

还原型电化学极谱检测高效液相色谱法测定 人血浆中青蒿酯和双氢青蒿素*

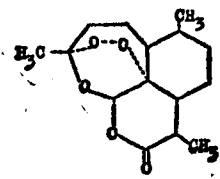
杨树德 马建民 孙娟华** 宋振玉

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

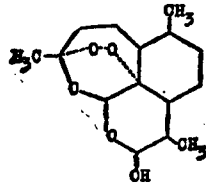
摘要 利用青蒿酯及其活性代谢产物双氢青蒿素可在滴汞电极上还原的性质, 建立了同时测定人血浆中此二者的还原型电化学极谱检测高效液相色谱法。本法灵敏、准确、特异性强, 血药浓度 20~800 ng/ml 范围内线性关系良好, 变异系数小于 9%, 适用于药代动力学和临床药理研究的需要。

关键词 青蒿酯; 双氢青蒿素; 血药浓度测定; 还原型电化学检测高效液相色谱法

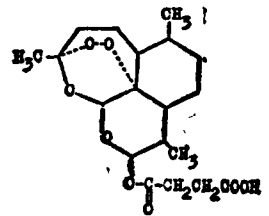
青蒿酯为双氢青蒿素的 12- α 琥珀酸酯, 是青蒿素的活性衍生物, 临床以 5% 碳酸氢钠溶液溶解后静脉注射, 对治疗和抢救恶性疟和脑型疟等疗效显著, 优于其他抗疟药, 并对耐氯喹株疟原虫感染亦有效⁽¹⁾。



青蒿素



双氢青蒿素



青蒿酯

为研究其临床药代动力学性质并进而指导临床合理用药, 测定青蒿酯及其活性代谢产物双氢青蒿素的血药浓度是十分必要的; 但由于二者既无紫外吸收亦无荧光, 方法学上的困难较大。从化学结构上考虑, 青蒿素及其活性衍生物中的过氧桥应为电化学活性基团, 我们用循环伏安法研究了这类化合物在玻碳、汞膜、悬汞和滴汞电极上的电极行为, 结果表明, 这类化合物在玻碳电极上无响应, 而在滴汞电极上的反应很好。据此, 以还原型电化学极谱检测高效液相色谱法^(2,3)建立了同时测定人血浆中青蒿酯和还原青蒿素的方法。本法灵敏、准确, 特异性和重现性好, 已应用于药代动力学和临床药理的研究。后一方面的工作另文报道⁽⁴⁾。

材 料 与 方 法

试剂与标准品

甲醇 北京化工厂; 二氯甲烷 上海试剂三厂; 乙醚 北京红星化工厂; 冰醋酸 北京

本文于 1985 年 1 月 19 日收到

* 本项研究工作得到联合国开发计划署/世界银行/世界卫生组织/热带病研究培训特别规划疟疾化疗工作组的部分资助

** 防化研究院

化工厂；汞 北京化工厂；以上均为二级。硫酸铵 北京化工厂 优级纯。高纯氮 北京氧气厂。水为石英蒸馏水或蒸馏水经四次以上离子交换。青蒿酯 桂林第二制药厂；双氢青蒿素 山东中医药研究所；两者在五氧化二磷干燥器中减压数小时后密封过夜，用甲醇各配成 100 ng/ μ l 的储备溶液，置冰箱中保存，该储备液再稀释成 10 ng/ μ l 的标准溶液备用。

