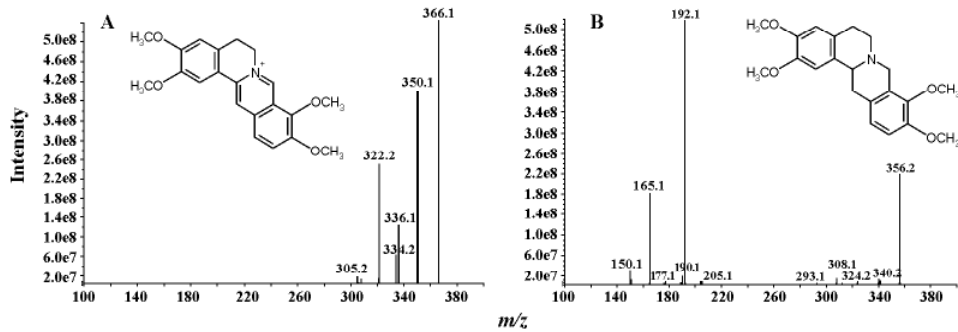


Figure 1 ESI-MS² product ion spectra of dehydrocorydaline (DHC, A) and tetrahydropalmatine (THP, B)

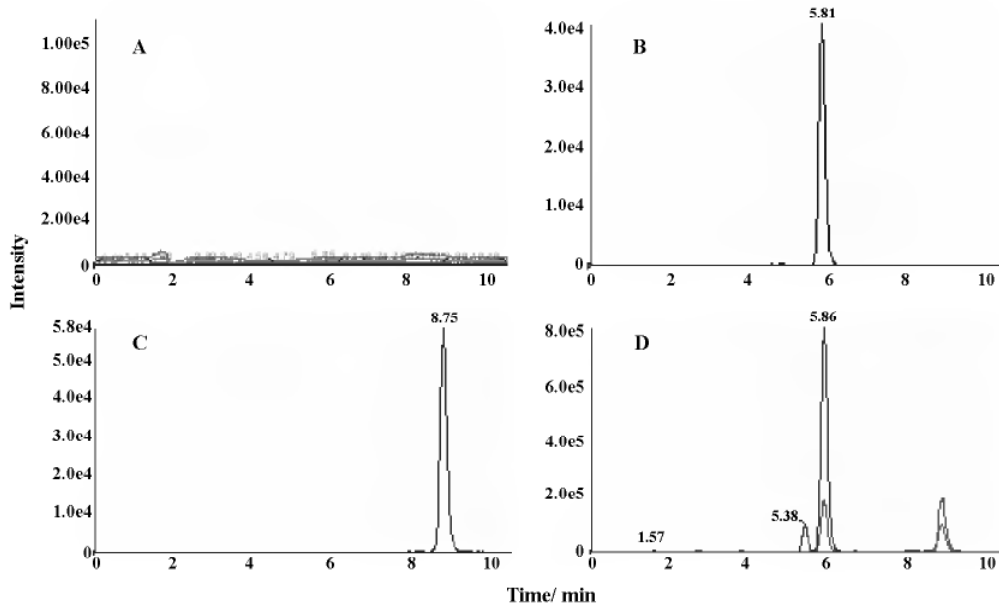


Figure 2 Representative MRM chromatograms of THP and DHC in rat plasma. A: Blank plasma sample; B: THP standard solution; C: DHC standard solution; D: Yanhusuo extraction in plasma

品处理”项下方法操作,获得大鼠空白血浆样品的色谱图(图 2A);将 THP 和 DHC 对照品系列溶液加入大鼠空白血浆中,依同法进行样品处理,获得相应的色谱图(图 2B 和 2C);取大鼠给药后收集的血浆样品同法处理,得色谱图(图 2D)。由上面结果可以说明大鼠血浆中内源性物质均不干扰 THP 和 DHC 的测定。

1.2 线性范围和定量下限 取大鼠空白血浆 160 μL , 依次加入 THP 和 DHC 对照品系列溶液 40 μL , 每个浓度 3 份,按“血浆样品处理”项下操作,建立工作曲线。以待测物浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,用加权最小二乘法进行回归运算,求得直线回归方程,其中 THP 的标准曲线 $Y = 137\,874.958 +$

$49\,134.926X$, $r = 0.994$ (权重 $W = 1/C$), 线性范围 1.0 ~ 1 000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; DHC 的标准曲线 $Y = 223\,189.399 + 54\,325.796X$, $r = 0.992$ (权重 $W = 1/CC$), 线性范围 1.0 ~ 1 000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

