

## 离子对反相液相色谱同时测定家兔血浆中的外源性磷酸肌酸及其代谢产物肌酸

郝 恒<sup>1</sup>, 韩国柱<sup>1</sup>, 吕 莉<sup>1\*</sup>, 张 迪<sup>2</sup>

(1. 大连医科大学药学院, 辽宁 大连 116044; 2. 大连医科大学临床医学院, 辽宁 大连 116044)

**摘要:** 建立了离子对反相高效液相色谱法(IP-RP-HPLC)同时测定家兔血浆中外源性磷酸肌酸(PCr)及其代谢产物肌酸(Cr)的方法,用于研究外源性PCr在家兔体内的药代动力学。以含离子对试剂四丁基硫酸氢铵(TBA)的磷酸盐缓冲液-甲醇为流动相,在Kromasil-C<sub>18</sub>色谱柱上进行梯度洗脱。采用内标法定量、以基线扣除法计算外源性PCr和Cr的浓度。PCr和Cr的线性范围分别为10~7500 mg/L和10~1500 mg/L;日内和日间精密度均≤6.2%,准确度分别为99.7%~102.2%和96.5%~102.4%;萃取回收率均大于92%。静脉注射PCr后,血浆中PCr的消除为二室模型,消除半衰期为(20.4±2.7) min;表观分布容积为(0.179±0.037) L/kg;清除率为(0.019±0.002) L/(kg·min);静脉注射PCr后血浆中迅即出现降解产物Cr,其达峰时间为30 min;消除半衰期为(43.7±4.5) min。本方法的专属性强,准确度和精密度高,能特异性地测定家兔血浆中的PCr和Cr。实际应用结果表明,该方法完全符合PCr药代动力学生物分析方法学的要求。

**关键词:** 离子对反相高效液相色谱;药代动力学;磷酸肌酸;肌酸;家兔血浆

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2011)10-1000-05

## Simultaneous determination of exogenous phosphocreatine and its metabolite creatine in rabbit plasma using ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography

XI Heng<sup>1</sup>, HAN Guozhu<sup>1</sup>, LÜ Li<sup>1\*</sup>, ZHANG Di<sup>2</sup>

(1. College of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116044, China;

2. College of Clinical Medical Sciences, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

**Abstract:** A method for simultaneous determination of exogenous phosphocreatine (PCr) and its metabolite creatine (Cr) in rabbit plasma was developed by using an ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography (IP-RP-HPLC). The pharmacokinetics (PK) of PCr was also investigated. In the IP-RP-HPLC method, a Kromasil C<sub>18</sub> column was used with methanol and phosphate buffer containing tetrabutylammonium hydrogen sulfate (TBA, ion-pair reagent) as the mobile phases in a gradient elution mode, while changing detection wavelength and flow rate. The internal standard method was used to quantify PCr and Cr, and the baseline subtraction method was applied. The calibration curves showed good linearity ranged from 10 to 7500 mg/L for PCr and from 10 to 1500 mg/L for Cr, and the correlation coefficients (*r*) were greater than 0.999. The methodology validation showed high specificity, precision and recovery with the intra-day and inter-day relative standard deviations (RSDs) of not more than 6.2%, accuracies of 96.5%–102.4%, and extraction recoveries of more than 92%. After intravenous injection of PCr, the concentration-time profile can be best described by two-compartment model with elimination half time of (20.4±2.7) min, apparent volume of distribution of (0.179±0.037) L/kg and clearance rate of (0.019±0.002) L/(kg·min). The Cr appeared rapidly with time to maximal concentration of 30 min, elimination half time of (43.7±4.5) min. The results of practical application

\* 通讯联系人: 吕 莉 副教授,研究方向为血栓药理学和药代动力学. Tel: (0411) 86110412, E-mail: lv\_li@126.com.

收稿日期: 2011-04-22

showed that this bio-analytical method can completely meet the requirements for PK study of PCr in rabbit plasma.

