

马蔺子甲素和乙素的生物分析方法研究

国家医药管理局天津药物研究院(300193)

刘昌孝* 李全胜 高连用

摘 要 建立了用 HPLC 法测定生物样品中马蔺子甲素和乙素的方法。以反相 C_{18} 柱,乙腈-水(97:3)为流动相,紫外 270 nm 检测,内标物为盐酸氟桂嗪。检测灵敏度为 5 ng/mL,回收率达 75% 以上,在 10 ng/mL~1 000 ng/mL 浓度范围内具有良好的线性关系和重现性。体外和体内试验证明该测定方法能满足生物样品测定的要求。

关键词 马蔺子 马蔺子甲素 马蔺子乙素 生物分析 HPLC

中药马蔺子为鸢尾科植物马蔺 *Iris pallasii* var. *chinensis* (Fisch) Koidz 的成熟种子。《神农本草经》记载为药性甘平无毒的中药。马蔺子中含有的马蔺子甲素(irisquinone A)和马蔺子乙素(irisquinone B)是其重要植物化学成分,由于两者含量的差异,主要为马蔺子甲素。它们为新型醌类结构的化合物。经系统药理研究,证明马蔺子素具有显著的放射增敏作用和抗癌作用,又无骨髓抑制的副作用^[1~3]。由于为新型结构的化合物,其动物和人体的药物动力学研究至今均未见报道,为研究其药物动力学,观察药物在体内变化,我们进行了体内药物浓度测定方法研究,对马蔺子甲素和乙素生物分析方法进行了实验研究。

1 材料和仪器

1.1 试验药物:马蔺子甲素和马蔺子乙素对照品由山东新华制药股份有限公司提供,含量 95%。内标物为盐酸氟桂嗪,含量 99%。

1.2 试剂:乙腈,色谱纯;甲醇,优级纯;其余试剂均为分析纯。超纯水,本研究室自制。

1.3 仪器:高效液相色谱仪,日本岛津 LC-6A 高效液相色谱仪,包括紫外检测器、柱温控制器、自动进样器、色谱数据处理器和中央控制单元。纯水器,Mill-Q I 型纯水器,日本 Millipore 公司产品。医用离心机,LD5-2A

型。混合器,KH-851 型,高速组织匀浆器,XHF-1 型。

1.4 动物:Wistar 大鼠,雌雄兼用,体重 150 g 左右,天津药物研究院动物室提供。

2 方法和结果

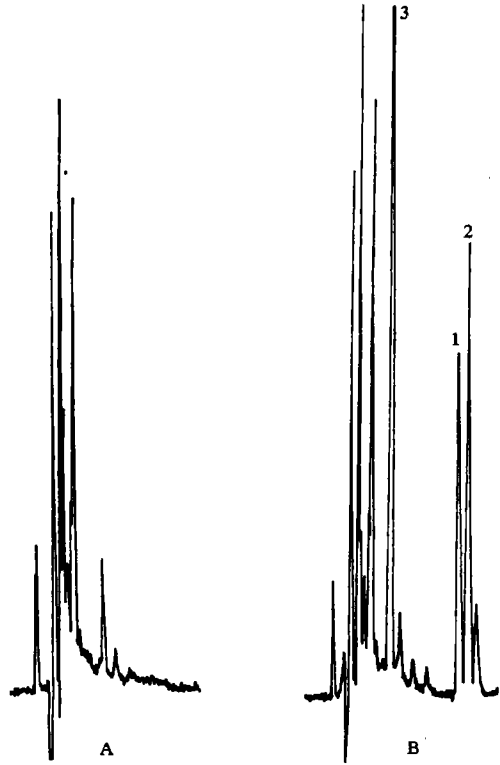
2.1 生物分析方法的建立和确证

2.1.1 HPLC 条件:色谱柱 C_{18} , 250 mm × 4.6 mm, 10 μ m, 柱温 38℃;流动相为乙腈-水(97:3);流速 0.7 mL/min;检测波长 270 nm;内标物为 50 μ g/mL 盐酸氟桂嗪甲醇溶液。在此条件下,马蔺子甲素、马蔺子乙素和内标物的保留时间分别为 14.3、15.2 和 7.9 min;色谱图见图 1。血清中内源性物质不影响它们的分离。

