

• 研究论文 •

固相萃取-毛细管电泳法测定兔血清中的山莨菪碱对映体

韦寿莲* 麦文敏 严子军

(肇庆学院化学化工学院 广东 肇庆 526061)

摘要 建立一种可用于定量的毛细管电泳法分离山莨菪碱对映体. 系统研究了三种手性选择剂: 羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD), 甲基- β -环糊精(Me- β -CD), 羧甲基- β -环糊精(CM- β -CD)及其浓度、缓冲溶液浓度和 pH 对山莨菪碱拆分的影响. 在 110 mmol/L Tris-H₃PO₄ 缓冲液中加入 20.0 mg/mL HP- β -CD 和 5.0 mg/mL CM- β -CD (pH 4.0)条件下, 山莨菪碱的 4 个对映体达到基线分离. 血清样品通过固相萃取预处理和浓缩, 对映体的固相萃取回收率在 82.9%~90.7%, 相对标准偏差 RSD%均小于 7%. 山莨菪碱的 4 个对映体血标准溶液浓度与电泳峰面积在 77.86~0.39 μ g/mL 范围内呈良好的线性, $r \geq 0.999$, 检出限($S/N=3$)为 0.08 μ g/mL. 平均日内和日间精密度(RSD%)分别小于 4.2%和 6.5%, 方法回收率为 95.1%和 105%. 建立的方法准确、可靠, 应用于监测兔连续 3 d 口服 75 mg 山莨菪碱后血清中山莨菪碱的血药浓度, 结果满意.

关键词 毛细管电泳; 手性拆分; 山莨菪碱; 固相萃取

Determination of Anisodamine Enantiomers in Rabbit Plasma Samples by Solid-phase Extraction with Capillary Electrophoresis

Wei, Shoulian* Mai, Wenmin Yan, Zijun

(Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Zhaoqing University, Zhaoqing 526061)

Abstract To establish a capillary electrophoresis method under which anisodamine enantiomers can be sufficiently separated for quantification, hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD), methyl- β -cyclodextrin (Me- β -CD) and carboxymethyl- β -cyclodextrin (CM- β -CD) were used as chiral selectors. Effects of the concentration of cyclodextrin, pH and concentration of buffer were investigated. The baseline separation of four enantiomers of anisodamine was obtained in 110 mmol/L Tris-H₃PO₄ buffer-20.0 mg/mL HP- β -CD-5.0 mg/mL CM- β -CD at pH 4.0. Prior to electrophoresis, the analytes were purified and preconcentrated by solid phase extraction from plasma. Standard curves constructed using blank plasma spiked with anisodamine in the range 77.86~0.39 μ g/mL, showed acceptable linearity with correlation coefficients, $r \geq 0.999$. The detection limits for the four enantiomers of anisodamine were all 0.08 μ g/mL. Mean intra- and inter-day precisions (RSD%) were <4.2% and 6.5%, respectively. The method showed recoveries for the four enantiomers ranging from 95.1% to 105%. Acceptable precision and accuracy of the method were demonstrated for pharmacokinetic studies by determining the concentrations of anisodamine enantiomers in rabbit plasma, after administration of 75 mg of anisodamine during three consecutive days.

Keywords capillary electrophoresis; chiral separation; anisodamine; solid phase extraction

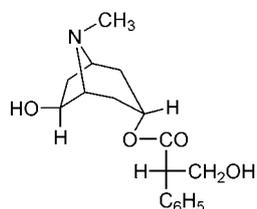
山莨菪碱是一种 M-胆碱受体阻滞药, 主要用于治疗心、脑、肝、肾、神经系统疾病等. 天然山莨菪碱的

* E-mail: weishlmary@126.com

Received July 30, 2008; revised October 18, 2008; accepted December 18, 2008.

广西自然科学基金(No. 0640038)、肇庆市科技计划(No. 10560)以及肇庆学院自然科学基金(No. 0737)资助项目.

化学结构为托品酸-6-羟基-3-托品酯, 分子中含有两个手性中心(结构式见图 1). 目前临床所用的山莨菪碱为合成品, 是四种光学异构体的混合物, 即两对消旋对映体, 二者互为差向异构体(6*S*,2'*S* 和 6*R*,2'*R*; 6*S*,2'*R* 和 6*R*,2'*S*).



1: 6*S*,2'*S*; 2: 6*S*,2'*R*; 3: 6*R*,2'*R*; 4: 6*R*,2'*S*

图 1 山莨菪碱的结构

Figure 1 Structure of anisodamine

通常外消旋体药物的对映体只有一个异构体具有治疗活性, 而另一个异构体可能很少具有这种治疗活性, 或者根本就没有治疗活性, 甚至还有毒性. 因此, 建立高专属性、高分离度的对映体拆分和测定技术研究药物的活性, 了解其可能的毒副作用, 以及对于研究药物的作用机理等都具有重要的理论和实际意义.

