

RP-HPLC法测定大鼠血浆中香柑内酯、欧前胡素和蛇床子素及其药动学研究^Δ

陈丹霞^{1*}, 何志高^{1#}, 金丽¹, 施燕¹, 张小刚¹, 茅惠明² (1. 同济大学附属东方医院药学部, 上海 200120; 2. 同济大学附属东方医院中心实验室, 上海 200120)

中图分类号 R969.1; R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)47-4433-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.47.05

摘要 目的: 建立测定大鼠血浆中香豆素类成分香柑内酯、欧前胡素和蛇床子素血药浓度的方法, 并研究其在大鼠体内的药动学。方法: 大鼠灌胃蛇床子提取物(900 mg/kg), 分别于给药前及给药后0.25、0.5、0.75、1、2、3、4、6、8、12 h取血, 以反相高效液相色谱法测定血浆中香豆素类成分香柑内酯、欧前胡素和蛇床子素的血药浓度。色谱柱为Diamonsil™ C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-150 mmol/L醋酸铵水溶液(50:50, V/V, 醋酸调pH值至4.3), 流速为1.0 ml/min, 紫外检测波长为320 nm, 进样量为10 μl。以非房室模型法(统计矩法)分析药动学参数。结果: 香柑内酯、欧前胡素和蛇床子素质量浓度在0.1~5.0、0.5~25.0、2.0~100.0 μg/ml范围内与各指标成分和相对应的峰面积积分值比呈良好线性关系。香柑内酯、欧前胡素、蛇床子素精密度试验的RSD≤8.8%, 准确度在(91.8±2.01)%~(102.6±0.40)%之间, 提取回收率在81.3%~92.8%之间, 稳定性试验的RSD<15%。香柑内酯、欧前胡素、蛇床子素的AUC_{0-∞}分别为(5.53±1.07)、(22.67±3.65)、(39.60±4.56) μg·h/ml; t_{1/2}分别为(3.33±0.39)、(2.27±0.55)、(2.24±0.35) h; c_{max}分别为(1.18±0.22)、(7.03±1.27)、(13.16±1.37) μg/ml。结论: 该方法简便、灵敏、专属性好, 可用于大鼠体内香柑内酯、欧前胡素和蛇床子素的药动学研究。

关键词 反相高效液相色谱法; 香柑内酯; 欧前胡素; 蛇床子素; 血药浓度; 药动学

Determination of Bergapten, Imperatorin and Osthole in Rat Plasma by RP-HPLC and Their Pharmacokinetic Study

CHEN Dan-xia¹, HE Zhi-gao¹, JIN Li¹, SHI Yan¹, ZHANG Xiao-gang¹, MAO Hui-ming² (1. Dept. of Pharmacy, Shanghai East Hospital Affiliated Tongji University, Shanghai 200120, China; 2. Dept. of Central Laboratory, Shanghai East Hospital Affiliated Tongji University, Shanghai 200120, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a RP-HPLC method for the determination of coumarin components as bergapten, imperatorin and osthole in rat plasma, and to study the pharmacokinetics of them. METHODS: The rats were given osthole extract (900 mg/kg) intragastrically, and the blood samples were collected before medication and 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 6, 8 and 12 h after medication. The blood concentrations of bergapten, imperatorin and osthole were determined by RP-HPLC. Diamonsil™ C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with mobile phase consisted of acetonitrile-ammonium acetate (50:50, V/V, pH adjusted to 4.3 using acetic acid) at the flow rate of 1.0 ml/min. UV detection wavelength was set at 320 nm, and sample size was 10 μl. The pharmacokinetic parameters were calculated with non-compartmental method (statistical moment). RESULTS: The linear ranges of bergapten, imperatorin and osthole were 0.1-5.0 μg/ml, 0.5-25 μg/ml and 2.0-100.0 μg/ml, respectively. RSDs of intra-day and inter-day were all lower than 8.8%, and the accuracy was calculated as (91.8±2.01)%-(102.6±0.40)%. The average recoveries were 81.3%-92.8%; RSD of stability test was lower than 15%. The pharmacokinetic parameters of bergapten, imperatorin and osthole were as follows: AUC_{0-∞} were (5.53±1.07) μg·h/ml, (22.67±3.65) μg·h/ml and (39.60±4.56) μg·h/ml; t_{1/2} were (3.33±0.39) h, (2.27±0.55) h and (2.24±0.35) h; c_{max} were (1.18±0.22) μg/ml, (7.03±1.27) μg/ml and (13.16±1.37) μg/ml. CONCLUSIONS: The method is convenient, sensitive and specific, and can be used for pharmacokinetic study of bergapten, imperatorin and osthole.

