

HPLC 测定金丝桃苷的血药浓度及其在药动学研究中的应用

王晓剑,郝旭亮,梁泰刚,李云兰,李青山* (山西医科大学药学院,太原 030001)

摘要:目的 建立 HPLC 测定大鼠血浆中金丝桃苷(槲皮素-3-O-半乳糖苷)浓度的方法,并用此方法对金丝桃苷在大鼠体内的药动学进行研究。方法 金丝桃苷以 $12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量经大鼠尾静脉注射,于不同时间点眼球静脉丛取血,甲醇直接沉淀蛋白,HPLC 测定金丝桃苷的血药浓度。采用 Shimadzu ODS(4.6 mm \times 150 mm,5 μm) 色谱柱,以甲醇:水(40:60)为流动相,检测波长 360 nm,流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 。乙酰苯胺为内标测定金丝桃苷的含量。结果 金丝桃苷和乙酰苯胺能完全分离。线性范围为 $20 \sim 4888 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,回归方程为 $Y = 132.539X - 8.736$, $r = 0.9996$ 。日内精密度 RSD 为 $0.1\% \sim 2.9\%$,日间精密度 RSD 为 $1.5\% \sim 7.3\%$;平均回收率为 90.1% ,RSD 为 0.9% 。其体内过程符合三室模型, $t_{1/2(p)}$ 为 $(1.62 \pm 0.54) \text{ min}$, $t_{1/2(a)}$ 为 $(18.67 \pm 2.48) \text{ min}$, $t_{1/2(b)}$ 为 $(660.15 \pm 155.56) \text{ min}$,AUC 为 $(200229 \pm 4397.63) \text{ ng} \cdot \text{min} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结论 分析方法简便快速,专属好,精密度和回收率高,可满足药动学研究的一般要求。

关键词:金丝桃苷;药动学;高效液相色谱法

中图分类号:R917.101;R917.792

文献标识码:B

文章编号:1007-7693(2009)03-0231-03

HPLC for Determination of Hyperoside in Rats Plasma and Its Application in Pharmacokinetics Study

WANG Xiaojian, HAO Xuliang, LIANG Taigang, LI Yunlan, LI Qingshan* (School of Pharmaceutical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To establish a HPLC for the determination of hyperoside (3-O-galactose-quercetin) in rats plasma and to study the pharmacokinetics of hyperoside in rats. **METHODS** Blood samples were collected via eyeball veniplex at different time intervals after injection of hyperoside through tail vein to rats at the doses of $12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The plasma protein was first precipitated directly with methanol and then the plasma concentrations of the hyperoside were analyzed by HPLC. A Shimadzu ODS column(4.6 mm \times 150 mm,5 μm) was used with a mobile phase consisting of methanol-water (40:60). The detection wavelength was set at 360 nm. The mobile phase was run at a flow rate of $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The temperature of column was $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Acetanilide was elected as the internal standard. **RESULTS** Hyperoside and acetanilide were successfully separated. The linear range was $20 \sim 4888 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, the regression equation of hyperoside was $Y = 132.539X - 8.736$, $r = 0.9996$. The precision of intra-assay and inter-assay was $0.1\% \sim 2.9\%$ and $1.5\% \sim 7.3\%$. The average extraction recovery was 90.1% with RSD 0.9% . The results showed that the concentration-time curve of Hyperoside in rat plasma could be fitted to three-compartment open model and its pharmacokinetic parameters were as follows: $t_{1/2(p)}$ was $(1.62 \pm 0.54) \text{ min}$, $t_{1/2(a)}$ was $(18.67 \pm 2.48) \text{ min}$, $t_{1/2(b)}$ was $(660.15 \pm 155.56) \text{ min}$, AUC was $(200229 \pm 4397.63) \text{ ng} \cdot \text{min} \cdot \text{mL}^{-1}$. **CONCLUSION** The HPLC method is simple and efficient with excellent specificity, sensitivity, precision, recovery and can be applied to pharmacokinetic investigation.