目前, 国内外对消旋的山莨菪碱手性分离的方法主要有成盐法、薄层层析法(TLC)^[1,2]、液相色谱法(HPLC)^[3]和毛细管电泳法^[4~7]. 薄层层析法^[2]在不同展开剂条件下均未能使山莨菪碱的光学异构体达到分离; 液相色谱法^[3]以 β -环糊精或*L*-(+)-酒石酸二正丁酯和*d*-樟脑磺酸为手性流动相仅使山莨菪碱中的 1 对差向异构体得到基线分离. 毛细管电泳法中, Kuhn 等^[4]以 β -CD 为拆分剂分离了山莨菪碱中的 1 对对映异构体, 而另 1 对对映异构体未能完全分离; 而文献^[5~7]分别采用环糊精衍生物单 3-*O*-苯基胺甲酰基- β -CD、羧甲基- γ -CD 或 β -环糊精(β -CD)结合 2,6-二羧甲基- β -环糊精(CM- β -CD)为手性选择剂, 均成功地拆分了山莨菪碱的 4 个光学异构体. 尽管文献^[5~7]报道成功地拆分了山莨菪碱的 4 种光学异构体, 但没有对山莨菪碱对映体进行动物体内的代谢研究.

目前消旋体的山莨菪碱动物体内的代谢研究主要有液相色谱-质谱法、液相色谱法、高效毛细管电泳法. 陈怀侠等^[8]运用液相色谱-电喷雾串联质谱法检测了大鼠血样中山莨菪碱及其代谢物; 周宏兵等^[9]采用 HPLC 测定了家兔口服盐酸山莨菪碱后的血药浓度; 马鹏等^[10]用胶束液相色谱技术以十二烷基硫酸钠(SDS)为表面活性剂, 正丙醇为改性剂, 硫酸阿托品为内标, 测定了山莨菪碱的体内血药浓度, 并进行了健康受试者肌注给药的药代动力学研究; Fan 等^[11]以 pH 2.5, 含 25

mmol/L 羧甲基- γ -CD 的磷酸盐为运行缓冲液, 研究了山莨菪碱对映体在兔体内的情况, 发现无论是口服途径还是静脉注射途径给药, 山莨菪碱对映体在兔体内显示立体选择性配置, 即有的兔体内可检测到山莨菪碱的 4 种光学异构体, 有的兔体内只检测到其中一对对映体且具有不同的血药浓度. 从以上文献可以看出, 消旋体的山莨菪碱动物体内的代谢研究较多, 而山莨菪碱对映体动物体内的代谢研究较少, 且尚无多剂量相关研究报道. 多剂量消旋体的山莨菪碱在体内是否会引起累积, 是否会产生立体选择性配置均有待进一步深入研究.

为了深入研究山莨菪碱 4 个光学异构体在动物体内的代谢情况, 本文采用不同类型的环糊精对山莨菪碱四个对映体进行拆分, 通过优化手性添加剂用量, 背景缓冲液的浓度、pH 值等条件, 建立一种准确、可靠的毛细管电泳拆分山莨菪碱 4 个对映体的方法, 应用于监测兔连续 3 d 口服 75 mg 山莨菪碱后血清中山莨菪碱的血药浓度.

由于直接测定体液特别是血液中药物的条件极为苛刻, 且难以控制和快速测定, 因此复杂的体液特别是血液常常需要进行预处理. 常用的预处理方法有液液萃取法、有机溶剂沉淀蛋白法、固相萃取法. 固相萃取法相对于液液萃取法和沉淀蛋白法, 显著减少有机溶剂的使用量, 操作相对简便, 具有高效、高选择性、高度自动化的特点, 被广泛应用于各种生物样品的分离和纯化. 为了有效地消除血样中基质的干扰, 达到快速、准确测定的目的, 本文采用固相萃取法对血样进行前处理.

1 实验部分

1.1 仪器

P/ACE MDQTM 高效毛细管电泳系统(BECKMAN 公司, USA), 未涂层石英毛细管柱(75 μ m i.d., 长度 59.9 cm, 有效长度 50 cm, 河北永年光纤厂). 检测波长 214 nm; 工作电压 20.0 kV; 压力进样, 3447.38 Pa; 进样时间 10 s; 柱温 25 $^{\circ}$ C.

