

人血浆中钩吻素甲和钩吻素子 HPLC-UV 测定

丘宏强¹, 程 昱¹, 刘茂柏¹, 许 盈², 俞昌喜^{2*}

1. 福建医科大学附属协和医院 药学部, 福建 福州 350001

2. 福建医科大学药学院, 福建 福州 350001

摘 要: 目的 建立 HPLC 法测定人血浆中钩吻素甲 (GM) 和钩吻素子 (KM) 的浓度。方法 用 Waters HLB-SPE 固相萃取小柱提取人血浆中 GM 及 KM。色谱柱为 Shim-Pack C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水-二正丁胺 (58 : 42 : 0.01); 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 50 μL; 柱温 30 ℃; 检测波长 263 nm。结果 GM 和 KM 在 0.05~20 μg/mL 线性关系良好, 最低定量限为 50 ng/mL (S/N≥10), GM 和 KM 的平均提取回收率分别为 90.88%、87.84%, 平均方法回收率分别为 98.65%、96.31%, 平均日间精密度 RSD 分别为 9.81%、10.63%, 平均日内精密度 RSD 分别为 7.79%、8.24%。含 GM 和 KM 的人血浆在室温 25 ℃避光的条件下保存 12 h、在 4 ℃冰箱保存 2 d、在 -20 ℃冰箱保存 15 d、-20 ℃冰箱反复冻融 3 次的条件下, 低、中、高 3 个质量浓度 (0.05、5.0、20 μg/mL) 的 GM 和 KM 回收率均在 90% 以上。结论 建立的人血浆中 GM 和 KM 的 HPLC 测定方法灵敏度高、血浆用量少、操作简便、结果准确可靠, 适用于钩吻制剂药动学研究和钩吻中毒时定性和定量分析。

关键词: 钩吻; 钩吻素甲; 钩吻素子; 固相萃取; HPLC; 中毒

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)13-2324-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.13.020

Determination of gelsemine and koumine in human plasma by HPLC-UV

QIU Hong-qiang¹, CHENG Yu¹, LIU Mao-bai¹, XU Ying², YU Chang-xi²

1. Department of Pharmacy, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China

2. College of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China

Abstract: **Objective** To establish the methods for determination of gelsemine (GM) and koumine (KM) in human plasma. **Methods** GM and KM in human plasma were extracted by SPE tubes and determined by HPLC-UV. The chromatographic conditions were as following: The column was Shim-Pack C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); The mobile phase consisted of methanol, water, and dibutylamine (58 : 42 : 0.01); The flow rate was 1.0 mL/min; The injection volume was 50 μL; Column temperature was 30 ℃; Detective wavelength was set at 263 nm. **Results** GM and KM were in good linearity in 0.05—20 μg/mL ($n = 6$, $r = 0.999\ 4$) and 0.05—20 μg/mL ($n = 6$, $r = 0.999\ 5$), respectively. The limits of detection for GM and KM were both 50 ng/mL ($S/N \geq 10$), respectively. The average recoveries of extraction for GM and KM were 90.88% and 87.84%, respectively. The average recoveries of method for GM and KM were 98.65% and 96.31%, respectively. Average inter-day RSD values for GM and KM were 9.81% and 10.63% as well as 7.79% and 8.24% in intra-day RSD, respectively. **Conclusion** The established method for the determination of GM and KM in human plasma by SPE is sensitive, simple, accurate, reliable, and suitable for pharmacokinetics and toxicity study on *Gelsemii Elegantis* Herba.

Key words: *Gelsemii Elegantis* Herba; gelsemine; koumine; solid phase extraction; HPLC; intoxication

有毒中药钩吻 *Gelsemii Elegantis* Herba 为马钱 (Loganiaceae) 科植物胡蔓藤 *Gelsemium elegans* (Gardn. et Champ.) Benth. 的全草, 共有 3 个种, 包括中国钩吻 1 种和北美钩吻 2 种^[1]。中国钩吻盛产

于闽、浙、桂等地, 在民间可用来治疗疼痛、炎症和肿瘤等, 具有药用价值。但钩吻是一种毒性植物, 民间俗称“断肠草”“大茶药”, 民间也常见误食或药食钩吻中毒事件报道。钩吻中毒事件时有发生,