KEY WORDS RP-HPLC; Bergapten; Imperatorin; Osthole; Blood concentration; Pharmacokinetics

蛇床子是伞形科植物蛇床的干燥果实^[1], 作为传统中药材, 具有广泛的药理作用, 常用于湿痹腰痛、阴痒、带下、阴道滴虫、湿疹、皮肤瘙痒、阳痿、宫冷不孕等的治疗^[2-3]。蛇床子药

材中主要含有香柑内酯、欧前胡素和蛇床子素等香豆素类成分^[4]。目前, 针对蛇床子药材中有效成分的体内研究多集中于单一活性成分^[5-8], 但单个成分的药动学显然不能完全等同于整味药材的药动学, 因此同时测定蛇床子提取物几个主要活性成分的血药浓度及其药动学研究成为了揭示蛇床子体内过程及其药效物质基础的一种重要手段^[9]。高效液相色谱(HPLC)法作为一项高效、快速的分析技术, 在蛇床子的分离分析中应用广泛^[10-12]。笔者在前期采用HPLC法研究蛇床子药材的特征成分谱之后^[13], 同时测定大鼠ig蛇床子提取物后血浆中香柑内

Δ 基金项目: 上海市浦东新区卫生局卫生科技项目(No.PW2010B-2)

* 药师, 硕士。研究方向: 药物分析学。电话: 021-61569829。

E-mail: joyce_chendx@163.com

通信作者: 主任药师, 副教授, 博士。研究方向: 药事管理、药品政策、药物经济学。电话: 021-61569835。E-mail: zhigaohe@hotmail.com

酯、欧前胡素、蛇床子素的质量浓度和研究其药动学特征,以期对香豆素类化合物在体内的应用及蛇床子药材的进一步开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-10A型HPLC仪,包括LC-10AT型泵、SPD-10A型检测器(日本岛津公司);超声清洗器(上海查理科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

蛇床子提取物由同济大学附属东方医院药剂科提取制备;蛇床子素对照品(批号:31089,含量 $\geq 99.5\%$)、香柑内酯对照品(批号:36706,含量 $> 98.0\%$)由上海晶纯实业有限公司提供;欧前胡素对照品(批号:MUST-10052001,含量 $> 99.0\%$)由成都曼思特生物科技有限公司提供;醋酸、醋酸铵为分析纯,乙腈为色谱纯,水为三蒸水。

1.3 动物

Wistar大鼠5只,♀,体质量250~300 g,由同济大学附属同济医院动物实验中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(沪)2007-0031]。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Diamonsil™ C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-150 mmol/L醋酸铵水溶液(50:50, V/V,醋酸调pH值至4.3);检测波长:320 nm;流速:1.0 ml/min;柱温:30 ℃;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取香柑内酯、欧前胡素、蛇床子素适量,分别用甲醇溶解并定容至10 ml量瓶中,制备成质量浓度为0.625、3.125、12.500 mg/ml的混合对照品溶液,即为混合对照品母液,4 ℃贮藏,备用。精密移取混合对照品母液1 ml至25 ml量瓶中,用甲醇定容至刻度,混匀,记为混合对照品系列溶液①,再分别精密移取混合对照品系列液① 10、4、2、1、0.4、0.2 ml于10 ml量瓶中,用甲醇定容至刻度,分别混匀,得混合对照品系列溶液②~⑧,4 ℃贮藏,备用。