配制 THP 和 DHC 的血浆样品质量浓度均为 1.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,并根据当日标准曲线求得每一样本测定浓度,求得 THP 和 DHC 的精密度(RSD)分别为 6.04% 和 2.11%,准确度分别为 100% ~ 118% 和 84% ~ 94% 之间,该结果表明此方法下 THP 和 DHC 的定量下限可达到 1.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.3 回收率、精密度、准确度和稳定性 选择低、中、高 3 种浓度(分别为 5、100 和 1 000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$),以空白血浆配制 QC 样品,每个浓度点 5 份样品,将

相同浓度的样品按照样品处理方法于处理后分析,分别计算其回收率、精密度和准确度实验。3种浓度下大鼠血浆 THP 的回收率分别为 71.73% ~ 91.59%,精密度分别为 1.35% ~ 9.54%,准确度的 RSD 分别为 2.05% ~ 7.43%;DHC 的回收率分别为 83.27% ~ 93.15%,精密度为 2.06% ~ 4.06%,准确度为 83% ~ 115%。THP 和 DHC 在室温 24 h 空白血浆中样品稳定性均符合相关要求。

本方法生物样品中 THP 和 DHC 的测定方法表明血浆内源性杂质不干扰样品的测定,血浆中药物平均回收率均在 71% 以上,变异系数小于 10%;最低定量限均为 $1.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,相关系数超过了 0.992,日内精密度和稳定性符合相关要求。

2 DHC 和 THP 的药代动力学

应用 LC-MS/MS 的方法,以延胡索总生物碱给药,研究其主要有效成分 DHC 和 THP 在大鼠体内的药代动力学,其药代参数见表 1,药时曲线分别见图 3A 和图 3B。对于 DHC,由于中、低剂量组所能定量的数据点太少而无法绘制药时曲线,因此实验结果只得到了高剂量组的药代动力学曲线,其 AUC 值为 $0.0896 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$,药代参数显示该成分在体内达峰较快,在体内表观分布容积较大,但 AUC

值和 C_{max} 较低;3 个剂量组 THP 在大鼠体内的 AUC 值分别为 1.896、2.583 和 $4.344 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$,该值与给药剂量呈正相关, r 为 0.977。低、中剂量组的达峰时间均为 3 h,高剂量组为 6 h,表观分布容积与给药剂量成反比。

讨论

生物碱是一大类含氮的有机化合物,具有较强的生物活性。自从 1806 年德国学者 F. W. Sertürner 从鸦片中分离出吗啡碱以后,迄今为止已从自然界分出 10 000 多种生物碱^[1]。植物体内生物碱含量虽少,但与人类关系密切。许多生物碱具药理活性,如小檗碱、利血平、加兰他敏、吗啡碱、奎宁碱,三尖杉碱和长春花碱等。目前对于生物碱类成分药代动力学的研究很多,近年来也逐渐采用 LC-MS/MS 的方法进行定量。实验中发现,当流动相采用灵敏度较高的 0.1% 甲酸溶液测定时在 THP 的前面出现一个保留时间接近、母离子和子离子完全相同的色谱峰,由于前面的峰在体外测定时并未出峰,因此判断其可能为延胡索总碱在体内生成的代谢产物,为延胡索乙素的同分异构体。由于两者分离度太小,严重干扰定量测定,因此必须调整色谱条件将

Table 1 Pharmacokinetic parameters of THP and DHC after oral administration in rat ($n=6$)

Parameter	THP-low dose	THP-medium dose	THP-high dose	DHC-high dose
$\text{AUC}_{0-t}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	1 895.898	2 568.107	4 286.196	89.557
$\text{AUC}_{0-\infty}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	1 900.963	2 583.457	4 349.126	277.146
$\text{MRT}_{0-t}/\text{h}$	4.799	5.63	7.172	3.355
$\text{MRT}_{0-\infty}/\text{h}$	4.851	5.767	7.49	18.892
$T_{1/2}/\text{h}$	2.748	3.358	3.56	21.238
T_{max}/h	3	3	6	0.5
$\text{CL}/\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.011	0.008	0.005	0.072
$V_d/\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.042	0.038	0.024	2.212
$C_{\text{max}}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	364.210	336.057	407.628	62.527

