



岩舒注射液4种生物碱类成分 Beagle 犬体内药动学研究

刘继平^{1,2}, 薛梅³, 黄鑫³, 王舒³, 江振洲^{3,4*}, 张陆勇^{3,5*}

(1. 中国药科大学 中药药理教研室, 江苏 南京 210009;

2. 陕西中医学院 药理教研室, 陕西 咸阳 712046;

3. 中国药科大学 江苏省新药筛选中心, 江苏 南京 210009;

4. 中国药科大学 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 江苏 南京 210009;

5. 中国药科大学 江苏省药效研究与评价服务中心, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的:建立 LC-MS 法测定 Beagle 犬血浆中苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱的浓度,研究岩舒注射液在 Beagle 犬体内药动学过程及其参数。方法:以野百合碱做内标,三氯甲烷提取,甲醇-10 mmol 醋酸铵 0.02% 甲酸水溶液 90:10 为流动相,CN 柱分离,检测 Beagle 犬 iv 1.2 g·kg⁻¹ 岩舒注射液后 12 h 内血浆样品中 4 种生物碱的浓度,用 DAS 2.0 药动学程序处理血药浓度-时间数据,分析药动学参数。结果:苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱分别在 0.01~16.0, 0.02~60.0, 0.01~4.0, 0.02~16.0 mg·L⁻¹ 具有良好的线性关系,平均回收率均大于 90%,精密性试验 RSD 小于 6.4%,稳定性试验 RSD 小于 4.6%;静注岩舒注射液后,4 种生物碱在 Beagle 犬体内的药代动力学符合二室开放模型, C_{max} 与原药液中浓度比例基本相符;苦参碱和氧化苦参碱、槐果碱和氧化槐果碱的 $AUC_{0-\infty}$ 与原药液中的比例相比均有增大,苦参碱和槐果碱 $MRT_{0-\infty}$ 和 $t_{1/2\alpha}$ 分别小于氧化苦参碱和氧化槐果碱;4 种生物碱表观分布容积苦参碱 > 氧化苦参碱,槐果碱 > 氧化槐果碱。结论:该方法用于岩舒注射液中苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱血药浓度的测定准确、灵敏、稳定性好、回收率高,适合其药动学研究。

[关键词] 岩舒注射液;液相色谱/质谱联用;药动学

岩舒注射液具有清热利湿、凉血解毒、散结止痛之功效,研究表明该注射液具有镇痛、止血、抗癌、提高免疫功能等作用。到目前为止,关于岩舒注射液系统的体内过程研究一直未见报道。本研究建立了 LC-MS 法,定量分析 Beagle 犬静脉给药后 12 h 岩舒注射液中主要成分(苦参碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱、槐果碱)的血药浓度-时间曲线,计算药动学参数,系统的研究岩舒注射液的药动学过程,以期全面提供该药的动物药代动力学资料,指导剂型开发,为

临床的合理应用和安全使用提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 LC-MS2010EV 高效液相色谱/质谱联用仪(SHIMADZU),BS210S 电子天平(德国 Sartorius 公司);SPD 2010 SPEEDVAC CONCENTRATOR 真空浓缩仪;MICROMAX 3591 Centrifuge 台式高速离心机(THERMO ELECTRON);XW-80A 涡旋混合器(上海沪西分析仪器厂)。

1.2 药物与试剂 岩舒注射液,山西振东制药有限公司,批号 20090912,原药液每 1 mL 相当于 2 g 生药,各生物碱质量浓度为苦参碱 3.5 g·L⁻¹,氧化苦参碱 7.0 g·L⁻¹,槐果碱 0.9 g·L⁻¹,氧化槐果碱 2.6 g·L⁻¹。氧化苦参碱、苦参碱和槐果碱(南京泽浪医药科技有限公司,纯度 > 99%);氧化槐果碱、内标物野百合碱(中国药品生物制品检定所)。甲醇(色谱纯,Merck 公司);乙酸铵(色谱纯,Dikma-Pure);氯仿(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司);氯化钠注射液(安徽双鹤药业有限责任公司,批号

[稿件编号] 20111030004

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2008ZX09202-009);陕西省教育厅自然科学基金专项(2010JK498)

