

HPLC-FLU法测定血清中黄藤素的含量

张 慧¹, 余 琛^{1*}, 洪有采¹, 蒋山好², 沈竞康², 朱大元²

(1. 上海市徐汇区中心医院, 上海 200031; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

摘要: 目的 建立血清样品中黄藤素的高效液相色谱-荧光检测法。方法 色谱柱为 LiChrosorb SI 60(5 μ m) 20 cm \times 4.0 mm ID; 流动相为二氯甲烷-甲醇-二乙胺-冰醋酸(90: 9: 0.4: 0.5); 流速为 1.0 mL \cdot min⁻¹; 荧光检测 $E_x = 365$ nm, $E_m = 510$ nm。血清样品加 13-甲基小檗碱(内标), 用三氯乙酸-氯仿提取, 水浴加温、氮气吹干, 用二氯乙烷溶解进样。结果 黄藤素和内标的保留时间分别为 8.4 min 和 7.1 min。黄藤素的最低检测浓度为 0.1 ng \cdot mL⁻¹。在 0.1 ~ 10.0 ng \cdot mL⁻¹ 有良好线性关系($r = 0.9999$)。血药浓度测定天内、日间精密度分别为 0.94% ~ 1.85% 和 0.15% ~ 6.47%。结论 用高效液相色谱-荧光检测法测定黄藤素的血药浓度, 有灵敏、专一和快速的优点, 可满足药代动力学研究的需要。

关键词: 黄藤素; 高效液相色谱-荧光检测; 血药浓度测定

中图分类号: R927.2; R282.71

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2000)07 - 0518 - 03

黄藤素(palmatine)系从防己科植物黄藤的茎部提取得到的生物碱, 有清热解毒作用。临床用于妇科炎症、菌痢、肠炎、呼吸道及泌尿道感染、外科感染等。近年来报道黄藤素有抗多种实验性心律失常作用^[1, 2]及提高实验动物的免疫功能^[3]。有关黄藤素的体内过程及药代动力学的研究尚未见报道。我们根据黄藤素的理化特性, 建立了血清中黄藤素的高效液相色谱-荧光检测法, 为开展其药代动力学研究提供检测手段。

材 料 和 方 法

仪器 Beckman 110B 泵; Waters 470 荧光检测器, K501 六通进样阀(Loop = 20 μ L), 中国科学院上海分院科学仪器厂; 色谱数据工作站, 浙江大学; CQ50 超声波清洗器, 上海超声波仪器厂; 台式离心机 80-2, 上海手术器件厂; 高速离心机 TGL16, 上海安亭科学仪器厂。

药品与试剂 黄藤素(盐酸盐, 以下简称 PA)对照品由中国科学院上海药物研究所提供, 13-甲基小檗碱自行合成。PA 注射液(20 mg/2 mL)由云南昆明制药厂生产, 批号 940418。全部试剂均为分析纯, 二氯甲烷、二乙胺使用前经分馏精制。

贮备液与标准液 精密称取 PA 对照品适量, 用甲醇配制成浓度为 0.5 mg \cdot mL⁻¹ 贮备液, 使用时用甲醇稀释成浓度为 0.1 μ g \cdot mL⁻¹ 和 5 ng \cdot mL⁻¹ 标准液。精密称取 13-甲基小檗碱适量用甲醇配制成浓度为 0.5 mg \cdot mL⁻¹ 的内标贮备液, 使用时用甲醇稀释成浓度约为 5 ng \cdot mL⁻¹ 的内标液。上述溶液均置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

色谱分析条件 分析柱为 LiChrosorb SI 60 (4.0 mm \times 200 mm, 5 μ m); 流动相为二氯甲烷-甲醇-二乙胺-冰醋酸(90: 9: 0.4: 0.5); 流速为 1.0 mL \cdot min⁻¹; 荧光激发波长 $E_x = 365$ nm, 发射波长 $E_m = 510$ nm。

生物样品预处理 取血清 1 mL 置 10 mL 离心管中, 加内标液 100 μ L 和含三氯乙酸 15 mg \cdot mL⁻¹ 的氯仿 5 mL, 旋涡混合 30 s, 超声处理 1 min 后经 1 800 \times g, 4 min 离心分层, 取下层有机相, 60 $^{\circ}$ C 水浴加热, 氮气吹干后用二氯乙烷 100 μ L 溶解残渣并将该溶液转入 1 mL 塑料具塞离心管中, 经高速离心 17 000 \times g, 2 min 后取上清液 20 μ L 进样。