2.1.2 标准曲线的制备:称取一定量的马蔺子甲素和乙素,分别用甲醇溶解,各吸取相当于马蔺子甲素和乙素分别为 10、25、50、100、200、500 和 1 000 ng,置于试管内,加内标物溶液 50 μ L,在氮气下挥干溶剂,残留物用 250 μ L 流动相振荡溶解,进样 50 μ L 进行色谱分析,以峰面积比与浓度进行回归,得到标准曲线方程,马蔺子甲素: $Y_a = 0.00305 + 0.0009511X$, $r = 0.9990$ ($n = 7$);马蔺子乙素: $Y_b = 0.001572 + 0.0009573X$, $r = 0.9997$ ($n = 7$)。结果显示浓度与峰面积比具有良好的线性关系。

* Address: Liu Changxiao, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin

2.1.3 校正曲线:称取一定量的马蔺子甲素和乙素,分别用甲醇溶解,各吸取相当于马蔺子甲素和乙素分别为 10、25、50、100、200、500 和 1 000 ng,置于试管内,加内标物溶液 50 μ L,在氮气下挥干溶剂,各加入大鼠血清 1 mL,混合有机溶剂(正己烷-异丙醇=95:5)5 mL 混合,振荡,离心,吸取有机相 4 mL,在氮气下挥干溶剂,残留物用 200 μ L 流动相振荡溶解,进样 50 μ L 进行色谱分析,以峰面积比与浓度进行回归,得到校正曲线方程,马蔺子甲素: $Y_a = -0.004862 + 0.0005663X, r = 0.9997 (n = 7)$; 马蔺子乙素: $Y_b = -0.009082 + 0.0007688X, r = 0.9980 (n = 7)$ 。结果显示浓度与峰面积比具有良好的线性关系。



A-空白血浆 B-含马蔺子甲素、乙素及内标的血浆
1-马蔺子甲素($t_R=14.3$) 2-马蔺子乙素($t_R=15.2$)
3-内标($t_R=7.9$)

图1 测定马蔺子素原型药色谱图

2.1.4 回收率:用 25、200 和 1 000 ng/mL 3 种浓度的马蔺子甲素和乙素进行回收率试

验,以未经血清处理的标准液和从血清中提取分离的样品在已确定的分析条件下进行定量分析,计算回收率,马蔺子甲素平均回收率(%): 76.0 ± 4.0 ; 马蔺子乙素平均回收率(%): 82.3 ± 10.6 。由此可见,在 25 ng/mL~1 000 ng/mL 浓度范围内,其平均回收率在 75%以上。

2.1.5 精密度和灵敏度试验:以 25、200 和 1 000 ng/mL 3 种浓度,按校正曲线制备方法,从血清中提取药物,每一浓度制备 5 份样品,用每一浓度测定的均值和标准差计算出相对误差(RSD%),考察当日和间日测定的精密度和重现性。结果如表 1 所示。本法测定的灵敏度为 5 ng/mL。经测定精密度和灵敏度考察表明本法符合生物样品测定的要求。

表1 日内和日间测定的精密度和重现性

浓度 (ng/mL)	马蔺子甲素		马蔺子乙素	
	日内 RSD(%)	日间 RSD(%)	日内 RSD(%)	日间 RSD(%)
25	18.4	20.2	10.5	14.3
200	9.4	7.3	5.5	8.5
1000	1.8	3.9	0.9	3.5

2.2 应用

2.2.1 体外转化试验:取大鼠新鲜血清及 20%肝匀浆 1 mL,加入马蔺子甲素和乙素对照液,制成 1 000 ng/mL 的样品,各 5 份样品,于 37℃ 环境下温浴,分别于 0、10、20、30、60 min 取样测定原型药物的浓度,测定方法为采样 1 mL,加内标物溶液 50 μ L,混合有机溶剂(正己烷-异丙醇=95:5)5 mL,混合,振荡离心,吸取有机相 4 mL,在氮气下挥干溶剂,残留物用 200 μ L 流动相振荡溶解,进样 50 μ L 进行色谱分析,测定原型药物浓度,结果见表 2。可见马蔺子甲素和乙素在血清中的转化快于肝匀浆中的转化。

2.2.2 体内血药浓度测定:大鼠 ig 800 mg/kg 马蔺子素(含马蔺子甲素 86%,乙素 14%),于给药后 0、5、15、30、60、120、180 和 240 min 采血,分离出血清,测定其血药浓度。测定程序为:取大鼠血清 1 mL,混合有机

