

UPLC法测定人血清中雷公藤甲素浓度^Δ

李颖*,汪永忠,李翔,吴建,夏伦祝(安徽中医学院第一附属医院/国家中医药管理局中药制剂三级实验室,合肥 230031)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)12-1083-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.12.09

摘要 目的:建立测定人血清中雷公藤甲素浓度的方法。方法:采用超高效液相色谱法,内标为艾司唑仑。色谱柱为 Waters Acquity C₁₈柱,流动相为乙腈-水(30:70, V/V),流速为 0.2 ml/min,柱温为室温,检测波长为 220 nm,进样量为 5 μl。结果:雷公藤甲素血药浓度在 13.13~840.00 ng/ml 范围内同雷公藤甲素与内标物峰面积比值线性关系良好;日内、日间 RSD 均 <15%,方法回收率为 88.25%~99.33%。结论:该方法快速、灵敏、准确,可用于雷公藤甲素的血药浓度监测和药动学研究。

关键词 雷公藤甲素;超高效液相色谱法;血药浓度;测定

Determination of Triptolide Concentration in Human Serum by UPLC

LI Ying, WANG Yong-zhong, LI Xiang, WU Jian, XIA Lun-zhu (The First Affiliated Hospital, Anhui College of TCM/Third Level Laboratory of TCM Preparation, State Administration of TCM, Hefei 230031, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for determining the concentration of triptolide in human serum. METHODS: UPLC method was adopted. The column was Waters Acquity C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (30:70, V/V) at flow rate of 0.2 ml/min using estazolam as internal standard. The temperature of column was set at room temperature and the detection wavelength was set at 220 nm. The injection volume was 5 μl. RESULTS: The linear ranges of triptolide were 13.13-840.00 ng/ml, and RSD of intra-day and inter-day was lower than 15%. The recoveries were 88.25% -99.33%. CONCLUSION: This method is rapid, sensitive and accurate, and can be used for pharmacokinetic study and serum concentration monitoring of triptolide.

KEY WORDS Triptolide; UPLC; Serum concentration; Determination

雷公藤多苷是从卫矛科植物雷公藤根提取精制而成的一种极性较大的脂溶性成分混合物,属国家基本药物,临床应用广泛^[1]。而环氧二萜类化合物雷公藤甲素(Triptolide)是雷公藤多苷制剂的质控指标,被认为是其最重要的活性成分和毒性成分。大量研究与临床实践表明,雷公藤甲素具有显著的抗炎、抗肿瘤、保护肾组织上皮细胞及免疫调节作用,但也可引起脏器的器质性损害和严重的功能障碍^[2]。当患者因病情需要长期服用雷公藤多苷制剂时,其毒副作用常常会给临床治疗带来困难。为了研究雷公藤甲素在患者体内药动学过程及开展临床治疗药物监测,需要进行体内药物分析。文献^[3-7]报道雷公藤甲素血样测定方法有 GC 法、HPLC 法、LC-MS 联用法。近年来,超高效液相色谱(Ultra high performance liquid chromatography, UPLC)法应用于体内药物分析呈增多趋势。故笔者在参考文献基础上,采用 UPLC 法,建立了测定人血清中雷公藤甲素浓度的方法,该法可用于临床治疗药物监测和药动学研究。

1 材料

1.1 仪器

Waters Acquity UPLC H-Class 系统,包括四元梯度泵、恒温自动进样器、柱温箱、Acquity PDA 检测器、Empower2 色谱

Δ 基金项目:安徽省高等学校省级优秀青年人才基金资助项目(No.2011SQRL092);安徽中医学院临床科学研究基金资助项目(No.2010LC-016A)

* 副主任药师。研究方向:医院药学。电话:0551-62838553。E-mail:yhmh2003@126.com

工作站(美国 Waters 公司);80-2 离心沉淀器(上海手术器械厂);XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂);BS210S 电子天平(德国赛多利斯公司);MTN-2800D 氮吹仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 药品、试剂与人血清

雷公藤甲素、艾司唑仑对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111567-200502、1219-0102);乙腈、甲醇为色谱纯,乙酸乙酯为分析纯,水为亚沸蒸馏水。健康人空白血清由本院检验科提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters Acquity BEH C₁₈柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈-水(30:70, V/V);流速:0.2 ml/min;柱温:室温;检测波长:220 nm;进样量:5 μl。