结 果

1 色谱与分离

在本实验条件下, PA 和 13-甲基小檗碱(内标)的保留时间分别为 8.4 min 和 7.1 min, 分离度优于 1.5。犬 iv PA 后的药代动力学测定, 血清中的代谢

产物不干扰 PA 的测定(图 1)。PA 的最低检测量为 1.5 pg ($S/N \geq 2$), 血样的最低检测浓度为 $0.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

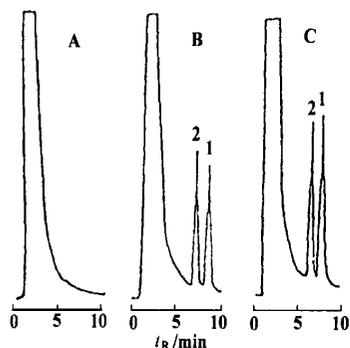


Fig 1 Chromatograms of blank serum (A), serum spiked with palmatine (B) and serum of dog 24 h after intravenous administration of palmatine $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (C). 1. Palmatine; 2. 13-methylberberine

2 线性范围

取 PA 标准液适量, 加入空白血清中, 分别制成 $0.10 \sim 10.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 血清标准液。分别取 1.0 mL 按样品预处理方法处理后进样。求出 PA 对内标的峰高比(X)与 PA 的浓度(C)进行线性回归, 得回归方程为: $C = -0.0013 + 2.045 X$, $r = 0.9999$ ($n = 12$)。

3 回收率与精密度

空白血清 1 mL 各 4 份, 分别加入 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ PA 标准液 20 和 $100 \text{ } \mu\text{L}$, $0.1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PA 标准液 20 和 $100 \text{ } \mu\text{L}$, 按生物样品预处理方法处理, 测定方法回收率和精密度。得此 4 种浓度样品平均方法回收率为 $(100.4 \pm 1.1) \%$ 。日内 RSD(%) 分别为 $1.20, 1.85, 0.94, 1.23$; 日间 RSD(%) 分别为 $6.47, 1.85, 1.48, 0.15$ 。另取相应量的 PA 标准液和内标液直接进样测定, 按血清样品中药物的峰高与直接进样量药物的峰高计算提取回收率。样品与内标的平均提取回收率均优于 85% 。

4 血样测定

取杂种犬 4 只(♂♀各 2), 体重为 $(7.6 \pm 1.4) \text{ kg}$, 经戊巴比妥钠麻醉后按 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量 iv PA 注射液后经对侧静脉取血。血样采集时间为 $0, 5, 10, 20, 30 \text{ min}$ 和 $1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 \text{ h}$, 离心分离血清后置 $-15 \text{ } ^\circ\text{C}$ 以下保存。

测定前取样品自然解冻, 依法处理后进行色谱测定, 结果见表 1。实验数据采用上海第二医科大学药理教研室编制的 PK-GRAPH 药代动力学程序进行处理, 符合三室模型, 求得平均表观分布容积(V_d)为 $(2.7 \pm 2.2) \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$, 平均血浆清除率(CL)为 $(1.7 \pm 0.7) \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 平均吸收总量(AUC)为 $(702.3 \pm 344.6) \text{ ng} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, 平均半衰期($T_{1/2}$)为 $(60.0 \pm 26.1) \text{ h}^{-1}$ 。

Tab 1 The concentration of palmatine in dog serum after iv administration of a single dose $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

Time	5 min	10 min	20 min	0.5 h	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h
Palmatine/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	185.3 ± 52.2	79.5 ± 34.9	50.8 ± 16.7	30.9 ± 10.9	20.8 ± 7.2	11.4 ± 3.0	9.3 ± 1.9	6.6 ± 1.5	4.9 ± 0.7	4.2 ± 0.2	3.8 ± 1.9	2.9 ± 1.6

$\bar{x} \pm s$, $n = 4$

讨 论

有关生药及中药制剂中黄藤素的含量测定方法文献已有大量报道, 其中大多系采用反相色谱-紫外检测法, 检测限约为 $1 \sim 10 \text{ ng}$ 。生物样品中黄藤素含量测定方法的报道甚少, 刘布鸣等^[4]曾报道用紫外二阶导数光谱法测定血浆、肝组织样品中的黄藤素, 但其检测灵敏度仅为 $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 水平且专一性差, 难以满足黄藤素药代动力学研究的需要。

