

HPLC 检测大鼠血浆中姜黄素的浓度及其药动力学研究

楼旦^a, 张立康^b, 孙未^b, 罗顺斌^b, 胡国新^b(温州医学院, a.附属第二医院; b.药学院, 浙江 温州 325035)

摘要: 目的 建立大鼠血浆姜黄素检测的高效液相色谱方法, 研究姜黄素的药动力学。方法 血浆经乙酸乙酯萃取, 以 ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm) 为色谱柱; 流动相为乙腈-水-0.1%TFA(50 : 30 : 20), 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 302(0~5.5 min)、426 nm(5.5~7.5 min)。6 只 SD 大鼠, ♂, 单剂量静脉给予 10 mg·kg⁻¹ 姜黄素, 分别在给药后多点尾静脉采血。用该方法检测血浆中姜黄素的浓度; 用 DAS 计算药动力学参数。结果 姜黄素浓度在 0.05~6.00 mg·L⁻¹ 内线性关系良好($r=0.9998$); 定量下限为 0.05 mg·L⁻¹; 低(0.10 mg·L⁻¹)、中(1.00 mg·L⁻¹)、高(4.00 mg·L⁻¹)3 个浓度的回收率分别为(99.3±5.4)%、(104.2±4.7)%和(99.8±2.0)%; 日内 RSD 分别为 4.49%、3.90%和 1.72%, 日间 RSD 分别为 4.61%、4.27%和 2.00%。大鼠姜黄素静脉注射后, 姜黄素在大鼠体内符合二室模型; α 相和 β 相消除半衰期分别为 0.08 h 和 0.75 h。结论 本方法准确可靠、简便快速, 适用于大鼠血浆姜黄素浓度的测定及其药代动力学研究。

关键词: 高效液相色谱法; 姜黄素; 血药浓度; 药动力学

中图分类号: R917.101; R969.11

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)09-0870-04

Determination of Curcumin in Rat Plasma by HPLC and Study of its Pharmacokinetics

LOU Dan^a, ZHANG Likang^b, SUN Wei^b, LUO Shunbin^b, HU Guoxin^b(Wenzhou Medical College, a.The Second Affiliated Hospital; b.School of Pharmacy, Wenzhou 325035, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a high performance liquid chromatography method for the determination of curcumin in rat plasma and study its pharmacokinetics. **METHODS** Plasma was extracted by ethyl acetate. The analytical column was packed with ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-water- 0.1% trifluoroacetic acid (50 : 30 : 20) and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The UV detection wavelength was 302 nm (0~5.5 min) and 426 nm (5.5~7.5 min). Six SD rats, ♂, were given a single dose of 10 mg·kg⁻¹ curcumin with intravenously injection into the sublingual vein. Blood samples were collected from the tail vein at different time points after injection. The concentration of curcumin in plasma were detected by the established HPLC method. The pharmacokinetics parameters were analyzed by DAS program. **RESULTS** Excellent liner relationship was obtained in the range of 0.05~6.00 mg·L⁻¹($r=0.9998$), the limit determination of curcumin was 0.05 mg·L⁻¹. The recoveries were(99.3±5.4)%、(104.2±4.7)%and (99.8±2.0)% respectively at three concentrations(0.10, 1.00, 4.00 mg·L⁻¹), the intra-day RSD were 4.49%, 3.90% and 1.72% and inter-day RSD were 4.61%, 4.27% and 2.00%, respectively. After intravenously injection of curcumin, curcumin was fitted the two-compartment model, the half-life of α phase and β phase was 0.08 h and 0.75 h, respectively. **CONCLUSION** The method is accurate, simple, rapid and could be used to determine the curcumin concentration in rat plasma and study its pharmacokinetics.

