

夏天无提取物在小鼠体内药动学研究

孙勇兵¹, 傅国强², 王琦¹, 李志峰^{1*}

1. 江西中医药大学 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

2. 江西中医药大学 科技学院, 江西 南昌 330025

摘要: **目的** 建立测定阿片碱在小鼠血浆中浓度的 LC-MS/MS 方法, 并将该方法用于夏天无提取物在小鼠体内的药动学研究。**方法** 采用 LC-MS/MS 法。色谱条件采用安捷伦 Zorbax C₁₈ 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为甲醇-水 (含 0.1% 甲酸), 梯度洗脱; 体积流量: 0.2 mL/min; 柱温: 35 °C; 进样量: 5 μL。质谱条件采用离子源: ESI 源, 正离子检测, 高纯氮气用作干燥气 (15 L/min) 和气帘气 (50 L/min), 气体温度 340 °C; 以多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 为扫描模式。采用回归方程计算小鼠血浆中阿片碱。小鼠 ig 给予夏天无提取物的羧甲基纤维素钠混悬液, 制备血药质量浓度-时间曲线, 计算药动学参数。**结果** 阿片碱在 0.4~200.0 ng/mL 线性关系良好, 精密度 RSD 均小于 15%, 准确度在 ±15% 以内, 提取回收率在 90% 以上, 基质效应在 90%~110%。药动学参数最大血药浓度 (C_{max}) 和达峰时间 (t_{max}) 分别为 134.6 ng/m、1.5 h。**结论** 该方法适合小鼠 ig 夏天无提取物后阿片碱在小鼠体内的药动学研究。

关键词: 夏天无; 阿片碱; 小鼠; 药动学; LC-MS/MS

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2014)10-1096-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.10.005

In vivo pharmacokinetics of *Corydalis Decumbentis Rhizoma* extract in mice

SUN Yong-bing¹, FU Guo-qiang², WANG Qi¹, LI Zhi-feng¹

1. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

2. College of Science and Technology, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330025, China

Abstract: Objective To establish an LC-MS/MS method for the determination of protopine in plasma of mice and apply to *in vivo* pharmacokinetics study of *Corydalis Decumbentis Rhizoma* extract in mice. **Methods** LC-MS/MS method was performed. The HPLC analysis was carried out on an Agilent Zorbax C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm). The mobile phase was methanol-water (0.1% formic acid water solution) with gradient elution. The column temperature was 35 °C with injection volume of 5 μL at a flow rate of 0.2 mL/min. MS conditions were that a triple-quadrupole mass spectrometry equipped with electrospray ionization (ESI) source for positive ion detection and multiple reaction monitoring (MRM) were applied. Dry gas (15 L/min) and air curtain gas (50 L/min) were used as high purity N₂ with temperature 340 °C. The contents of protopine in in plasma samples of mice were determined with regression equation of standard curves. The blood concentration-time curve was investigated after ig administration of *Corydalis Decumbentis Rhizoma* extract suspension prepared with sodium carboxymethyl cellulose to mice, then the pharmacokinetic parameters were calculated. **Results** The method was linear over the concentration ranges of 0.4–200 ng/mL for protopine. The RSD values of intra-day and inter-day were less than 15%, the relative error (RE) were all within 15%, and the extract recovery was above 90%. The matrix effects were between 90% and 110%. The parameters of pharmacokinetics were C_{max} 134.6 ng/m, and t_{max} 1.5 h. **Conclusion** The method is suitable to *in vivo* pharmacokinetic study of protopine in mice after ig administered *Corydalis Decumbentis Rhizoma* extract.

Key words: *Corydalis Decumbentis Rhizoma*; protopine; mice; pharmacokinetics; LC-MS/MS

收稿日期: 2014-07-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81360485); 江西省博士后科研择优资助项目 (赣人社[2012]195 号); 江西中医药大学校级课题 (ZX1002)

作者简介: 孙勇兵 (1980—), 男, 安徽人, 讲师, 药剂学博士, 从事药物新剂型和药物动力学研究。Tel: (0791) 87119652 E-mail: yongbing_sun@hotmail.com

*通信作者 李志峰 (1976—), 男, 黑龙江人, 副教授, 药物化学博士, 从事中药化学的研究。Tel: (0791) 87119623 E-mail: wangqilizhifeng@126.com

夏天无是罂粟科植物伏生紫堇 *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. 的干燥块茎, 春季或初夏出苗后采挖, 除去茎、叶及须根, 洗净干燥后使用, 具有舒筋活络、活血止痛的功能^[1-5]。本课题组提取了夏天无中总生物碱成分, 拟开发中药五类新药。为了支持新药研究, 本实验以夏天无提取物中含量最高的阿片碱为指标成分, 建立小鼠血浆中阿片碱的 LC-MS/MS 测定方法^[6-7], 并将该方法应用于夏天无提取物在小鼠体内的药动学研究。