[通信作者] * 江振洲,博士,助理研究员,研究方向为毒代动力学研究,Tel:(025) 85391036, E-mail:jiangcpu@yahoo.com.cn; * 张陆勇,教授,博士生导师,研究方向为毒理学,Tel:(025) 83271500, E-mail:drugscreen@126.com

[作者简介] 刘继平,讲师,博士研究生,Tel:(025) 83271419, 13815440721, E-mail:liwenjie780711@163.com



0911281K);试验用水均为 Milli-Q 超纯水机制备。

1.3 动物 Beagle 犬,6 条,体重 8.8~9.4 kg,雌雄各半。由上海新冈实验动物场提供,动物生产许可证号 SCXK(沪)2007-0009。

2 方法

2.1 色谱条件 汉邦 1CN 152F 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 5 μm)。柱温 25 °C。流动相甲醇-10 mmol · L⁻¹ 醋酸铵 0.02% 甲酸溶液 90:10;电喷雾离子源参数,喷雾电压为 4 kV;干燥气为氮气,流速 10 L · min⁻¹;喷雾压力 275.79 kPa;温度 350 °C;裂解器电压 120 V。离子化方式:电喷雾离子化,正离子方式。选择离子检测(SIM) 苦参碱 *m/z* 249.1, 氧化苦参碱 *m/z* 264.9, 槐果碱 *m/z* 247.1, 氧化槐果碱 *m/z* 263.1, 内标野百合碱 *m/z* 326.0。

2.2 对照品溶液和内标溶液的配制 对照品溶液配制:精密称取苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱对照品 4.9, 5.1, 5.0, 5.0 mg 各置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度(0.49, 0.51, 0.50, 0.50 g · L⁻¹),作为母液。分别进样针精密量取计算量母液,配制苦参碱 0.2, 2, 20, 160 mg · L⁻¹;氧化苦参碱 0.4, 4, 40, 400 mg · L⁻¹;槐果碱 0.2, 2, 10, 40 mg · L⁻¹;氧化槐果碱 0.4, 4, 40, 160 mg · L⁻¹ 的储备液。

内标溶液的配制:精密称取野百合碱对照品 5.0 mg,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容(0.50 g · L⁻¹),作为母液;精密量取储备溶液 200 μL,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,得 10 mg · L⁻¹ 的溶液,作为内标溶液。

2.3 血浆样品的处理方法 取 2 mL EP 管,加入待测血浆 0.2 mL,精密加入内标溶液 20 μL,加三氯甲烷 1 mL,涡旋 3 min, 3 500 r · min⁻¹ 离心 10 min,取有机层 0.8 mL 于 1.5 mL EP 管中,真空浓缩仪挥干,加入流动相 200 μL,涡旋 60 s,溶解残渣。14 800 r · min⁻¹ 离心 5 min,取 160 μL 上层清液加入进样瓶,LC-MS 进样检测(进样量 10 μL),记录分析结果。

2.4 给药与取样 比格犬 6 只,给药前禁食 12 h,饮水不限。试验之日早晨空腹抽血约 1 mL,作为空白对照。按体重 *iv* 给药生药 1.2 g · kg⁻¹(相当于临床人用剂量,配制方案为生理盐水-原药 1:1 稀释后给药,给药体积 1.2 mL · kg⁻¹),记下各犬给药的准确时间,于给药后 2, 5, 10, 20, 30, 45 min, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12 h 不同时间犬前肢皮下静脉取血 2 mL, 3 500

