

HPLC测定人血浆中山莨菪碱的浓度

陈小陆¹, 任斌^{1*}, 李磊², 吴喜英¹, 陈孝¹ (1. 中山大学附属第一医院, 广州 510080; 2. 中山大学附属第一医院黄埔院区, 广州 510730)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定人血浆中山莨菪碱的血药浓度。方法 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-10 mmol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液 (pH 3.0, 内含 10 mmol·L⁻¹高氯酸) (20:80); 柱温: 室温; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 214 nm。结果 标准曲线的线性范围为 0.5~50 mg·L⁻¹ ($r=0.9997$, $n=7$), 低、中、高 3 种浓度的平均回收率为 (87.2 ± 2.2)%, (92.5 ± 1.0)%, (89.3 ± 2.1)%, 日内 RSD ≤ 2.5%, 日间 RSD ≤ 5.2%。山莨菪碱的最低检出量为 0.1 mg·L⁻¹。结论 本方法简单、灵敏、重现性好, 适用于山莨菪碱临床血药浓度测定及人体药动学研究。

关键词: 山莨菪碱; 血药浓度; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-2494 (2008) 23-1829-03

Determination of Anisodamine in Human Plasma by HPLC

CHEN Xiao-lu¹, REN Bin^{1*}, LI Lei², WU Xi-ying¹, CHEN Xiao¹ (1. First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Huangpu Division of First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510730, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a HPLC method for the determination of anisodamine in plasma. **METHODS** The HPLC separation was carried out on a Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column, mobile phase was a mixture of acetonitrile and 10 mmol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate buffer (pH 3.0, including 10 mmol·L⁻¹ perchloric acid) (20:80). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 214 nm. **RESULTS** A good linearity of anisodamine in plasma was obtained over the range of 0.5 to 50 mg·L⁻¹ ($r=0.9997$, $n=7$). Within the range, the recoveries of three different concentrations were (87.2 ± 2.2)%, (92.5 ± 1.0)%, (89.3 ± 2.1)%, and the RSDs of intra-day and inter-day validation were less than 2.5% and 5.2%, respectively. The detection limit of anisodamine was 0.1 mg·L⁻¹. **CONCLUSION** The method is reproducible, convenient and sensitive for plasma concentration monitoring and clinical pharmacokinetic study of anisodamine.

KEY WORDS: anisodamine; plasma concentration; HPLC

山莨菪碱 (anisodamine) 为我国特产茄科植物山莨菪 (*Anisodus tanguticus*) 根中提取的一种生物碱, 常称“654”。其天然品称为“654-1”, 人工合成品称为“654-2”^[1]。654-2为 M胆碱受体阻断药, 临床用途十分广泛, 可用于感染中毒性休克、神经痛、脑血管栓塞、眼底疾患、突发性耳聋、胃、肠、胆道绞痛等^[1], 同时也可用于肝炎、肾炎和糖尿病的治疗^[2]。山莨菪碱还曾用于治疗 2003 年非典中的低氧血症病人^[3]。尽管 654-2 有很高的治疗价值, 但目前国内外还很少有关于 654-2 血药浓度测定方法的相关报道。为评价 654-2 在人体内的药动学特征, 并为临床有效治疗提供参考数据, 我们建立了一种简单、高效、灵敏的 HPLC 测定人血浆中 654-2 的药物浓度, 用于临床上 654-2 血药浓度测定以及人体药动学研究, 为

654-2 的合理用药提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

Waters 高效液相色谱系统 (515 型泵, 486 型紫外检测器, Millennium³² 色谱工作站); MN-2800D 氮吹仪 (Auto Science); KS 型康氏振荡器 (广州市富城仪器厂); XW-80A 旋涡混合器 (上海医科大学仪器厂); Sigma 3K18 高速冷冻离心机; 高速离心机 (美国雅培公司 IDX 仪附件)。