2.2 溶液的配制

精密称定雷公藤甲素对照品 3.50 mg,用甲醇溶解并定容于 50 ml 量瓶中,得到质量浓度为 70.00 μg/ml 的对照品溶液。制备后置于冰箱中 4℃ 冷藏。

精密称定艾司唑仑对照品 1.39 mg,用甲醇溶解并定容于 100 ml 量瓶中,得到质量浓度为 13.90 μg/ml 的内标溶液。制备后置于冰箱中 4℃ 冷藏。

2.3 血样预处理

血样预处理方法:精密量取 1 ml 待测空白血清,置于离心管中,加入“2.2”项下内标溶液 20 μl,旋涡混合器上混匀 30 s,加入乙酸乙酯 4 ml,旋涡混合器萃取 1 min,4 000 r/min 离心

10 min, 吸取有机相, 放入 50 °C 氮气流挥干, 残渣加 150 μl 甲醇溶解, 漩涡混合器上混匀 1 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进样。

精密量取 1 ml 待测空白血清, 置于离心管中, 不加入内标溶液, 按上述方法处理, 得空白血清。

精密量取 1 ml 待测空白血清, 置于离心管中, 加入雷公藤甲素对照品溶液适量, 模拟血清样品, 按上述方法处理, 得空白血清+雷公藤甲素+艾司唑仑。

2.4 专属性试验

在“2.1”项色谱条件下, 取对照品溶液、空白血清、空白血清+雷公藤甲素+艾司唑仑进样, 色谱见图 1。由图 1 可见, 人血清中的内源性物质不干扰雷公藤甲素的测定, 雷公藤甲素、内标物的保留时间分别约为 4.8 min 和 8.7 min。

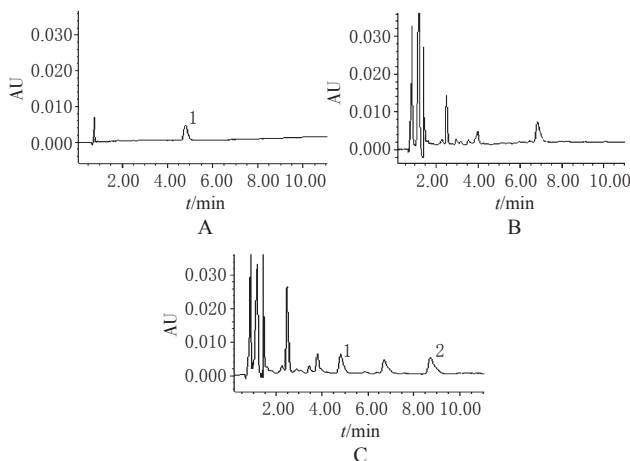


图 1 超高效液相色谱图

A. 对照品; B. 空白血清; C. 空白血清+雷公藤甲素+艾司唑仑; 1. 雷公藤甲素; 2. 艾司唑仑

Fig 1 UPLC chromatograms

A. triptolide control; B. blank serum; C. blank serum+triptolide+estazolam; 1. triptolide; 2. estazolam

2.5 线性关系考察

精密量取对照品溶液适量, 用空白血清稀释成质量浓度依次为 13.13、26.25、52.50、105.00、210.00、420.00、840.00 ng/ml 的系列血清标准溶液。按“2.3”项下方法处理后按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱。以雷公藤甲素与内标物峰面积比值(y)对雷公藤甲素质量浓度(x)进行线性回归, 回归方程为 $y=0.0055x+0.1465$ ($r=0.9997$)。结果表明, 雷公藤甲素血药浓度在 13.13~840.00 ng/ml 范围内同雷公藤甲素与内标物峰面积比值线性关系良好, 最低定量限为 13.13 ng/ml。

