

RP-HPLC 法测定人血清中苦参碱浓度的方法学研究

★ 黄阿农 (浙江省永康市第一人民医院药剂科 永康 321300)

摘要:目的:建立一种简易的方法测定成人血清中苦参碱的含量,便于临床药物浓度监测。方法:采用 hypersil ODS C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 (0.01 mol/L) 磷酸二氢钾溶液-甲醇-磷酸 (33:67:0.01), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 229 nm。结果:苦参碱保留时间为 5.2 min, 标准曲线的线性范围为 0.0625~4.0 μg·mL⁻¹, $r = 0.999\ 6$, 苦参碱的高、中、低日间、日内变异系数均在 10% 以下, 回收率 >90%。结论:本法简便、快速重现性好, 灵敏度高, 可用于人血清中苦参碱药物含量检测及应用于临床治疗药物监测。

关键词:苦参碱;反相高效液相色谱法;血清浓度

中图分类号:R 284.1 **文献标识码:**A

苦参碱 (matrine) 是从豆科槐属植物山豆根 (*sophora tonkinensis* gagnep) 分离提取的氧化苦参碱和极少量槐果碱的混合物, 具有抗炎、抗病毒、免疫机制和抗肿瘤等作用, 近年来发现它对病毒性肝炎亦有明显治疗作用^[1,2]。对苦参碱进行临床药物治疗血药浓度监测非常有助于个体化治疗, 但目前国内目前尚缺乏测定苦参碱血药浓度的简单易行方法, 给临床合理用药造成一定困难。因此, 本文对针对国外相关文献报道的方法加以改进^[3,4], 采用高效液相色谱法建立简单有效的苦参碱血药浓度检测方法, 非常有助于该药的临床药物治疗监测及个体化用药^[5]。

1 材料与仪器

1.1 药品与试剂 苦参碱标准品由温州市华基化工有限公司提供, 甲醇为 HPLC 专用色谱醇, 磷酸二氢钾和磷酸为分析纯试剂, 水为去离子重蒸馏水 (用前过滤), 标准空白人血清由中国药品检定所提供。

1.2 仪器 美国 Waters 高效液相色谱仪 (包括 Waters 600 型 HPLC 泵, Waters 2996 PAD 型紫外检测仪, Waters 600 柱温控箱等); Empower Pro 色谱数据工作站; 1000、200、20 μl 微量注射器; 50 μl 进样器; 旋涡混合器; 离心沉淀器。

1.3 色谱分析条件 色谱柱为 hypersil ODS C₁₈ 色谱柱 (大连依利特公司 250 mm×4.6 mm, 5 μm);

流动相为 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液-甲醇-磷酸 (33:67:0.01); 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 205 nm; 柱温为 30 ℃。

1.4 标准溶液的配制 精密称取苦参碱标准品 5.0 mg, 用甲醇配制含苦参碱 100 μg·ml⁻¹ 的对照品贮备液; 取适量贮备液, 用甲醇精密稀释成 10 μg·ml⁻¹ 的苦参碱标准品液, 低温避光储存。

1.5 样品预处理 取血清 0.5 ml 加入一定量样品标准液 (10 μg·ml⁻¹), 加甲醇 0.3 ml, 加 0.1 mol/L 盐酸 5 μl 漩涡混匀, 4 ℃ 离心 (3 000 r·min⁻¹) 10 分钟。取上清液 -70 ℃ 冻存待测定。

1.6 HPLC 方法专属性 分别取样品血清、空白血清、标准品溶液 5 μl 进样, 苦参碱保留时间为 5.2 分钟左右, 无杂峰干扰测定。血清中苦参碱能得到较好的分离, 与苦参碱对照品基本一致, 故在此条件下所测的结果能代表原药浓度。

2 结果

2.1 线性关系与灵敏度 取空白试管分别加入不同量的对照品溶液, 再加入血清 0.5 mL, 配成 4.0、2.0、1.0、0.5、0.25、0.125、0.062 5 μg·mL⁻¹ 7 份标准浓度溶液, 按上述“样品预处理方法”进行操作, 取 30 μl 进样, 以样品浓度 (x) 与样品峰面积 (y) 作线性回归, 线性范围为 0.0625~4.0 μg·mL⁻¹, 回归方程为 $y = 0.05x + 0.03 - 2.73e$ ($r = 0.999\ 6$, $P < 0.05$), 最低检测浓度为 0.0625 μg·mL⁻¹, 最低检测

限为 2.79 ng。

2.2 回收率测定 取空白试管加入不同量的对照品溶液,再加入血清 0.5 mL,使血清浓度分别为 0.125、0.5 和 2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,按“样品预处理方法”进行操作,记录样品峰面积,同时以相同浓度标准对照品直接进样的峰面积进行回收率计算,结果见表 1。

表 1 血清中苦参碱回收率试验($\bar{x} \pm s, n=5$)

浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1	2	3	4	5	$\bar{x} \pm s$
0.125	0.98	0.92	0.96	0.94	0.90	0.94 $\pm$ 0.03
0.5	0.90	0.89	0.96	0.92	0.94	0.92 $\pm$ 0.03
2	0.91	0.93	0.92	0.94	0.95	0.93 $\pm$ 0.02

由表 1 可见,低、中、高浓度苦参碱回收率均在 90% 以上,提示该法的提取回收率符合生物样品分析要求。

2.3 精密度试验 取空白试管分别加入不同量的对照品溶液,加入 0.5 mL 血清,使血清药物浓度分别为 2.0、0.5 和 0.125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,按“血清样品提取与分离”操作,计算日内变异和 5 天内日间变异(表 2)。由表 2 结果可见,高、中、低三个浓度日内及日间变异均 $<8\%$ 。

表 2 苦参碱的精密度试验($\bar{x} \pm s, n=5$)

加入浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	日内变异			日间变异		
	0.125	0.5	2.0	0.125	0.5	2.0
检测浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.122	0.51	2.05	0.122	0.51	2.05
	0.117	0.48	2.13	0.128	0.46	1.94
	0.113	0.49	2.08	0.114	0.44	2.21
	0.124	0.52	1.94	0.129	0.48	1.92
	0.126	0.51	1.99	0.11	0.51	2.09
$\bar{x} \pm s$	0.120 $\pm$ 0.005	0.49 $\pm$ 0.02	2.041 $\pm$ 0.07	0.120 $\pm$ 0.008	0.48 $\pm$ 0.03	2.04 $\pm$ 0.12
RSD (%)	4.2	4.1	3.4	6.7	6.3	5.9

3 讨论

本实验建立了血清中苦参碱的高效液相检测方法。保留时间为 5.2 分钟左右,最低检测浓度 0.0625 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,最低检测限为 2.79 ng,线性范围在 0.0625 ~ 4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,标准曲线为 $y = 0.05x + 0.03 - 2.73e$ ($r = 0.9996, P < 0.05$),回收率高于 90%,日间、日内变异系数均在 10% 以下,符合生物样品分析要求,可用于临床药物治疗监测。

本研究比较了不同系统和比例的流动相,如甲醇-(0.01 mol/L)磷酸二氢钾溶液,甲醇-(0.01 mol/L)磷酸二氢钾溶液-磷酸。结果表明,以甲醇-(0.01 mol/L)磷酸二氢钾溶液-磷酸(33:67:0.01)为流动

相时色谱峰比文献报道^[6]选择乙醇和三乙胺时较好且峰形不受其他杂质峰干扰。

在检测波长的选择方面,紫外扫描显示,在 200 ~ 400 nm 波长处有三个比较大吸收峰,波长分别为 205、229 和 306 nm,为了提高分析检测的灵敏度,利用二极管阵列检测器具有同时监测多波长的优点,在本研究的条件下把波长定在 229 nm 时峰形最好,杂质干扰最少,灵敏度最高。

加样回收率研究中,甲醇提取效果明显优于乙醚、二氯甲烷、二氯甲烷与环己烷,提取过程中加入 0.1 mol/L 盐酸对苦参碱的色谱行为影响很大,加入适量的盐酸可改善苦参碱色谱峰的拖尾现象、延长出峰时间,使峰形对称,并且明显提高了加样回收率,但是盐酸量过大和过小都会影响到回收率。另外,经实验,对照品及样品溶液采用棕色容量瓶低温贮存,测定结果比较稳定。

在“1.3 色谱分析条件”中,除上述 Hypersil ODS C18 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)柱外,还使用 Penomenex C18 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)柱、Kromasil C18 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)柱在不同时间,经不同试验人员,对本品进行检测,发现使用 Hypersil ODS C18 柱时,柱峰峰形最为理想,耐用性比较好,符合测定的要求。

参考文献

- [1] 胡波,王亚玲. 安络化纤丸联合氧化苦参碱治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的近期疗效观察[G]. 全国医药学术交流会暨临床药理学研究进展培训班资料汇编,2006. 8:93-94.
- [2] 徐彬,杨惠娣,侯爱君. 苦参碱治疗慢性病毒性肝炎的作用[J]. 国外医药合成药生化药·制剂分册,2002,23(6):356.
- [3] 李正蓉. 苦参碱的药理与临床研究进展[J]. 华西药理学杂志,2003,18(6):435-437.
- [4] Zur Muhlen A. Schwarz C. Mehnert W. Solid lipid nanoparticlar (SLN) for controlled drug delivery-drug release and release mechanism[J]. Eur J pharm Biopharm. 2006. 47(3):147-156.
- [5] Li CY. The research of liver targeted dosage system [J]. Emerg Tradchin Med (Chinese), 2001, 10(6):354-355.
- [6] 欧阳吉德,齐皓,康乐,等. 高效液相法测定苦参碱栓中苦参碱的含量[J]. 国际医药卫生导报,2008,14(18):58-60.

(收稿日期:2009-02-25 责任编辑:查青林)

欢 迎 投 稿 ! 欢 迎 订 阅 !