**Key words:** ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography (IP-RP-HPLC); pharmacokinetics; phosphocreatine; creatine; rabbit plasma

磷酸肌酸(phosphocreatine, PCr)是细胞能量代谢的重要生理活性物质,它作为一种高能磷酸盐组成能量穿梭系统(energy shuttle system)使二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)磷酸化,从而保证了机体直接供能物质三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)的循环利用,在机体生理功能的维持中发挥十分重要的作用<sup>[1-2]</sup>。PCr已能人工合成,外源性PCr的补充有助于机体在缺血缺氧状态下维持高能磷酸池于恒定水平,使器官免受损伤,现已开发为一种高效低毒的心肌保护药,并为英国马丁代尔大药典收载<sup>[3]</sup>,临床用于治疗心肌梗死、心力衰竭以及心脏手术时停搏液的附加成分<sup>[4-6]</sup>。此外,PCr还是不违反兴奋剂规则的运动比赛项目的首选运动补剂<sup>[1-2]</sup>,成为运动医学研究之热点。

PCr的药效学已有众多研究,然而其药代动力学研究却罕见,仅有的3篇早年发表的国外文献均采用分光光度法和化学发光法等非特异性生物分析方法<sup>[5-8]</sup>,其结果可信度不高。近年来,文献报道PCr的降解产物肌酸(creatine, Cr)具有广泛的药理活性<sup>[9-13]</sup>,但PCr在体内代谢转化为Cr的动力学过程的研究迄今仍处于空白状态。

有鉴于此,本研究旨在建立一种离子对反相高效液相色谱法(ion-pair reversed-phase HPLC, IP-RP-HPLC)同时测定家兔血浆中PCr和Cr浓度,并以基线扣除(baseline subtraction)法计算家兔静脉注射PCr后外源性PCr及其代谢物Cr的浓度,并应用于PCr的药代动力学研究。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与动物

Agilent 1100 高效液相色谱仪:包括一组四元泵、在线脱气装置、低温自动进样器、紫外检测器、色谱工作站(美国安捷伦公司)。

PCr注射用粉针剂(内含磷酸肌酸二钠盐四水合物,按无水物计含量为磷酸肌酸钠1g/支,哈尔滨博莱制药有限公司惠赠,批号070823,纯度>97%);PCr对照品(磷酸肌酸二钠盐四水合物,纯度99%,德国Merck公司);Cr对照品(一水肌酸,纯度99%,美国Merck Sharp & Dohme公司);甲氧苄啶对照品(trimethoprim, TMP, 内标,纯度99%,中国药品

生物制品检定所);四丁基硫酸氢铵(tetrabutylammonium hydrogen sulfate, TBA, 纯度99%,美国J&K Chemical公司);甲醇(色谱纯,美国Tedia公司);磷酸二氢钾、氢氧化钠、高氯酸、碳酸钾(国产分析纯)。

新西兰长耳白兔,体重2~2.5kg,大连医科大学动物中心提供,合格证号:SCXK(II)2008-0002。

### 1.2 色谱条件

采用Kromasil-C18色谱柱(250mm×4.6mm, 5μm),预柱为Kromasil-C18保护柱(20mm×4.6mm, 10μm)(大连依利特分析仪器有限公司);柱温为室温;流动相A为0.08%(质量分数)TBA+0.2%(质量分数)KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液(pH3.0),B为0.08%TBA+0.2%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液(以NaOH调pH为7.5),C为甲醇。采用梯度洗脱,同时变流速和检测波长(见表1),进样量20μL,自动进样器温度为2~4℃。

表1 流动相组成、梯度洗脱方式、流速以及检测波长  
Table 1 Composition of mobile phases, elution mode, flow rate and detection wavelength

Time/ min	Composition of mobile phase/%			Flow rate/ (mL/min)	Detection wavelength/ nm
	A	B	C		
0	100	0	0	1.0	210
8	100	0	0	1.0	210
10	0	82	18	1.2	260
23	0	82	18	1.2	260
24	100	0	0	1.0	210

A. 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0.08% tetrabutylammonium hydrogen sulfate, pH 3.0; B. buffer A adjusted to pH 7.5 with 1 mol/L NaOH; C. methanol.