色谱和电化学检测条件

整个高效液相色谱系统的示意图见图 1。

高压泵，Waters 6000 A solvent delivery system。进样阀，Rheodyne 7105, 175 μ l loop。色谱柱，YWG-C₁₈H₃₇, 10 μ , 15 \times 0.46 cm；流动相，甲醇—0.03 M (NH₄)₂SO₄—冰醋酸 = 55:45:0.1(V/V)，置图 1 的 1000 ml 三口烧瓶中，在连续通入高纯氮的情况下加热迴流至沸约 20 分钟后保持微沸。高纯氮通入流动相前先经两瓶氯化亚钒⁽⁵⁾溶液进一步洗涤去氧并再经另一瓶甲醇饱和。为防止液体输送过程中空气中的氧渗入流动相，流动相的储瓶至电解池的全部管路均改为不锈钢管。流速：3.0 ml/min。Model 310 极谱检测器 (EG&G PARC) 由 Model 174 极谱仪 (EG&G PARC) 控制。操作方式：取样直流 (sampled DC)。工作电位：-0.24 V (vs Ag/AgCl)。汞滴大小：中。汞滴时间：2 s。电极工作方式：静汞电极 (static mercury drop electrode)。Low pass filter: 3。电流量程：0.5 或 1 μ A。记录仪，台式自动平衡记录仪，上海大华仪器厂，量程，1 V；纸速 4 mm/min。

样品提取条件

取血浆 1 ml 放入 14 ml 磨口试管中，加入 1 滴冰醋酸及一定量青蒿酯和双氢青蒿素标

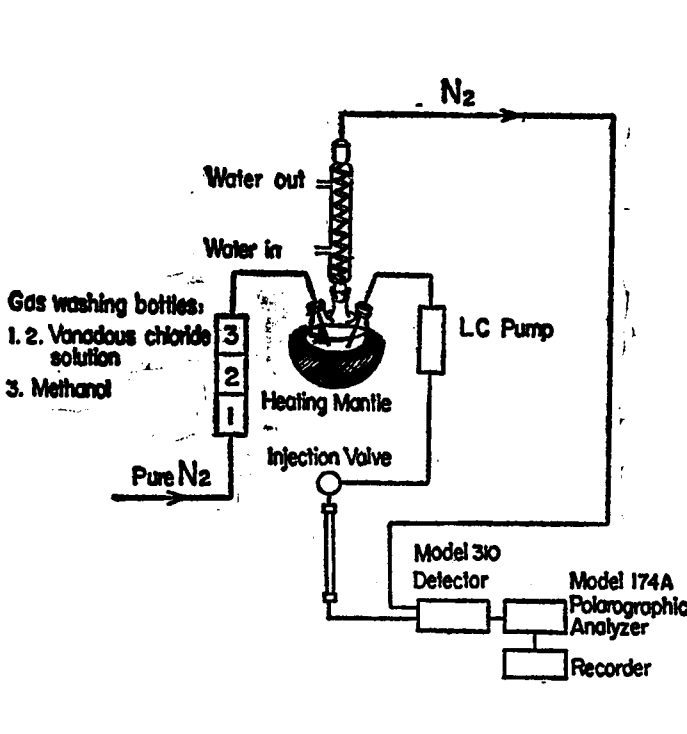


Fig 1. Schematic diagram of the reductive mode LCEC system using polarographic detector

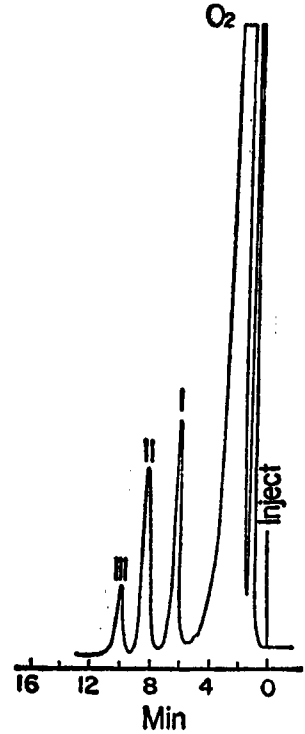


Fig 2. chromatogram of pooled plasma (containing 400 ng/ml each of artesunate (II), and dihydroqinghaosu (I. α -dihydroqinghaosu, III. β -dihydroqinghaosu)

