

HPLC-UV 测定大鼠血浆中氧化槐定碱含量及其药代动力学研究

文友民,纪红燕,邓 宁,王欣瑜,高 华*

宁夏医科大学总医院药剂科,银川 750004

摘要:建立测定大鼠血浆中氧化槐定碱的体内分析方法,并考察其药代动力学参数。血浆样品以甲醇溶液沉淀,采用 ZORBAX XDB-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 4.0 μm) 色谱柱分离,流动相为乙腈-磷酸缓冲溶液(0.01 mol/L KH₂PO₄, H₃PO₄ 调 pH 3.30) = 4:96 (V/V), 检测波长 210 nm。血浆中氧化槐定碱在 2.50 ~ 500.00 μg/mL 内线性较好($r = 0.9971$), 提取回收率为 77.3% ~ 89.9%, 日内、日间精密度 RSD 均小于 10%。大鼠静脉注射 50 mg/kg 和 100 mg/kg 氧化槐定碱后,其消除半衰期 $t_{1/2}$ 分别为(37.24 ± 9.27) 和(34.25 ± 8.82) min, AUC 分别为(1998.76 ± 178.35) 和(5130.62 ± 1450.86) mg/L/min, C_{max} 分别为(89.53 ± 10.47) 和(247.35 ± 112.02) mg/L。本文建立的方法简便、经济,可用于氧化槐定碱体内药代动力学分析。

关键词:氧化槐定碱;药代动力学;高效液相色谱法;大鼠

中图分类号:R945

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.9.019

Determination of Oxysophoridine in Rats Plasma by HPLC-UV and Investigation its Pharmacokinetics

WEN You-min, JI Hong-yan, DENG Ning, WANG Xin-yu, GAO Hua*

Department of Pharmacy, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

Abstract: To establish a method for the determination of oxysophoridine in rats plasma by HPLC-UV and to explore its profiles of pharmacokinetics. Plasma samples were extracted with methanol and separated on a ZORBAX XDB-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 4 μm) column with a mobile phase consisting of phosphate buffer (pH 3.00) and acetonitrile (96:4, v/v). The detection wavelength was 210 nm. The assay was linear in the range of 2.50 ~ 500.00 μg/mL ($r = 0.9974$). The recovery of oxysophoridine from plasma was 77.3% to 89.9%, and RSDs of inter-day and intra-day were less than 10%. After intravenous injection of oxysophoridine (50, 100 mg/kg) to rats, its $t_{1/2}$, AUC and C_{max} were (37.24 ± 9.27) and (34.25 ± 8.82) min, (1998.76 ± 178.35) and (5130.62 ± 1450.86) mg/L/min, and (89.53 ± 10.47) and (247.35 ± 112.02) mg/L, respectively. The method was convenient and economical. It was suitable for the study on pharmacokinetics of oxysophoridine *in vivo*.

Key words: oxysophoridine; pharmacokinetics; HPLC-UV; rat

氧化槐定碱(Oxysophoridine, OSR)为喹诺里西啶类生物碱,是从宁夏特色回药材豆科槐属植物苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)中提取到的一种重要的生物碱,其药物来源充足,药理作用广泛。近年来不断有研究^[1-6]表明,氧化槐定碱有镇静催眠、镇痛、抗炎、抗氧化、抗心律失常、抗肿瘤以及改善心功能等方面的作用,具有重要的临床应用价值。因此研究氧化槐定碱在体内的药代动力学具有重要意义。

义。目前国内外对该成分的研究主要集中在药理活性方面,已有人将氧化槐定碱制成冻干粉针剂^[7],而有关其药代动力学方面的研究尚未见文献报道。为此,本文建立了 HPLC-UV 方法测定大鼠血浆中氧化槐定碱的浓度,以评价氧化槐定碱在大鼠体内的药代动力学过程,为氧化槐定碱的进一步开发和应用奠定了基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),包括 G1322A 型脱气机、G1311A 型泵、G1329A 型自

动进样器、G1316A 型柱温箱、G1314B 型紫外检测器;HPD-25 无油隔膜真空泵(天津市达因仪器厂);5804R 台式低温冷冻离心机(德国 Eppendorf);SI-0246 涡旋混合仪(美国 SI 公司);OS-SYS 氮吹仪(美国 Organomation 公司)。

氧化槐定碱(质量分数 > 99.2%,宁夏紫荆花制药有限公司,批号:071217);甲醇、乙腈为色谱纯(Fisher Scientific 公司); KH_2PO_4 、 NaOH 、 CCl_4 均为分析纯,试验用水为双蒸水。