收稿日期: 2016-01-08

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2014J01417)

作者简介: 丘宏强 (1978—), 男, 药理学博士, 副主任药师, 研究方向为临床药学。Tel: (0591)83357896-8917 E-mail: honjohn@126.com

*通信作者 俞昌喜 (1963—), 男, 药学博士, 博士生导师, 教授, 研究方向为神经药理学。Tel: (0591)22862587 E-mail: changxiyu@mail.fjmu.edu.cn

主要是误食或被下毒。钩吻中毒尚无特效的解毒剂,中毒后处理原则立即给予催吐、洗胃、导泻,可用活性炭洗胃,血透。然后对症治疗,如给予新斯的明或阿托品^[2]。此外,《本草纲目》记载,人误食断肠草的叶子会致死,而羊食其叶则大肥。猪羊食其叶不但无毒,还会使毛色光润,有增肥和防瘟之效。《广西中药志》也记载:“当猪胃纳不良时,用钩吻(断肠草)饲喂,能增加食欲”。说明钩吻体内药效和代谢存在种属差异性。有报道采用液相色谱-质谱联用对大鼠血浆中钩吻生物碱进行检测^[3],但设备昂贵不易普及;钩吻生物碱人体内的代谢及动力学研究尚未见报道。目前从钩吻中分离出的生物碱多达 49 种,钩吻素子(koumine, KM)和钩吻素甲(gelsemine, GM)为中国钩吻中量最多的 2 种单体成分,因此测定人体液或组织中钩吻素甲和钩吻素子浓度有助于人钩吻中毒鉴定、解救方案的制定,也为钩吻的种属差异性研究提供方法学基础。本研究拟建立人血浆中 KM 和 GM 的 HPLC 测定方法,为钩吻生物碱人体药物临床研究及中毒解救提供参考。

1 材料与试剂

1.1 药品

KM 和 GM,为本课题组从钩吻中分离纯化得到,质量分数达 99%以上^[4];奥卡西平对照品,质量分数 98%,批号 1001474257,美国 Sigma 公司

1.2 受试样品

人血浆,由福建医科大学附属协和医院招募的健康志愿者提供。

1.3 仪器与试剂

高效液相色谱仪岛津 20A(包括 LC-20AB 泵, SIL-20A 自动进样器, CTO-10Asvp 柱温箱, DGU-20AB 自动脱气装置, SPD-M20A 二极管阵列检测器, CBM-20A 系统控制器, LC solution 色谱工作站),日本岛津公司产品; Waters 固相萃取柱(HLB, 1 cc, 30 mg); HSC-12A 氮吹仪; 奥豪斯电子分析天平 CP114。甲醇,乙腈为色谱纯(Fisher Scientific),水为灭菌注射用水(福州海王福药制药有限公司),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Shim-Pack C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水-二正丁胺(58:42:0.01);体积流量 1.0 mL/min;进样量 50 μL;柱温

30 ℃;检测波长 263 nm。

2.2 溶液配制

精密称取 GM 5.0 mg 和 KM 5.0 mg,用 20%甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中,制得质量浓度分别为 500 μg/mL 的对照品储备液,置 4 ℃冰箱中保存;准确称取内标奥卡西平对照品 5.0 mg 加入 80%甲醇溶解并定容至 100 mL 量瓶中,使其质量浓度为 50 μg/mL,置于 4 ℃冰箱中,备用。

2.3 血浆样品处理

取血浆和混合对照品溶液适量加至尖底离心管中配成 400 μL 的含药血浆,涡旋 30 s,再加内标奥卡西平溶液(50 μg/mL) 20 μL。涡旋 30 s,取上清液 400 μL 加入活化的 HLB 固相萃取小柱(活化方法:1 mL 甲醇和水分别依次过柱)。先用 1 mL 灭菌注射用水洗柱(萃取液弃去),再用 500 μL 5% 甲醇洗柱(萃取液弃去),最后用 1.5 mL 纯乙腈过柱,收集所过柱乙腈,于氮吹仪水浴 60 ℃,氮气吹干,80%甲醇 150 μL 复溶,取 50 μL 进样分析。