1.2 试剂

消旋山莨菪碱片(杭州民生药业集团有限公司); 山莨菪碱对照品(中国药品生物制品检定所); β -环糊精(β -CD)、甲基- β -环糊精(Me- β -CD)、羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)、羧甲基- β -环糊精(CM- β -CD)(Sigma 公司产品), 三羟甲基氨基甲烷(Tris, 分析纯, 天津市科密欧化学试剂开发中心), 实验所用的其余试剂均为分析纯, 所用水均为三次重蒸水.

1.3 样品溶液的配制

称取一定量的山莨菪碱对照品, 用三次重蒸水溶解, 配成 5.0×10^{-3} mol/L 的标准品储备液, 避光 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存, 保质期为两个星期. 工作溶液由标准品储备液逐级稀释配制.

1.4 运行缓冲溶液配制

吸取一定体积 0.5 mol/L Tris, 滴加 0.5 mol/L H_3PO_4 至所需 pH 值, 加入适量蒸馏水得到一定浓度的 Tris- H_3PO_4 缓冲溶液. 取适量手性选择剂 Me- β -CD, HP- β -CD 或 CM- β -CD 直接加入上述溶液中, 即得含一定手性选择剂浓度的运行缓冲溶液(Buffer).

1.5 兔血清样品前处理

1.5.1 去蛋白

准确吸取 0.50 mL 兔血清样品于洁净的离心管中, 加入 100 μL 不同浓度的山莨菪碱样品液, 再加入 3.0 mL 乙腈或甲醇, 涡旋 2 min, 在 4000 r/min 条件下离心 10 min. 取上清液于 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气气流下吹干, 溶于 100 μL 水, 过 0.2 μm 滤膜, 进 CE 分离分析.

1.5.2 液液萃取

准确吸取 0.50 mL 兔血清样品于洁净的离心管中, 加入 100 μL 不同浓度的山莨菪碱样品液, 再加入 5.0 mL 氯仿或乙酸乙酯, 涡旋 2 min, 静置 10 min, 吸取氯仿层或乙酸乙酯层 4.0 mL. 再次向血清中加入氯仿或乙酸乙酯 4.0 mL, 吸取 4.0 mL. 合并有机相, 于 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气气流下吹干, 溶于 100 μL 水, 过 0.2 μm 滤膜, 进 CE 分离分析.

1.5.3 固相萃取

活化: 依次用 2.0 mL 甲醇和 1.0 mL 水活化 SPE 小柱, 流速为 0.4 mL/min, 勿抽干.

上样: 准确吸取 0.50 mL 兔血清样品于洁净的离心管中, 加入不同浓度的山莨菪碱样品液和 1.0 mol/L 的氢氧化钠各 100 μL , 充分碱化后加入 3.0 mL 乙腈, 涡旋 2 min, 在 4000 r/min 条件下离心 10 min. 取上清液于 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气气流下吹至约 0.5 mL, 上样.

洗涤: 依次用 1.0 mL Tris- H_3PO_4 (pH 6.8) 的水溶液和 1.0 mL 80% 甲醇水溶液以流速 0.4 mL/min 洗涤, 抽干, 4000 r/min 条件下离心 2 min, 弃去滤液和离心液.

洗脱: 用 3.0 mL 甲醇过 SPE 小柱, 以流速 0.4 mL/min 抽滤, 收集洗脱液, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气气流下吹干, 加 100 μL 水溶解残渣, 经 0.2 μm 滤膜过滤, 进样.

1.6 实验方法

每天运行前, 毛细管依次用 0.1 mol/L 的氢氧化钠(5 min)、二次蒸馏水(3 min)、硼砂(2 min)冲洗; 两次运行之间分别依次用 0.1 mol/L 的氢氧化钠、二次蒸馏水、

运行缓冲溶液冲洗 3 min; 当天实验结束时, 毛细管依次用 0.1 mol/L 的氢氧化钠(3 min)、二次蒸馏水(3 min)冲洗. 所用溶液均经 0.2 μm 滤膜过滤.

2 结果与讨论

2.1 手性选择剂类型对分离的影响

文献[8~10]报道环糊精及其衍生物对山莨菪碱的 4 个光学异构体具有良好的拆分能力, 因此分别以甲基- β -环糊精(Me- β -CD)、羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)、羧甲基- β -环糊精(CM- β -CD)为手性拆分剂, 研究其对山莨菪碱对映体手性分离的影响. 结果发现 Me- β -CD 使 **1** 和 **2** 两个对映异构体部分分离, 未能使 **3** 和 **4** 两个对映异构体分离; HP- β -CD 未能使 **1** 和 **2** 两个对映异构体分离, 但能使 **3** 和 **4** 两个对映异构体部分分离, 因此尝试以 Me- β -CD 和 HP- β -CD 为拆分剂. 结果发现, **1** 和 **2** 两个对映异构体, **3** 和 **4** 两个对映异构体的分离度均减小. 在 Me- β -CD 中加入少量 CM- β -CD 时, 能使 **1** 和 **2** 两个对映异构体部分分离, **3** 和 **4** 两个对映异构体完全分离; 而在 HP- β -CD 中加入少量 CM- β -CD 能使山莨菪碱的 4 个光学异构体达到完全分离. 因此, 选择 HP- β -CD 和 CM- β -CD 为手性拆分剂.

