

固相萃取 HPLC/DAD 法测定大鼠尿样中的延胡索乙素*

洪战英, 郑振, 闻俊, 范国荣**, 柴逸峰, 吴玉田

(中国人民解放军第二军医大学药学院, 上海市药物代谢产物研究重点实验室, 上海 200433)

摘要 目的: 建立能同时分离分析大鼠尿样中延胡索乙素 (THP) 及其代谢产物的 HPLC/DAD 方法。方法: 尿样经 Oasis HLB C₁₈ 固相萃取小柱提取, 采用 HPLC/DAD 法检测, 色谱柱: Ultimate XB-C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm); 流动相: A 相为 0.1% 醋酸水溶液 (三乙胺调节 pH 5.5), B 相为乙腈, 梯度洗脱; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 230 nm; 大鼠给药 THP 后, 收集其尿样分析。结果: THP 在 0.10~50.0 μg·mL⁻¹ 的范围内有良好的线性关系 ($r = 0.9999$), 最低定量限为 0.10 μg·mL⁻¹, 平均方法回收率为 99.5%, 提取回收率为 73.6%; 日内和日间 RSD 小于 9%。结论: 所建立的方法准确可靠, 可用于 THP 尿样浓度测定及其排泄动力学研究。

关键词 延胡索乙素; 固相萃取; HPLC/DAD; 药物排泄

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)07-1067-03

HPLC/DAD determination of tetrahydropalmatine with SPE in rat urine using solid phase extraction*

HONG Zhan-ying, ZHENG Zhen, WEN Jun, FAN Guo-rong**, CHAI Yi-feng, WU Yu-tian

(School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai Key Laboratory for Pharmaceutical Metabolites Research, Shanghai 200433, China)

Abstract Objective To develop an SPE-HPLC method for the determination of tetrahydropalmatine in rat urine. **Methods** Samples were purified by Oasis HLB C₁₈ SPE column. Separation was performed on Ultimate XB-C₁₈ column (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), and the mobile phase was comprised of 0.1% acetic acid solution (adjusted to pH 5.5 with triethylamine) - acetonitrile and delivered in gradient procedure. Flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was set at 230 nm. **Results** The calibration curve was linear in the range of 0.10-50.0 μg·mL⁻¹ for tetrahydropalmatine ($r = 0.9999$), with LLOQ of 0.10 μg·mL⁻¹. The average recovery was 99.5% and the extraction recovery was 73.6%. Intra-day and inter-day RSDs were less than 9%. **Conclusion** The method is accurate, reliable and suitable for excretion study of THP in rat.

Key words tetrahydropalmatine; solid phase extraction (SPE); HPLC/DAD; excretion

传统中药延胡索是罂粟科紫堇属植物延胡索 (*Corydalis yanhusuo* W. T. Wang) 的干燥块茎, 别称元胡、玄胡等, 具有活血、利气、止痛的功效, 常用于治疗各种疼痛。延胡索的化学活性成分主要为生物碱^[1], 其中以延胡索乙素 (tetrahydropalmatine, THP) 的止痛、镇痛、抗惊厥作用最强, 常被作为该药材的质控指标^[2]。

关于延胡索乙素的体内动态过程, 前期研究^[3]已经进行了延胡索乙素在大鼠体内的血浆药代动力学研究, 获得该成分在动物体内的吸收、分布等信

息, 并且提示该成分经过代谢后可能存在多个代谢产物。本文建立了定量测定 SD 大鼠尿样中延胡索乙素的固相萃取-HPLC/DAD 方法, 可用于尿样测定及排泄动力学研究, 为进一步分离制备代谢产物提供基础。

1 仪器与试剂

VARIAN ProStar 210 高效液相色谱仪; ProStar 210 双泵、410 分析型自动进样器、PDA-330 二极管阵列检测器、Star 色谱工作站; SUPELCO 固相萃取仪, OASIS 萃取小柱 (C₁₈, 1 mL, Waters

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30600815)