准溶液,加入乙醚-二氯甲烷(5:4)混合溶剂 10 ml, 密塞, 振摇 10 分钟, 于 3000 r/min 离心 5 分钟。转移全部有机相至另一离心管中, 在约 35°C 水浴中用氮气吹干后置冰箱中保存。测定前用 50~60 μ l 甲醇溶解残渣, 放置约 5 分钟后全部注入进样器的样品环(loop)中, 继用约 25 μ l 水洗涤离心管, 合并注入样品环后即可进样。

色谱图

在上述实验条件下自血浆中提取之青蒿酯和双氢青蒿素两个差向异构体的色谱图如图 2 所示。

结 果

流体动力学伏安学曲线

图 3 为在本文给定的其它条件下测得之流体动力伏安学曲线。由该曲线可知, 青蒿酯和双氢青蒿素 α 型和 β 型两个异构体在 -0.24V 均已基本上达到饱和电位。实验结果还表明, 差示脉冲(differential pulse)的基电流较大而检测灵敏度并不优于取样直流(sampled DC)⁽⁶⁾, 故采用了后者的工作方式。为降低基电流和减少其它可能的干扰因素但基本上不牺牲灵敏度, 本文的工作电位选为 -0.24 V (vs Ag/AgCl)。

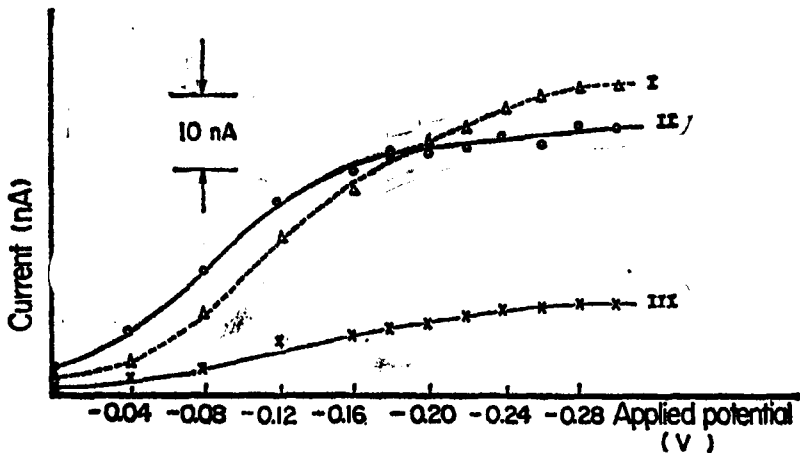


Fig 3. Hydrodynamic voltammograms of α -dihydroqinghaosu(I), artesunate(II) and β -dihydroqinghaosu (III)

回收率和精密度

1. 在 1 ml 空白血浆中加入 1 滴冰醋酸和不同量的青蒿酯和双氢青蒿素标准溶液, 依法提取和进样; 2. 另取空白血浆 1 ml, 加入冰醋酸 1 滴, 提取并转移有机相后再在其中加入相同量的标准溶液, 以下操作不变。1, 2 两组相应色谱峰的峰电流之比, 即为提取回收率。因在本文给定的条件下, 双氢青蒿素两种差向异构体的比例固定, 故仅以其 α 型异构体为代表计算双氢青蒿素的回收率。表 1 列出了不同浓度水平的回收率和精密度, 结果相当满意。

线性关系和标准曲线

于 1 ml 空白血浆中, 各加入 20, 40, 60, 100, 200, 400 和 800 ng 的青蒿酯和双氢青蒿素并以后者的 α 型异构体计算其总量。依法提取并测定, 以峰电流 (nA) 为应变量 (Y), 青蒿酯和双氢青蒿素的血药浓度 (ng/ml) 为自变量 (X), 进行线性回归分析, 所得两者标准曲线的回归方程如下:

Tab 1. Recovery and its precision of artesunate and dihydroqinghaosu from plasma

	Amt added (ng/ml)	Amt recovered Average \pm SD (ng/ml)	Recovery (%) Average \pm SD	CV (%) (n=6)
Dihydroqinghaosu	400	383.2 \pm 18.8	95.8 \pm 4.7	4.9
	80	78.2 \pm 6.8	97.9 \pm 8.5	8.7
	30	28.6 \pm 2.2	95.3 \pm 7.3	7.7
Artesunate	400	379.6 \pm 23.9	94.9 \pm 6.0	6.3
	80	71.1 \pm 4.0	88.9 \pm 5.0	5.6
	30	27.8 \pm 1.9	91.8 \pm 6.4	7.0

$$\text{双氢青蒿素 } Y(nA) = 0.059 X(\text{ng/ml}) + 0.309$$

$$\text{相关系数 } \gamma = 1.000$$

$$\text{青蒿酯 } Y(nA) = 0.05 X(\text{ng/ml}) - 0.033$$

$$\text{相关系数 } \gamma = 1.000$$

上述回归方程表明, 血药浓度相差 40 倍 (20~800 ng/ml), 标准曲线关系良好, Y 轴截距甚小, 可视为通过原点。

拟定方法

视血药浓度的可能范围和血浆量, 准确吸取病人或志愿者血浆 0.20~1.0 ml (血浆用量不足 1.0 ml, 补加空白血浆至 1.0 ml), 加入冰醋酸 1 滴, 依法操作并以当日空白血浆配制的随行标准计算血药含量。

讨 论

电化学检测高效液相色谱必须兼颜色谱分离和电化学检测的条件, 故本文应用 ODS 柱并在甲醇-水的反相体系中加入适量硫酸铵作为电解质。但因青蒿酯为琥珀酸的半羧酸酯, 其羧基部分有一定 pKa 值, 若流动相的酸度偏弱, 其峰形扩散, 在流动相中加入少量冰醋酸进行离子抑制后, 情况即明显改善, 青蒿酯和双氢青蒿素两种差向异构体三者分离情况相当理想 (图 2)。青蒿酯的保留时间介于双氢青蒿素 α 型和 β 型异构体之间, 可能亦系在 ODS 键合相上, 其疏水取代参数 π 和疏水碎片常数 f 比双氢青蒿素 α 型异构体大 而比 β 型小之故⁽⁷⁾。还原型电化学检测的进样溶液一般均需去氧, 本工作受实验条件的限制, 采用了调整色谱体系以避免氧峰干扰的办法。在此情况下, 因需加大流动相中水溶液部分的比例, 保留时间延长, 色谱峰扩散程度增加, 在一定程度上有损于峰电流的灵敏度。

实验中发现, 双氢青蒿素用甲醇溶解后立即进样, 基本上为 β 型异构体, 室温放置时 α 型迅速增加最后达到平衡而以 α 型为主, 两者比例不再变化。故本文采用以 α 型为准计算双氢青蒿素的含量。青蒿酯和双氢青蒿素在纯甲醇中相当稳定, 但提取后的残渣用甲醇溶解后, 可能因血浆中提出的其它成分的影响, 室温放置约半小时两者含量均见明显下降, 所得残渣即使不用甲醇溶解而在室温放置时间过长, 含量亦似有下降趋势。为此, 本工作提取后所得残渣置冰箱中保存, 测定前再取出溶解进样。

在本文给定的条件下, 仅氧和其它有过氧桥结构的化合物可在电极上反应, 且不同的过氧化物又经高效液相色谱进行了分离, 故本法的特异性很强。本文样品预处理步骤的主要目的是为了 保护色谱柱, 液-液提取后的残渣用甲醇重组注入样品环并以水洗涤后合并注入后进样, 系根据反相色谱“大体积进样”原理设计的简易方法, 效果相当满意。实验结果证明, 离体后人血浆中青蒿酯的酶解作用并不显著, 故采样或提取时没有必要加入酶抑制剂。