1.2 实验动物

健康 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,雌雄各半,体重(300 ± 20) g,购自宁夏医科大学动物中心,动物合格证号:SCXK(宁)2014-0003。SPF 级环境饲养,饲养条件为室温 22 ~ 28 °C,相对湿度 40% ~ 70%,自由饮水及进食。实验动物的使用通过了宁夏医科大学总医院伦理委员会的论证,预养 1 周后进行实验。

2 实验方法

2.1 氧化槐定碱标准溶液的配制

精确称取 10.17 mg 氧化槐定碱对照品,置于 10 mL 容量瓶中,纯水溶解并定容至刻度,摇匀制成 1 mg/mL 的储备液 I。以流动相为稀释溶液,逐步将储备液 I 稀释成 100 μg/mL 的储备液 II。置于 4 °C 冰箱保存备用。

2.2 色谱条件

色谱柱:ZORBAX XDB-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 4.0 μm);保护柱:ZORBAX SB-C₁₈ (4 mm × 2.0 mm, 5 μm);流动相:0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(磷酸调 pH 至 3.30)与乙腈按 96:4(体积比)混合;流速:1.0 mL/min;检测波长:210 nm,柱温:30 °C;进样量:20 μL。

2.3 给药方法与样品采集

健康 SD 大鼠 12 只,雌雄各半,随机分为两组,每组 6 只大鼠,给药前禁食 12 h,自由饮水。分别尾静脉注射 50、100 mg/kg 的氧化槐定碱(剂量参考文献 8,为 1/3 半数致死量上下),分别于给药后 2、5、10、15、20、30、40、50、60、80、100 min 眼眶后静脉丛取血 500 μL 至含肝素的离心管中,14000 rpm 离心 10 min,取上层血浆 200 μL,置 -20 °C 冰箱保存。

2.4 血浆样品预处理

精密吸取血浆 100 μL,置于 1.5 mL EP 管中,精密加入 300 μL 甲醇溶液,涡旋震荡 1 min,4000 rpm 离心 2 min,取上清溶液,55 °C 下空气流吹干。

残渣用 100 μL 流动相复溶,涡旋震荡 30 s,14000 rpm 离心 10 min,吸取上清液,取 20 μL 进样分析。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性

分别取大鼠空白血浆,对照品以及大鼠给药后的血浆样品,按照 2.4 项下方法操作处理,考察大鼠血浆中有无干扰物以及方法的专属性,见图 1。

2.5.2 标准曲线的制备

取氧化槐定碱标准溶液以大鼠空白血浆为稀释溶液,配成含氧化槐定碱浓度为 2.50、5.00、12.50、25.00、50.00、125.00、250.00 和 500.00 μg/mL 的血浆样品,按 2.4 项下操作,进样 20 μL 测定,记录色谱图。

2.5.3 精密度

取大鼠空白血浆配制质量浓度为 5.00、25.00 和 200.00 μg/mL 低、中、高的氧化槐定碱血浆样品,每个浓度 5 个样品,按 2.4 项下处理并测定药物浓度,连续测定三天。以测得值与理论值计算相对回收率,另计算日间、日内精密度,结果见表 1。

2.5.4 回收率

取大鼠空白血浆配制质量浓度为 5.00、25.00 和 200.00 μg/mL 低、中、高的氧化槐定碱血浆样品,每个浓度 5 个样品,按 2.4 项下处理并测定药物浓度。另用流动相配制质量浓度为 5.00、25.00 和 200.00 μg/mL 低、中、高的氧化槐定碱溶液各 5 份,按 2.2 项下色谱条件进行分析,以血浆样品测定的峰面积除以同浓度的对照溶液峰面积,计算回收率,结果见表 1。

2.5.5 稳定性

采用大鼠空白血浆配制质量浓度为 5.00、25.00 和 200.00 μg/mL 的低、中、高氧化槐定碱血浆样品,每个浓度 5 个样品,按 2.4 项下操作分别考察血浆样品室温放置 4、12 h,以及将样品经历 3 次冻融后的稳定性,结果见表 2。

2.6 氧化槐定碱大鼠体内药动学考察

两组大鼠禁食 12 h,自由饮水。分别尾静脉注射给予氧化槐定碱 50、100 mg/kg,在给药后 2、5、10、15、20、30、40、50、60、80、100 min 分别从大鼠眼眶后静脉丛取 500 μL 血,置于含肝素的离心管中,以 14000 rpm 离心 10 min,取 200 μL 上清液,按 2.4 项下操作并测定其血药浓度,绘制血药浓度-时间曲线,结果见图 2。运用 DAS 2.0 软件对数据进行处理并计算其药代动力学参数,结果见表 3。