r · min⁻¹ 离心分离出血浆, -20 °C 冷冻保存。按所建立的血浆样品的处理方法提取,经 LC-MS 法测定各时间点 4 种待测化合物的血浆药物浓度。

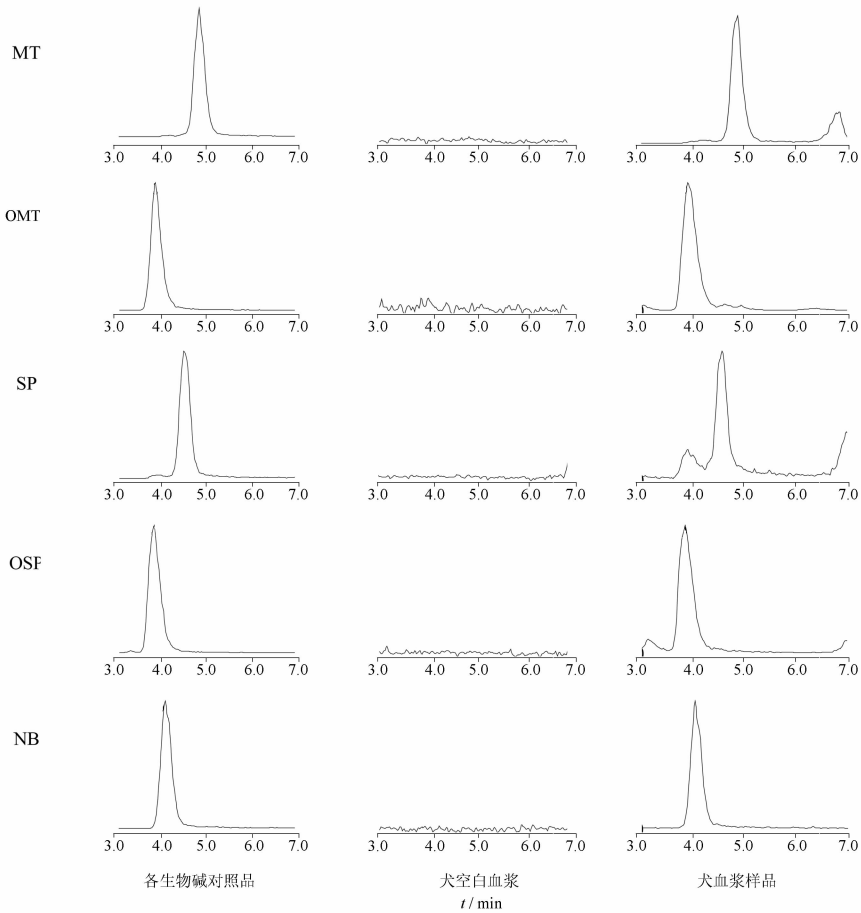
2.5 数据分析 将试验所得血药浓度-时间数据用 DAS 2.0 药动学程序进行处理,即得药动学参数。

3 方法验证

3.1 专属性试验 用上述血样处理方法及检测条件,Beagle 犬空白血浆中内源性物质不干扰样品及内标峰,基线噪音小;苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱以及内标野百合碱的出峰时间分别为 5.13, 4.11, 4.83, 4.06, 4.30 min(图 1)。

3.2 标准曲线制备 取 2 mL EP 管,各加入 Beagle 犬空白血浆 0.2 mL,精密吸取不同量的氧化苦参碱、苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱对照品溶液适量,分别配成苦参碱 10, 20, 100, 200, 1 000, 2 000, 8 000, 16 000 μg · L⁻¹;氧化苦参碱 20, 40, 200, 400, 2 000, 4 000, 20 000, 60 000 μg · L⁻¹;槐果碱 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1 000, 4 000 μg · L⁻¹;氧化槐果碱 20, 40, 200, 400, 2 000, 4 000, 8 000, 16 000 μg · L⁻¹ 的标准浓度系列,按 2.3 项下血样处理方法自“精密加入内标溶液 20 μL”起同法操作分析。以苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱的标准浓度(*C*)为横坐标,苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱与内标的峰面积比值($Y = A_s/A_i$)为纵坐标,按 $1/y^2$ 权重进行线性回归,测得犬血浆的标准曲线,其平均线性回归方程为苦参碱 $Y = 0.003 1C + 0.048 4$ (0.01~2.0 mg · L⁻¹), $Y = 0.002 3C + 1.698 7$ (2.0~16.0 mg · L⁻¹), 氧化苦参碱 $Y = 0.001 C + 0.044 6$ (0.02~4.0 mg · L⁻¹), $Y = 0.000 5C + 2.069 1$ (4.0~60.0 mg · L⁻¹), 槐果碱 $Y = 0.003 8C - 0.06$ (0.01~4.0 mg · L⁻¹), 氧化槐果碱分别为 $Y = 0.001 3C - 0.002 1$ (0.02~0.2 mg · L⁻¹); $Y = 0.000 5C + 0.318$ (0.2~16.0 mg · L⁻¹), *r* 均大于 0.999。