### 1.3 溶液的配制

#### 1.3.1 对照品储备液及系列对照品工作液

精密称取PCr和Cr对照品各适量,加水溶解并稀释,混匀,分别配制成75g/L的PCr储备液和15g/L的Cr储备液。分别取上述两种储备液,用水作梯度稀释,分别得到100、200、500、1000、5000、25000、75000mg/L的PCr和100、200、500、1000、3000、7500、15000mg/L的Cr系列对照品工作溶液。上述储备液均于-20℃低温保存,系列对照品工作溶液在使用当天配制,4℃保存。

#### 1.3.2 内标(IS)溶液的配制

精密称取TMP适量,置于10mL容量瓶中,加

甲醇溶解并稀释至刻度,混匀,配制成 5 g/L 的内标溶液, -20 °C 保存。

1.4 系列对照品血浆溶液的制备

分别精密吸取 PCr 和 Cr 对照品工作液和 IS 溶液各 10 μL,依次加入空白血浆(100 μL)中,涡旋混匀,分别制成 PCr 质量浓度为 7 500、2 500、500、100、50、20、10 mg/L, Cr 质量浓度为 1 500、750、300、100、50、20、10 mg/L 的系列对照品血浆溶液。

1.5 血浆样品的预处理

向家兔血浆样品(100 μL)中精密加入 TMP 溶液 10 μL、H<sub>2</sub>O 30 μL,涡旋混匀 0.5 min,加入预先冰冷的 6% (体积分数) 高氯酸 160 μL,涡旋混匀 0.5 min,冰浴中放置 10 min,使沉淀完全,于 4 °C 下 15 000 r/min 离心 2 min,取上清液 150 μL 置于另一离心管中,加入预冷的 2 mol/L 碳酸钾 20 μL 中和 pH 至中性,离心后取上清液进行 HPLC 测定。

1.6 在药代动力学中的应用

家兔 5 只,自耳缘静脉注射 PCr 500 mg/kg,均于早晨固定时间(9:00)给药。于给药前及给药后 2、10、20、30、40、50、60、80、100、120、150、180、210、240、300 min 在耳正中动脉采血 0.6 mL,置于肝素化离心管中,于 4 °C 下 3 000 r/min 离心 10 min;取上层血浆 200 μL 为血浆样本。然后按 1.5 节方法处理样品,进行 HPLC 分析。

2 结果与讨论

2.1 色谱行为和方法的专属性

空白血浆样品,加入 PCr、Cr 和 IS 的空白血浆样品以及加入 IS 的家兔静脉注射 PCr 20 min 后血浆样品的 HPLC 色谱图见图 1。从图 1 可以看出,PCr、Cr 和 TMP 的保留时间分别为 5.4 min、3.8 min 和 17.8 min,三者之间达到基线分离,空白血浆中的杂质峰不干扰测定;给药后血浆样品的 HPLC 图谱中未见代谢物干扰。

2.2 线性关系及定量限

精密吸取 1.4 节系列对照品血浆溶液以及空白血浆,然后按 1.5 节方法操作,进行 HPLC 分析,记录样品色谱图及 PCr、Cr 和 TMP 的峰面积。如上重复 3 次。采用基线扣除法,以加标血浆中目标物峰面积减去空白血浆中目标物峰面积的差值与内标 TMP 峰面积之比为 Y,将 Y 对血浆中目标物的加标质量浓度 X (mg/L) 作图,按加权最小二乘法作线性回归,权重因子为 1/X<sup>2</sup>,得出标准曲线的线性回归方程。其线性方程、相关系数(r)、定量限(LOQ, S/N = 10) 及线性范围见表 2。

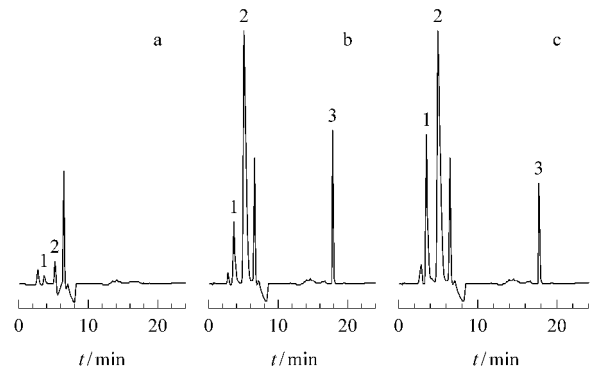


图 1 (a) 空白血浆、(b) 空白血浆加入 PCr 和 Cr 对照品和 IS 以及 (c) 家兔静脉注射 PCr 20 min 后的血浆样品(添加 IS) 的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of (a) blank plasma, (b) blank plasma spiked with PCr, Cr and IS and (c) a rabbit plasma sample collected 20 min after intravenous injection of PCr and spiked with IS

For PCr, Cr and IS, each concentration was 500 mg/L. Peak identifications: 1. Cr; 2. PCr; 3. TMP (IS).