2.4 方法学考察

2.4.1 标准曲线与定量限 精密吸取 GM、KM 对照品储备液适量,用空白血浆分别配成质量浓度 0.05、0.1、0.5、2.0、10、20 μg/mL 的系列含药血浆,与空白血浆分别以“2.3”项方法处理样品后,进样分析。计算 GM、KM 各自与内标奥卡西平峰面积的比值,以峰面积比值为纵坐标(Y),以质量浓度为横坐标(X),用最小二乘法进行回归运算。以信噪比(S/N)≥10 作为最低定量限。求得回归方程:GM 为 $Y=0.2034X-0.05$, $r=0.9994$; KM 为 $Y=0.2547X-0.0219$, $r=0.9995$;结果表明 GM、KM 在 0.05~20 μg/mL 线性关系良好,最低定量限均为 50 ng/mL。

2.4.2 专属性考察 取 6 份来自不同健康志愿者的血浆,于空白血浆中加入 GM、KM 对照品储备液及内标溶液制得含药血浆,空白血浆及含药血浆均按照“2.3”项方法操作,取空白血浆、混合对照品溶液(含内标)及含药血浆适量,进样测定,记录色谱图,结果见图 1。按内标奥卡西平、KM、GM 顺序出峰,保留时间依次为 6.45、9.81、11.78 min,图中各组分峰形较对称,无其他干扰峰,分离效果较好。

2.4.3 回收率考察

(1) 提取回收率:精确配制同时含 GM 和 KM 0.05、5.0、20 μg/mL 的含药血浆各 5 份,以“2.3”

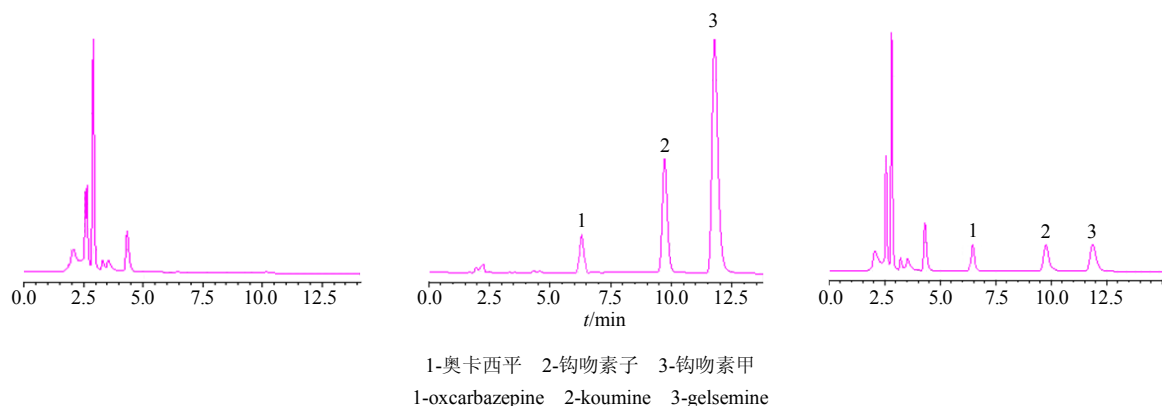


图 1 空白人血浆 (A)、对照品溶液+内标 (B) 和含药血浆 (C) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of blank human plasma (A), reference solution +internal standard (B), and plasma containing drug (C)

项的方法处理样品后, 进样分析。另取 400 μL 空白血浆 5 份, 以“2.3”项的方法处理样品, 氮气吹干后残渣分别加入相应质量浓度 GM 和 KM 对照品溶液, 使其终质量浓度分别为 0.05、5.0、20 $\mu\text{g/mL}$, 进样分析。含药血浆经过固相萃取所得的峰面积与相应质量浓度未经固相萃取对照品溶液进样直接所得的峰面积比值计算提取回收率。结果见表 1。