高效液相的还原型电化学检测, 文献中所见不多, 应用 Model 310 极谱检测器测定人血浆中的药物, 则为数更少⁽²⁾。本工作证明, 由于滴汞电极表面不断更新, 不存在固体电极常见的钝化现象, 加之 Model 310 极谱检测器使用的静汞电极有独特的优点, 测定结果的重现性较好。但还原型电化学检测流动相中去氧是一关键问题, 国外采用超纯氮, 效果较满意⁽³⁾。本工作受条件所限, 用国产高纯氮经氯化亚钒溶液洗涤, 基电流仍稍偏高; 估计若再辅以将氮气通过加热的金属铜去氧, 基电流可望有所下降, 检测灵敏度有可能进一步提高。

致谢 本工作在组装仪器过程中, 得到李百龙同志的帮助; Model 174 极谱仪系从防化研究院借用

参 考 文 献

1. LI Guo-Qiao, et al. Clinical studies on treatment of cerebral malaria with qinghaosu and its derivatives. *J Traditional Chinese Medicine* 1982;2:125.
2. Martin RH, et al. Differential pulse amperometric detection of drugs in plasma using dropping mercury electrode as a high performance liquid chromatographic detector. *J Chromatogr* 1981;222:179.
3. Saroj KV. The evaluation of polarographic detector for high performance liquid chromatography in the determination of N-nitrosamines. *J Chromatogr Sci* 1981;18:379.
4. 杨树德等. 青蒿素的临床药代动物学. 中国临床药理杂志 印刷中.
5. EG & G Princeton Applied Research. Model 303A static mercury drop electrode operating and service manual. 1984.
6. EG & G Princeton Applied Research. Model 310 polarographic detector operating and service manual. 1978.
7. 张仁斌等. 反相高效液相色谱法分离青蒿素及其衍生物. 药学学报 1981;16:460.

DETERMINATION OF ARTESUNATE AND DIHYDROQINGHAOSU IN HUMAN PLASMA BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH REDUCTIVE MODE ELECTROCHEMICAL DETECTION*

YANG Shu-De, MA Jian-Min, SUN Juan-Hua** and SONG Zhen-Yu

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

ABSTRACT A reductive HPLC-EC method using Model 310 polarographic detector (EG&G PARC) for the determination of artesunate and its active derivative dihydroqinghaosu in human plasma has been established. The whole HPLC system is shown in fig 1 and stainless steel tubing was used throughout from mobile phase to electrolytic cell. The procedure is as follows: transfer 0.20 to 1.0 ml of plasma into a 14 ml glass centrifuge tube, add one drop of glacial acetic acid and 10 ml of ethyl ether-dichloromethane (5:4, V/V), shake for 10 minutes and centrifuge for 5 minutes at 3000 r/min. Transfer the organic phase into another centrifuge tube as completely as possible and evaporate to dryness under N₂ stream at about 35°C. Keep the tube containing the residue in a refrigerator and reconstitute the residue with about 50 μl methanol before assay. Load the reconstituted solution into the injection loop followed with about 30 μl of water to wash the tube and then inject the two solutions in the loop into the chromatograph using the following conditions: column, 15 × 0.46 cm packed with ODS (YWG-C₁₈H₃₇, made

* Partial financial support was received from UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, under the SWG-CHEMAL

** Research Institute of Chemical Defence

in China), mobile phase, MeOH—0.03 M(NH₄)₂SO₄—glacial HAc=55:45:0.1 (V/V) which must be deaerated by purging pure N₂ gas under reflux all the time; flow rate, 3.0 ml/min. The Model 310 detector was controlled by Model 174 polarographic analyzer (EG&G PARC) operated in sampled DC mode with a fixed potential of -0.24 V(vs Ag/AgCl); operate mode, static mercury drop electrode; drop time, 2 second; drop size, middle.

This method is selective, sensitive and has a good linearity. The absolute recoveries of artesunate and dihydroqinghaosu were found to be above 90% in general with CV values of less than 9%. This method is suitable for the study of pharmacokinetics of these two antimalarial drugs.

Key words Artesunate; Dihydroqinghaosu; Determination of blood concentration for antimalaria drugs; Reductive mode HPLC-ECD