KEY WORDS: hyperoside; pharmacokinetics; HPLC

金丝桃苷(hyperoside)属黄酮醇苷化合物,结构为槲皮素-3-O-半乳糖苷。广泛存在于多种中草药植物中,是多种中草药的有效成分,国内外对其药理作用的机制也进行了大量研究^[1],大量的实验证实,它具有镇痛、镇静、解痉、抗氧化、抗炎、止咳、对脑缺血损伤的保护等作用^[2-3],而且也有对含有金

丝桃苷的有效部位进行了体内研究的报道,许慧君^[4]等直接用照山白总黄酮给药,测定药动学参数。但对于单一的金丝桃苷在体内的药动学研究至今未见报道。本研究建立了 HPLC 测定大鼠体内金丝桃苷的浓度,并对金丝桃苷在体内的药动学进行了探讨。

基金项目:山西省自然科学科学基金(NO.20031102);山西省科技攻关项目(NO.2006031201-01);山西医科大学学生校青年基金资助项目(NO.200711)

作者简介:王晓剑,男,硕士

* **通信作者:**李青山,男,教授,博士生导师

Tel:(0351)4690322

E-mail;qingshanl@yahoo.com

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

金丝桃苷(中国药品生物制品检定所,批号:111521-200303);乙酰苯胺(中国药品生物制品检定所,批号:040547-007);色谱甲醇;乙醇和肝素均为分析纯。Wistar大鼠(SCXK D01-01007),♂,体重200~250 g,山西医科大学实验动物中心提供。

Waters2695全自动高效液相色谱仪,DAD检测器,Empower操作软件(美国Waters公司);TGL-16G高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);CAY-1型漩涡混合器(北京冰箱电机厂)。

1.2 给药及样品采集

健康大鼠5只,体重200~250 g,给药前禁食12 h,自由饮水,金丝桃苷以12 mg·kg⁻¹的剂量经尾静脉注射,分别给药前和给药后1,5,10,20,35 min,1,1.5,2,4,8,12,24 h,经大鼠眼球后静脉丛取血

0.5 mL,置肝素化试管中,3 000 r·min⁻¹离心5 min,分离血浆,-20℃保存待测。

1.3 生物样品的预处理

取血浆200 μL置冰浴的带塞尖底试管中,加内标20 μL(含乙酰苯胺10 mg·L⁻¹),甲醇600 μL,漩涡混合1 min,冷冻离心机4℃高速离心10 min,转速为11 000 r·min⁻¹,取出上层溶液,用0.45 μm微孔滤膜过滤,取20 μL进样分析。

2 实验条件与结果

2.1 色谱条件

采用Shimadzu ODS(4.6 mm×150 mm,5 μm)色谱柱,以甲醇:水(40:60)为流动相,检测波长360 nm,流速为1.0 mL·min⁻¹,柱温25℃,进样量20 μL。乙酰苯胺为内标测定金丝桃苷的含量。此色谱条件下内标和样品的色谱图,见图1。可见空白血浆中内源性物质不干扰金丝桃苷和内标的测定。

