

液相色谱-质谱联用法测定犬血浆中盐酸关附甲素的血药浓度及其药代动力学

吴民淑¹, 王广基^{1*}, 蔡晓辉¹, 孙建国¹, 刘静涵²

(中国药科大学 1. 药代研究中心, 2. 植化教研室, 江苏 南京 210009)

摘要: 目的 建立用于测定盐酸关附甲素血药浓度的液相色谱-质谱联用分析方法, 并探讨关附甲素在犬体内的药代动力学。方法 犬 6 只 iv 盐酸关附甲素 $7.56 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后采集一系列血样, 利用 LC-MS 联用系统测定血浆药物浓度, 并用 3P87 软件拟合求算药代动力学参数。结果 盐酸关附甲素浓度 $0.42 \sim 21.2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好 ($r = 0.9994$)。绝对回收率高于 80%, 日内、日间 RSD 均小于 15%, 符合生物样品分析要求。6 只犬 iv 盐酸关附甲素 $7.56 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后的血药浓度-时间曲线符合开放三室模型, 其快分布相、慢分布相和末端消除相的半衰期 ($T_{1/2\alpha}$, $T_{1/2\beta}$ 和 $T_{1/2\gamma}$) 分别为 0.07, 1.5 和 13.5 h。曲线下面积 (AUC)、中央室分布容积 (V_c) 和血浆清除率 (CL_s) 分别为 $61.43 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.37 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $0.14 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。结论 建立的 LC-MS 联用方法专属性强, 灵敏度高, 可用于盐酸关附甲素的体内定量分析。

关键词: 关附甲素; 液相色谱-质谱; 药代动力学

中图分类号: R917.101

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2002)07 - 0551 - 04

关附甲素 (guanfu base A, GFA) 为毛茛科植物黄花乌头 *Aconitum coreanum* (Lévl.) Rapaics 的块根——关白附子中提取分离得到的活性单体化合物 (图 1) 是由中国药科大学研制的抗心律失常一类新药^[1]。药理研究表明, 关附甲素能减慢心律, 显著降低 CaCl_2 诱发的大鼠室颤发生率和死亡率^[2], 有稳定心肌细胞膜及阻断钠通道等电生理活性^[3]。该药在其最大吸收波长 207 nm 下仅有弱紫外吸收, 因此用一般的 HPLC 紫外检测法难以测定体内 GFA 的浓度。文献^[4]报道, 关附甲素经衍生化后用 GC-ECD 检测其在兔血浆中的药物浓度, 该方法操作繁琐、费时、测定误差较大。本文用 LC-MS 联用技术, 建立了简

便、灵敏的体内分析方法, 为盐酸关附甲素的临床药代动力学研究提供可靠的检测手段, 并以此法研究了犬 iv 盐酸关附甲素后的体内药代动力学过程。

材料与 方法

药品与试剂 盐酸关附甲素由中国药科大学植化教研室提供, 纯度高于 98%; 内标盐酸拉贝洛尔由江苏华朋制药厂赠送; 乙腈为色谱纯, 美国 TEDIA 公司产品; 其余有机溶剂均为分析纯, 南京化学试剂厂产品; 所有水溶液均用自制三蒸水配制。

实验动物 犬 6 只, 体重 (8.8 ± 1.7) kg, 由中国药科大学实验动物饲养中心提供。

仪器 HP1100 型液相色谱-质谱联用系统, 含双高压泵, 在线真空脱气机, 自动进样器, 柱温箱, 气动辅助电喷雾离子化接口的四极质谱检测器, 数据处理系统为 HP ChemStation Rev. A.06.03 [509]。

色谱条件 色谱柱为 Shimadzu VP-ODS, 粒径 $5 \text{ } \mu\text{m}$, $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm ID}$; 流动相为 0.5% 乙酸-乙腈 (80:20); 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱后分流比是 6:4; 柱温为 $20 \text{ } ^\circ\text{C}$ 。

电喷雾参数 干燥气流速: $10 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; 雾化室压力: 172 kPa; 干燥气温度: $350 \text{ } ^\circ\text{C}$; 毛细管电压: 4 000 V。

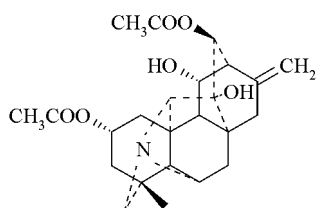


Figure 1 Chemical structure of guanfu base A (GFA)

收稿日期: 2001-08-20.

基金项目: 国家自然科学基金 (39970862), 国家 973 项目 (G998051119).