3 实验结果

定,氧化槐定碱在当前色谱条件下峰形良好,其保留时间为 11.3 min。

3.1 方法专属性

图 1 表明血浆中内源性物质不干扰样品的测

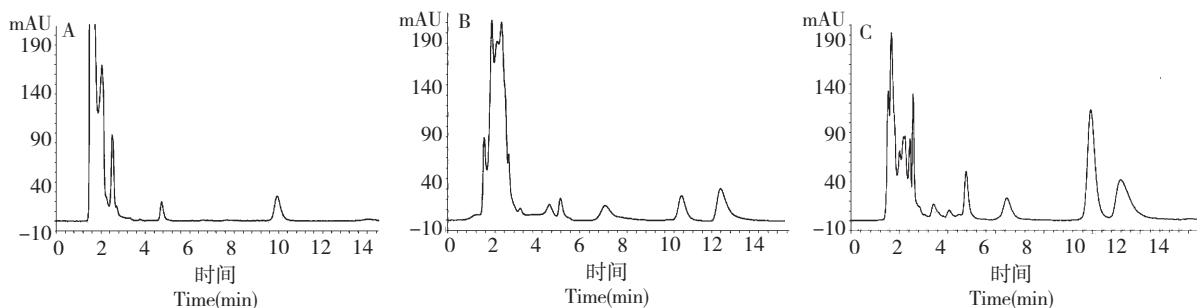


图 1 空白血浆 (A)、空白血浆添加氧化槐定碱 (B) 和静脉注射氧化槐定碱 5 min 后血样 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank plasma (A), blank plasma spiked with oxysophoridine (B) and plasma samples 5 min after intravenous injection of oxysophoridine (C)

3.2 血浆样品中氧化槐定碱的标准曲线

以氧化槐定碱峰面积 (Y) 与质量浓度 (X) 进行线性回归,求得氧化槐定碱血浆标准曲线为: $Y = 9.3140X - 0.3949$ ($r = 0.9971$, 权重系数 = $1/X$), 线性范围 2.50 ~ 500.00 $\mu\text{g/mL}$, 最低检测浓度为 2.50 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.3 精密度与回收率

氧化槐定碱日内和日间精密度 RSD (%) 均小于 10%, 低、中、高三个浓度氧化槐定碱的相对回收率在 99.20% ~ 108.11%, 绝对回收率在 77.3% ~ 89.9% 范围内。

表 1 精密度与回收率实验结果 (n = 5)

Table 1 Intra-day and inter-day precision and recovery of oxysophoridine (n = 5)

质量浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	日内 Inter-day		日间 Intra-day		相对回收率 Relative recovery (%)	绝对回收率 Absolute recovery (%)
	测定值 Detected concentration ($\mu\text{g/mL}$)	精密度 Precision RSD (%)	测定值 Detected concentration ($\mu\text{g/mL}$)	精密度 Precision RSD (%)		
5.00	4.96 \pm 0.31	6.18	4.82 \pm 0.39	8.11	99.20	89.90
25.00	24.45 \pm 0.72	2.96	23.46 \pm 1.03	4.39	97.81	77.30
200.00	216.22 \pm 7.50	3.45	216.89 \pm 5.30	2.44	108.11	79.30

3.4 稳定性实验

血浆样品室温放置 4、12 h, 以及将样品经历 3

次冻融后, 结果表明各种测定结果的 RSD 均小于 10.0%, 可以满足实验的需要。

表 2 样品稳定性 (n = 5)

Table 2 Sample stability result (n = 5)

质量浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	放置条件 Storage conditions	测得量 Detected concentration ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)
5.00	处理前室温 4 h Room temperature stability (4 h)	4.38 \pm 0.28	6.31
25.00		22.54 \pm 1.05	4.66
200.00		212.18 \pm 11.18	5.27
5.00	处理前室温 12 h Room temperature stability (12 h)	4.83 \pm 0.30	6.27
25.00		26.23 \pm 0.97	3.70

质量浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	放置条件 Storage conditions	测得量 Detected concentration ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)
200.00	冻融 3 次 Freeze - thaw stability (3 times)	218.25 \pm 7.03	3.22
5.00		4.36 \pm 0.42	9.59
25.00		23.54 \pm 1.20	5.09
200.00		212.45 \pm 5.22	2.46

