

# RP-HPLC 法测定大鼠血浆的普鲁托品浓度及其药代动力学研究

杨丹莉<sup>1\*</sup>, 黄燮南<sup>1</sup>, 孙安盛<sup>1</sup>, 黄 斌<sup>1</sup>, 叶 兰<sup>2</sup>, 石京山<sup>1</sup>

(1. 遵义医学院药理教研室, 贵州 遵义 563003; 2. 贵阳医学院药理教研室, 贵州 贵阳 550000)

关键词: 普鲁托品; 反相高效液相色谱法; 药代动力学

中图分类号: R917.101; R969.1

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2001)10 - 0790 - 03

普鲁托品 (protopine, Pro) 又名 fumarine, 是从罂粟科 (Papaveraceae) 的夏天无、紫金龙等植物中提取的一种异喹啉生物碱。现代药理学研究表明, Pro 有抗血小板聚集<sup>[1]</sup>、解痉镇痛<sup>[2]</sup>、舒张血管平滑肌<sup>[3-5]</sup>及抗实验性心律失常<sup>[6]</sup>等作用, 但有关 Pro 在生物体内处置及药代动力学研究未见报道。本研究建立了 Pro 的 RP-HPLC 测定法, 并研究了 Pro 在大鼠的体内过程及其药代动力学参数, 为临床应用提供实验资料。

## 材 料 和 方 法

**试剂** 盐酸普鲁托品 (protopine hydrochloride), 为 ICN Biomedical Inc 产品, 批号为 92344, 含量 99.99%, 用蒸馏水溶解并稀释成所需浓度。其他试剂均为国产分析纯。

**仪器** LC-10A 系列高效液相色谱仪: 日本岛津公司产品, 其中包括 LC10-AD 高压泵、SPD-10A 紫外检测器、CBM10A 工作站及 NEC 软件包。

**实验动物** 健康 ♂ Wistar 大鼠, 体重 (220 ± 30) g, 由本院实验动物中心提供。

**色谱条件** 反相色谱柱: ODS, 250 mm × 4.6 mm, 5 μm; 流动相: 甲醇-重蒸水-10%乙酸 (80: 20: 2), 用 15% 氨水调至 pH 5.6, 经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后, 负压脱气 10 min, 紫外检测波长: 285 nm, 柱温: 40 °C, 洗脱速度: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。

**样品测定** 大鼠颈动脉插管取血, 肝素抗凝,

4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 抽取血浆备用。吸取含 Pro 的血浆 0.5 mL, 加入氨-氯化铵缓冲液 (pH 10.0) 0.5 mL 混匀, 用乙醚提取两次, 第 1 次 4 mL, 第 2 次 3 mL, 每次震荡 4 min, 合并乙醚提取液于尖底试管中, 40 °C 水浴浓缩至 1 mL, 加入 0.02 mol·L<sup>-1</sup> 硫酸 50 μL, 振荡 5 min, 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 吸取硫酸液 25 μL 进样分析。

## 结 果

### 1 色谱行为

在上述色谱条件下, 空白血浆和含药血浆的色谱图见图 1, Pro 色谱分离良好, 不受杂质峰干扰, 保留时间为 (5.7 ± 0.1) min。

### 2 标准曲线

在一系列含有 0.5 mL 大鼠血浆的试管中加入不同量对照点溶液, 使血浆标准管浓度分别为: 0.060, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.6, 4.0 μg·mL<sup>-1</sup>; 按上述样品处理过程分析, 以 Pro 的峰高为纵坐标, Pro 的浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程和相关系数。求得回归方程为:  $Y = 0.083 + 2.770 X$ ,  $r = 0.998$ 。表明, 血浆样品在标准曲线范围内, 线性关系良好。

### 3 精密度、回收率和定量限

准确配制浓度为 0.125, 1.0, 4.0 μg·mL<sup>-1</sup> 的 Pro 血浆样品各 5 管, 一日内经萃取, 进样分析后计算 3 浓度的回收率和日内相对标准差 (RSD)。结果显示, 上述 3 浓度的平均回收率分别为 80.6%, 96.8%, 97.6%, 日内 RSD 分别为 3.0%, 2.6%, 1.5%。同时配制 5 套上述 3 浓度的样品管, 分别于不同日测定, 求得日间 RSD 分别为 6.2%, 2.5%, 2.1%。取信噪比为 3, 血浆检测限为 50 ng·mL<sup>-1</sup>。

收稿日期: 2001-02-08.