表 2 PCr 和 Cr 在血浆样品中的标准曲线、相关系数、线性范围及定量限(n = 3)

Table 2 Linear equations, correlation coefficients (r), linear ranges and limits of quantification (LOQs) of PCr and Cr in plasma samples (n = 3)

Analyte	Linear equation	r	Linear range/ (mg/L)	LOQ/ (mg/L)
PCr	Y = 0.0092X + 0.00819	0.9990	10 - 7500	10
Cr	Y = 0.0131X + 0.01193	0.9992	10 - 1500	10

Y: calibrated peak area ratios of analytes vs internal standard; X: mass concentrations of analytes added to plasma, mg/L.

2.3 精密度、准确度与回收率

按 1.4 节方法分别配制含 PCr 和 Cr 高、中、低 3 种质量浓度的质控(Quality control, QC) 样品以及空白血浆样品,质控样品中 PCr 为 2 500、100、20 mg/L, Cr 为 750、100、20 mg/L。然后按 1.5 节方法处理后进行测定,同日内测定 5 次计算得日内精密度;连续 5 d,每日测定 1 次,得日间精密度(见表 3)。QC 样品和空白血浆样品测得的峰面积之差与未经提取的相应浓度对照品溶液直接进样测得的峰面积进行比较,计算得萃取回收率;对 QC 样品进行 HPLC 测定后,各组样品峰面积减去空白血浆样品峰面积之差值与 IS 峰面积之比代入标准曲线回归方程,计算 PCr、Cr 的质量浓度,与加入浓度比较,得方法回收率,用以表示分析的准确度(见表 4)。从表 3 和表 4 中可以看出,本方法精密度较高,PCr 和 Cr 的日内和日间相对标准偏差(RSD) 均不大于 6.2%;方法回收率为 96.5% ~ 102.4%。

表 3 质控样品中 PCr 和 Cr 测定的日内和日间精密度(RSD,  $n=5$ )Table 3 Intra-day and inter-day precisions (RSDs) for analysis of PCr and Cr in QC samples ( $n=5$ )

Component	Added/ (mg/L)	RSD/%	
		Intra-day	Inter-day
PCr	20	4.2	3.8
	100	5.1	6.0
	2500	3.6	3.9
Cr	20	2.0	5.4
	100	5.7	4.5
	750	4.5	6.2

表 4 质控样品中 PCr 和 Cr 的萃取回收率及方法的准确度( $\bar{x} \pm SD, n=5$ )Table 4 Extraction recoveries of PCr and Cr in QC samples and the method accuracy ( $\bar{x} \pm SD, n=5$ )

Analyte	Added/ (mg/L)	Found/ (mg/L)	Extraction recovery/%	Accuracy/ %
PCr	20	19.7 ± 0.8	93.2 ± 3.5	99.7 ± 4.2
	100	100.4 ± 5.1	93.1 ± 2.3	100.4 ± 5.2
	2500	2555.9 ± 93	93.6 ± 2.7	102.2 ± 3.7
Cr	20	19.80 ± 0.4	92.7 ± 2.8	99.0 ± 2.0
	100	96.5 ± 5.6	93.5 ± 2.4	96.5 ± 5.6
	750	768.4 ± 34.5	93.7 ± 3.3	102.4 ± 4.6

## 2.4 稳定性考察

分别取高、低两个质量浓度的血浆 QC 样品各 3 份,按 1.5 节方法进行样品处理,室温放置,分别于 0、2、4、8 h 进行测定,以 0 h 测定的结果为 100%。结果表明,PCr 血浆样品室温保存 2 h 含量已降至 90% 以下,Cr 4 h 即降至 90%,可见其在室温下的稳定性较差。将 QC 样品分别于 -20 °C 保存 0、10、20、30 d,室温解冻后测定,PCr 和 Cr 的平均相对浓度( $n=3$ )均在 90%~100% 之间,表明 QC 样品于 -20 °C 保存时至少一个月内稳定。