(2) 方法回收率: 精确配制同时含有 GM 和 KM, 质量浓度均为 0.05、5.0、20 $\mu\text{g/mL}$ 的含药血

浆各 5 份, 以“2.3”项的方法处理样品后, 进样分析。以“2.4.1”项所得的标准曲线计算测定的质量浓度, 以实测质量浓度与理论质量浓度比值计算方法回收率。结果见表 1。

2.4.4 精密度试验 精确配制同时含有 GM 和 KM, 质量浓度为 0.05、5.0、20 $\mu\text{g/mL}$ 的含药血浆各 5 份, 以“2.3”项的方法处理样品后, 进样分析。每个质量浓度于 1 日内分别测定 5 次, 计算日内精密密度; 每个质量浓度连续测定 5 d, 计算日间精密密度。结果见表 1。

表 1 GM 和 KM 的精密度及回收率 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 1 Precisions and recoveries of GM and KM in human plasma ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

成分	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	提取回收率/%	方法回收率/%	日内精密密度		日间精密密度	
				测定值/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	RSD/%	测定值/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	RSD/%
GM	0.05	91.61 ± 5.26	102.91 ± 3.28	0.054 ± 0.006	11.11	0.052 ± 0.005	9.62
	5.0	89.52 ± 5.53	97.51 ± 5.13	5.120 ± 0.410	8.00	5.160 ± 0.310	6.00
	20	91.52 ± 5.94	95.54 ± 3.96	21.810 ± 2.250	10.32	20.940 ± 1.620	7.74
KM	0.05	87.63 ± 4.55	95.65 ± 5.94	0.055 ± 0.005	9.09	0.053 ± 0.003	5.66
	5.0	89.34 ± 6.16	96.97 ± 5.85	5.220 ± 0.640	12.26	5.080 ± 0.460	9.06
	20	86.56 ± 7.28	96.32 ± 5.56	22.120 ± 2.330	10.53	21.420 ± 2.140	9.99

2.4.5 血浆样本稳定性考察 精确配制同时含有 GM 和 KM, 质量浓度为 0.05、5.0、20 $\mu\text{g/mL}$ 的含药血浆, 共设置 4 组, 每组含 3 个质量浓度水平血浆各 3 份。第 1 组: 置常温避光 25 $^{\circ}\text{C}$ 放置, 0、3、6、12 h 取样, 以“2.3”项的方法处理样品后, 进样分析; 第 2 组: 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 3 d, 以“2.3”项的方法处理样品后, 进样分析; 第 3 组: 置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置冷冻后, 观察持续 15 d, 室温融化, 以“2.3”项的方法处理样品后, 进样分析; 第 4 组: 3 个质

量浓度水平血浆 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱反复冻融 3 次, 以“2.3”项的方法处理样品后, 进样分析。

结果提示, 在室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光的条件下保存 12 h, GM 和 KM 各质量浓度血浆样品保持稳定, GM 高、中、低质量浓度回收率为 93.21%~97.35%, KM 各质量浓度在室温回收率为 90.25%~96.73%; 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存的条件下, 第 1、2 天 GM、KM 各质量浓度回收率在 90% 以上波动, 在第 3 天后质量浓度回收率均降至 85% 以下。在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存的

条件下, 在 15 d 的观察时间内 GM 和 KM 均较为稳定, 回收率维持在 91% 以上; 反复冻融结果提示, 低、中、高 3 个质量浓度的 GM 和 KM 回收率均在 90% 以上, 且 RSD 也均小于 9%, 说明含 KM 和 GM 的血浆在反复冻融条件下稳定性较好。

3 讨论

钩吻素生物碱单体在多种实验性疼痛模型上呈现显著的抗慢性疼痛、抗风湿性关节炎等药理作用, 且作用机制有别于传统解热镇痛药, 且没有依赖性^[5]。钩吻生物总碱有极强的神经毒性, 对中枢作用强烈, 主要为抑制延髓呼吸中枢, 抑制脑和脊髓运动中枢, 使呼吸麻痹, 呼吸衰竭^[2]。但生物碱单体毒性差别大, 其中以 KM 治疗指数最大, 提示钩吻生物碱单体有望开发为临床新型镇痛药的潜在价值^[6-9]。