3.5 药时曲线及药代动力学参数

大鼠尾静脉注射氧化槐定碱 50、100 mg/kg 后平均血药浓度-时间曲线如图 2, 主要药代动力学参数见表 3。

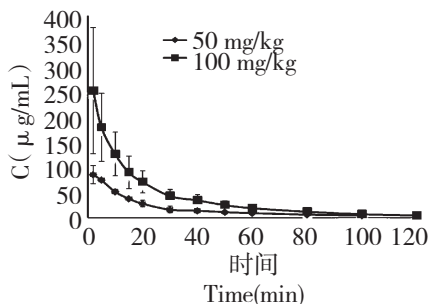


图 2 静脉注射 50、100 mg/kg 氧化槐定碱后平均血药浓度-时间曲线 ($n = 5$)

Fig. 2 Average plasma concentration-time curves of oxysphoridine with dosages of 50 and 100 mg/kg after intravenous injection

表 3 大鼠静脉注射氧化槐定碱后的主要药代动力学参数 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 The main pharmacokinetic parameters of oxysphoridine after intravenous injection in rat ($\bar{x} \pm s$)

参数 Parameters	静脉注射剂量 Intravenous dosage (mg/kg)	
	50	100
$t_{1/2}$ (min)	37.24 \pm 9.27	34.25 \pm 8.82
C_{\max} (mg/L)	89.53 \pm 10.47	247.35 \pm 112.02
CL (L/min/kg)	0.02 \pm 0.003	0.02 \pm 0.008
AUC (0-t) / mg/L/min	1998.76 \pm 178.35	5130.62 \pm 1450.86
AUC (0- ∞) / mg/L/min	2247.46 \pm 343.10	5317.53 \pm 1474.07
MRT(0-t) / min	25.24 \pm 4.50	27.03 \pm 4.78
MRT(0- ∞) / min	38.90 \pm 11.41	32.68 \pm 5.51
V_e (L/kg)	1.192 \pm 0.23	0.96 \pm 0.17

4 讨论与结论

4.1 血浆样品的处理

本试验选用沉淀蛋白法提取血浆中氧化槐定碱, 该方法成本低、操作简单。相对液液萃取或固相

萃取, 沉淀蛋白法可能杂质多, 如果杂质不干扰分析, 对于药动学研究多样品而言, 其仍然是首选的处理方法。为了进一步减少样品本底干扰, 提高检测限, 本实验中的血浆样品经甲醇沉淀蛋白后, 经过离心、氮气吹干溶剂、流动相复溶后进样分析。

4.2 流动相的考查

本实验考察了不同比例的 0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (用磷酸调 pH = 3.30)-乙腈 (88:12、90:10、94:6、96:4) 对色谱行为的影响。结果表明, 随着磷酸二氢钾溶液的比例增加, 氧化槐定碱能更好的与内源性物质分开, 因此最终确定 0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (磷酸调 pH = 3.30): 乙腈 = 96:4 作为流动相。

4.3 药动学结果

目前关于生物样品中氧化槐定碱测定方法的报道较少, 尚未发现有关其药代动力学方面的研究, 本实验采用 HPLC 法建立起测定大鼠体内氧化槐定碱血药浓度的方法。大鼠尾静脉注射 50、100 mg/kg 氧化槐定碱后, 其消除半衰期 $t_{1/2}$ 分别为 (37.24 \pm 9.27), (34.25 \pm 8.82) min, AUC 分别为 (1998.76 \pm 178.35), (5130.62 \pm 1450.86) mg/L/min, C_{\max} 分别为 (89.53 \pm 10.47), (247.35 \pm 112.02) mg/L, 实验表明氧化槐定碱吸收快、分布快、平均滞留时间较短。从药-时曲线图中可以看出氧化槐定碱血药浓度下降起初较为迅速但末端缓慢, 实验剂量下静脉注射表现为线性动力学特征。实验中我们考察了大鼠静脉注射 50、100、200 mg/kg 氧化槐定碱时的情况, 实验过程中发现静脉给予 200 mg/kg 氧化槐定碱的时候, 大鼠死亡较多, 可能是由于该剂量接近药物半数致死量^[8]所引起。

本实验建立的 HPLC 法简便、经济, 能满足氧化槐定碱在大鼠体内药代动力学的测定, 可为氧化槐定碱的药理、毒理研究以及临床应用和后续制剂研发提供方法参考和实验依据。