2.2 pH 对分离的影响

以 Tris- H_3PO_4 为缓冲液, 考察 pH 3.0~5.0 范围内对山莨菪碱手性拆分的影响. 结果发现, 在 pH 3.0~4.2 范围内, 随 pH 的增大, 对映体的迁移时间减小, 分离度增大; 在 pH 4.0~5.0 范围内, 随 pH 的增大, 对映体的迁移时间增大, 分离度减小. 这是由于在 pH 3.0~4.2 范围内, 一方面山莨菪碱的质子化程度较大, 电渗流速度变化不大, 另一方面随 pH 的增大, CM- β -CD 解离程度逐渐增加, 与山莨菪碱的静电作用力逐渐增大, 手性识别能力增强, 分离度增大. 而在 pH 4.0~5.0 范围内, 随 pH 的增大, 电渗流增大, CM- β -CD 解离程度增加, 但山莨菪碱的质子化程度减小, 手性识别能力减弱, 分离度减小. 在 pH 3.8~4.2 范围内, 4 个光学异构体达到完全分离. 因此, 选择缓冲液 pH 为 4.0.

2.3 缓冲液浓度对分离的影响

以 Tris- H_3PO_4 为缓冲液, 考察不同缓冲液浓度对手性分离的影响. 当 Tris 的浓度从 80 mmol/L 增加到 110 mmol/L 时, 分离度增大; 当 Tris 的浓度超过 110 mmol/L 时, 由于产生较高的焦耳热, 导致分离度减小. 因此, 选择缓冲液浓度为 110 mmol/L.

2.4 手性选择剂用量对分离的影响

固定 CM- β -CD 的浓度为 5.0 mg/mL, 考察 HP- β -CD

浓度在 10~40 mg/mL 范围内对分离的影响. 结果发现随着 HP- β -CD 浓度的增加, 山莨菪碱对映体分离度先增大后减小, 当浓度 20 mg/mL 时, 分离度达最大. 固定 HP- β -CD 的浓度为 20 mg/mL, 考察 CM- β -CD 浓度在 2.0~10.0 mg/mL 范围内对分离的影响. 当 CM- β -CD 浓度增大时, 手性选择剂与对映异构体间的相互作用几率增加, 分离度增大. 但随着 CM- β -CD 浓度的进一步增大, 手性选择剂与对映异构体间的相互作用进一步增强, 使得两对映体之间的电泳迁移率之差变小, 导致分离度降低. CM- β -CD 的最佳用量为 5.0 mg/mL. 图 2 为优化的实验条件下, 山莨菪碱对映体的电泳分离图.

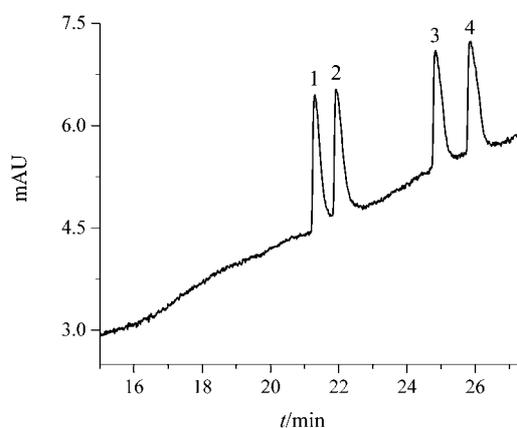


图 2 优选条件下山莨菪碱对映体的电泳图

Figure 2 Electropherograms of anisodamine enantiomers under the optimal conditions

Running buffer: 110 mmol/L Tris- H_3PO_4 + 20.0 mg/mL HP- β -CD + 5.0 mg/mL CM- β -CD (pH 4.0)

2.5 应用

2.5.1 基质干扰的消除

为了将建立的方法应用于复杂的生物体液, 我们考察了基质的干扰. 图 3(a~d)是空白血样分别用甲醇和乙腈沉淀蛋白, 氯仿和乙酸乙酯萃取后的电泳分离图. 从图中可以看出, 在山莨菪碱的迁移时间附近均有干扰峰出现. 为了消除干扰, 尝试用固相萃取对血样进行预处理. 图 3(e, f)是空白血样和空白血样加标经去蛋白后固相萃取处理的电泳分离图. 从图中可以看出, 在山莨菪碱的迁移时间附近已无干扰峰出现, 说明血样经固相萃取预处理可以有效地消除干扰.