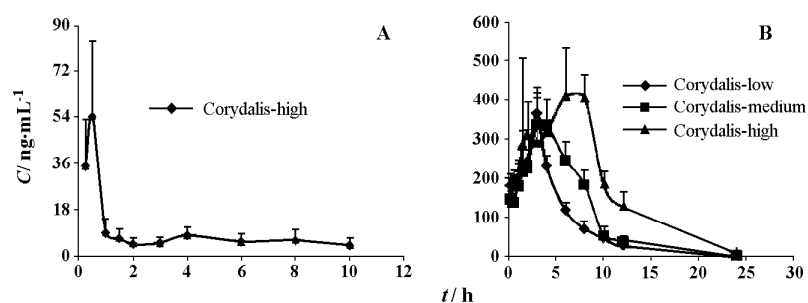


Figure 3 Mean plasma concentration-time curve of DHC (A) and THP (B)

其分开。通过不断调整色谱条件,发现只有将水相转换为酸性乙酸铵溶液并将色谱柱温调至 5 ℃ 才能将两峰完全分开,使其分离度达到定量标准。

在体内血药浓度的测定时进行了延胡索乙素和脱氢紫堇碱的研究,结果显示对于 3 个剂量组的 THP 体内均可以完整描绘其药时曲线,但对于 DHC 只有高剂量组才能得到药时曲线,中低剂量组均无法测定,这说明 DHC 的吸收很差(体外的吸收实验也证明了这一点,具体结果另文发表),这可能与其为季胺碱极性太大有关。文献^[7,8]中对 DHC 的体内研究仅见用同位素标记的分布研究,血药浓度的测定尚未见报道,这可能与给药剂量和体内难于吸收有关。

References

- [1] Lü QW, Cong YL. Pharmacological and clinical application of *Rhizoma Corydalis* [J]. *Inn Mong J Tradit Chin Med* (内蒙古中医药), 2005,24:26-29.
- [2] Xu XH, Wang ZT, Yu GD, et al. Alkaloids from *Rhizoma Corydalis* [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2002,33:483-486.
- [3] Hong ZY, Fan GR, Chai YF, et al. Stereoselective pharmacokinetics of tetrahydropalmatine in rats [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2005,40:746-749.
- [4] Pang ZG, Wang BQ, WANG CY, et al. Study on pharmacokinetics of tetrahydropalmatine in rabbit plasma [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1995,15:13-16.
- [5] Hong ZY, Fan GR, Chai YF, et al. Chiral liquid chromatography resolution and stereoselective pharmacokinetic study of tetrahydropalmatine enantiomers in dogs [J]. *J Chromatogr B*, 2005,108-113.
- [6] Yuan JH. Estimation of variance for AUC in animal studies [J]. *J Pharm Sci*, 1993,82:761-763.
- [7] Fujii T, Miyazaki H, Nambu K, et al. Autoradiographic and biochemical studies of drug distribution in the liver. I: ¹⁴C-Dehydrocorydaline [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 1984,9:235-246.
- [8] Fujii T, Miyazaki H, Nambu K, et al. Disposition and metabolism of ¹⁴C-dehydrocorydaline in mice and rats [J]. *Radioisotopes*, 1984,33:519-525.

欢迎订阅和投稿《药物流行病学杂志》

《药物流行病学杂志》是药物流行病学这一新兴边缘学科在我国乃至整个亚洲最早公开发行的专业期刊,中国药学会主办,刊号 CN 42-1333/R(国内)、ISSN 1005-0698(国际),双月刊,大 16 开,68 页,邮发代号 38-187,2009 年每期定价 8 元。杂志设有“述评”“论著”“临床用药与药效评价”“药物不良反应与合理用药”“药物利用与药物经济学”“国外进展”“方法资源”“讲座”“综述与论坛”“病例报道 病案分析”等栏目。编辑部开发运行了界面友好更为实用的远程稿处系统,作者与编审者沟通便捷。杂志经过 16 年的不懈努力,该领域具有国际先进水平的咪唑类药物不良反应系列研究等国内高水平论文首选此刊,杂志社还主办或承办了十余次全国药物流行病学学术活动及一次此专业的国际会议,充分体现了杂志与学科发展的高度同步性和密切关联。网址: www.cnjpe.org; E-mail: tg@cnjpe.org, ywlbxzz@periodicals.net.cn; 编辑部地址:武汉市兰陵路 2 号;邮编:430014;电话:027-82778580, 82835077。