1 材料和仪器

安捷伦 1290 型超高效液相、6460 型四极杆串联质谱仪、MasshunterTM 2.0 数据处理软件(美国安捷伦公司), LD5—2A 型离心机(北京医用离心机厂), 涡旋振荡器(德国 IKA 公司)。

阿片碱对照品(批号 110853-201003)、对乙酰氨基酚(批号 100018-200408)对照品均购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈(色谱级, 美国 Fisher 公司), 甲酸(色谱级, Sigma 公司)。夏天无提取物由中药固体制剂制造技术国家工程研究中心制备, 含阿片碱 3.5%。

昆明种小鼠体重质量 18~25 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号 SCXK(湘)2011-0003。

2 方法和结果

2.1 血浆样品的处理

取血浆样品 40 μ L, 加入内标工作溶液(50 ng/mL 对乙酰氨基酚水溶液) 20 μ L 和甲醇 40 μ L, 加 1 mol/L 盐酸溶液 10 μ L 和甲醇 100 μ L, 涡旋 5 min 后, 15 000 r/min 离心, 取上清液 80 μ L, 加入水 30 μ L, 混合后取 5 μ L, 即得。

2.2 测定条件

2.2.1 色谱条件 安捷伦 Zorbax C₁₈ 色谱柱(50 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m); 流动相为甲醇(A) - 水(含 0.1%甲酸, B), 梯度洗脱: 0 min (10%A), 2.5 min (85%A), 4.5 min (10%A), 5.5 min (10%A); 体积流量: 0.2 mL/min; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 进样量: 5 μ L。

2.2.2 质谱条件 离子源: ESI 源, 正离子检测, 高纯氮气用作干燥气(15 L/min)和气帘气(50 L/min), 气体温度 340 $^{\circ}$ C。以多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)为扫描模式, 用于定量反应的离子分别是 m/z 354 \rightarrow 189(阿片碱, 碰撞

电压是 32 V), m/z 152 \rightarrow 110(对乙酰氨基酚, 碰撞电压是 20 V)。

2.3 专属性试验

分别取小鼠空白血浆 40 μ L, 除不加内标外(补加相应体积的水), 其余按照血浆样品的处理项下方法操作, 进行 LC-MS/MS 分析, 得空白血浆色谱图。将标准曲线的最低点和内标加入到空白血浆中, 以及取小鼠给药后的血浆 40 μ L, 按照血浆样品的处理项下方法操作, 得色谱图, 见图 1。可知, 空白血浆中内源性物质不干扰阿片碱和内标的测定。

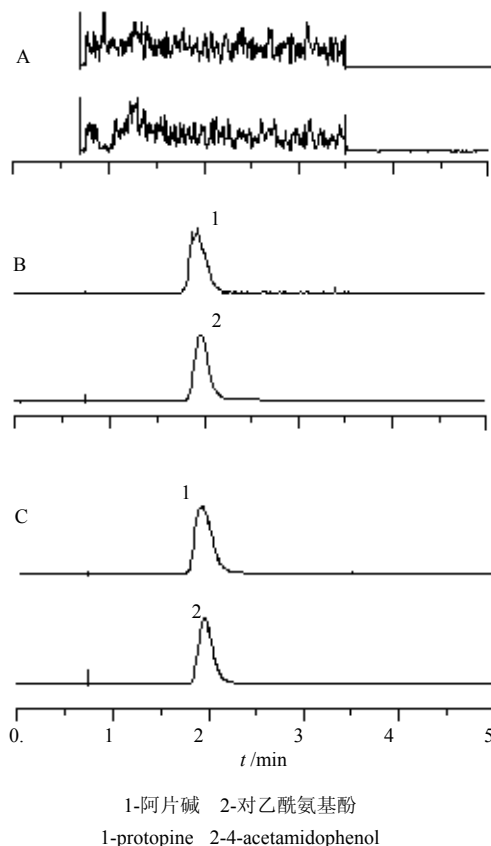


图 1 空白血浆(A)、加 0.4 ng/mL 阿片碱和 50.0 ng/mL 内标对乙酰氨基酚的小鼠血浆(B)以及小鼠给药 22 mg/kg 夏天无提取物 30 min 后的血浆样品

Fig. 1 MRM chromatograms of blank plasma (A), blank plasma spiked with 0.4 ng/mL protopine and 50.0 ng/mL internal standard acetamidophenol (B), and plasma sample at 30 min after ig 22 mg/kg of *Corydalis Decumbentis Rhizoma* extract (C) of mice