2.5.2 固相萃取回收率

分别在若干份 0.50 mL 空白兔血清中, 加入山莨菪碱标准溶液适量, 配成浓度分别为 1.0×10^{-4} , 1.0×10^{-5} , 5.0×10^{-6} mol/L 的血清样品, 经乙腈沉淀蛋白后, 按 1.5.3 节步骤操作, 进行固相萃取和电泳分离分析, 得到

各药物的峰面积. 另配制浓度分别为 1.0×10^{-4} , 1.0×10^{-5} , 5.0×10^{-6} mol/L 的山莨菪碱标准溶液, 直接进行电泳分离分析. 每个样品重复测定 5 次, 根据回收率 = $A(\text{萃取峰面积})/A(\text{未萃取峰面积})$, 计算固相萃取回收率, 结果见表 1. 从表 1 可以看出: 固相萃取回收率在 82.9%~90.7% 范围内, 相对标准偏差小于 4.0%, 说明 SPE 条件能满足实际样品的测定.

表 1 山莨菪碱的萃取回收率 ($n=5$)

Table 1 Extraction recoveries of anisodamine enantiomers ($n=5$)

山莨菪碱 对映体	Average recoveries/%			RSD/%
	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	5.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
1	84.5	82.9	83.1	3.3
2	84.8	83.1	83.5	3.2
3	90.7	89.9	88.4	3.8
4	90.6	90.3	88.9	3.9

2.5.3 工作曲线和检出限

分别精密移取适量山莨菪碱标准储备液, 逐级稀释成 1.0×10^{-3} , 5.0×10^{-4} , 2.5×10^{-4} , 6.25×10^{-5} , 1.0×10^{-5} , 5.0×10^{-6} mol/L 的山莨菪碱标准工作溶液. 取洁净的离心管 6 支, 分别精密加入兔空白血清 0.40 mL, 再分别加入 100 μL 不同浓度的山莨菪碱标准工作溶液, 使每个血标的浓度分别为 77.86, 38.93, 19.46, 4.87, 0.78, 0.39 $\mu\text{g/mL}$. 按 1.5.3 节步骤操作, 进行固相萃取和电泳分离分析. 以山莨菪碱对映体的峰面积 Y 对其相应的浓度 X ($\mu\text{g/mL}$) 进行线性回归, 结果见表 2.

表 2 线性方程、相关系数及检出限

Table 2 The regression equations and the detection limits of anisodamine enantiomers

山莨菪碱 对映体	线性方程 $Y=a+bX$	相关系数(R)	LOD/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	$Y=351.2+6923.2X$	0.9990	0.08
2	$Y=263.6+6888.6X$	0.9990	0.08
3	$Y=273.2+6826.5X$	0.9991	0.08
4	$Y=162.6+6982.8X$	0.9992	0.08

2.5.4 精密度和准确度

取 0.40 mL 空白兔血清若干份, 加入 100 μL 不同浓度的山莨菪碱标准工作溶液, 使每个血标的浓度分别为 38.92, 4.87, 0.61 $\mu\text{g/mL}$. 按 1.5.3 节步骤操作, 在同日内每种样品分别测定 5 次, 每日测定 1 次, 连测 5 d, 计算日内、日间精密度和准确度, 结果见表 3.