2.2.2 质控样品的制备 分别取不同质量浓度的混合对照品系列溶液20 μl,置于80 μl空白血浆中,得高、中、低质量浓度的质控样品,分别得含香柑内酯质量浓度为0.2、1.0、5.0 μg/ml、欧前胡素质量浓度为1.0、5.0、25.0 μg/ml和蛇床子素质量浓度为4.0、20.0、100.0 μg/ml的样品,-20 ℃贮藏,备用。

2.3 血浆样品的处理

精密吸取大鼠血浆样品100 μl,加入乙腈10 μl涡旋混合1 min,以离心半径为8 cm,12 000 r/min离心10 min,分离沉淀蛋白,吸取上清液过0.45 μm有机微孔滤膜,取20 μl上清液进样分析。

2.4 方法学考察

2.4.1 方法专属性 分别取0.2 ml空白血浆、0.2 ml空白血浆+分析物对照品+内标、0.2 ml给药后大鼠血浆样品,按“2.3”项下方法处理,再按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果显示,香柑内酯的保留时间为5.5 min,欧前胡素的保留时间为12.4 min,蛇床子素的保留时间为16.3 min,理论塔板数符合要求,各峰分离度 > 1.5 ,表明血浆中所含的内源性物质不干扰被测物和内标的测定,且二者峰形良好。色谱见图1。

2.4.2 标准曲线的制备 按“2.2”项下方法制备混合对照品

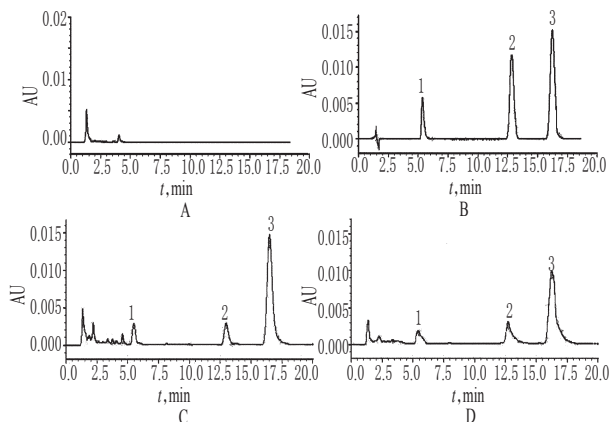


图1 高效液相色谱图

A.空白血浆;B.对照品溶液;C.空白血浆+蛇床子提取物;D.ig给药后血浆样品;1.香柑内酯;2.欧前胡素;3.蛇床子素

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. control solution; C. blank plasma + Fructus cnidii extract; D. plasma sample after intragastric administration; 1. Bergapten; 2. imperatorin; 3. Osthole

系列溶液②~⑧,按“2.3”项下方法处理,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以各对应指标成分的质量浓度(x)为横坐标,指标成分和内标峰面积比(y)为纵坐标,进行线性回归,得香柑内酯、欧前胡素、蛇床子素回归方程分别为 $y=75\ 443x+4\ 508.9$ ($r=0.999\ 1$)、 $y=41\ 055x-15\ 013$ ($r=0.999\ 2$)、 $y=77\ 568x+21\ 416$ ($r=0.999\ 5$)。结果表明,香柑内酯、欧前胡素、蛇床子素在0.1~5.0、0.5~25.0、2.0~100.0 μg/ml质量浓度范围内与各指标成分和内标峰面积积分值比呈良好线性关系。

2.4.3 稳定性试验 取“2.3”项下高、中、低质量浓度的标准质控样品各5份,置于室温保存24 h后测定,考察血浆样品的短期稳定性;取“2.3”项下高、中、低质量浓度的标准质控样品各5份,冷冻贮藏于-20 ℃,7 d后测定,考察血浆样品的长期稳定性;取“2.3”项下高、中、低质量浓度的标准质控样品各5份,冷冻贮藏于-20 ℃,在室温中充分解冻,然后再次冷冻,每次间隔24 h,重复3个冻融周期后测定,考察血浆样品的3个周期冻融稳定性。结果显示,被测物在上述保存条件下测得实际值均在理论值的87.3%~110.7%范围波动,RSD $< 15\%$,表明3种成分在血浆样品中稳定性良好。