2.6 精密度试验

于空白血清中加入雷公藤甲素对照品溶液适量, 配成低、中、高 3 种浓度(即质量浓度分别为 13.13、52.50、420.00 ng/ml) 质控样品 3 份, 按“2.3”项下方法处理并按“2.1”项下色谱条件分析, 每个浓度每天测 5 次, 连续测定 5 d, 得到日内和日间 RSD。结果, 低、中、高浓度日内 RSD 分别为 3.20%、4.01%、1.05%; 日间 RSD 分别为 2.27%、4.30%、2.67%。

2.7 回收率试验

取“2.5”项下已知质量浓度的低、中、高 3 种浓度质控样品, 按“2.3”项下方法处理并按“2.1”项下色谱条件分析, 将测得的雷公藤甲素与内标物峰面积比值代入“2.4”项下回归方程计算浓度, 按求得的浓度除以加入浓度即得方法回收率, 结果

见表 1。

表 1 回收率试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Result of recovery tests($\bar{x} \pm s, n=5$)

待测成分	已知质量浓度, ng/ml	测得质量浓度, ng/ml	回收率, %
雷公藤甲素	13.13	11.38 ± 0.86	88.25 ± 6.61
	52.50	50.84 ± 3.09	96.84 ± 5.89
	420.00	417.20 ± 4.67	99.33 ± 1.11

2.8 稳定性试验

取已知浓度的雷公藤甲素血清样品, 分别于室温放置 24 h、-80 °C 冰箱放置 20 d、反复冻融 2 次后, 测定其含量, 浓度变化 RSD < 10%。说明样品在以上 3 种贮存条件下是稳定的。

3 临床应用

患者 1, 女性, 70 岁, 因患类风湿关节炎长期服用雷公藤多苷片, 应用上述方法测定血清雷公藤甲素浓度为 65.59 ng/ml。患者 2, 女性, 26 岁, 因患肾病综合征长期服用雷公藤多苷片, 测定血清雷公藤甲素浓度为 88.39 ng/ml。

4 讨论

文献^[6]报道血样处理采用固相萃取, 成本较高, 同时雷公藤甲素与内源性杂质分离不够理想。本试验血样处理方法采用乙酸乙酯萃取, 成本较低; 选用艾司唑仑为内标物, 与雷公藤甲素分离良好, 可减少样品前处理的误差, 提高测定准确性。

雷公藤甲素紫外吸收良好, 经全波长扫描, 220 nm 为最大吸收波长, 内标物艾司唑仑在此波长附近也有最大吸收, 故选择 220 nm 为检测波长。另外, 本试验选用乙腈和水为流动相, 分离度好, 方法简便。

本试验结合实验室条件采用 UPLC 法建立了测定人血清中雷公藤甲素浓度的方法。在该色谱条件下, 雷公藤甲素与内源性杂质分离较好; 能在较短时间内完成样品的检测, 所需流动相溶剂量以及样品进样量较 HPLC 法大大减少, 符合血药浓度监测快速、准确测定的要求。因此, 本方法适用于常规雷公藤甲素血药浓度监测及药动力学研究。

参考文献

- [1] 姚骥如, 孙莹, 罗顺葵, 等. 雷公藤多苷的临床应用进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2010, 29(3): 179.
- [2] 水光兴, 万毅刚, 蒋春明, 等. 雷公藤及其活性成分药理学和药理学研究的若干进展[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(40): 515.
- [3] 杨丽莉, 张昕, 袁倚盛. 气相色谱-电子捕获法测定血浆中的雷公藤甲素[J]. 色谱, 2001, 19(1): 28.
- [4] 邵凤, 王广基, 孙建国, 等. 雷公藤内酯醇在 Beagle 犬体内的药代动力学[J]. 药学报, 2007, 42(1): 61.
- [5] 黄秀旺, 许建华, 陈元仲. 高效液相色谱测定大鼠血浆中雷公藤甲素含量的方法改进[J]. 福建中医学院学报, 2008, 18(4): 16.
- [6] 王朝虹, 张吉林, 何毅, 等. 高效液相色谱法测定血浆中雷公藤甲素和雷公藤酮[J]. 中国法医学杂志, 2004, 19(5): 268.
- [7] 金米聪, 马建明, 姚浔平, 等. 血清中雷公藤甲素的液相色谱/质谱联用法测定研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(10): 1729.

(收稿日期: 2012-07-05 修回日期: 2013-01-30)