根据在卤代烃类溶剂中的小檗碱在紫外线的激发下可产生强烈的荧光这一特性, 我们曾建立了小檗碱的高灵敏度检测方法^[6]。在实验中发现同属

小檗碱类生物碱的黄藤素、13-甲基小檗碱、去氢紫堇碱(13-甲基巴马丁)等化合物亦均具有类似的荧光特性, 故可利用以卤代烃类溶剂为流动相主要成分采用正相色谱-荧光法进行分离检测。本法对小檗碱类化合物的检测限可达 pg 级, 高于文献报道的 GC-MS 法^[7], 远优于常规的反相色谱-紫外检测法。

因黄藤素系季铵碱类化合物, 在血样预处理中采用常用的有机溶剂进行液-液萃取时难以获得良好的提取回收率。在实验中发现, 三氯醋酸具有较强的酸性, 可使水溶液中的黄藤素充分离子化, 进而与三氯醋酸根结合生成易溶于卤代烃类溶剂的离子对。故以三氯醋酸为离子对试剂, 用氯仿萃取富

集生物样品中的黄藤素可获得良好的提取回收率。

本文所建立的黄藤素血药浓度测定法具有快速、专一和检测灵敏度高的优点。预试验结果表明,本法的灵敏度对于按 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 犬一次 iv 给药后 72 h, 血药浓度的定量检测尚有 10 倍以上的富裕量, 可较好地满足其药代动力学研究的需要。在本法的基础上, 有关黄藤素、小檗碱、去氢紫堇碱的药代动力学的研究正在进行中。

致谢: 本实验经曾衍霖教授多方指导; 严桦、潘俊芳同志参加了部分工作。

REFERENCES:

- [1] Chen C, Fang DC. Effects of palmatine on electrophysiological character in the isolated guinea pig papillary muscles [J]. *Chin Pharmacol Bull* (in Chinese), 1991, 7(2): 138 - 141.
- [2] Chen C, Fang DC. Effects of palmatine on experimental antiarrhythmic activity [J]. *Chin Pharmacol Bull* (in Chinese), 1992, 8(5): 408 - 429.
- [3] Zhu ZJ, Ke MZ, Li FC, *et al.* Effects of fibrauretinum on the immunological functions of rats [J]. *Acta Acad Med Guangxi* (in Chinese), 1995, 12(6): 518 - 521.
- [4] Huang JC. Studies of the metabolism and pharmacokinetics of active principles isolated from Chinese herbal medicine since the foundation of the People's Republic of China [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 1987, 22(9): 553 - 556.
- [5] Liu BM, Yang ZX, Jiang JH, *et al.* Determination of palmatine in plasma or liver by ultraviolet secondary derivative spectroscopy [J]. *Chin Anal Test Bull* (in Chinese), 1987, 6(1): 27 - 30.
- [6] Yu C, Hong YC, Zhang H, *et al.* Analysis of berberine by a sensitive high performance liquid chromatographic method [J]. *Chin J Chromatogr* (in Chinese), 1994, 12(1): 37 - 39.
- [7] Miyazaki H, Shirai E, Ishibashi M, *et al.* Quantitative analysis of berberine in urine samples by chemical ionization mass fragmentography [J]. *J Chromatogr*, 1978, 152(1): 79 - 82.

DETERMINATION OF PALMATINE IN SERUM BY HPLC-FLU

ZHANG Hui¹, YU Chen¹, HONG You Cai¹, JIANG Shan Hao², SHEN Jing Kang², ZHU Da Yuan²

(1. Xuhui Central Hospital, Shanghai 200031, China;

2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

ABSTRACT: **AIM** To develop a method for analysis of palmatine in serum by high performance liquid chromatography with fluorometric detector. **METHODS** Separation was obtained by using a LiChrosorb SI 60 column (4.0 mm × 200 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of a mixture of dichloromethane - methanol - diethylamine - acetic acid (90: 9: 0.4: 0.5) and the flow rate was $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Excitation and emission wavelengths were set at 365 and 510 nm respectively. To 1.0 mL of serum containing palmatine was added 13-methylberberine (internal standard, IS), then extracted with 5.0 mL chloroform containing trichloroacetic acid. The organic phase was removed with nitrogen and the residue dissolved with 100 μL dichloromethane. After centrifugation, 20 μL of the lower layer was subjected to HPLC. **RESULTS** The retention times of palmatine and IS were 8.4 and 7.1 min respectively. In serum the detection limit of palmatine was $0.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. The extraction recoveries of palmatine and IS were over 85%. The relative standard deviations of within-day and between-day were 0.94% ~ 1.85% and 0.10% ~ 6.47% ($n=6$) respectively. **CONCLUSION** This method is sensitive, simple and fast, so it can fit the need of palmatine pharmacokinetic research preferably.

KEY WORDS: palmatine; HPLC-FLU; serum