2.4 标准曲线的制备

取阿片碱对照品约 10.0 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成 400 μ g/mL 的储备液 I。稀释储备液 I, 制备 10 μ g/mL 阿片碱对照品储备液 II。将储备液 II 逐级稀释, 制备 0.4、0.8、2.0、10.0、50.0、100.0、200.0 ng/mL

系列阿片碱对照品溶液。取对乙酰氨基酚对照品 10.0 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 用水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成 400.0 $\mu\text{g/mL}$ 储备液。取该储备液适量, 用水稀释成 50.0 ng/mL 内标工作溶液。取空白血浆 40 μL , 分别加入系列阿片碱对照品溶液 40 μL , 按照血浆样品的处理项下方法操作, 每一个质量浓度进行双样本分析, 记录色谱图, 连续记录 3 d。以待测物质量浓度为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标, 用加权最小二乘法进行回归运算, 得回归方程 $Y=0.0091 X-0.045 62$, $r=0.997 6$, 线性范围 0.4~200.0 ng/mL, 阿片碱的最低定量限为 0.4 ng/mL。

2.5 精密度和准确度试验

将储备液 II 稀释, 制备低、中、高质量浓度的质量控制 (quality control, QC) 溶液, 质量浓度分别是 0.8、100.0、160.0 ng/mL。所有溶液置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。取空白血浆 40 μL , 将 40 μL 的甲醇换成相应体积的 QC 样品 (0.8、100.0、160.0 ng/mL 阿片碱对照品溶液), 其余按照血浆样品的处理项下方法操作, 6 样品平行分析, 每天测定 1 次, 连续测定 3 d, 并与标准曲线同时进行, 计算 QC 样品的测得浓度。以测得值和真实值的比值计算准确度。结果见表 1。精密度、准确度均在 $\pm 15\%$, 符合测定的要求。

表 1 精密度和准确度试验结果

Table 1 Results of precision and accuracy tests

加入浓度/(ng·mL ⁻¹)	测得浓度/(ng·mL ⁻¹)	日内 RSD/%	日间 RSD/%	准确度/%
0.8	0.86	7.2	7.6	7.5
100.0	109.50	5.7	9.6	9.5
160.0	178.10	6.4	7.2	11.3

2.6 提取回收率试验

取空白血浆 40 μL , 将 40 μL 的甲醇换成相应体积的 QC 样品 (0.8、160.0 ng/mL 阿片碱对照品溶液), 其余按照血浆样品的处理项下方法操作, 制备低、高质量浓度的 QC 血浆样品, 6 样本平行分析, 测得峰面积 (A_1); 另取空白血浆 40 μL , 按照血浆样品的处理项下方法操作, 残留物用阿片碱 QC 样品的溶液溶解, 制成的样品质量浓度分别是阿片碱 (0.8、160.0 ng/mL) 进样分析, 测得峰面积是 (A_2)。以每一个质量浓度正常提取样品所得的峰面积 (A_1), 与未提取样品峰面积 (A_2) 均值的比值计算提取回收率。内标按照同样的方法测定回收率。结果阿片碱和内标的提取回收率分别是 93.4%、90.3%。

2.7 基质效应

分别取阿片碱 0.8、160.0 ng/mL 的 QC 样品, 进样分析, 记录峰面积 (A_3)。与 2.6 项下制备的血浆样品的峰面积 (A_2) 进行比较, 以同一个质量浓度血浆基质样品的峰面积 A_2 和无基质样品的峰面积 A_3 的比值计算基质效应。内标按照同样的方法测定。结果阿片碱和内标的平均基质效应分别是 108.5%、102.1%、106.4%。

2.8 稳定性试验

分别考察处理后的血浆样品 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h 的稳定性, 血浆样品在 3 个冻融循环 (-40~22 $^{\circ}\text{C}$), 以及长期稳定性 (-40 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 d) 和室温放置 2 h 的稳定性, 结果见表 2。结果表明样品在上述条件下稳定。

表 2 小鼠血浆中阿片碱在不同条件下的稳定性

Table 2 Stability of protopine in plasma of mice under different conditions

加入浓度/ (ng·mL ⁻¹)	4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h		3 个冻融循环		长期稳定性		室温放置 2 h	
	测得浓度/ (ng·mL ⁻¹)	RSD/%	测得浓度/ (ng·mL ⁻¹)	RSD/%	测得浓度/ (ng·mL ⁻¹)	RSD/%	测得浓度/ (ng·mL ⁻¹)	RSD/%
0.8	0.87	8.4	0.72	10.3	0.73	8.2	0.85	11.2
100.0	107.20	8.3	105.30	8.4	106.80	7.1	91.30	8.4
160.0	173.10	5.9	173.10	7.9	169.80	5.7	169.20	5.9