参考文献

1 Gao JX (高进贤), Tao LJ (陶丽君), Yu JQ (余建强), et

- al. The analgesic action of oxysophoridine and its effect on the expression of PKC γ in central nervous system of mice. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2009, 25: 1453-1456.
- 2 Fu J, Wang Y, Zhang J, *et al.* Anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of oxysophoridine on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Am J Transl Res*, 2015, 7: 2672-2682.
 - 3 Yu JQ(余建强), Jiang YX(蒋袁絮). Research progress in pharmacological actions of sophoridine and oxysophoridine. *J Ningxia Med Coll* (宁夏医学院学报), 2005, 27(1): 78-80.
 - 4 Zhang HM, Li HQ. Anti-arrhythmic effects of sophoridine and oxysophoridine. *Acta Pharmacol Sin*, 1999, 20: 517-520.
 - 5 Meng C, Liu C, Liu Y, *et al.* Oxysophoridine attenuates the injury caused by acute myocardial infarction in rats through anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic pathways. *Mol Med Rep*, 2015, 11: 527-532.
 - 6 Yao XQ, Zhang YH, Long W, *et al.* Oxysophoridine suppresses the growth of hepatocellular carcinoma in mice; in vivo and cDNA microarray studies. *Chin J Integr Med*, 2012, 18: 209-213.
 - 7 Zhang JS(张军帅), Zhao B(赵斌), Long W(龙伟), *et al.* Preparation and quality control of oxysophoridine freeze-dried powder injection. *China Pharm*(中国药师), 2011, 14: 1308-1310.
 - 8 Hu YX(胡月霞), Zhou JC(周建财), Dai WH(戴五好). Oxysophoridine and the sophoridine tail vein injection acute-toxicity studies in mice. *Guide China Med* (中国医药指南), 2012, 10(34): 13-14.
-
- (上接第 1448 页)
- 7 Lv L, Chi YJ. Improvement of functional properties of egg white protein phosphorylated by dry-heating in the presence of pyrophosphate. *Eur Food Res Technol*, 2012, 235: 981-987.
 - 8 Menarpoor-yazdi M, Asoodeh A, Chamani J. A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *J Funct Foods*, 2012, 4: 278-286.
 - 9 Zhang RD(张瑞东), Chi YJ(迟玉杰), Ruan CQ(阮长青). Optimization of egg white protein enzymolysis for the preparation of ACE inhibitory peptides. *Food Sci* (食品科学), 2010, 31: 1-4.
 - 10 Zhang XK(张祥奎), Tan SM(谭书明). Preparation process optimization of polypeptides from egg white protein by enzymatic hydrolysis. *Guizhou Agric Sci* (贵州农业科学), 2011, 39: 153-155.
 - 11 Chen C, Chi YJ, Zhao MY, *et al.* Purification and identification of antioxidant peptides from egg white protein hydrolysate. *Amino Acids*, 2012, 43: 457-466.
 - 12 Ruan GP(阮光萍), Wang JX(王金祥), Yao X(姚翔), *et al.* Chicken egg extracts promote increased expression of pluripotent gene OCT4 and NANOG in 293T cells. *Chin J Cell Biol* (中国细胞生物学学报), 2014, 36: 190-194.
 - 13 Ruan GP(阮光萍), Wang JX(王金祥), Liu JF(刘菊芬), *et al.* Components of chicken ovalbumin extract less than 3 kDa in size promote cell proliferation. *Chin J Cell Biol* (中国细胞生物学学报), 2014, 36: 1350-1354.
 - 14 Ruan GP(阮光萍), Wang JX(王金祥), Yao X(姚翔), *et al.* The effect of different fractions of chicken egg-white extract on the expression of the pluripotency factors in 293T cells. *Chin J Cell Biol* (中国细胞生物学学报), 2016, 38: 60-64.
 - 15 Quiros A, Chichon R, Recio I, *et al.* The use of high hydrostatic pressure to promote the proteolysis and release of bioactive peptides from egg white protein. *Food Chem*, 2007, 104: 1734-1739.
 - 16 Cui M(崔敏), Fu J(傅婕), Chi YL(迟原龙), *et al.* Comparison of ninhydrin colorimetry and formaldehyde titration in determination of collagen hydrolysate. *China Leather* (中国皮革), 2011, 40: 1-4.
 - 17 Stefanovic AB, Jovanovic JR, Grbavcic Sz, *et al.* Impact of ultrasound on egg white proteins as a pretreatment for functional hydrolysates production. *Eur Food Res Technol*, 2014, 239: 979-993.
 - 18 Liu M(刘铭), Liu YH(刘玉环), Wang YF(王允圃), *et al.* Research progress on production, purification and identification of bioactive peptides and its challenges in application. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2016, 42: 244-251.
 - 19 Hafeez Z, Cakir-kedfer C, Roux E, *et al.* Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Res Int*, 2014, 63: 71-80.