

反相 HPLC 法测定兔血浆异钩藤碱浓度及其药物代谢动力学

黄 彬 吴 芹 陆远富 文国容 石京山

(遵义医学院药理学教研室, 遵义 563003)

摘要 用 ODS 柱分离, 甲醇—水(95:5)为流动相, 检测波长 UV 254 nm, 建立了兔血浆异钩藤碱浓度的 HPLC 测定方法。结果显示, 血药浓度在 $0.016 \sim 16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 范围内呈线性关系, 血浆最低检测浓度为 $0.016 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 绝对回收率为 80.5%~85.1%。兔 iv IRHY 2 及 $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 药代动力学过程符合二室开放模型, $T_{1/2\beta}$ 分别为 1.32 h 和 1.25 h。兔经十二指肠给 2 及 $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后, $T_{1/2\beta}$ 分别为 1.75 h 和 1.26 h。生物利用度为 42.4%~69.4%。此法简便、快速。IRHY 在兔体内吸收迅速, 消除也较快。

关键词 异钩藤碱; 反相高效液相色谱法; 药代动力学

异钩藤碱(isorhynchopylline, IRHY)系传统中药钩藤的主要生物碱, 有降低血压及明显负性变时变力等效应^[1,2], 总碱可对抗实验性心律失常^[3]。本文建立了反相 HPLC 法测定血浆中 IRHY 浓度及其药代动力学参数, 对临床应用具参考价值。

材 料 和 方 法

药品和试剂 IRHY 纯度在 96% 以上, 由广西中医药研究所提供, 临用时以 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶解, 蒸馏水稀释, 调至 pH 6~6.5; 其他化学试剂均为分析纯。

动物 兔, 体重 $2.3 \pm 0.5 \text{ kg}$, ♀ ♂ 兼用。遵义医学院实验动物中心提供。

仪器 LC-10A 高压泵, SPD-10A 紫外检测器, CLC-ODS 色谱(4.6 mm × 150 mm), CBM-10A 色谱数据处理机, 均为日本岛津公司产品。

色谱条件 流动相为甲醇—重蒸溜水(95:5), 用前先过滤及脱气, 流速 $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测

波长为 254 nm。

药品检测方法 取兔血浆 0.25 ml 加重蒸溜水 1 ml, 用氯化钠饱和, 混匀后离心($2000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 10 min, 取上清液加乙醚 2 ml 和 12% 碳酸氢钠 0.14 ml, 混匀后离心。吸取有机相后, 再用乙醚 2 ml 混匀提取, 离心。合并两次乙醚提取液置尖底试管内, 于恒温(52℃)水浴中蒸干。用甲醇 50 μl 定容, 取 20 μl 进样。CBM-10A 色谱数据处理机自动打印出 IRHY 的峰面积, 从血浆样品的标准曲线换算含药的绝对量, 得出每毫升血浆的微克数。

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。IRHY 的保留时间(t_R)为 $4.1 \pm 0.1 \text{ min}$ 。

2 标准曲线与检测限

于空白血浆中加入不同量的标准液($200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 甲醇液), 配制成系列浓度 0.016, 0.08, 0.016, 0.4, 0.8, 1.6, 4.0, 8.0, 16.0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 按上述血浆样品处理过程分析。以

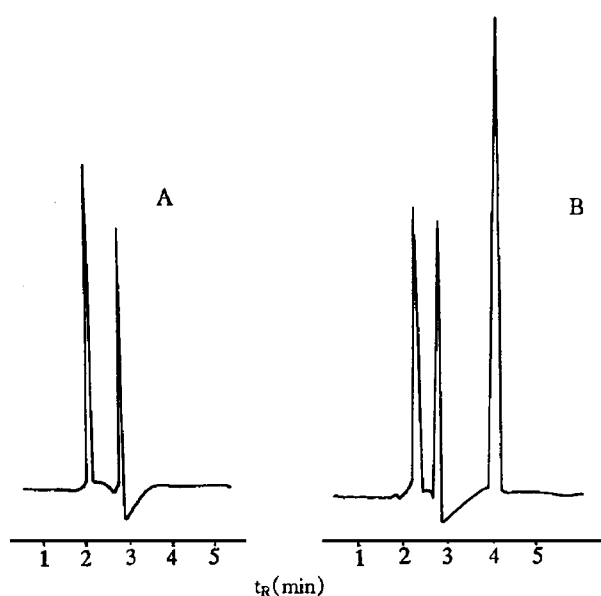


Fig 1 Chromatograms of blank rabbit plasma (A) and plasma containing isorhynchophylline (B).