1.2 药品与试剂

654-2 对照品 (民生药业, 批号 RCA0512003, 纯度为 99.5%); 阿托品片 (江苏方强制药, 规格: 0.3 mg, 批号: 20060320); 乙腈 (色谱纯); 其余试剂均为分析纯。水为二次重蒸水。

作者简介: 陈小陆, 女, 药师 * 通讯作者: 任斌, 男, 硕士, 副主任药师

Tel: (020) 87755766-8430

E-mail: renbinsys@sina.com

1.3 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (4.6 mm ×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-10 mmol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液 (pH 3.0, 内含 10 mmol·L⁻¹高氯酸) (20:80); 柱温: 室温; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 214 nm。

1.4 血药浓度测定法

1.4.1 标准溶液的配制 精密称取 654-2 对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 得 5 g·L⁻¹的 654-2 储备液。将 654-2 储备液用甲醇稀释, 配制质量浓度为 12.5, 25, 50, 125, 250, 625, 1 250 mg·L⁻¹的 654-2 标准溶液, 储备液及标准溶液均于 4℃下保存。

1.4.2 内标溶液的配制 取阿托品片剂适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加入适量甲醇, 37℃恒温振荡使片剂完全溶解后定容, 过滤。吸取滤液 1.67 mL, 用甲醇稀释至 10 mL, 得质量浓度为 125 mg·L⁻¹的内标溶液, 于 4℃下保存。

1.4.3 血浆样品处理与测定 吸取内标溶液 20 μL, 置 10 mL 离心管中, 氮气吹干后加入血浆样品 500 μL 和 0.5 mol·L⁻¹的氢氧化钠溶液 10 μL, 旋涡混匀 10 s 后加入乙酸乙酯 1.5 mL, 水平震荡 15 min, 4 500 r·min⁻¹离心 5 min, 分离有机层, 置于 1.5 mL 离心管中以 N₂流吹干。下层溶液加入乙酸乙酯 1.5 mL, 水平震荡 15 min, 4 500 r·min⁻¹离心 5 min, 合并有机层于 1.5 mL 离心管中以 N₂流吹干。加入体积分数 75% 甲醇溶液 75 μL, 旋涡混匀 30 s, 10 000 r·min⁻¹离心 5 min, 取上清液 20 μL 进样。记录色谱图, 以 654-2 峰面积 (A_s) 与内标峰面积 (A_i) 之比 Y 代入标准曲线计算 654-2 血药浓度。

1.4.4 标准曲线 分别吸取不同浓度的 654-2 标准溶液及内标溶液各 20 μL, 置于 10 mL 离心管中, 氮气吹干后加入空白血浆 500 μL 和 0.5 mol·L⁻¹的氢氧化钠溶液 10 μL, 旋涡混匀 10 s, 使血药浓度分别相当于 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 25, 50 mg·L⁻¹。按“1.4.3”项下方法处理并测定, 以不同质量浓度 654-2 系列溶液的 A_s 和 A_i 之比计算 Y 值, 以 Y 值为纵坐标, 654-2 质量浓度 (ρ) 为横坐标进行线性回归。

1.4.5 回收率及精密度 分别吸取低、中、高 3 种浓度的 654-2 标准溶液和内标溶液各 20 μL, 吹干后加入空白血浆 500 μL 和 0.5 mol·L⁻¹的氢氧化钠溶液 10 μL, 旋涡混匀 10 s, 使血药浓度分别

相当于 0.5, 5.0, 50 mg·L⁻¹。按“1.4.3”项下方法处理并测定, 将 654-2 峰面积 (A_s) 与内标峰面积 (A_i) 之比 Y 代入标准曲线计算 654-2 血药浓度, 以测得值与加入值之比计算方法回收率。以 1 d 内测得的 654-2 浓度计算日内精密度, 以一周内 5 次测定的 654-2 浓度计算日间精密度。