基金项目: 贵州省科委资助课题 (983054).

作者简介: 杨丹莉 (1971 - ), 女, 讲师.

\* Tel: (0852) 8228032, Fax: (0852) 8623729,

E-mail: LiuGuoXiong @163.net

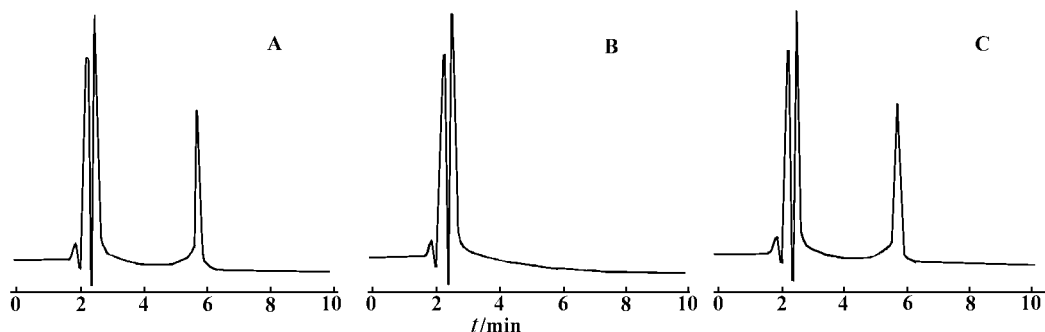


Figure 1 Chromatograms of protopine (A), blank rat plasma (B) and plasma of a rat given protopine (C)

#### 4 血药浓度及药物动力学参数

尾静脉注射 Pro  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 给药后 2, 5, 15, 30, 60, 180 及 360 min 颈动脉插管取血, 每组每时间点 5 只大鼠, 分离血浆, 测定血药浓度。将血药浓度观察值用上海医科大学临床药理研究所自编的药代动力学程序进行曲线拟合, Pro 在大鼠体内按一级动力学代谢, 并呈二室开放模型, 大鼠 iv Pro  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  后血药浓度-时间曲线见图 2。静注 Pro  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的  $T_{1/2\alpha}$ ,  $T_{1/2\beta}$ ,  $V_d$ ,  $CL$ ,  $K_e$ ,  $K_{21}$ ,  $V_1$ ,  $K_{12}$  和 AUC 分别为 0.05 h, 1.85 h, 17.28 L,  $6.46 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ , 1.52 h, 3.39 h, 4.24 L, 9.24 h 和  $1.55 \mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 由前 5 个参数可说明该药由中央室向周边室分布快、广, 消除迅速, 从血浆迅速向组织转移。

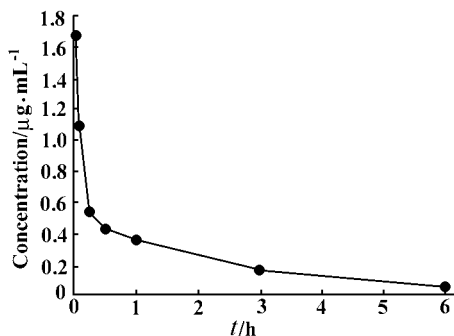


Figure 2 Concentration-time curve of protopine in rat plasma after  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  iv