课题组近几年动物实验研究表明, KM 具有较强药理活性, 治疗指数高, 治疗剂量毒性远小于 GM^[6-8]。

人血浆钩吻生物碱浓度检测未见相关文献报道。有报道采用液相色谱-质谱联用对大鼠血浆中钩吻生物碱进行检测^[3], 其设备昂贵不易普及。本研究建立的检测方法采用普通高效液相色谱法进行检测, 方法相对简单, 设备要求低, 易普及。本课题组前期研究 KM 在大鼠体内药动学及组织分布, 对 KM 的检测方法, 采用液液萃取, 采用氢氧化钠调节样本 pH, 醋酸乙酯等提取, 操作较为复杂^[10]。本研究改进采取固相萃取方法提取纯化人血浆中钩吻生物碱, 操作相对简单, 提取回收率高, 色谱背景杂峰低。本研究采用奥卡西平作为内标物, 因为钩吻生物碱和奥卡西平都含有苯并氮杂环结构, 有相似的极性且彼此分离度好, 色谱出峰时间较为合适。对 GM 及 KM 不同条件下的血浆稳定性进行了考察。结果提示如没有马上检测, 放置室温 12 h 内血浆中 GM 和 KM 稳定性较好, 也可将血浆于 4 °C 冰箱避光保存, 但不要超过 3 d。如超过不能及时检测, 最好于 -20 °C 以下冰箱冷冻保存。血浆 GM 和 KM 反复冻融稳定也较好。由于伦理问题, 目前无法在人身上口服 KM 和 GM 后进行检测验证, 只能等待有钩吻中毒患者样本。如经过人体代谢, 可能产生的代谢产物和原药是否能完好分离。

解决此问题, 只需在今后实际检测过程中, 轻微改变流动相极性即可。

综上, 本研究所建立 GM 和 KM 检测方法线性范围满足临床检测要求, 适合今后 GM 或 KM 人体临床药代药效动力学和毒性研究, 亦可运用于临床钩吻误食急性中毒后血药浓度监测, 制定解救方案。

参考文献

- [1] Jin G L, Su Y P, Liu M, *et al.* Medicinal plants of the genus *Gelsemium* (Gelsemiaceae, Gentianales)-a review of their phytochemistry, pharmacology, toxicology and traditional use [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 152(1): 33-52.
- [2] 谢立璟, 韩雪峰. 钩吻中毒的机制、临床特点及处理 [J]. 药物不良反应杂志, 2006, 8(3): 202-204.
- [3] Chen J Z, Li Y, Xiao J P, *et al.* Development of a sensitive and rapid UPLC-MS/MS method for the determination of koumine in rat plasma: application to a pharmacokinetic study [J]. *Biomed Chromatogr*, 2013, 27(6): 736-740.
- [4] Su Y P, Shen J, Xu Y, *et al.* Preparative separation of alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. using pH-zone-refining counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218: 3695-3698.
- [5] 许盈, 丘宏强, 沈洁, 等. 钩吻素子无吗啡样药物依赖性 [J]. 福建医科大学学报, 2013, 47(4): 210-213.
- [6] Xu Y, Qiu H Q, Liu H, *et al.* Effects of koumine, an alkaloid of *Gelsemium elegans* Benth., on inflammatory and neuropathic pain models and possible mechanism with allopregnanolone [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2012, 101(3): 504-514.
- [7] Ling Q, Liu M, Wu M X, *et al.* Anti-allodynic and neuroprotective effects of koumine, a Benth alkaloid, in a rat model of diabetic neuropathy [J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(5): 858-864.
- [8] Qiu H Q, Xu Y, Jin G L, *et al.* Koumine enhances spinal cord 3 α -hydroxysteroid oxidoreductase expression and activity in a rat model of neuropathic pain [J]. *Mol Pain*, 2015, 11: 46.
- [9] 黄志毅, 刘铭, 沈洁, 等. 1-甲氧基钩吻碱抗慢性疼痛作用 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 2034-2037.
- [10] 许盈, 郑宓, 李苏平, 等. 钩吻素子在大鼠体内的药物代谢动力学及组织分布 [J]. 福建医科大学学报, 2013, 47(4): 199-202.