3.3 回收率的测定 取 2 mL EP 管,各加入 Beagle 犬空白血浆 0.2 mL,精密吸取不同量的苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱对照品溶液适量,分别配制低、中、高 3 种不同浓度的血浆样本各 5 份,按照 2.3 项下血浆样品处理方法操作,记录分析结果,计算浓度;另按以上操作不加空白血浆,同步处理对照样品。根据以上测得浓度计算回收率,结果回收率分别大于 96.22%, 90.91%, 95.23%, 91.13%。



MT. 苦参碱; OMT. 氧化苦参碱; SP. 槐果碱; OSP. 氧化槐果碱; NB. 野百合碱(图 2, 表 1 同)。

图 1 犬空白血浆及样品与对照品色谱图

Fig. 1 Chromatograms of blank plasma, the sample and reference standard of Beagle dog

3.4 精密度试验 日内精密度按标准曲线项下操作, 配制低、中、高 3 种不同浓度的血浆样本(苦参碱 20, 1 000, 8 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 氧化苦参碱质量浓度为 40, 2 000, 20 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 槐果碱 20, 200, 1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 氧化槐果碱 40, 2 000, 8 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 加入内标溶液 20 μL , 按血浆样品处理项下操作, LC-MS 分析, 计算样品和内标的峰面积的比值, 代入标准曲线中求算浓度。在同一天内, 每 1 个浓度各做 5 份, 计算相对标准偏差, 结果苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱在 Beagle 犬血浆中日内精密度标准偏差分别小于 1.5%, 2.9%, 3.3%, 2.9%。

日间精密度按日内精密度项下操作, 每天将苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱的低、中、高 3 个浓度的血样各做 1 份, 得到分析结果, 分别做 5 d, 计算相对标准偏差, 结果苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱在 Beagle 犬血浆

中日间精密度标准偏差分别小于 3.8%, 3.2%, 4.6%, 6.4%。

3.5 冻融状态下稳定性考察 取 Beagle 犬空白血浆 1 mL 各 3 份, 分别精密加入不同浓度的氧化苦参碱、苦参碱和槐果碱对照品溶液适量, 配制低、中、高 3 份含药血浆样本(苦参碱 20, 1 000, 8 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 氧化苦参碱 40, 2 000, 20 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 槐果碱 20, 200, 1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 氧化槐果碱 40, 2 000, 8 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 取低、中、高浓度各 0.2 mL 含药血浆, 按血浆处理项下操作, 得到分析结果。剩余含药血浆放入 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 冷冻保存 5, 25 d, 再分别用 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴化冻, 按血浆处理项下操作, 得到分析结果。结果苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱和氧化槐果碱标准偏差分别小于 5.0%, 2.4%, 4.6%, 2.9%, 表明 4 种生物碱在保存和冻融状态下稳定。

3.6 岩舒注射液给药后 4 种生物碱在 Beagle 犬体



内血药浓度时间曲线及药动学参数 Beagle 犬 *iv* 岩舒注射液后不同时间血浆中主要生物碱成分(苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱)的药时曲线显示,4 种生物碱血药浓度随时间变化持续下降,呈典型二相分布(图 2),用 DAS 2.0 软件处理 4 种生物碱的血药浓度数据,经自动拟合 4 种成分均符合二室模型,得到相关药动学参数(表 1)。

4 讨论

在新的中药、天然药物注射剂药理毒理的非临床药代动力学要求中明确提出“多成分制成的注射剂,应对其药代特征进行探索性研究,必要时,尚应研究主要成分之间的相互影响”。岩舒注射液在临

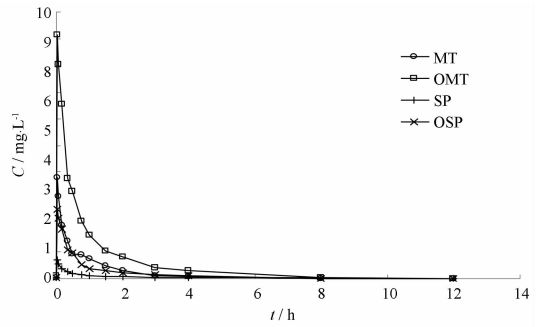


图 2 6 只 Beagle 犬岩舒注射液(1.2 g · kg⁻¹)静注后主要成分的平均血药浓度-时间曲线

Fig. 2 Plasma drug concentration-time curve after *iv* compound matrine injection in 6 dogs