### 讨论

Pro 是极性较小的弱碱性物质。用反相萃取法对生物样品中的 Pro 进行提取, 即在碱性条件下, 将

Pro 转移到醚相, 再以酸性水相反提取, 最后将水相进样分析。实验选用常规流动相, 仅以甲醇和水为主要成分, 不能达到理想的分离效果, 而加入一定量的乙酸, 用 15% 氨水调流动相至 pH 5.6, 可获得良好的分离效果。最佳提取条件: 提取次数为 2 次, 振荡时间为 4 min, 氨-氯化铵缓冲液 pH 10.0, 提取过程中不易形成乳化层, 回收率高。用酸回提可以除去部分杂质, 提高回收率。本方法不需要特殊的样品预处理及特殊试剂, 方法快速简便、可靠。曾尝试用内标法测定 Pro 的含量, 但未找到理想的内标物, 故本实验采用了外标法。

### REFERENCES:

- [1] Ma GY, Zhang ZZ, Chen ZH. Effect of protopine in rabbit platelet function [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1994, **15**(4): 367 - 371.
- [2] Xu Q, J RL, Wu YY. Opioid, calcium and adrenergic receptor involvement in protopine analgesia [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1993, **14**(6): 495 - 500.
- [3] Ko FN, Wu TS.  $\text{Ca}^{2+}$ -channel blockade in rat thoracic aorta by protopine isolated from *Cordalis Tubers* [J]. *J Pharmacol*, 1992, **28**(1): 1 - 9.
- [4] Huang YH, Zhang ZZ, Jiang JX. Relaxant effects of protopine on smooth muscles [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1991, **12**(1): 16 - 19.
- [5] Yu LM, Huang XN, Sun AS. Vasodilative mechanism of protopine in rabbit aorta [J]. *Chin J Pharm Toxicol* (in Chinese), 2000, **14**(1): 21 - 25.
- [6] Lu ZA, Wang DC, Chen ZH, et al. Effects of protopine on experimental arrhythmia [J]. *Chin Pharm J* (in Chinese), 1995, **30**(2): 81 - 84.

## RP-HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF PROTOPINE IN PLASMA AND PHARMACOKINETICS IN RATS

YANG Dan-li<sup>1</sup>, HUANG Xie-nan<sup>1</sup>, SUN An-sheng<sup>1</sup>, HUANG Bing<sup>1</sup>, YE Lan<sup>2</sup>, SHI Jing-shan<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmacology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China;

2. Department of Pharmacology, Guiyang Medical College, Guiyang 550000, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To develop a reversed phase high performance liquid chromatographic method (RP-HPLC) for determination of protopine (Pro) in rat plasma and to investigate the pharmacokinetics of Pro in rats. **METHODS** The column was packed with 5  $\mu\text{m}$  C<sub>8</sub>. The mobile phase (pH 5.6) was a mixture of methanol-water-10% acetic acid (80:20:2). After twice extracted with ether under basic condition, and reextracted with 0.02 mol·L<sup>-1</sup> sulfuric acid, protopine in the plasma samples was isolated well. The content of protopine in the plasma sample was measured by UV detector at 285 nm. **RESULTS** The lowest limit of detection was 50 ng·mL<sup>-1</sup>. The intraday and interday precisions were 1.5% - 3.0% and 2.1% - 6.2%, respectively. The mean recovery was 80.6% - 97.6%. A good linear relationship between the peak height and the concentration of protopine in rat plasma was observed. The pharmacokinetics of protopine had been investigated in rats after intravenous administration 10 mg·kg<sup>-1</sup>. The concentration-time curve of protopine in rat was confirmed to two-compartment open model. The  $T_{1/2\alpha}$ ,  $T_{1/2\beta}$ ,  $K_e$ ,  $CL$ ,  $V_d$  were 0.05 h, 1.85 h, 1.52 h, 6.41 L·h<sup>-1</sup> and 17.27 L, respectively. **CONCLUSION** This method is suitable for studies on pharmacokinetics of protopine.

**KEY WORDS:** protopine; RP-HPLC; pharmacokinetics