** 通讯作者 Tel: (021) 81871260 E-mail: guofan@yahoo.com.cn

公司)。

THP硫酸盐对照品(批号: 110726- 200208, 纯度: 99.9%)购自中国药品生物制品检定所; THP原料药由南宁市药品检验所(中国, 广西)提供, 乙腈、甲醇为色谱纯(Caledon公司), 冰醋酸、三乙胺等均为分析纯; 水为二次重蒸馏水。

2 方法

2.1 色谱条件 Ultimate XB- C₁₈色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm), C₁₈保护柱(月旭材料科技上海有限公司)。流动相: A相为 0.1% 醋酸水溶液(三乙胺调节 pH 5.5), B相为乙腈, 采用梯度洗脱方式: 0~ 22 min 15% B线性增至 40% B, 22~ 32 min 保持 40% B, 32~ 35 min 线性降至 15% B。流速: 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 室温; 检测波长: 230 nm; 进样量: 50 μL。

2.2 对照品储备液的配制 精密称取 THP硫酸盐对照品适量, 至 10 mL量瓶中, 加水溶解, 定容后即得 1 mg · mL⁻¹对照品储备液。以纯水稀释成 1.0, 2.0, 8.0, 20.0, 80.0, 200.0, 500.0 μg · mL⁻¹系列浓度的对照品溶液。

2.3 尿样处理 采用固相萃取方法, 固相萃取小柱先依次用甲醇 1 mL, 水 1 mL活化, 然后加入尿样 0.5 mL, 依次用水 1 mL, 5% 及 30% 甲醇溶液各 0.5 mL淋洗, 弃去淋洗液; 再用 90% 甲醇溶液 0.5 mL洗脱并收集洗脱液, 于 45 °C水浴挥干, 用 200 μL流动相复溶, 取 50 μL进样。

2.4 动物实验设计 健康 SD大鼠 10只, 雌雄各半, 体重 220~ 250 g 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 合格证号: SCXK(沪) 2007- 0005。10只大鼠按性别分为 2组, 分置于代谢笼内, 收集空白尿。以 60 mg · kg⁻¹ THP灌胃, 分别收集给药后 0~ 3, 3~ 6, 6~ 9, 9~ 12, 12~ 24, 24~ 36, 36~ 48 h尿样。尿样保存于 - 20 °C冰箱, 待测。

3 结果

3.1 方法专属性 图 1为空白尿液样品、空白尿样添加 THP对照品溶液以及实测尿液样品的色谱图。可见, 尿样中的内源性物质、代谢产物均能与 THP达到良好的基线分离, 不干扰样品的测定, THP的保留时间为 32.7 min, 3个代谢产物的保留时间分别为 14, 18, 22 min左右。

3.2 线性与最低定量限 取大鼠空白尿样 0.45 mL共 7份, 分别加入系列浓度的 THP对照品溶液 50 μL, 配制成浓度为 0.10, 0.20, 0.80, 2.0, 8.0, 20.0, 50.0 μg · mL⁻¹的 THP对照品尿样, 涡旋混

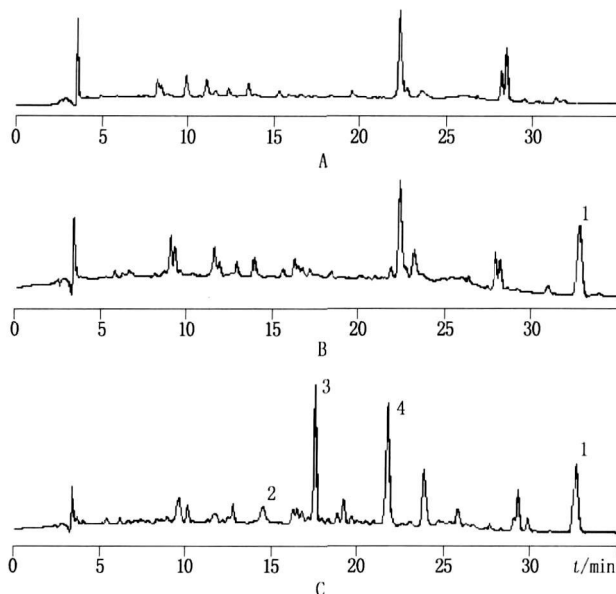


图 1 大鼠尿样中 THP 的色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of THP in rat urine