不同浓度 IRHY (X) 与相应的峰面积 (Y) 进行回归处理。在 $0.016 \sim 16.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 范围内响应值与 IRHY 浓度成线性关系, 回归方程为: $Y = 2.525X + 0.117$, $\gamma = 0.9990$ 。信噪比 (S/N)

为 3 时, 最低检测浓度为 $0.016 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

3 回收率及精密度

准确配制浓度为 $0.16, 1.6, 16.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的 IRHY 血浆样品各 4 管, 一日内经萃取进行分析后测定并计算上述 3 浓度的绝对回收率和日内相对标准偏差 (RDS)。结果表明, 上述 3 浓度的平均回收率分别为 85.1%, 80.5% 和 84.9%, 并用之对所测血药浓度进行校正; 日内精密度分别为 6.2%, 3.8% 和 6.1%。同时配制 4 套上述 3 浓度的样品管, 分别于不同日内测定, 求得日间精密度分别为 6.3%, 6.9% 和 6.5%。

4 血药浓度及药动力学参数

取兔 16 只, 随机分 4 组, 在戊巴比妥麻醉下, 两组分别 iv IRHY $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 于给药后不同时间取血, 分离血浆并测定血药浓度。将血药浓度观察值用上海医科大学临床药理研究所自编药代动力学程序进行曲线拟合, 判定 IRHY 在兔体内的药代动力学模型为二室开放模型 (图 2), 药动力学参数见表 1 和表 2。

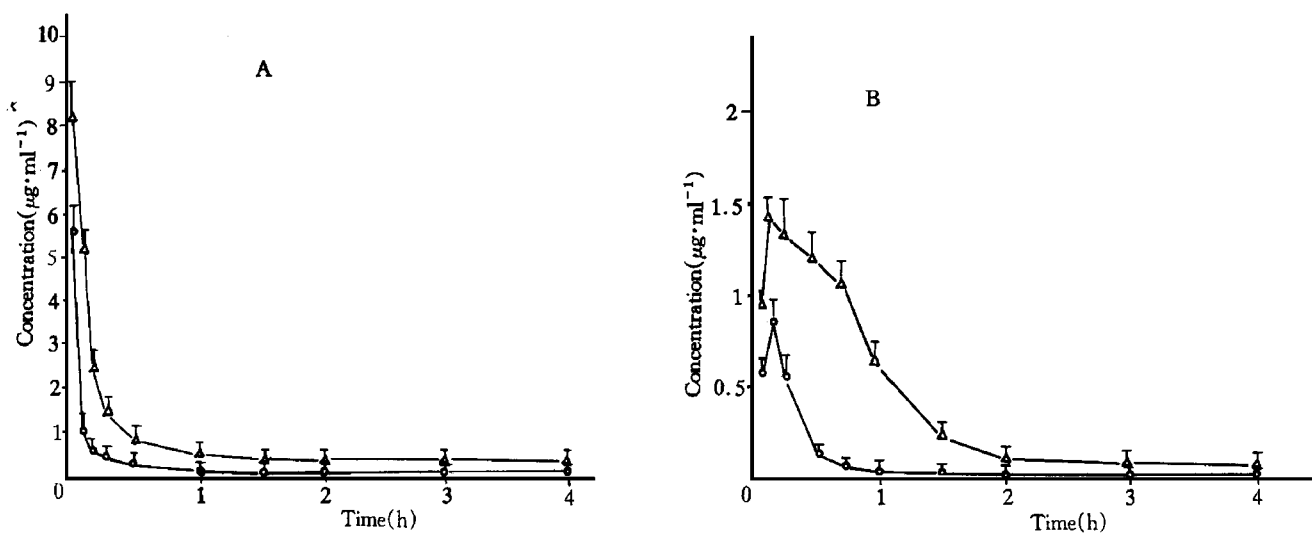


Fig 2 Plasma concentration-time curves of isorhynchophylline after iv (A) and intraduodenal (B) administration in rabbits ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$). $\circ - \circ$ $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; $\triangle - \triangle$ $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of IRHY iv in rabbits ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Parameter	Dose	
	2 mg•kg ⁻¹	5 mg•kg ⁻¹
K_{21} (h)	2.40±0.18	2.02±0.30
KE (h)	6.79±0.89	3.48±0.44
K_{12} (h)	21.8±3.27	6.26±0.49
V_1 (L)	0.24±0.04	0.53±0.06
$T_{1/2\alpha}$ (h)	0.03±0.01	0.07±0.01
$T_{1/2\beta}$ (h)	1.32±0.16	1.25±0.09
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{ml}^{-1}$)	1.09±0.05	2.81±0.25
CL (L•h ⁻¹)	1.84±0.08	1.86±0.07
Vd(L)	3.50±0.32	3.25±0.35