* 通讯作者 Tel: (025) 3271544, Fax: (025) 3302827,

E-mail: gjwang@mailbox.cpu.edu.cn

质谱检测参数 离子化方式:气动辅助电喷雾离子化;选择性离子监测(SIM):关附甲素 m/z :430 $[M+H]^+$,拉贝洛尔 m/z :329 $[M+H]^+$,传输电压:70 V。

血浆样品处理方法 于干净试管中精密加入血浆 0.5 mL 和 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内标盐酸拉贝洛尔溶液 $10 \mu\text{L}$,涡旋振荡 10 s,再加入饱和 NaHCO_3 溶液 0.5 mL,混匀后加入乙酸乙酯 5 mL,涡旋振荡 3 min,于 $1000 \times g$ 离心 5 min,取上清液 4 mL 定量转移至另一干净试管中,于 50°C 水浴中空气流挥干。残渣用流动相 $200 \mu\text{L}$ 溶解, $6000 \times g$, 4°C 离心 10 min,取上清液 $5 \mu\text{L}$ 进样分析。

实验方案 犬 6 只,体重 $(8.8 \pm 1.7) \text{ kg}$,♀ ♂ 各半,实验前 12 h 开始禁食不禁水。于犬前肢浅隐静脉 iv 盐酸关附甲素生理盐水溶液,剂量为 $7.56 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。分别在 iv 后 3, 10, 15, 30, 45, 60 min 以及 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0 h, 于另一侧浅隐静脉取血 2 mL,置肝素化试管中,于 $1000 \times g$ 离心 10 min,转移血浆,立即置于 -20°C 冰箱保存至分析。

数据分析 将所得盐酸关附甲素在犬体内的血药浓度-时间数据用 3P87 软件拟合,以 AIC 值为拟合度指标确定所采用的房室模型,并求算盐酸关附甲素在犬体内的各项药代动力学参数。

结 果

1 色谱行为

LC-MS 联用测定关附甲素时,采用选择性离子监测方式,因此其专属性强,响应值较高,血浆中杂质不干扰样品的测定。关附甲素和内标的保留时间分别为 1.6 和 4.4 min(图 2)。

2 盐酸关附甲素在犬血浆中的标准曲线

分别取犬空白血浆 0.5 mL,精密加入不同量的盐酸关附甲素标准溶液,使成含盐酸关附甲素 $0.42, 2.1, 4.2, 12.7$ 和 $21.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的盐酸关附甲素血浆样品,按“血浆样品处理方法”项下操作,分别记录峰面积。以样品的提取离子流峰面积(A_s)与内标的提取离子流峰面积(A_{is})的比值(A_s/A_{is})对浓度(C)作直线回归,得标准曲线回归方程: $A_s/A_{is} = 0.3429 C - 0.0568$ ($n=5, r=0.9994$)。

3 回收率与精密度

取空白犬血浆 0.5 mL,精密加入不同量的盐酸关附甲素标准品,使其浓度分别为 $0.42, 4.20$ 和

$12.70 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,按“血浆样品处理方法”项下操作,记录样品与内标离子流峰面积比值 f_x 。另于试管中精密加入含 GFA 分别为 $0.21, 2.10$ 和 $6.40 \mu\text{g}$ 的标准溶液和 $10 \mu\text{L}$ 内标溶液,将溶剂挥干后加入 $200 \mu\text{L}$ 流动相,振荡 30 s,取 $5 \mu\text{L}$ 进样,记录样品与内标离子流峰面积的比值 f_s 。按下式求算盐酸关附甲素的绝对回收率: $R\% = f_x/f_s \times 100\%$ 。

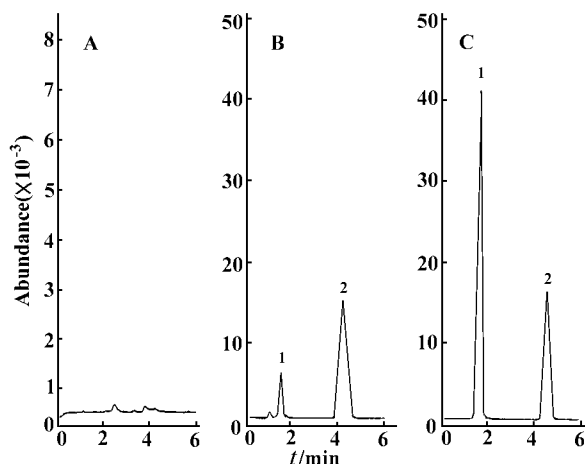


Figure 2 Chromatograms of guanfu base A (GFA) in dog plasma

1. GFA; 2. Labetalol (internal standard). A. Blank plasma; B. Blank plasma spiked with GFA and labetalol; C. Plasma sample of a dog after iv administration of GFA saline solution