2.9 药动学参数的测定

昆明种小鼠禁食给水过夜, ig 给予夏天无提取物的羧甲基纤维素钠混悬液, 给药剂量以夏天无生物碱计 22 mg/kg, 在 5.0、10.0、15.0、30.0 min 以及 1、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、12.0、24.0 h 眼眶取血 0.2 mL, 每个时间点平行 4 只小鼠, 放置在涂有肝素的离心管中, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上层血浆。按照血浆样品的处理项下方法操作, 同时制备阿片碱低、中、高质量浓度的 QC 样品(0.8、160.0 ng/mL 阿片碱对照品溶液), 每一个质量浓度进行双样本分析。以当日的回归方程计算 QC 样品及各时间点样品中阿片碱的质量浓度, 血药质量浓度 - 时间曲线见图 2。

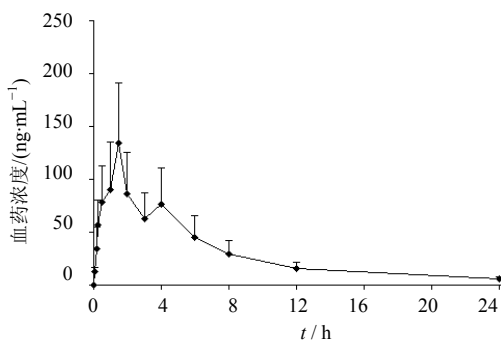


图 2 小鼠 ig 给予夏天无提取物体内阿片碱的血药浓度 - 时间曲线

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curve of protopine in mice after ig administered with *Corydalis Decumbentis Rhizoma* extracts

药动学数据采用 DAS 2.0 软件处理。夏天无提取物中阿片碱在小鼠体内的最大血药浓度 (C_{max}) 和达峰时间 (t_{max}) 由实测值得出。血药浓度 - 时间曲线末四点作半对数图, 以 $\lg C - t$ 按最小二乘法进行线性回归, 所得斜率的绝对值为消除速率常数 (k_e), 消除半衰期 ($t_{1/2}$) 为 $\ln 2/k_e$ 。药时曲线下面积 ($AUC_{0-\infty}$) 由梯形法计算。药动学参数分别为: t_{max} 为 1.5 h, C_{max} 为 134.6 ng/mL, AUC_{0-t} 为 732.5 ng·h/mL, $t_{1/2}$ 为 6.1 h, Vd 为 43.2 L/kg, CL 为 13.6

L/(kg·h)。

3 讨论

本研究建立了超高效液相串联质谱法测定阿片碱在生物样品中浓度的方法, 该方法灵敏度高, 操作简便, 可确保阿片碱在体内低浓度生物样品检测的准确性和可靠性。

本课题组对夏天无提取物的药理实验选取小鼠, 因此为了建立药理和药动学的相关性, 本研究考察了该提取物在小鼠体内的药动学, 有力地支持了夏天无提取物五类新药的开发。

阿片碱的药动学呈现出双峰现象, 可能是药物在血浆和组织的重新分布, 药物的重吸收和肝肠循环, 与文献报道^[6-7]一致。

参考文献

- [1] 中国药科大学. 中药辞海 [M]. 第 2 卷. 北京: 中国医药科技出版社, 1996: 2019.
- [2] Wang P X, Li Y H, Li Y J, *et al.* Determination of protopine in rat brain tissues by RRLC-ESI/Q-TOF-MS method [J]. *Chin Herb Med*, 2014, 6(2): 125-130.
- [3] 姚丽梅, 刘 瑶, 段 启. 注射用夏天无总碱对大鼠局灶性脑缺血的影响 [J]. *中成药*, 2011, 33(5): 872-874.
- [4] 姚丽梅, 段 启. 注射用夏天无总碱对沙鼠全脑缺血再灌注损伤的影响 [J]. *中草药*, 2010, 41(8): 1342-1344.
- [5] 周巧霞, 顾振纶. 夏天无的实验研究和临床应用进展 [J]. *中国野生植物资源*, 2004, 23(3): 4-10.
- [6] Ma H, Wang Y, Guo T, *et al.* Simultaneous determination of tetrahydropalmatine, protopine, and palmatine in rat plasma by LC-ESI-MS and its application to a pharmacokinetic study [J]. *J Pharm Biomed. Anal*, 2009, 49(2) 440-446.
- [7] Deng Y, Liao Q, Xie Z, *et al.* Simultaneous determination of berberine, palmatine and jatrorrhizine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in rat plasma and its application in a pharmacokinetic study after oral administration of coptis-evodia herb couple [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 863(2): 195-205.