

口服丁香酚在大鼠体内药动学研究

李婷婷^a, 赵雪^a, 曾文婷^a, 张斌^a, 杨书^{b*} (成都医学院, a.药学院; b.公共卫生系, 成都 610083)

摘要: 目的 建立大鼠血浆中丁香酚含量测定的高效液相色谱法(HPLC)。方法 丁香酚大鼠灌胃给药后,应用 HPLC 测定其在大鼠血浆中的含量,色谱柱: Allsphere ODS-2 RP-18(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-0.5%冰醋酸=63:37 (pH=4.78); 检测波长: 280 nm; 柱温: 30 °C; 流速: 0.8 mL·min⁻¹。结果 丁香酚经口服 14.25 mg·kg⁻¹ 的剂量后在体内药动学特征符合二室开放模型。结论 所建方法简单、灵敏、准确可靠,可用于丁香酚的药动学研究。

关键词: 丁香酚; 药动学; 高效液相色谱法

中图分类号: R945

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)02-0170-03

Study on Pharmacokinetics of Oral Eugenol in Rats

LI Tingting^a, ZHAO Xue^a, ZENG Wenting^a, ZHANG Bin^a, YANG Shu^{b*} (Chengdu Medical College, a.School of Pharmacy; b.Public Health Department, Chengdu 610083, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determination of eugenol in rat plasma. **METHODS** HPLC was applied to assay the eugenol concentration in rat plasma after oral administration. The separation was carried out on a Allsphere ODS-2 RP-18(4.6 mm×250 mm, 5 μm) column using the mobile phase: methanol-0.5% acetic acid (63:37), pH=4.78. The detection wavelength was set at 280 nm with the column temperature 30 °C. The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. **RESULTS** Eugenol pharmacokinetics fit the two-rooms open model after oral administration in rats with a 14.25 mg·kg⁻¹ dosage. **CONCLUSION** The method is simple, sensitive and accurate, and could be applied to the pharmacokinetic study of eugenol in rats.

KEY WORDS: eugenol; pharmacokinetics; HPLC

丁香酚(eugenol)是丁香及丁香罗勒油的主要成分,化学结构式为 4-烯丙基-2-甲氧基苯酚。近年研究表明,丁香酚具有抑菌、麻醉、解热、抗氧化、抗肿瘤等多种药理活性^[1-4]。常作为健胃等中成药的主要成分。本实验通过 HPLC 测定大鼠口服丁香酚后在血浆中的药物含量,其旨在研究丁香酚的药动学特性,目前相关药动学研究未见报道。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪,包括 P680 型高压泵、ASI-100 自动进样器、UVD170U 多波长紫外检测器(戴安公司); TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂); XW-80A 涡旋混合仪(上海青浦沪西仪器厂)。

丁香酚对照品(中国药品生物制品检定所,批号: A0074,纯度≥99%); 肉桂酸对照品(国药集团化学试剂有限公司,批号: A0305,纯度≥98%); 甲醇为色谱纯(DIKMA 公司,批号: 93102); 乙醇(成都市科伦化学试剂厂,批号: 20090725); 冰醋

酸、氢氧化钠(天津市致远化学试剂有限公司,批号分别为 20090908, 20090820)。除甲醇为色谱纯外,其余试剂均为分析纯,水为实验室自制超纯水,抽滤后使用。

SD 大鼠,♂,四川大学实验动物中心,实验动物合格证号: SCXK(川)-10-2006,体重(200±20)g,实验前未用任何药物。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Allsphere ODS-2 RP-18(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.5%冰醋酸=63:37(pH=4.78); 检测波长: 280 nm; 柱温: 30 °C; 流速: 0.8 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μL。

2.2 对照品溶液的配制

2.2.1 标准系列对照品溶液的配制 称取丁香酚对照品适量,精密称定,置 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释并定容,配制成浓度为 68.672 μg·mL⁻¹ 的储备液,经稀释,配制成浓度为 0.537, 1.074 5, 2.167, 4.292, 8.584, 17.168, 34.336 μg·mL⁻¹ 的标准系列

作者简介: 李婷婷,女,硕士,实验师 Tel: 13693498161 E-mail: lttys-1983@163.com

E-mail: 93897556@qq.com

*通信作者: 杨书,男,硕士,讲师 Tel:

工作液, 置 0~4 °C 冰箱中保存待用。

2.2.2 内标溶液的配制 称取肉桂酸对照品适量, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 配制成浓度为 31.80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的甲醇稀释液, 即得到内标工作液, 置 0~4 °C 冰箱中保存待用。