溶剂(正己烷-异丙醇=95:5)5 mL 混合,振荡,离心,吸取有机相 4 mL,在氮气下挥干溶剂,残留物用 200 μ L 流动相振摇溶解,进样 50 μ L 进行色谱分析,用校正曲线计算其血药浓度,结果见表 3。可见给药后血药浓度很低,而且测不出马蔺子乙素。

表 2 体外转化试验

时间(min)	0	10	20	30	60
20%肝匀浆					
马蔺子甲素					
浓度(ng/mL)	1 000	794	803	598	598
含量(%)	100.0	79.4	80.3	59.8	59.8
转化率(%)	0	20.6	19.7	40.2	40.2
马蔺子乙素					
浓度(ng/mL)	1 000	719	801	721	432
含量(%)	100.0	71.9	80.1	72.1	43.2
转化率(%)	0	28.1	19.9	27.9	56.8
血清					
马蔺子甲素					
浓度(ng/mL)	1 000	477	243	185	163
含量(%)	100.0	47.7	24.3	18.5	16.3
转化率(%)	0	52.3	75.7	81.5	83.7
马蔺子乙素					
浓度(ng/mL)	1 000	377	197	156	150
含量(%)	100.0	37.7	19.7	15.6	15.0
转化率(%)	0	62.3	80.3	84.4	85.0

3 讨论

马蔺子甲素和乙素是马蔺子的有效化学成分,由于其为醌类结构化合物,在体外和体内均具有不稳定的特点,在分析处理过程中

易变化,在体内也易代谢,因此给生物分析带来困难。一是要求测定方法具有稳定性,二是要求测定体内的药物的灵敏度必须达到 ng/mL 的水平,为此样品处理过程必须在避光条件下完成,生物提取样品尽可能富集后测定,以达到应有的灵敏度。

表 3 大鼠 ig 给药后的马蔺子甲素浓度(ng/mL)

t (min)	动物编号					$\bar{x} \pm s$
	1	2	3	4	5	
5	12.8	14.9	10.6	—	12.8	12.8 $\pm$ 1.8
15	19.9	49.5	38.4	47.7	28.2	40.0 $\pm$ 12.0
30	28.0	17.1	38.4	45.5	28.2	31.4 $\pm$ 10.9
60	20.1	22.5	9.3	33.2	23.5	21.7 $\pm$ 8.6
120	14.1	14.3	16.0	19.3	17.3	16.2 $\pm$ 2.2
180	19.5	16.9	14.4	15.5	10.8	15.4 $\pm$ 3.2
240	13.2	10.9	6.9	3.0	10.8	9.0 $\pm$ 4.0

通过分析测定条件的比较研究,获得较理想的 HPLC 条件,经过方法学验证,体外转化试验和给药后的血药浓度测定证明所拟定的试验条件能满足体内药物分析的基本要求,在此基础上完成了马蔺子甲素的动物药物动力学研究、吸收分布排泄、代谢和蛋白结合试验,这部分研究将另文报告。

参考文献

1 江纪武,等. 植物药有效成分手册. 北京:人民卫生出版社,1986:613
2 李德华. 中国肿瘤临床,1997;(3):4
3 张 力,等. 中国肿瘤临床,1997;(3):13

(1998-03-31 收稿)

Studies on the Determination of Irisquinone A and B in Biological Samples

Liu Changxio, Li Quansheng, Gao Lianyong (Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, State Pharmaceutical Administration of China, Tianjin 300193)

Abstract An HPLC method is used to determine concentrations of irisquinone A and B in biological samples. Before analysis, the biological samples are extracted by organic solvent (n-hexane: isopropanol = 95 : 5) transferred, evaporated and resoluted. They can be separated on reverse phase column (C₁₈) with acetonitrile-water (93 : 7) as mobile phase with a flow rate of 1.0 mL/min and detected at ultraviolet wave length of 270nm. The retention times of irisquinone A, B and internal standard (cinnarizine) are 14.3, 15.2 and 7.9 min, respectively. The measurements are linear over a wide concentration range (10 ng/mL ~ 1000 ng/mL), and with good precision. The method affords the sensitivity of 5 ng/mL, and the extraction recovery is 76% and 82.3% for irisquinone A and B, respectively.

Key Words *Iris pallasii* var. *Chinensis* Irisquinone A Irisquinone B bio-analysis HPLC