再配制浓度为 $0.42, 4.20$ 和 $12.70 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的盐酸关附甲素血浆样品,按“血浆样品处理方法”项下操作,测定方法的日内 RSD 和连续 5 d 内的日间 RSD。

结果表明高、中、低 3 种浓度的绝对回收率 ($n=5$) 分别为 $(100 \pm 8)\%$, $(92 \pm 8)\%$ 和 $(95 \pm 5)\%$, 日内及日间 RSD 均小于 15%,符合生物样品测定要求。

4 犬 iv 给药后药代动力学

6 只犬单剂量 iv 盐酸关附甲素 $7.56 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后,测定不同时间的平均血药浓度-时间数据见图 3。将该数据用 3P87 药代动力学程序拟合,以 AIC 值为拟合度指标进行模型识别,结果表明关附甲素 iv 后的药代动力学符合开放三室模型,在犬体内的末端相半衰期为 13.5 h,曲线下面积 AUC 为 $61.43 \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$,中央室分布容积 V_c 和清除率 CL_s 分别为 $0.37 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$, $0.14 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。求算的各主要药理学参数见表 1。

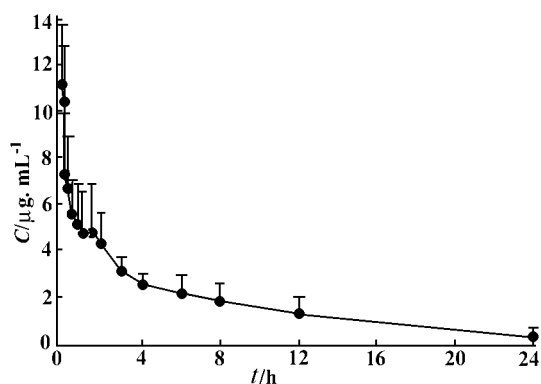


Figure 3 Mean plasma concentration-time curve of GFA after iv administration of $7.56 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ GFA to 6 dogs ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Main pharmacokinetic parameters of GFA after iv administration of $7.56 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ in dogs

| Parameter | Dog number | | | | | | $\bar{x} \pm s$ |
|---|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| $V_d / \text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 0.76 | 0.14 | 0.13 | 0.29 | 0.22 | 0.66 | 0.37 ± 0.28 |
| $T_{1/2\pi} / \text{h}$ | 0.08 | 0.01 | 0.01 | 0.04 | 0.01 | 0.24 | 0.07 ± 0.09 |
| $T_{1/2\alpha} / \text{h}$ | 1.98 | 2.12 | 0.26 | 1.55 | 1.67 | 1.43 | 1.5 ± 0.7 |
| $T_{1/2\beta} / \text{h}$ | 14.55 | 10.24 | 8.01 | 23.71 | 7.97 | 16.78 | 14 ± 6 |
| K_{12} / h^{-1} | 3.77 | 42.96 | 33.12 | 12.80 | 42.43 | 0.04 | 22 ± 19 |
| K_{21} / h^{-1} | 4.90 | 7.47 | 10.13 | 3.88 | 6.70 | 2.89 | 6.0 ± 2.6 |
| K_{13} / h^{-1} | 0.20 | 0.55 | 8.76 | 1.09 | 0.69 | 0.25 | 2 ± 3 |
| K_{31} / h^{-1} | 0.21 | 0.21 | 0.84 | 0.17 | 0.29 | 0.13 | 0.31 ± 0.26 |
| K_{10} / h^{-1} | 0.14 | 0.71 | 1.38 | 0.35 | 0.94 | 0.16 | 0.6 ± 0.5 |
| $\text{AUC} / \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ | 70.46 | 77.35 | 40.62 | 72.76 | 36.81 | 70.55 | 61 ± 18 |
| $\text{CL}_d / \text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ | 0.11 | 0.10 | 0.19 | 0.10 | 0.21 | 0.11 | 0.14 ± 0.05 |

讨 论

盐酸关附甲素在最大吸收波长 207 nm 下仅有弱紫外吸收,而血浆中杂质的紫外末端吸收较多,用普通 HPLC 紫外检测器难以测定其体内药物浓度,且专属性较差。文献^[4,5]报道的 GC-ECD 法需用三氟醋酐进行衍生化处理,样品提取过程中吹干的时间过长及气流量过大都会引起内标和关附甲素的损失,时间过短则三氟醋酐去除不尽会污染 ECD,生成的双-三氟乙酸酯衍生物溶于乙酸乙酯后迅速降解,因此其操作相当繁琐、费时,易产生较大误差,对操