表 1 Beagle 犬岩舒注射液(1.2 g · kg⁻¹)*iv* 后 4 种生物碱药动学参数($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of 4 alkaloids after *iv* Compound matrine injection(1.2 g · kg⁻¹) in dog($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	MT	OMT	SP	OSP
AUC _{0-t} /μg · h · L ⁻¹	1 999.55 ± 587.88	5 483.41 ± 1 203.37	378.30 ± 107.07	1 488.19 ± 376.64
AUC _{0-∞} /μg · h · L ⁻¹	2 159.05 ± 688.99	6 108.54 ± 1 400.20	420.86 ± 123.99	1 761.33 ± 359.13
MRT _{0-t} /h	0.82 ± 0.07	0.80 ± 0.04	0.87 ± 0.05	0.82 ± 0.04
MRT _{0-∞} /h	1.04 ± 0.13	1.20 ± 0.33	1.29 ± 0.14	1.48 ± 0.42
t _{1/2α} /h	0.81 ± 0.10	1.02 ± 0.36	0.94 ± 0.20	1.40 ± 0.57
T _{max} /h	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.00
CL _z /L · h ⁻¹ · kg ⁻¹	10 011.77 ± 2 915.53	3 442.23 ± 894.06	51 027.44 ± 14 746.24	11 740.08 ± 2 280.17
V _z /L · kg ⁻¹	11 490.79 ± 2 628.92	4 925.19 ± 1 502.30	67 985.55 ± 21 674.83	24 093.23 ± 11 721.12
C _{max} /μg · L ⁻¹	3 878.20 ± 887.78	9 151.23 ± 1 995.10	721.52 ± 168.60	2 603.87 ± 571.86

床中广泛用于抗癌治疗^[1],但一直未进行系统的体内过程研究,作者根据注射液中生物碱含量,选择了 4 种生物碱同时检测;根据苦参碱类提取溶剂的有关文献,采用三氯甲烷作为提取溶剂^[2],提取率高,步骤简便;色谱柱试用了 C₁₈ 柱^[2-3],VP-ODS 柱^[4],CN 柱^[5],确定采用 CN 柱,在选定色谱条件下,色谱峰展宽较小,峰形较对称,血浆中其他成分不干扰药物的测定,所需样品量少,满足生物样品的测定要求;内标物选择试用了文献常用的非那雄胺^[2],发现出峰较宽,在所检测生物碱出峰时间恰当时,非那雄胺出峰时间大幅延长,改用野百合碱后,在上述色谱系统中,色谱行为为佳,保留时间适中,在苦参类生物碱的提取条件下提取完全。

岩舒注射液静注后,氧化苦参碱、苦参碱、氧化槐果碱和槐果碱的药时曲线均为单峰,4 种生物碱在 Beagle 犬体内的药动学过程均符合二室开放模型,T_{max} 均为 2 min,C_{max} 与原药液中浓度比例基本相符,但 AUC_{0-∞} 不完全符合,苦参碱和氧化苦参碱、槐

果碱和氧化槐果碱在原药液比例分别为 1:2,1:3,而其 AUC_{0-∞} 比例分别约为 1:3,1:4,结合 MRT_{0-∞} 和 t_{1/2α} 数据分析,苦参碱和槐果碱在血中平均滞留时间和 t_{1/2α} 均分别小于氧化苦参碱和氧化槐果碱,说明氧化苦参碱和氧化槐果碱相对于苦参碱和槐果碱而言可能主要分布于血液,或者代谢相对较慢,理论上还原型生物碱极性小,更容易跨膜转运,在作者前期对该药的组织分布研究也证实了苦参碱和槐果碱相对氧化型生物碱更多的转入组织中^[6];当然,也可能是由于苦参碱、槐果碱的转化引起,具体的原因还需要进行各个单体的犬体内药代动力学比较研究来确定。表观分布容积作为反映药物在体内分布广窄程度的一个重要参数具有重要的意义;结果显示 4 种生物碱表观分布容积为槐果碱 > 氧化槐果碱,苦参碱 > 氧化苦参碱,说明氧化苦参碱和氧化槐果碱主要分布在血液,消除较快。以上参数反应 Beagle 犬岩舒注射液静脉注射后,苦参碱和槐果碱药动学过程相似,而氧化苦参碱和氧化槐果碱较为近似。