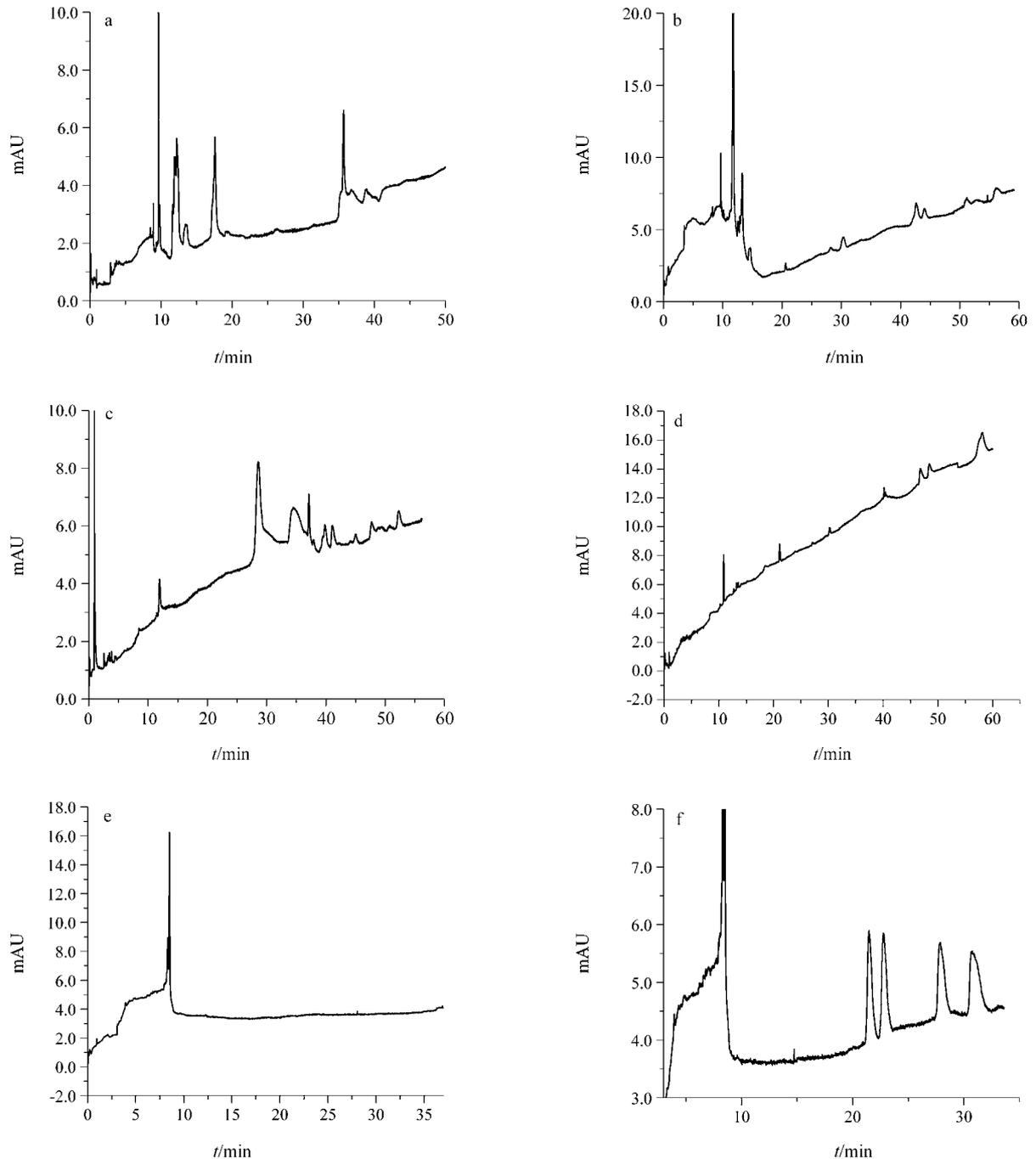


图3 样品电泳图

电泳条件同图2。(a)血样经甲醇沉淀蛋白;(b)血样经乙腈沉淀蛋白;(c)血样经氯仿萃取;(d)血样经乙酸乙酯萃取;(e)血样经乙腈沉淀蛋白和固相萃取处理;(f)血样加标后经乙腈沉淀蛋白和固相萃取处理

Figure 3 Electropherograms of samples

Analytical conditions were as for Figure 2. (a) a blank drug-free deproteinized serum with methanol; (b) a blank drug-free deproteinized serum with acetonitrile; (c) a blank drug-free extraction serum with chloroform; (d) a blank drug-free extraction serum with ethyl acetate; (e) a blank drug-free deproteinized serum with acetonitrile and with solid-phase extraction; (f) deproteinized serum spiked with 4.87 $\mu\text{g/mL}$ anisodamine with acetonitrile and with solid-phase extraction

2.5.5 山莨菪碱对映体的血药浓度-时间曲线

将15片消旋山莨菪碱(5 mg/片)磨成粉末, 雄兔[体重(2.5 \pm 0.25) kg]每日口服1次, 连续给药3 d, 于第3 d给药后, 在0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12 h抽取兔动脉血2.0 mL, 血浆放置30 min后在4000 r/min条件下离心10

min, 分离血清。取0.50 mL血清, 按照实验1.5.3节步骤对样品进行处理和电泳分离分析, 电泳图见图4。电泳峰经加标和紫外光谱图确认, 图中的1, 2, 3, 4为山莨菪碱的4个对映体, 所研究的3只雄兔中均能检出山莨菪碱的4个对映体, 没有出现文献[11]报道的立体选择性

表3 精密度和准确度($n=5$)
Table 3 Precision and accuracy ($n=5$)