## 2.5 方法学在药代动力学研究中的应用

HPLC 测定结果以保留时间定性,内标法定量,按基线扣除法,从标准曲线回归方程计算得到血浆样品中外源性 PCr 和 Cr 的浓度,其浓度-时间(concentration-time, C-T)曲线见图 2。采用 3p97 程序对 C-T 数据进行房室模型判别和参数计算。从图 2 可以看出,PCr 的 C-T 曲线呈双指数衰减,经 3p97 程序处理属于二室模型药物;其代谢产物 Cr 的 C-T 曲线显示先升后降特征,类似于血管外给药一室模型。结果表明,血浆中 PCr 的消除半衰期(elimination half time,  $t_{1/2\beta}$ )为(20.4 ± 2.7) min,表观分布容积(apparent volume of distribution,  $V_d$ )为(0.179 ± 0.037) L/kg;清除率(clearance, CL)为(0.019 ± 0.002) L/(kg · min);静注 PCr 后迅即出现代谢物 Cr,其达峰时间(time to maximal concentration,  $t_{max}$ )

为 30 min,高峰血药浓度(the maximal concentration,  $C_{max}$ )为 573.80 mg/L,消除半衰期( $t_{1/2k(m)}$ )为(43.7 ± 4.5) min。本研究表明家兔静脉注射 PCr 后原形药呈二室模型,PCr 体内消除快速,并迅即降解生成 Cr。Cr 的消除半衰期较长,约为前者的 2 倍。

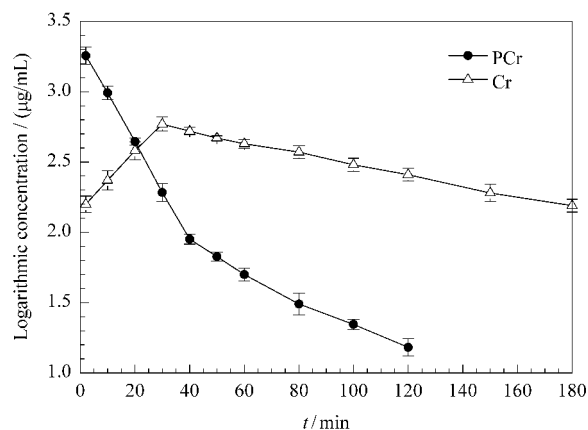


图 2 家兔静脉注射 500 mg/kg PCr 后血浆中外源性 PCr 和代谢物 Cr 的平均药物浓度-时间曲线

Fig. 2 Concentration-time curves of exogenous PCr and its metabolite Cr in plasma of rabbits after intravenous injection of PCr (500 mg/kg)

## 2.6 讨论

### 2.6.1 色谱条件的优化

本研究中 3 种目标化合物均极性较大,很难在常规  $C_{18}$  柱上保留,无法应用常规的反相 HPLC 法测定,故采用 IP-RP-HPLC 法分析上述化合物,通过加入离子对试剂 TBA 与待测物形成亲脂性复合物,增强了它们与  $C_{18}$  固定相之间的亲和力,从而有可能采用反相 HPLC 法予以测定。

基质的干扰是生物样品测定时的共同难题,本文采用三元流动相梯度洗脱和流速梯度的方法来消除基质的干扰。另外 PCr 和 Cr 分子中缺少生色团,紫外吸收很差,只好采用末端吸收波长检测,但这样会面临血浆基质的干扰,必须通过改变流动相的配比予以排除;TMP 不仅在 210 nm 处有吸收,在 260 nm 处亦有吸收,故采用变波长方法,在 210 nm 测定 PCr 和 Cr,260 nm 测定 TMP。PCr 和 Cr 出峰较快,而 TMP 出峰较慢,若采用等度洗脱整个分析过程过长。为缩短分析时间,在 PCr 和 Cr 出峰后提高流速并且逐渐加大甲醇的比例至 18%,从而使分析时间缩短至 20 min。

流动相中离子对试剂 TBA 和缓冲盐  $KH_2PO_4$  的浓度对上述化合物的色谱行为具有显著影响。随着 TBA 浓度的升高,Cr 的保留时间几乎不变,但 PCr 的保留时间将会延长,且伴有峰高降低,出现拖尾的现象。经过筛选,最终选定 0.08% TBA 和

0.2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  作为流动相,既可以满足两种目标化合物及 IS 的基线分离,同时保证了峰形的对称。流动相 pH 对它们的色谱行为亦有影响,低 pH 值对 PCr 和 Cr 的出峰有利,但是将延长 TMP 的出峰时间;高 pH 有利于 TMP 的出峰,但会延长 PCr 和 Cr 的出峰时间,且出现严重的拖尾现象。因此,我们首先用 pH 3.0 的流动相(流动相 A)进行 PCr 和 Cr 的分离,在其出峰后再改用 pH 7.5 的流动相(流动相 B)以利于 TMP 的出峰。