A 空白尿样 (blank urine) B 空白尿样添加 2.0 μg · mL⁻¹ THP (blank urine spiked with 2.0 μg · mL⁻¹ THP) C 大鼠给药后 0~ 3 h 收集的尿样 (urine sample collected at 0~ 3 h after dosing)
1. THP 2, 3, 4 代谢产物 (metabolites)

匀, 按上述“尿样处理”方法处理后, 进样测定。以 THP峰面积 (A) 对浓度 (C) 作线性回归, 得到标准曲线方程为:

$$A = 1.243 \times 10^6 C - 6.528 \times 10^3 \quad r = 0.9999 (n = 7)$$

表明在 0.10~ 50.0 μg · mL⁻¹ 范围内, 尿样中 THP 浓度与色谱峰面积线性关系良好, 最低定量限为 0.10 μg · mL⁻¹ (以信噪比 $SN = 10$ 计)。

3.3 精密度试验 取大鼠空白尿液 0.45 mL, 按“3.2”项下方法配制 THP低、中、高 (0.2, 2.0, 50.0 μg · mL⁻¹) 的质量控制样品各 5份, 按尿样处理方法处理, 于同一天内重复测定 5次, 连续测定 3 d 求得日内和日间精密度, 见表 1。

3.4 提取回收率 取大鼠空白尿液 0.45 mL, 按“3.2”项下方法配制 THP低、中、高 (0.2, 2.0, 50.0 μg · mL⁻¹) 的质量控制样品各 5份, 按“尿样处理”方法处理后进样, 记录 THP峰面积, 另用流动相配制相应浓度的 THP对照品溶液, 不经固相萃取直接进样, 将两组峰面积相比, 计算提取回收率, 结果见表 1。

3.5 方法回收率 取大鼠空白尿液 0.45 mL, 按“3.2”项下方法配制 THP低、中、高 (0.2, 2.0, 50.0 μg · mL⁻¹) 的质量控制样品各 5份, 按相同尿样处理方法处理后进样, 根据标准曲线方程求得药物浓度, 与已知加入浓度比较, 得方法回收率, 见表 1。

表 1 延胡索乙素尿样回收率及精密度测定结果 (n = 5)

Tab 1 Recoveries and precision results for THP in rat urine

加入量 (added) / μg · mL ⁻¹	提取回收率 (extraction recovery) %	RSD %	方法回收率 (method recovery) %	RSD %	精密度 (precision RSD %)	
					日内 (intra- day)	日间 (inter- day)
0.2	72.9 ± 4.5	6.2	102.6 ± 5.3	5.2	8.1	8.7
2.0	74.6 ± 3.1	4.2	96.8 ± 3.7	3.8	2.7	7.3
50.0	73.2 ± 2.0	2.7	99.1 ± 3.5	3.5	6.8	5.9

3.6 稳定性试验

室温稳定性: 低、中、高 (0.2, 2.0, 50.0 μg · mL⁻¹) 3种对照品尿样经过提取后, 放入全自动进样器中分别于 0, 12, 24 h 测定, 用测得的 THP 峰面积与 0 h 时的峰面积结果进行比较, 求得 RSD < 3.0%, 表明处理后的样品在自动进样器中存放 24 h 内稳定。

冻融稳定性: 配制低、中、高 (0.2, 2.0, 50.0 μg · mL⁻¹) 3种对照品尿样, 放入 -20 °C 冰箱保存, 分别于 1, 7, 14 d 取出, 冻融, 按上述尿样处理方法处理进样, 测得 RSD 为 3.6% ~ 6.5%, 表明尿样中 THP 冷冻保存 14 d 稳定性良好。