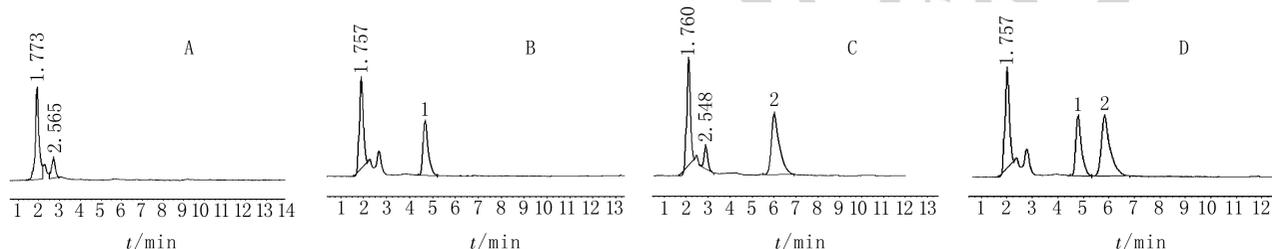


图1 金丝桃苷的HPLC色谱图

A-空白血浆;B-空白血浆中加入乙酰苯胺;C-空白血浆中加入金丝桃苷;D-血浆样品;1-乙酰苯胺;2-金丝桃苷

Fig 1 HPLC chromatograms of hyperoside

A-blank plasma;B-blank plasma spiked with acetanilide;C-blank plasma spiked with hyperoside;D-the plasma sample;1-acetanilide;2-hyperoside

2.2 稳定性考察

将一定浓度的金丝桃苷标准液分别加入200 μL空白血浆中,使终浓度分别为4 888,1 222,24 ng·mL⁻¹,经处理后,分别置室温、-20℃冰箱保存及连续冻融3次,考察48 h,以金丝桃苷峰面积与内标乙酰苯胺峰面积之比考察样品的稳定性。结果表明:生物样品室温、-20℃放置及连续冻融3次的RSD%值分别为25.6%,0.9%,1.3%。因此,金丝桃苷血浆样品在室温条件下放置不稳定,-20℃放置48 h及连续冻融3次都能保持稳定。

2.3 提取回收率考察

取大鼠空白血浆,分别加入一定浓度的金丝桃苷标准溶液,配成4 888,1 222,24 ng·mL⁻¹的浓度,各取6份,除不加内标外,按“1.3”项下方法操作并进行HPLC分析,以金丝桃苷的峰面积与相应浓度的标准溶液直接进样的峰面积之比计算回收率。结果表明在上述3种浓度下金丝桃苷的平均回

收率分别为86.4%,85.5%,98.3%,RSD分别为0.6%,0.2%,1.8%。

2.4 精密度

取大鼠空白血浆200 μL,按“1.3”项下的方法制备高、中、低三个浓度点的QC样品(4 888,1 222,24 ng·mL⁻¹),每个浓度点6个样品,依法与标准曲线同批测定,重复测定3 d,以当日的标准曲线标定QC样品的浓度。据此求算分析方法的日内和日间精密度,该分析方法的日内精密度RSD为0.1%~2.9%,日间精密度RSD为1.5%~7.3%,上述结果均符合生物分析方法指导原则的要求。

2.5 标准曲线的建立

取大鼠空白血浆200 μL置冰浴中的带塞尖底试管内,加入金丝桃苷标准系列溶液,使终浓度分别为20,244,635,1 222,2 444,4 888 ng·mL⁻¹。按“1.3”项下方法处理上述血浆样品,建立标准曲线。分别以待测物与内标的峰面积比为横坐标,以生物

样品中待测物的浓度为纵坐标,用加权最小二乘法 ($W = 1/X^2$) 进行回归计算,求得直线回归方程: $Y = 132.539X - 8.736, r = 0.9996$ (X 为峰面积之比, Y 为浓度),在血药浓度 $20 \sim 4888 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。根据信噪比 $S/N = 3$ 时的浓度是检测限, $S/N = 10$ 是定量限,得最低定量限为 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($RSD = 0.7\%, n = 6$),最低检测限为 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.6 数据处理及结果

金丝桃苷以 $12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量经尾静脉注射,取样,以标准曲线算出各血样的浓度,得金丝桃苷在大鼠体内的平均血药浓度-时间曲线,见图 2,数据经 3P97 程序拟合,得到动力学参数,见表 1。结果表明,给大鼠静脉注射金丝桃苷,体内过程符合三室模型。