2.2.3 丁香酚供试溶液的配制 取丁香酚对照品, 精密称定, 加入 70%乙醇-聚氧乙烯蓖麻油约为 1:1 的溶液充分溶解后稀释, 配制浓度为 2.26 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的丁香酚供试液。

2.3 血浆样品预处理

精密量取大鼠空白血浆样品 100 μL , 加入内标工作液肉桂酸 20 μL , 涡旋混旋 30 s, 再加入 200 μL 的蛋白沉淀剂甲醇, 涡旋混合 3 min 后, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 20 μL 进样, 按“2.1”项下色谱条件分离测定, 记录丁香酚峰面积和内标峰面积, 代入标准曲线计算大鼠血浆中丁香酚的浓度。

2.4 方法学考察

2.4.1 标准工作曲线的绘制 精密吸取 100 μL 大鼠空白血浆, 置于塑料离心管中, 分别加入 20 μL 不同浓度的丁香酚标准曲线系列工作液, 得 0.089 5, 0.179 0, 0.361 2, 0.715 3, 1.430 6, 2.861 3, 5.722 6, 11.445 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的丁香酚血浆溶液。再于各管中加入 20 μL 内标液, 按“2.2”项下方法处

理后, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录峰面积。以丁香酚与内标峰面积的比值为纵坐标, 浓度为横坐标进行线性回归。得回归方程为 $Y=109.82 X+1.278 7$, $r=0.996 1$ 。结果表明: 丁香酚血浆浓度在 0.089 5~11.445 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 浓度与峰面积比值有良好的线性关系。

2.4.2 专属性考察 取空白组织样品加丁香酚和内标物肉桂酸, 按“2.2”项下方法处理后, 按“2.1”项下色谱条件分别进样测定。结果表明, 各组织中的内源性物质对测定结果无影响, 丁香酚的保留时间约为 9.7 min, 内标物肉桂酸的保留时间约为 7.6 min, 两者峰形良好, 基线平稳。

2.4.3 最低定量浓度 配制一系列不同浓度的丁香酚溶液, 按“2.2”项下方法处理后, 按“2.1”项下色谱条件测定样品峰面积。结果表明丁香酚血浆浓度在 0.089 5~11.445 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 浓度与峰面积比值有良好的线性关系。故确定丁香酚在血浆中的最低定量浓度为 0.089 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($\text{RSD}=13.63\%$, $n=6$)。

2.4.4 方法回收率 精密量取丁香酚工作液各 20 μL , 加入 100 μL 空白血浆中, 配制低、中、高浓度的丁香酚血浆样品各 3 份, 按“2.4.1”项下从“于各管中加入 20 μL 内标液”方法开始操作, 以测得值与加入量的比值计算回收率, 结果见表 1。

表 1 回收率试验结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 1 Results of recovery test ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

理论值/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	测得值/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$					回收率/%
0.179	0.183 6	0.188 1	0.187 8	0.184 2	0.185 6	103.8 \pm 1.15
1.430 6	1.331	1.376	1.246	1.385	1.37	93.8 \pm 4.00
11.445	11.045	9.842	12.382	10.359	10.421	97.5 \pm 4.41

2.4.5 精密度试验 取丁香酚血浆样品高、中、低 3 个浓度各 6 份, 每一浓度进行 6 样本分析, 按“2.4.4”项下方法测定, 以一天内 5 次测定结果计算日内精密度。以一周内 3 d 测定计算日间精密度。本方法测定的丁香酚血浆样品的日内和日间精密度 $\text{RSD}<15\%$, 结果均符合目前生物样品分析方法指导原则的有关规定。

2.4.6 绝对回收率 取丁香酚血浆样品高、中、低 3 个浓度各 3 样本, 按“2.2”项下方法操作, 测得样品中被测物的色谱峰面积, 与相应浓度的标准溶液中被测物的色谱峰面积比较, 计算绝对回收率。被测物及内标在高、中、低 3 个浓度组织样品中绝对回收率 $>80\%$, 说明组织样品的萃取方法