KEY WORDS: HPLC; curcumin; plasma concentration; pharmacokinetics

作者简介: 楼旦, 女, 药师

Tel: 13905776721

E-mail: choupidan99@163.com

姜黄素(curcumin)是从姜科姜黄属植物姜黄、莪术等的根茎中提取的一种有效成分,具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗纤维化和抗动脉粥样硬化等作用^[1];另外还具有调血脂和保护心肌缺血再灌注损伤的作用^[2-3];能明显抑制糖尿病大鼠的氧化应激作用,在防治糖尿病肾脏病变过程中具有良好的应用前景^[4]。关于姜黄素的高效液相色谱法检测,国内已有报道^[5-7];本试验在相关报道的基础上,建立了液液萃取法测定大鼠血浆姜黄素的高效液相色谱检测方法,具有操作简便、测定速度快、试剂便宜等优点,便于推广使用,并在此基础上研究了姜黄素在大鼠体内的药动学过程。

1 材料与方法

1.1 仪器

Agilent1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);AB204-A 电子分析天平(梅特勒-托利多上海仪器有限公司,灵敏度 0.1 mg);XK96-B 涡旋混合器(姜堰市新康医疗器械有限公司);D10 型氮吹仪(杭州蓝焰科技有限公司)。

1.2 试剂和药品

姜黄素对照品(上海融禾医药科技有限公司,批号:070912,纯度:98.7%);AF-2364 对照品(美国洛克菲尔大学提供,批号:061104,纯度:99.6%)。甲醇和乙腈为一级色谱纯,三氟乙酸、乙酸乙酯、氢氧化钠均为分析纯;实验用水为纯净水。

1.3 溶液配制

准确称取姜黄素对照品 25 mg 于 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解定容,得浓度为 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的姜黄素标准储备液;用甲醇稀释成浓度依次为 100, 10 和 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准工作液(临用时稀释)。

准确称取 AF2364 对照品 25 mg 于 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解定容至 25 mL,得浓度为 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AF2364 标准储备液;用甲醇稀释成浓度为 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AF2364 内标工作溶液。

1.4 色谱条件

色谱柱:ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm);保护柱:SB-C₁₈保护柱(4.6 mm×12.5 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水-0.1%TFA(50:30:20);流速: $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;柱温:35 °C;检测波长:302 nm(0~5.5 min), 422 nm(5.5~7.5 min)。

1.5 血浆样品处理方法

准确吸取待测血浆样品 0.3 mL 于 10 mL 具塞试管中,加入 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AF2364 内标工作液 50 μL,混匀后加入 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 200

μL。再加入乙酸乙酯 3.0 mL,漩涡混匀 2 min。转移上层有机相于另一刻度离心管中,氮吹仪中吹干。用 200 μL 流动相复溶,取复溶液于自动进样器的样品瓶中,设定 10 μL 进样检测。

1.6 药动学实验

6 只 SD 大鼠,♂,由温州医学院实验动物中心提供[实验动物合格证号:SCXK(浙)2005-0019],体质量 180~230 g,禁食 12 h 后用于药动学研究。姜黄素用二甲基亚砜溶解。每只动物按照 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量舌下静脉注射姜黄素,2 h 后禁食不禁水。分别在给药前和给药后 0.08, 0.17, 0.25, 0.33, 0.50, 0.75, 1, 1.5, 2, 3 和 4 h 尾静脉采血 0.7 mL 于肝素化试管中,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后分离血浆,−80 °C 保存待检。用 DAS 2.0 程序计算姜黄素的药动学参数。

2 结果

2.1 专属性试验

空白血浆、姜黄素+内标血浆对照品以及大鼠血浆样品,经 HPLC 分析测定得到的色谱图见图 1。结果显示姜黄素与内标能完全分离,血浆中内源性物质不干扰姜黄素和内标的检测。

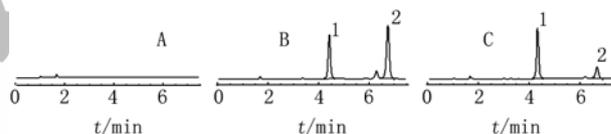


图1 姜黄素的高效液相色谱图

A-空白血浆;B-血浆加姜黄素($4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)及内标;C-血浆样品($0.57 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$);1-内标;2-姜黄素

Fig 1 HPLC Chromatograms of curcumin

A-blank plasma; B-plasma spiked with curcumin($4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and internal standard; C-rat plasma sample; 1-internal standard; 2-curcumin

2.2 线性关系及定量下限

配成浓度相当于 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00 和 $6.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的姜黄素血浆标准品溶液,再按“1.5”项下方法处理后检测,记录姜黄素峰面积 A_s 、内标峰面积 A_i ,以 A_s/A_i 为纵坐标(Y),以所对应各点浓度 C 为横坐标(X)绘制标准曲线。得姜黄素的标准曲线回归方程为 $Y=0.3186X-0.0012$ ($r=0.9998$)。定量下限为 $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($n=6$; $\text{RSD}=5.21\%$)。