2 结果

2.1 色谱行为

在“1.3”色谱条件下, 血浆内源性杂质均不影响 654-2 和内标物的分离测定。峰 1 和峰 2 为 654-2 的异构体峰, 保留时间分别为 7.9, 9.3 min; 峰 3 为内标阿托品, 保留时间为 15.3 min。空白血浆及血浆样品色谱图见图 1。

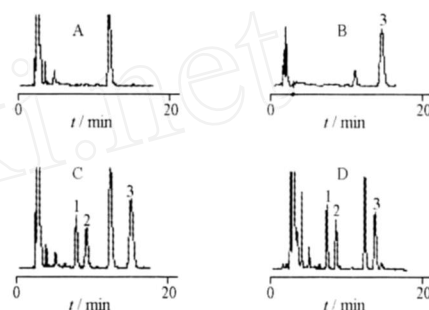


图 1 654-2 HPLC 色谱图

A - 空白血浆; B - 空白血浆加入内标; C - 空白血浆加入 654-2 和内标; D - 血浆样品; 1~2 - 654-2; 3 - 阿托品

Fig. 1 HPLC Chromatograms of 654-2

A - blank plasma; B - blank plasma spiked with IS; C - blank plasma spiked with 654-2 and IS; D - plasma sample; 1~2 - 654-2; 3 - atropine

2.2 线性范围

654-2 在 0.5 ~ 50 mg·L⁻¹ 内, 血药浓度与峰面积比有良好线性关系, 其回归方程为: $Y = 5.8312\rho - 0.1026$ ($r = 0.9997$)。以信噪比 S/N = 3 计算, 654-2 最低检出量为 0.1 mg·L⁻¹。

2.3 回收率及精密度

低、中、高 3 种浓度的平均方法回收率分别为 (87.2 ± 2.2) %、(92.5 ± 1.0) %、(89.3 ± 2.1) % ($n = 5$)。3 种浓度的日内 RSD ≤ 2.5 %, 日间 RSD ≤ 5.2 %。结果见表 1。

表 1 回收率和精密度实验结果 $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

Tab. 1 Result of recovery and precision. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

Added concentration /mg·L ⁻¹	Found concentration /mg·L ⁻¹	Method recovery /%	Within-day RSD /%	Between-day RSD /%
0.5	0.44 ± 0.01	87.2 ± 2.2	2.5	5.2
5	4.63 ± 0.05	92.5 ± 1.0	1.1	3.5
50	44.63 ± 1.05	89.3 ± 2.1	2.4	4.3

3 讨论

3.1 山莨菪碱有 4 个异构体, 药用外消旋体^[4]。2005 年版《中国药典》记录: 用高效液相色谱法测定消旋山莨菪碱含量, 应以顺反式异构体峰面积的和计算^[5]。从本实验的色谱图可以清晰看出 654-2 有 2 个峰, 其中每个峰含两个对映异构体。654-2 的对映异构体已经在毛细管电泳法中得到分离和提取^[4], HPLC 作为手性药物异构体分离提取应用最广泛的方法, 对 654-2 异构体的分离提取研究还比较少。本实验不但操作简单, 而且体现出灵敏度高、实用性强的特点。

3.2 654-2 含叔胺结构, 碱性较强, 结构中的酯键在 pH 3.5~4.0 最稳定, 弱酸性和近中性条件下稳定, 在碱性溶液中易水解^[6]。血浆样品处理过程要注意酸碱度, pH 过高可导致 654-2 分解, 过低样品提不出来。本实验考查了不同浓度, 不同体积的 NaOH 和 Na₂CO₃ 溶液, 结果 0.5 mL 血浆以 0.5 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 5~25 μL 碱化最好, 提取率最高。流动相的酸碱度调为 pH 3.0, 即保持了样品的稳定性, 同时保证样品与内标、杂质能完全分离, 且色谱峰型好。