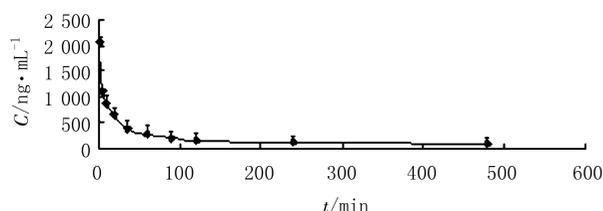


图 2 金丝桃苷静注给药后平均血药浓度-时间曲线 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Fig 2 Mean plasma concentration-time curves of hyperoside files after iv administration ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

表 1 金丝桃苷在大鼠体内药动学参数

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of hyperoside in rat

参数	单位	结果
V_c	$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} / \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.0075 ± 0.0006
$t_{1/2 \text{ pi}}$	min	1.621 ± 0.541
$t_{1/2 \text{ alpha}}$	min	18.667 ± 2.482
$t_{1/2 \text{ beta}}$	min	660.149 ± 155.558
K_{12}	min^{-1}	0.212 ± 0.074
K_{21}	min^{-1}	0.212 ± 0.058
K_{13}	min^{-1}	0.0578 ± 0.0074
K_{31}	min^{-1}	0.0062 ± 0.0014
K_{10}	min^{-1}	0.0139 ± 0.0034
AUC	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	$200.229 \pm 4.397.63$
CL(s)	$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} / \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$0.000103 \pm 1.94E-05$

3 讨论

3.1 在静注溶剂选择上,由于金丝桃苷溶于甲醇、乙醇、丙酮。但这些溶剂都不能直接静注。曾尝试在生理盐水中分别加入乙醇、DMSO、吐温、CMC、甘油等作为静注溶剂,但在规定的静注用量内溶解度都很低,不能满足给药剂量,经考察最后选用乙醇:吐温:生理盐水 = 1:1:8 作为静注溶剂能够满足要求。

3.2 在选择房室模型上,通过比较不同浓度的精密度,选用权重系数为 $1/C^2$,在此权重系数下比较不同房室的 R^2 和 AIC 值,经拟合金丝桃苷在大鼠体内动力学过程符合三室模型。半衰期为 $t_{1/2(p)}$: (1.621 ± 0.541) min, $t_{1/2(a)}$: (18.667 ± 2.482) min, $t_{1/2(b)}$: (660.149 ± 155.558) min。

3.3 本试验也尝试同等剂量的灌胃给药,但并未检测到金丝桃苷原形药物。有文献报导^[5],一些黄酮类化合物如槲皮素等灌胃后,被肠道内细菌转化为各代谢产物后吸收入血,导致在血液中检测不到原形药物,对于金丝桃苷的吸收机理有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] WURGLICS M, SCHUBERT-ZSILAVECZ M. Hypericum Perforatum; A 'Modern' Herbal Antidepressant; Pharmacokinetics of Active Ingredients [J]. Clin Pharmacokinet, 2006, 45 (5):449-468.
- [2] ZHANG C W, ZHOU Y Q, CHEN L. Advances of the Hyperin pharmacology research [J]. Anhui Med Pharm J (安徽医药), 2007, 11 (11):961-963.
- [3] WU L L, ANG X B, HUANG Z M et al. In vivo and in vitro antiviral activity of hyperoside extracted from Abelmoschus manihot(L) medik [J]. Acta Pharmacol Sin (中国药理学报), 2007, 28 (3):404-409.
- [4] XU H J. Study on Pharmacokinetics of Hyperin in Folium Rhododendri Micranthi [D]. Hebei Med Univ (河北医科大学), 2004.
- [5] LI Y F, GUO C J. Advances of the Quercetin pharmacokinetics research [J]. Prog Physiol Sci (生理科学进展), 2002, 33 (1): 53-55.

收稿日期:2008-01-24

2009 年起本刊在线投稿系统全面投入使用,投稿请登陆 www.chinjm.com, 点击左上方的“作者在线投稿”即可。为方便作者投稿,本刊自 2009 年 3 月起开通在线缴纳稿件费用的功能,欢迎大家通过在线系统踊跃投稿。