作要求较高。本文用 LC-MS 联用技术,建立了更为简便的盐酸关附甲素血药浓度测定方法,通过选择性监测样品和内标的分子离子峰进行定量,具有很高的专属性。每一样品的分析时间只需 6 min,比 GC-ECD 法缩短了一半以上。研究结果表明,此法灵敏度高(最低检测限可达 0.02 ng),方法的重现性好,操作简便、快速、准确,符合生物样品分析要求,可用于盐酸关附甲素的体内定量分析。

本文首次进行了 GFA 在犬体内的药代动力学研究,继家兔、小鼠、大鼠和人体内的药代动力学研究后,充实了 GFA 药代动力学方面的资料,为进一步研究临床药代动力学提供了参考依据。目前公开发表的文献^[5]中,只有在人体 iv 盐酸关附甲素 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后的药代动力学研究。本文研究所得到的盐酸关附甲素在犬体内 iv 后的房室模型识别结果, V_c , CL_s 和 $T_{1/2\pi}$ 等参数值与文献报道的人体内结果较为一致,但 $T_{1/2\alpha}$ 和 $T_{1/2\beta}$ 值较人体内为长,说明盐酸关附甲素在两者的代谢有种种属间差异。也正因为对此差异的估计不足,仅借鉴前期资料($T_{1/2} < 7 \text{ h}$)而设定采样时间,故导致了在犬药代动力学研究中采样时间的偏短,最好应延长至 36 ~ 48 h 为好。

REFERENCES:

- [1] Liu JH, Wang HC, Gao YL, *et al.* Studies of Chinese monkshood XVI. A new alkaloid from Korean monkshood root (2) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1981, 12(3): 1 - 2.
- [2] Hou DH, Li L, Wang QJ, *et al.* Effects of guanfu base A on experimental arrhythmia [J]. *J Nanjing Coll Pharm* (南京药学院学报), 1981, (2): 68 - 74.
- [3] Zhang LY, Ji HF, Chang XS, *et al.* Effect of guanfu base A on action potential of guinea-pig papillary muscles in comparison with class I antiarrhythmic drugs [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1994, 25(1): 49 - 52.
- [4] Yang LL, Yang XJ, Liu JH, *et al.* Studies on the analytical method of a new arrhythmic guanfu base A in rabbit plasma [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 1992, 27(7): 533 - 538.
- [5] Wang GG, Cui HD, Wang GJ, *et al.* Evaluation of pharmacokinetics of the hydrochloride guanfu base A [J]. *Chin J Clin Pharmacol* (中国临床药理学杂志), 2000, 16(4): 283 - 285.

DETERMINATION OF GUANFU BASE A HYDROCHLORIDE IN PLASMA BY LC-MS METHOD AND ITS PHARMACOKINETICS IN DOGS

WU Min-shu¹, WANG Guang-ji¹, CAI Xiao-hui¹, SUN Jian-guo¹, LIU Jing-han²

(1. Center of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2. Department of Phytochemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an analytical method for determination of guanfu base A (GFA) concentration in plasma and to study its pharmacokinetic profile in dogs. **METHODS** Six dogs were given a $7.56 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ dose intravenously. Blood samples were collected at various time-points after drug administration. Analytical method based on liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) was established to determine the plasma concentration of GFA. Pharmacokinetic evaluation was carried out using the 3P87 program. **RESULTS** The calibration curves were linear over the concentration range from $0.42 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ to $21.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r = 0.9994$). The intra-day and inter-day precisions were generally good ($<15\%$) at low, medium and high concentrations. The overall recovery of the analytes was more than 80%. Six dogs were given an iv dose of $7.56 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of GFA hydrochloride, an open three compartment model best described the concentration-time profiles for GFA. The half-lives for the rapid and slow distribution phase and terminal elimination phase ($T_{1/2\pi}$, $T_{1/2\alpha}$ and $T_{1/2\beta}$) were 0.07 h, 1.5 h, and 13.5 h, respectively. The total area under the plasma concentration-time curve (AUC), the volume of the central compartment (V_c), and plasma clearance (CL_s) were $61.43 \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.37 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $0.14 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively. **CONCLUSION** The analytical method was shown to be sensitive, specific, rapid and reproducible, and was suitable for pharmacokinetic studies of GFA.

KEY WORDS: guanfu base A; liquid chromatography-mass spectrometry; pharmacokinetics