2.3 回收率试验

2.3.1 方法回收率试验 配制低、中、高 3 种浓度(0.10, 1.00, $4.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的姜黄素血浆标准品溶液,每种浓度 6 份,再按“1.5”项下方法处理后检测。依据标准曲线计算各自的浓度,计算方

法回收率, 结果见表 1。

2.3.2 绝对回收率试验 配制低、中、高 3 种浓度(0.10, 1.00, 4.00 mg·L⁻¹)的姜黄素血浆标准品溶液, 每种浓度 6 份, 再按“1.5”项下方法处理后检测, 记录姜黄素的峰面积, 为血浆标准的峰面积。另取锥底试管 6 支, 两个一组; 每组加入与配制血浆标准品溶液相同的姜黄素标准品溶液, 直接吹干后用流动相 200 μL 复溶, 10 μL 进样检测; 记录不同浓度姜黄素的峰面积, 为该浓度的纯标准品的峰面积。计算血浆标准的峰面积与纯标的峰面积的比值, 即为绝对回收率, 结果见表 1。

表 1 血浆姜黄素的回收率结果(n=6, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Recoveries of curcumin in rat plasma(n=6, $\bar{x} \pm s$)

加入量/ mg·L ⁻¹	测得量/ mg·L ⁻¹	相对回收率/%	RSD/%	绝对回收率/%	RSD/%
0.10	0.10±0.01	99.3±5.4	5.42	77.18±3.48	4.51
1.00	1.04±0.05	104.2±4.7	4.53	77.84±1.22	1.57
4.00	3.99±0.08	99.8±2.0	1.98	78.25±0.81	1.04

2.4 精密性试验

配制低、中、高 3 种浓度(0.10, 1.00, 4.00 mg·L⁻¹)的姜黄素血浆标准品溶液, 每种浓度 6 份, 再按“1.5”项下方法处理后于同一日内测定, 依据当日标准曲线计算检测量, 计算日内精密性; 连续 3 d 同样操作, 计算日间精密性, 结果见表 2。

表 2 血浆姜黄素的精密性结果(n=6, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Precisions of curcumin in rat plasma(n=6, $\bar{x} \pm s$)

加入量/ mg·L ⁻¹	日内 /mg·L ⁻¹	RSD/%	日间/mg·L ⁻¹	RSD/%
0.10	0.10±0.00	4.49	0.10±0.01	4.61
1.00	1.02±0.04	3.90	1.03±0.04	4.27
4.00	4.01±0.07	1.72	4.01±0.08	2.00

2.5 样品稳定性

2.5.1 冻融条件下血浆样品的稳定性 配制低、中、高 3 个浓度(0.10, 1.00, 4.00 mg·L⁻¹)的姜黄素血浆标准溶液, 每种浓度 3 份; 经历 3 次冰冻-解冻循环后, 按“1.5”项下方法处理检测, 考察其稳定性。低、中、高三个浓度的 RSD 分别为 4.92%, 4.56%, 0.65%, 结果显示冻融条件对血浆样品的检测结果没有明显的影响。

2.5.2 冰冻保存血浆样品的稳定性 配制低、中、高 3 个浓度(0.10, 1.00, 4.00 mg·L⁻¹)的姜黄素血浆标准样品溶液, 每种浓度 3 份; 在-80 °C 冰箱冰冻保存 28 d 后, 再按“1.5”项下方法处理后检测, 考察其稳定性。低、中、高 3 个浓度的 RSD 分别

为 2.97%, 0.61%, 0.56%。结果显示姜黄素血浆样品在冰冻保存的条件下有很好的稳定性。

2.5 血浆药时数据

6 只大鼠按 10 mg·kg⁻¹ 的剂量舌下静脉注射姜黄素后, HPLC 检测血浆中姜黄素的浓度, 平均的血浆药物浓度-时间曲线见图 2。

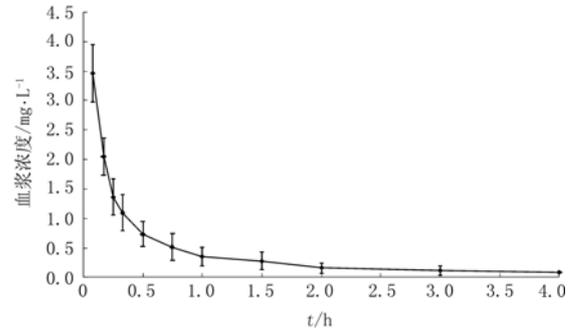


图 2 单剂量静脉注射 10 mg·kg⁻¹ 姜黄素后的平均血浆药时曲线(n=6)