稳定可靠。

2.4.7 血浆样品稳定性 参照 SFDA “化学药物非临床药代动力学研究技术”与 FDA 的“Guidance for Industry—Bioanalytical Method Validation”中的相关技术指导原则, 并且结合待测物丁香酚本身的理化性质及其预实验结果, 对丁香酚待测样品的稳定性进行考察, 具体包括①样品在室温下放置 6 h 的稳定性考察; ②样品反复冻融 3 次后的稳定性考察 ($-70\text{ }^\circ\text{C}$); ③样品的长期稳定性考察 ($-70\text{ }^\circ\text{C}$)。结果表明样品于室温下放置至少 6 h 内可保持稳定, 于 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下放置至少 5 d 内可保持稳定, 样品经过 3 次冻融后仍可保持稳定。结果稳定性 $\text{RSD}<15\%$, 表明组织中的被测物浓度可以

被准确测定。

2.5 大鼠口服给药后体内药动学研究

选取健康SD大鼠6只, ♂, 禁食12 h, 自由饮水。体重(200±20)g, 次日按14.25 mg·kg⁻¹剂量口服灌胃给予丁香酚供试液, 给药前断尾取空白血约0.3~0.4 mL于肝素化塑料离心管中, 给药后分别于15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 210, 240, 360, 480, 600 min断尾取血0.3~0.4 mL, 置0.5 mL肝素化塑料离心管中, 离心后分离血浆, 所得血浆置-70 °C保存, 按“2.2”项下方法处理后, 按“2.1”项下色谱条件测定。

将药时曲线数据输入DAS 2.0软件, 进行房室模型拟和。房室模型的选择遵循Akaike原则, 根据拟和残差的大小来选择合适的权重。结果表明房室模型为二室模型, 权重选择均为1/c²。主要药动学参数见表2, 平均药时曲线见图1。

表2 大鼠口服 14.25 mg·kg⁻¹丁香酚后主要药动学参数

Tab 2 Pharmacokinetics parameters of eugenol after p.o at 14.25 mg·kg⁻¹ dosage

参数	均数	标准差
AUC _(0-t) /mg·L ⁻¹ ·min ⁻¹	576.444	266.627
AUC _(0-∞) /mg·L ⁻¹ ·min ⁻¹	719.062	299.55
MRT _(0-t) /min	119.19	41.221
MRT _(0-∞) /min	227.135	79.793
t _{1/2z} /min	183.161	79.751
T _{max} /min	40	12.247
CL _z /L·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	0.007	0.004
V _z /L·kg ⁻¹	1.708	0.838
C _{max} /mg·L ⁻¹	4.831	1.287

3 讨论

本实验建立的生物样品中丁香酚的 HPLC 检测方法, 简单、快速、重复性高且满足丁香酚样品测定的需要。利用 DAS 2.0 药动学软件进行了

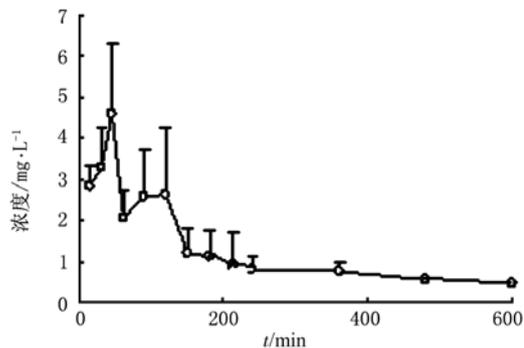


图1 大鼠口服 14.25 mg·kg⁻¹丁香酚后平均药时曲线(n=6)
Fig 1 Mean plasma concentration-time curve of eugenol p.o. 14.25 mg·kg⁻¹ to rats (n=6)

房室模型拟合并计算各药动学参数, 了解了丁香酚在大鼠体内的药动学变化过程。结果显示丁香酚经口服后在体内药动学特征符合二室开放模型, 在血中浓度快速下降, 迅速分布到体内各组织器官中, 消除较快, 表观分布容积较大, 在组织中分布较广, 且出现双峰现象, 初步判断由于肝肠循环导致。有关丁香酚的药动学报道甚少, 为以后丁香酚的进一步研究打下了生物药剂学与药动学基础。

REFERENCES

- [1] PENG Z B, ZHANG Q G, DAI H J, et al. Progress in pharmacological research of eugenol [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2006, 17(10): 2079-2081.
- [2] ZENG H F, HUANG Y H, LI X L, et al. Determination of volatile components in baicao oil [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2007, 29(4): 558-560.
- [3] YU X P. Determination of eugenol in liac by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2008, 28(6): 975-977.
- [4] CHEN T L, ZHANG H, ZHOU C Y. Clinical and experimental study on lilac topical overview [J]. Shangdong J Tradit Chin Med(山东中医杂志), 2009, 28(2): 139-141.

收稿日期: 2011-06-13