3.7 THP 的尿液排泄分析 采用所建立的方法测定 2 组大鼠 (每组 5 只) 尿样中的 THP 含量, 计算各组累积排泄量, 其尿药累积排泄曲线如图 2 可见给药后 24 h 内大鼠体内 THP 基本排泄完毕, 3~6 h 时间段 THP 排泄量较大。雌、雄两组在给药后 24 h 内的尿液累积排泄量分别为 (66.5 ± 24.7) μg 和 (104.8 ± 57.2) μg, 累积排泄率分别为 0.55% 和 0.87%, 提示大鼠尿液中 THP 的排泄存在一定的性别差异。此外, 在本实验条件下, 从大鼠尿样中分离出了 3 个可能的代谢产物峰 (保留时间分别为 14, 18, 22 min 左右, 该 3 个色谱峰的 DAD 光谱图与 THP 的 DAD 光谱图相似), 其分离制备和结构确证正在进行中。

4 讨论

前期研究显示 THP 在大鼠体内经过生物转化可能存在多个代谢产物, 本试验旨在建立 SPE-HPLC 法测定大鼠尿样中 THP 的浓度, 应用于其尿液排泄研究以及为进一步寻找和确证相应的代谢产物提供信息。当采用原有的流动相等度洗脱条

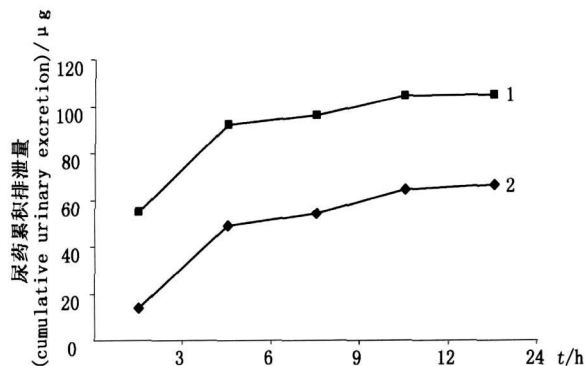


图 2 大鼠体内 THP 的尿药累积排泄曲线

Fig 2 Cumulative urinary excretion of THP after i.g. administration to rats

1. 雄性大鼠组 (male rats) 2. 雌性大鼠组 (female rats)

件^[3]时, 有较多内源性物质峰不能达到基线分离, 其中也包括代谢产物峰, 因而通过对乙腈和水不同配比进行筛选, 兼顾分离度、保留时间及峰形等因素, 最终确定梯度洗脱方案, 使内源性物质峰与代谢产物峰较好分离, THP 保留时间在 33 min 左右。

为了获得更多的代谢产物信息, 本试验选用 C₁₈ 小柱进行尿样的固相萃取, 比较了多种溶剂对样品中内源性物质的洗脱效果, 结果发现上样后纯水淋洗去除水溶性内源性物质效果明显, 但接着用 5% 甲醇溶液淋洗后, 内源性杂质还较多, 导致色谱峰上有部分干扰; 而再用 30% 甲醇溶液淋洗, 杂质明显减少, 且对 THP 提取回收率以及代谢产物信息没有影响, 最终确定了本试验的萃取方案, 实验结果充分显示出固相萃取在尿样测定及代谢产物追踪方面的优势。

参考文献

1. LIU Fang (刘芳), LUO Yue-e (罗跃娥). Advancements on research of Rhizoma Corydalis (延胡索研究概况). *J Tianjin Univ Tradit Chin Med* (天津中医学院学报), 2005, 24(4): 240
2. JIN Guo-zhang (金国章). Discoveries in the voyage of *Corydalis* research (中药延胡索的研究进展). Shanghai (上海): Shanghai Science & Technology Publishers (上海科学技术出版社), 2001: 23
3. HONG Zhan-ying (洪战英), FAN Guo-rong (范国荣), CHAI Yi-feng (柴逸峰), et al. Studies on stereoselective pharmacokinetics of tetrahydropalmatine enantiomers in rats (延胡索乙素在大鼠体内的立体选择性药代动力学). *Acta Pharm Sin* (药学报), 2005, 40(8): 746

(本文于 2008 年 7 月 15 日收到)