3.3 本实验通过比较萃取样品 2 次和 3 次的提取过程, 结果发现, 低浓度样品以萃取 3 次的提取率较高, 但随着 654-2 浓度升高, 3 次萃取的提取率反而降低, 2 次萃取的提取率却随着样品浓度的升高而升高。因此, 本实验提取过程采用 2 次萃取法。

3.4 654-2 为抗胆碱药, 对 M₁, M₂ 受体均有作

用。在 654-2 原有的药理作用基础上, 临床开发了许多新应用, 如治疗肺结核、血栓闭塞性脉管炎、消化性溃疡、肝硬化腹水、过敏性紫癜、小儿神经性尿频和癫痫等^[7]。在我国 2003 年的非典型肺炎中, 654-2 还扮演了功臣的角色。本实验方法为临床开发 654-2 新应用提供了很好的研发基础。

REFERENCES

- [1] ZHANG X L. *Clinical Drug Reference* (药物临床信息参考) [M]. Vol 1. Chengdu: Science and Technique Press of Sichuan, 2007: 614.
- [2] CHEN H X, WANG H, CHEN Y, *et al* Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of anisodamine and its phase and metabolites in rat urine[J]. *J Chromatogr B*, 2005, 824: 21-29.
- [3] LUO G, XING Y X. The new usage of anisodamine[N]. *Health Daily* (健康报), 2003-06-04.
- [4] YANG L M, XIE Y F, CHEN H Z, *et al* Diastereomeric and enantiomeric high-performance liquid chromatographic separation of synthetic anisodamine[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43 (3): 905-909.
- [5] *Ch P* (2005) Vol (中国药典 2005 年版. 二部) [S]. 2005: 640-641.
- [6] XU W F. *Medicinal Chemistry* (药物化学) [M]. Vol 1. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000: 81-83.
- [7] WEI C H, LU Y H. The novel clinical application of anisodamine [J]. *Heilongjiang Med J* (黑龙江医药杂志), 2002, 15 (4): 301-302.
- [8] HE X, CHEN J. Determination of anisodamine hydrochloride and its pharmacokinetic parameters by RP-HPLC [J]. *Acta Acad Med Xinjiang* (新疆医学院学报), 1998, 21 (2): 114-117.
- [9] FAN G R, HONG Z Y, LIN M, *et al* Study of stereoselective pharmacokinetics of anisodamine enantiomers in rabbits by capillary electrophoresis[J]. *J Chromatogr B*, 2004, 809 (2): 265-271.

(收稿日期: 2008-01-17)

第二届全国医院药剂科建设与管理学术研讨会在北京召开

由中国药学会医院药专业委员会主办, 北京大学第三医院和《中国药学杂志》编辑部承办的“第二届全国医院药剂科建设与管理学术研讨会”于 2008 年 11 月 7~9 日在北京举行。250 多名来自全国各地的医院药师参加了大会。袁锁中副主任委员主持会议, 李大魁主任委员致开幕辞。

李大魁主任做了题为“当前医改与医院药学”的报告, 详细介绍了医药卫生改革中的国家基本药物政策, 并结合当前实际指出在医药卫生改革中医院药学的发展机遇。香港医管局的蒋秀珠高级药师、上海长海医院药学部主任胡晋红、北京大学第三医院药剂科主任翟所迪、解放军总医院药品保障中心主任郭代红、清华大学公共管理学院沈群红教授、北京协和医院药剂科梅丹主任等专家到会报告, 与参会代表探讨和交流医疗机构药房建设、流程创新和服务创新等方面的经验和体会, 研讨存在的问题。

大会还邀请到上海第一医药股份公司崔黎萍副总经理、国药集团医药物流有限公司顾一民总经理等将医院外的经验提供给医院药剂科管理者, 作为实际工作中的借鉴。

会议在大会征文中评选出两篇优秀论文在会上进行宣读, 12 篇优秀征文以壁报的形式进行交流。会议结束后, 大会还组织参观了解放军总医院药学部和北京大学第三医院制剂楼。

[本刊讯]