[参考文献]

- [1] 李春梅,张宗江,石岩. 复方苦参注射液的临床应用[J]. 疾病监测与控制杂志,2010,4(6):330.
- [2] 王素军,王广基,李晓天,等. 氧化苦参碱在犬体内的药动学[J]. 中国医院药学杂志,2005,25(7):585.
- [3] 尹莉芳,王广基,张陆勇,等. 氧化苦参碱生物黏附缓释片在Beagle犬体内的药动学[J]. 中国药科大学学报,2008,39(6):523.
- [4] 赵晨光,廖丹丹,何小燕,等. 苦参碱肌肉注射给药在大鼠体内的药动学研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(10):1315.
- [5] Wu Xiaoluan, Hang Taijun, Shen Jianping, et al. Determination and pharmacokinetic study of oxymatrine and its metabolite matrine in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. J Pharma Bio Anal, 2006 (41):918.
- [6] 刘继平,黄鑫,薛梅,等. 复方苦参注射液中4种生物碱在大鼠体内组织分布研究[J]. 中药药理与临床,2011,27(4):74.

Pharmacokinetic of four alkaloids of Yanshu injection in Beagle dogs

LIU Jiping^{1,2}, XUE Mei³, HUANG Xin³, WANG Shu³, JIANG Zhenzhou^{3,4*}, ZHANG Luyong^{3,5*}

(1. Department of Pharmacology of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2. Department of Pharmacology, Shanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

3. Jiangsu Center for Drug Screening, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

4. Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance of Ministry of Education, China Pharmaceutical University Nanjing 210009, China;

5. Jiangsu Center for Pharmacodynamics Research and Evaluation, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** For studying the pharmacokinetic of Yanshu injections in Beagle dogs, a sensitive and reproducible LC-MS method for quantitative determination of matrine, oxymatrine, sophocarpine and oxysophocarpine in dog's plasma were developed and validated using monocrotaline as an internal standard after *iv* of Yanshu injections (Sophorae Flavescentis Radix and Heterosmilacis Japonicae Rhizoma). **Method:** The separation of plasma samples was performed on a CN column by isocratic elution with methanol-10 mmol · L⁻¹ NH₄Ac-0.02% HCOOH-H₂O 90:10 as the mobile phase. The plasma concentration of four kinds of alkaloids were calculated in dog plasma by detection of healthy dogs given Yanshu injection fluid after in twelve hours of plasma samples. All data of concentration-time of four kinds of alkaloids were treated with pharmacokinetics program DAS 2.0. **Result:** MT, OMT, SP and OSP have a good linear relationship in 0.01-16.0, 0.02-60.0, 0.01-4.0, 0.02-16.0 mg · L⁻¹, respectively. The average recoveries were more than 90% and the RSD of precision and stability of the test were less than 6.4% *iv* 1.2 g · kg⁻¹ Yanshu injection, four kinds of alkaloids in rats meet the two-compartment open pharmacokinetic model, C_{max} and the concentration of the original liquid in the proportion of the basic line, the AUC_{0-∞} of matrine and oxymatrine, sophocarpine and oxysophocarpine compared to the original both in the proportion of liquid increases, the MRT_{0-∞} and $t_{1/2z}$ of matrine and sophocarpine were less than oxymatrine and oxysophocarpine; four kinds of alkaloids apparent volume of distribution matrine > oxymatrine, sophocarpine > oxysophocarpine. **Conclusion:** A method with high recovery rate and good stability was established to determine the blood concentration of MT, OMT, SP, OSP in Yanshu injection and applied in its pharmacokinetics successfully.

[Key words] Yanshu injection; LC-MS; pharmacokinetic

doi:10.4268/cjcm20121232

[责任编辑 陈玲]