2.4.4 精密度和准确度试验 按“2.2”项下方法制备高、中、低质量浓度的标准质控样品各5份,按“2.3”项下方法处理,按“2.1”项下色谱条件测定日内精密(5次)、日间精密(5 d)、准确度(5次)。结果显示,三种质量浓度的标准质控样品日内、日间精密RSD $\leq 8.8\%$,准确度在(91.8±2.01)%~(102.6±0.40)%之间,表明该试验方法符合目前生物样品分析方法指导原则中的有关规定。准确度与精密试验结果详见表1。

2.4.5 提取回收率试验 按“2.2”项下方法制备高、中、低质量浓度的标准质控样品各5份,按“2.3”项下方法处理。同时,以流动相为基质加适量香柑内酯、欧前胡素和蛇床子素标准品溶液制备相同质量浓度的标准品溶液,每个质量浓度制备5份。标准质控样品进样后记录峰面积为 A_1 ,标准品溶液直接进样分析后记录峰面积为 A_0 。提取回收率为 A_1 与 A_0 之比。结果表明,3种质量浓度质控样品的提取回收率在81.3%~

92.8%。提取回收率试验结果详见表1。

表1 提取回收率、精密度和准确度试验结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Results of extraction recovery, accuracy and precision tests ($\bar{x} \pm s, n=6$)

成分	质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	提取回收 率,%	准确 度,%	精密度	
				日内RSD,%	日间RSD,%
香柑内酯	0.2	87.6	91.8±2.01	4.3	2.7
	1	85.2	93.7±1.75	2.7	8.8
	5	81.3	95.5±3.44	4.4	3.2
欧前胡素	1	88.8	97.3±1.55	3.7	5.1
	5	85.1	101.3±2.16	2.2	2.9
	25	84.0	102.6±0.40	1.3	4.7
蛇床子素	4	89.2	95.4±1.19	4.5	2.1
	20	83.2	97.3±2.13	3.1	2.8
	100	92.8	99.3±2.54	4.0	3.9

2.5 药动学研究

取♀SD大鼠5只,ig给药(900 mg/kg)1次,在给药前与给药后的0.25、0.5、0.75、1、2、3、4、6、8、12 h取血0.2 ml,分离得血浆,贮藏于-20℃冰箱。按“2.3”项下方法处理血浆后进样分析,测定血浆中香柑内酯、欧前胡素和蛇床子素的血药浓度,绘制血药浓度-时间曲线,详见图2;采用非房室模型法(统计矩法)分析药动学参数^[14],详见表2。

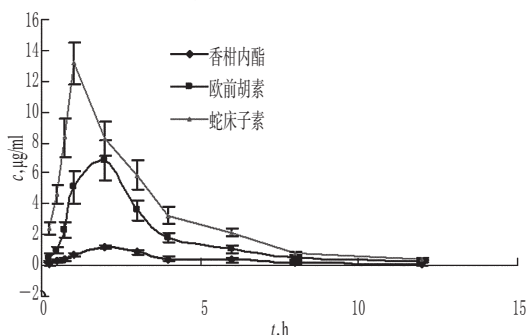


图2 浓度-时间曲线($n=5$)

Fig 2 Mean plasma concentration-time curves of bergapten, imperatorin and osthole ($n=5$)

表2 主要药动学参数($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 2 Main pharmacokinetic parameters ($\bar{x} \pm s, n=5$)

参数	香柑内酯	欧前胡素	蛇床子素
AUC ₀₋₁₂ , $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$	5.03±1.04	21.7±3.56	38.1±3.41
$t_{1/2}$, h	3.33±0.39	2.27±0.55	2.24±0.35
t_{max} , h	2.18±0.58	2.03±0.34	2.75±0.24
c_{max} , $\mu\text{g/ml}$	1.18±0.22	7.03±1.27	13.16±1.37
AUC _{0-∞} , $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$	5.53±1.07	22.67±3.65	39.60±4.56
MRT, h	3.78±0.54	3.70±0.48	3.47±0.72