Sample/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	山莨菪碱对映体	日内			日间		
		测得平均值/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD/%	回收率 ^a /%	测得平均值/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD/%	回收率 ^a /%
38.92	1	38.40	2.2	98.7	38.20	3.8	98.2
	2	38.50	2.5	98.9	38.25	3.7	98.3
	3	39.40	2.8	101.0	38.95	4.0	100.0
	4	39.50	3.0	101.0	39.00	4.2	100.0
4.87	1	4.75	3.3	97.5	4.70	4.5	96.5
	2	4.78	3.4	98.2	4.72	4.4	96.9
	3	4.98	3.7	102.0	4.88	4.9	100.0
	4	5.02	3.8	103.0	4.92	4.6	101.0
0.61	1	0.59	3.6	96.7	0.58	5.4	95.1
	2	0.60	3.8	98.4	0.59	5.8	96.7
	3	0.63	4.0	103.0	0.60	6.1	98.4
	4	0.64	4.2	105.0	0.62	6.5	102.0

^a回收率=测得药物含量平均值/血清药物含量 $\times 100\%$.

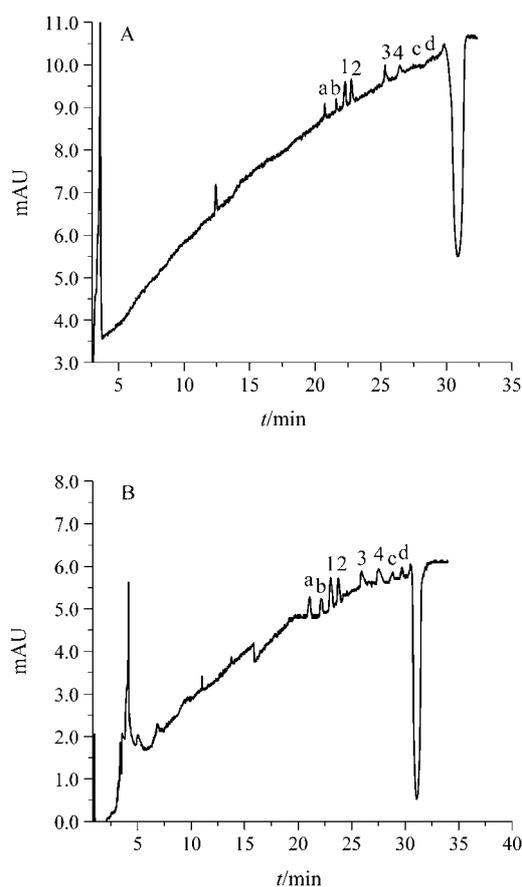


图4 兔服药后血样电泳图

电泳条件同图2. 1, 2, 3, 4为山莨菪碱的4个对映体; a, b, c, d可能是山莨菪碱的代谢产物

Figure 4 Electropherograms of rabbit serum after oral administration of 75 mg anisodamine

Analytical conditions were as for Figure 2. (A) 0.5 h; (B) 1.0 h.; Peaks 1, 2, 3, and 4 were anisodamine enantiomers; Peaks a, b, c and d were probably anisodamine metabolites

配置现象. 且在紫外光谱图确认过程中, 发现一些新的电泳峰 a, b, c, d, 其紫外光谱图与山莨菪碱的光谱图一致, 成对出现, 类似对映体, 且峰面积随时间变化. 根据文献[8]的报道, 山莨菪碱在动物体内经代谢先后共有6~7种代谢物存在, 因此推测 a, b, c, d可能是山莨菪碱的代谢产物.

根据兔血清中山莨菪碱含量的测定结果, 得山莨菪碱4个对映体的血药-时间曲线图(图5). 图5中, 兔口服山莨菪碱后, 4个对映体血药浓度在1.5 h达到峰值(分别为0.54, 0.50, 0.47, 0.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 与文献[9]报道相一致. 从图5可以看出: 在1.5 h后山莨菪碱的代谢速度大于吸收速度, 其中在1.5~3 h迅速下降, 在3~8 h较平稳, 12 h后本仪器几乎测不到兔中的血药浓度, 说明山莨菪碱吸收迅速, 属于快分布型药物. 与单剂量一样, 多剂量消旋体的山莨菪碱在体内没有引起累积.

手性药物因立体选择性不同, 与血浆蛋白的结合率也不同, 使药物对映体进入体循环的量和速度不同. 山莨菪碱4个对映体的血药-时间曲线中, 在0.5 h时对映体4血药浓度最高, 其次是1, 3对映体, 表明对映体4的释放速度最快, 而对映体2的释放速度最慢; 在1.5 h时, 1的峰值达到最高, 接着是第4, 2, 3个对映体. 相比之下, 山莨菪碱4个对映体中对映体1在1.5 h内释放速度最快, 对映体3释放速度最慢; 在1.5 h以后, 就整个吸收情况来看, 对映体1下降最快, 被迅速吸收, 对映体2下降最平缓, 吸收速度最慢.