Tab 2 Pharmacokinetic parameter of IRHY after intraduodenal administration in rabbits ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Parameter	Dose	
	2 mg•kg ⁻¹	5 mg•kg ⁻¹
K_{21} (h)	3.11±0.85	0.80±0.10
KE (h)	0.53±0.13	1.89±0.53
K_{12} (h)	2.04±0.91	0.83±0.08
V_1 (L)	17.56±3.93	2.59±0.95
$T_{1/2\alpha}$ (h)	0.24±0.05	0.41±0.21
$T_{1/2\beta}$ (h)	1.75±0.18	1.26±0.20
$T_{1/2A}$ (h)	0.23±0.06	0.12±0.02
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{ml}^{-1}$)	0.46±0.15	1.95±0.07
CL (L•h ⁻¹)	4.84±1.55	2.89±0.65
Vd (L)	16.21±3.88	5.29±1.21

讨 论

实验结果表明, iv IRHY 后, 兔血浆分布半衰期($T_{1/2\alpha}$)和消除半衰期($T_{1/2\beta}$)分别为 0.03~0.07 h 和 1.25~1.32 h。兔十二指肠给予 IRHY 后, 吸收半衰期($T_{1/2A}$)为 0.12~0.23 h, 血浆 $T_{1/2\alpha}$ 和 $T_{1/2\beta}$ 分别为 0.24~0.40 和 1.26~1.75 h, 说明该药吸收快, 由中央室向外周室的分布较快, 消除也迅速。表观分布容积(V_d)值提示该药在兔体内的分布较广。十二指肠给予 IRHY 2 mg•kg⁻¹ 和 5 mg•kg⁻¹ 后, 生物利用度分别为 42.4% 和 69.4%, 表明吸收较好, 特别是高剂量组更好。

参 考 文 献

- 1 Shi JS, Liu GX, Wu Q, *et al.* Hypotensive and hemodynamic effect of isorhynchophylline in conscious rat and anaesthetized dogs. 中国药理学与毒理学杂志, 1989, 3:205
- 2 朱毅, 刘国雄, 黄燮南. 钩藤碱和异钩藤碱对豚鼠心房的负性变时和变力作用. 中国药理学与毒理学杂志, 1993, 7:17
- 3 孙安盛, 李淑媛, 刘国雄, 等. 钩藤总碱抗实验性心律失常作用的观察. 广西医学, 1983, 5:6

RP-HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF ISORHYNCHOPHYLLINE IN PLASMA AND ITS PHARMACOKINETICS IN RABBITS *

Huang Bin(Huang B), Wu Qin(Wu Q), Lu Yuanfu(Lu YF),
Wen Guorong(Wen GR) and Shi Jingshan(Shi JS)

(Department of Pharmacology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003)

ABSTRACT A reversed phase HPLC method for determination of isorhynchophylline (IRHY) in rabbit plasma was developed. A Shimadzu LC-10A liquid chromatograph equipped with a Shimadzu SPD-10A multiwavelength detector and a Chromatopac LC-10A data processor were used. The analytical column was a 4.6 mm×150 mm CLC-ODS. The mobile phase was a mixture of methanol-water (95:5), the flow rate was 1 ml•min⁻¹. Detection was performed at UV 254 nm. The

calibration curve was linear in the range from 0.016 to 16 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ with $\gamma = 0.9990$. The lowest detection limit was 0.016 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. The precision and accuracy of within-day and day-to-day ranged from 3.8% to 6.9%. The recoveries were 80.5% to 85.1%. The drug concentration-time curves of IRHY in rabbits after iv of 2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ were shown to fit a two-compartment open model with half-times of 1.32 ± 0.6 h and 1.25 ± 0.09 h respectively. The absorption was fast after intraduodenal administration of IRHY (2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) to rabbits with half-times of 1.75 ± 0.18 h and 1.26 ± 0.20 h, respectively. The bioavailability of IRHY was about 42.4% to 69.4%. The results showed that the method was simple and fast. The absorption and elimination were fast after intraduodenal administration or iv of IRHY to rabbits.

KEY WORDS Isorhynchophylline; RP-HPLC; Pharmacokinetics

* Project supported by the Science Foundation of the Ministry of Health of China for Youth (No. 92304)