### 2.6.2 血浆样品制备条件的选择

由于分析物的极性较大,制备血浆样品时无法用有机溶剂萃取富集,只能采用强酸沉淀蛋白的方法制备样品。但 PCr 在酸中稳定性差,室温下很快分解,故样品处理时需进行低温操作,包括所有的器皿和试剂都需进行预冷。除去蛋白后,必须立即用  $\text{K}_2\text{CO}_3$  中和至中性。本文所用的样品预处理方法具有稀释效应,加之 PCr 和 Cr 摩尔吸光系数低,使得所建立的方法学的 LOQ 在 mg/L 级水平。由于 PCr 临床用药剂量大,毒性低(小鼠药物半数致死量 ( $\text{LD}_{50\text{iv}}$ ) 高至 3 g/kg),因此这样的 LOQ 亦可满足 PCr 药代动力学研究的要求。

### 2.6.3 外源性 PCr 和 Cr 定量方法的选择

本研究要测定的两种化合物均为内源性生理活性物质,而我们的目的是要定量测定血浆中的外源性 PCr 及其代谢物 Cr,这比通常测定机体没有的外源性化合物难得多。目前,在内源性化合物的药代动力学研究中,如何将外源性与内源性化合物相区分仍是一大难题。最好的方法是将外源性药物进行同位素标记,但易造成污染,且操作难度大,花费高,尤其不适合人体药代动力学研究,故很少应用。本文采用基线扣除法,即用给药后样品中测得的内源性与外源性化合物总量减去给药前空白样品中测得的内源性化合物的量,得到样品中外源性化合物的量。这种方法已用于维生素 C、 $\beta$ -胡萝卜素、肌酸等药代动力学的研究<sup>[14-16]</sup>。

## 3 结论

本文建立的家兔血浆中同时测定外源性 PCr 及其代谢产物 Cr 的 IP-RP-HPLC 方法,经方法学验证,其特异性、精密度、准确度和萃取回收率均较高。实际应用表明本文描述的方法完全符合 PCr 药代动力学生物分析方法学的要求。

致谢 感谢哈尔滨博莱制药有限公司提供磷酸肌酸注射剂。

### 参考文献:

- [1] Wang L, Zhang L. Journal of Wuhan Institute of Physical Education (王雷,张立. 武汉体育学院学报), 2002, 36(5): 37
- [2] Hou L X. Progress in Biochemistry and Biophysics (侯立向. 生物化学和生物物理进展), 2003, 30(2): 324
- [3] Sweetman S C. Martindale: the Complete Drug Reference. 35th ed. Li D K, Jin Y Y, Tang G, et al, transl. Beijing: Chemical Industry Press( Sweetman S C. 马丁代尔药物大典. 35th ed. 李大魁, 金有豫, 汤光, 等, 译. 北京: 化学工业出版社), 2009: 1834
- [4] Sharov V G, Afonskaya N I, Ruda M Y, et al. Biochem Med Metab Biol, 1986, 35: 101
- [5] Ferraro S, Maddalena G, Fazio S, et al. Curr Ther Res, 1990, 47(6): 917
- [6] Sharov V G, Saks V A, Kupriyanov V V, et al. J Thorac Cardiovasc Surg, 1987, 94: 749
- [7] Lorenzi E, Piacenza G, Strumia E, et al. Cardiologia, 1987, 32(9): 1031
- [8] Kôrge P, Silber M L, Gollnick P D. Cardiologia, 1998, 43(12): 1345
- [9] Kingsley M, Cunningham D, Mason L, et al. Oxid Med Cell Longev, 2009, 2(4): 247
- [10] Steen O, Per A, Fawzi K, et al. J Physiol, 2006, 573(2): 525
- [11] Vorgerd M, Zange J, Kely R, et al. Arch Neurol, 2002, 59: 9
- [12] Brewer G J, Walimann T W. J Neurochem, 2000, 74: 1968
- [13] Tarnopolsky M A, Beal M F. Ann Neurol, 2001, 49(5): 561
- [14] Chen T F, Yu X Y, Lin S G. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology (陈铁锋, 余细勇, 林曙光. 中国临床药理学杂志), 1998, 14(1): 35
- [15] Persky A M, Muller M, Derendorf H, et al. J Clin Pharmacol, 2003, 43: 29
- [16] Prince M R, Frisoli J K. Am J Clin Nutr, 1993, 57: 175