3 讨论

对蛇床子的研究不应仅仅局限在体外寻找其化学物质基础,同时也应该深入探讨蛇床子提取物中有效成分在体内吸收、分布、代谢、排泄的动态变化规律和量-效关系。蛇床子中含有多种成分,其中以香豆素为主,对活性成分香豆素的体内药动学特征进行考察是有必要的。本研究建立一种简便、可靠的HPLC法,同时测定大鼠ig蛇床子提取物后活性成分香柑内酯、欧前胡素、蛇床子素的血药浓度及其药动学特征,样品制备过程简单,方法专属性、精密度、回收率、分离度均满足要

求,可作为考察蛇床子药效物质基础的重要手段。

研究中曾使用不同比例流动相乙腈-醋酸铵水溶液进行分离,但欧前胡素与蛇床子素始终存在峰形拖尾的情况,因此利用醋酸改变流动相中水相的pH,经过优化筛选以后确定最终流动相为乙腈-150 mmol/L 醋酸铵水溶液(醋酸调pH值至4.3,50:50, V/V)。

本研究采用非房室模型法分析了蛇床子提取物在大鼠体内的药动学过程,ig给药后,香柑内酯、欧前胡素和蛇床子素在大鼠体内 t_{max} 分别为(2.18±0.58)、(2.03±0.34)、(2.75±0.24) h, c_{max} 分别为(1.18±0.22)、(7.03±1.27)、(13.16±1.37) $\mu\text{g/ml}$, $t_{1/2}$ 为(3.33±0.39)、(2.27±0.55)、(2.24±0.35) h。由于给药方式、取血时间点和考察时间范围不同,所以 $t_{1/2}$ 、AUC与相关文献^[5-7]不具有可比性。另外,在整个配制过程中,香柑内酯、欧前胡素、蛇床子素应注意避光,以免受光分解,影响分析的准确性。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:219.
- [2] 邹霞,熊爱珍. 正交试验优选蛇床子中蛇床子素提取工艺[J]. 中国药房, 2009, 20(21): 1 626.
- [3] 韩亮,冯毅凡,江涛,等. 蛇床子超临界提取物肝肾毒性及代谢组学的初步研究[J]. 中国新药与临床药理, 2012, 23(2): 131.
- [4] 翁德新,李天傲. 蛇床子中5种成分的HPLC测定法[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(18): 1 883.
- [5] 施爱明,谢梅林,张全英,等. HPLC法测定大鼠血浆中蛇床子素的浓度[J]. 抗感染药学, 2006, 3(2): 58.
- [6] 郑立卿,张丹参,张力,等. 蛇床子素在兔体内的药动学研究[J]. 中成药, 2010, 32(10): 1 698.
- [7] 丁光超,叶肖栗,任国飞. 高效液相色谱串联质谱法测定大鼠血浆中的欧前胡素[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(7): 1 056.
- [8] 郑立卿,刘建华,张丹参,等. 蛇床子素在大鼠体内药动学和组织靶向性研究[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(4): 589.
- [9] 李文,杨媛,王萍,等. HPLC法测定大鼠蛇床子素和欧前胡素的血药浓度[J]. 南昌大学学报:医学版, 2011, 51(3): 5.
- [10] 吴西霆,唐秋月,沈夕坤. 不同产地蛇床子中的蛇床子素的含量测定[J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(6): 800.
- [11] 叶晓平,宋纯清. RP-HPLC法同时测定蛇床子中蛇床子素、欧芹素乙和异茴芹素的含量[J]. 中草药, 2005, 36(1): 118.
- [12] 吴波,马长清,张寒俊. 反相高效液相色谱法测定蛇床子中蛇床子素的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(7): 843.
- [13] 陈丹霞,周婷婷,王佳静,等. 蛇床子特征成分谱的RP-HPLC分析[J]. 药学实践杂志, 2009, 27(6): 430.
- [14] 崔俐俊,范国荣,等. 壬苯醇醚-9胶囊在比格犬体内的药代动力学研究[J]. 解放军药科学学报, 2011, 27(5): 404.

(收稿日期:2013-09-16 修回日期:2013-10-09)