Fig 2 Mean concentration-time curve of curcumin after a single dose of 10 mg·kg⁻¹ to rats (n=6)

2.6 药动学参数

血浆药物浓度经 DAS 2.0 程序处理, 用房室模型估算药代动力学参数。姜黄素在大鼠体内的主要药代动力学参数见表 3。

表 3 单剂量静脉注射 10 mg·kg⁻¹ 姜黄素的主要药代动力学参数(n=6)

Tab 3 Pharmacokinetic parameter of curcumin after a single dose of 10 mg·kg⁻¹ to rats (n=6)

药动学参数	$\bar{x} \pm s$
C _{max} /mg·L ⁻¹	3.46±0.53
t _{1/2α} /h	0.08±0.03
t _{1/2β} /h	0.75±0.36
V ₁ /L·kg ⁻¹	1.60±0.47
CL/L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	4.64±1.09
AUC ₍₀₋₄₎ /mg·h·L ⁻¹	1.82±0.48
AUC _(0-∞) /mg·h·L ⁻¹	2.26±0.53

3 讨论

姜黄素在整个紫外区均有良好的吸收, 二极管阵列检测器(DAD)三维立体图显示, 姜黄素的最大吸收波长在 426 nm 处。关于血浆姜黄素的检测, 一般采用 HPLC-UV 的方法^[5-8]。内标 AF-2364[1-(2,4-dichlorobenzyl)-indazole-3-carbohydrazide], 中文名(1-(2, 4-二氯苯)-1H-吡唑-3-碳酰肼, 是一种新型药物, 为氯尼达明的类似物, 极性较弱, 与姜黄素有着相似的理化性质, 在相同的实验条件下, 保留时间比较接近。本试验建立的 HPLC 内标法检测大鼠血浆姜黄素浓度的方法, 具有血浆处理方法简单, 样品检测时间短, 定量下限低等优点; 方法的专属性高, 方法回收率均在 85%~115%内,

绝对回收率大于 70%；日内和日间变异均小于 10%，符合药代动力学研究的要求。

本研究显示，大鼠静脉注射姜黄素后，姜黄素在大鼠体内符合的二室模型， α 相和 β 相消除半衰期分别为 0.08 h 和 0.75 h，血浆消除半衰期很短。

REFERENCES

- [1] SU Q, XU Z P. The research progress of pharmacological actions of curcumin [J]. Jiangxi J Tradit Chin Med(江西中医药), 2010, 41(332): 78-80.
- [2] DI J B, GU Z L, ZHAO X D, et al. Study of curcumin for rats with high lipid fatty liver [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2010, 41(8): 1322-1326.
- [3] ZHAO X F, CHANG C, XIN S L, et al. Study of curcumin on myocardial ischemia reperfusion injury in rats [J]. Chin J Integr Med Cardio Cereb Dis(中国中西医结合心脑血管病杂志), 2010, 8(8): 956.
- [4] ZHANG W G, HAN G, WANG B, et al. Effect of curcumin solid dispersion on oxidative stress in diabetic rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2010, 27(1): 13-15, 34.
- [5] GU J J, DENG Y J, WANG H, et al. Determination of curcumin in rat plasma by RP-HPLC [J]. J Chengdu Med Col(成都医学院学报), 2009, 4(4): 241-244.
- [6] ZENG X H, CHEN Y X, ZHAO Z M, et al. Pharmacokinetics of curcumin microcystin in rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2010, 16(2): 107-110.
- [7] XU H L, SUN Y, SHAI J Z, et al. Study of pharmacokinetics of curcumin liposomes in rat [J]. J Hubei Coll Tradit Chin Med(湖北中医学院学报), 2007, 9(1): 42-43.
- [8] ZHANG J F, HOU S X, LIU H L, et al. Determination of curcumin in plasma by HPLC and Its pharmacokinetics in mice [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2007, 42(4): 288-290.

收稿日期 2010-12-08