3 结论

(1) 建立一种毛细管电泳手性拆分山莨菪碱的4种

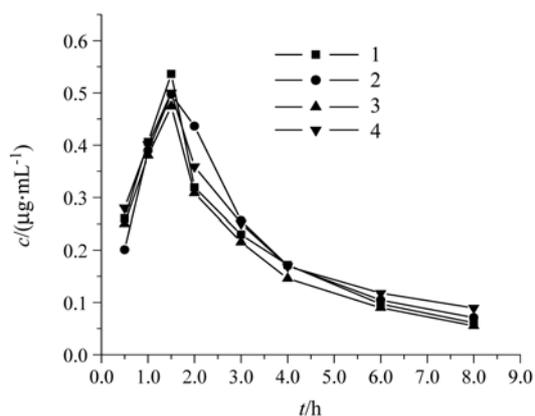


图5 山莨菪碱的4个对映体的血药浓度-时间曲线

Figure 5 The concentration-time profiles of 4 anisodamine enantiomers in blood

光学异构体的方法。在 110 mmol/L Tris-H₃PO₄ 缓冲液中, 加入 20 mg/mL HP-β-CD 和 5 mg/mL CM-β-CD (pH 4.0), 运行电压 20 kV, 毛细管柱温 25 °C, 检测波长 214 nm 的条件下, 山莨菪碱的 4 个对映体获得完全分离。

(2) 采用固相萃取技术以 1.0 mL Tris-H₃PO₄ (pH 6.8)的水溶液和 1.0 mL 80%甲醇水溶液为洗涤剂, 3.0 mL 甲醇(pH 5.0)为洗脱剂时能较好地消除血清蛋白、血清内源性干扰物质的干扰, 应用于兔体内血药浓度的检测, 得到了山莨菪碱 4 个对映体在兔体内的血药浓度的变化曲线图, 发现山莨菪碱 4 个对映体在兔体内可能的代谢产物及其在兔体内的吸收和代谢速率有所不同。

References

1 Petterson, C. *Trends Anal. Chem.* **1988**, 7, 207.

- 2 Zheng, C.-S.; Xie, J.-X. *Acta Pharma. Sinica* **1991**, 26(2), 96 (in Chinese).
(郑长胜, 谢晶曦, 药学学报, **1991**, 26(2), 96.)
- 3 Xie, L.; Chi, H.; Zhou, T.-H. *Acta Pharma. Sinica* **1991**, 26(7), 527 (in Chinese).
(谢蓝, 池华, 周同惠, 药学学报, **1991**, 26(7), 527.)
- 4 Kuhn, R.; Hoffstetter-Kuhn, S. *Chromatographia* **1992**, 34, 505.
- 5 Wu, J.-S.; Lin, X.-L. *J. Anal. Sci.* **2005**, 21(3), 277 (in Chinese).
(吴俊森, 林秀丽, 分析科学学报, **2005**, 21(3), 277.)
- 6 Lin, M.; Zhang, Z.-X.; Chen, Y. *Chin. J. Pharma.* **2007**, 38(8), 580 (in Chinese).
(林梅, 张正行, 陈怡, 中国医药工业杂志, **2007**, 38(8), 580.)
- 7 Cheng, Q.-C.; Li, X.-R.; Wang, H. *Chin. J. Pharma. Anal.* **1998**, 18(3), 149 (in Chinese).
(程庆春, 李学仁, 王洪, 药物分析杂志, **1998**, 18(3), 149.)
- 8 Chen, H.-X.; Du, P.; Han, F.-M.; Chen, Y. *Acta Pharma. Sinica* **2006**, 41(6), 518 (in Chinese).
(陈怀侠, 杜鹏, 韩凤梅, 陈勇, 药学学报, **2006**, 41(6), 518.)
- 9 Zhou, H.-B.; Zhang, H.; He, X. *Chin. J. Chromatogr.* **1996**, 14(1), 60 (in Chinese).
(周宏兵, 张桓, 何新, 色谱, **1996**, 14(1), 60.)
- 10 Ma, P.; Wu, C.-Y. *Acta Pharma. Sinica* **1992**, 27(10), 763 (in Chinese).
(马鹏, 伍朝员, 药学学报, **1992**, 27(10), 763.)
- 11 Fan, G. R.; Hong, Z. Y.; Lin, M.; Yin, X. P.; Wu, Y. T. *J. Chromatogr. B* **2004**, 809(2), 265.

(A0807305 Chen, J.; Fan, Y.)