

表 2 3 种方法测定含量测定结果比较
Tab. 2 The comparative assay result of three methods

剂型	厂家	批号	含量测定			有关物质	
			HPLC/%	UV/%	现行标准/%	最大杂质/%	其他杂质总和/%
注射用甘草酸二铵	B	100131	97.10	98.14	98.18	3.4	1.9
	C	0908021	86.38	87.41	87.44	3.8	2.2
甘草酸二铵注射液	A	1003271	101.93	102.51	102.54	1.3	1.1
		1004031	100.05	101.15	101.19	1.4	1.0
		1004241	100.73	101.93	101.96	1.2	1.1
	D	0908021	97.25	98.64	98.68	2.1	2.0
	E	060111	96.86	97.10	97.14	3.0	4.7

3 讨论

本研究考察了乙腈-0.01 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液 (pH 4.53, 4.04, 3.54, 3.04), 乙腈-1%冰醋酸和乙腈- 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸溶液等体系, 结果显示: 前 2 个缓冲体系色谱峰峰形拖尾严重且分离度欠佳; 而后者效果较好, 色谱峰峰形对称且主峰与相邻杂质峰完全分离。

表 2 可以看出, 对照品紫外-分光光度法测定含量的结果与现行标准基本一致, 但 HPLC 测定的结果低于现行标准, 原因可能为紫外可见分光光度法测定时将含其他三萜皂苷母核的物质均计入, 说明 HPLC 专属性更强, 能更好的控制药品质量。

在测定有关物质时发现最大杂质高达 3.8%, 其他杂质和最高达 4.7%, 充分说明标准中增订有关物质检查项的必要性。

REFERENCES

[1] GAO Z C, LU L X, KANG L. HPLC determination related substance of diammonium glycyrrhizinate [J]. Chin J Coal Indust Med(中国煤炭工业医学杂志), 2010, 13(1): 122-123.
[2] XU B Y. HPLC determination assay of diammonium glycyrrhizinate [J]. Jiangsu Pharm Clin Res(江苏药学与临床研究), 2005, 13(4): 15-16.
[3] XIE S G, CHEN S, ZHENG G G. HPLC determination of 18-isomer of diammonium glycyrrhetate for injection and its ratio evaluation [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(7): 772-775.

收稿日期: 2013-11-12

补骨脂酚在大鼠血清、肝和肾中的含量测定

张昀^{a,b}, 刘路^b(河南大学, a.民生学院, b.药学院, 河南 开封 475004)

摘要: 目的 建立一种快速检测大鼠灌胃给药后, 补骨脂酚在血清、肝脏、肾脏中含量测定的方法。方法 Agilent HC-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~10 min, B 35%→45%, 10~25 min, B 80%), 流速: 1 mL·min⁻¹, 柱温: 30 ℃, 检测波长: 0~10 min, 295 nm(氯霉素), 10~25 min, 260 nm(补骨脂酚)。结果 补骨脂酚在血清、肝匀浆液、肾匀浆液中均能达到很好的分离, 在 0.1~10.0 mg·L⁻¹ 内有良好的线性关系。结论 本方法简便准确, 可用于测定给药后血清、肝脏、肾脏中补骨脂酚的含量。

关键词: 补骨脂; 补骨脂酚; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2014)08-0984-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.08.019

基金项目: 河南大学民生学院教育教学改革研究项目资助计划(MSJG2013-41); 河南省教育厅研究项目(14B350009)
作者简介: 张昀, 女, 硕士, 讲师 Tel: (0378)3880680 E-mail: 201zhangyun@sina.com.cn

Determination of Bakuchiol in Serum, Liver and Kidney of Rats

ZHANG Yun^{a,b}, LIU Lu^b (Henan University, a.Minsheng College, b.Pharmacy College, Kaifeng 475004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a quantitative determination method of bakuchiol in serum, liver and kidney of rats by HPLC. **METHODS** The HPLC method was used with the Agilent HC-C₁₈ and the mobile phase was 0.1% formic acid-acetonitrile (65 : 35) [0–10 min, B 35%→45%, 10–25 min, B 80%] in the flow rate of 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 295 nm(chloramphenicol) in 0–10 min and 260 nm(bakuchiol) in 10–25 min with column temperature of 30 °C. **RESULTS** The bakuchiol had a good linear between 0.1–10.0 mg·L⁻¹ in serum, liver and kidney of rats. **CONCLUSION** This method can determine the content of bakuchiol in serum, liver and kidney of rats. **KEY WORDS:** psoralen; bakuchiol; HPLC

补骨脂是目前研究较多的中药之一, 具有温补脾肾、壮阳止泻之功效。补骨脂挥发油中的主要成分为补骨脂酚, 具有显著的降血糖作用, 对肝细胞有一定的保护作用, 此外还具有抗炎、抗氧化, 抑制肿瘤细胞生长等多种药理活性, 具有广阔的应用前景^[1-6]。但是, 补骨脂酚的含量测定尚没有完善的方法学, 其在血液中的测定复杂繁琐。因此, 本实验拟建立一种测定大鼠血清、肝脏、肾脏中补骨脂酚含量的方法, 为补骨脂在体内的分布及药动学研究奠定基础。

1 仪器及试剂

AE200S 电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司); Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent); 氯霉素(中国药品生物制品检定所, 批号: 130555-201203, 纯度≥98.0%); 补骨脂酚(自制, 纯度: 98.1%); 甲醇、乙腈为色谱纯(均为天津四友精细化学品有限公司); 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

SD 大鼠, 河南省动物实验中心提供, 合格证号: SCXK(豫)2010-0002, 体质量: 200~250 g, 随机分组, 每组 6 只。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent HC-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B); 梯度洗脱: 0~10 min, B 35%→45%, 10~25 min, B 80%; 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 检测波长: 0~10 min, 295 nm(氯霉素), 10~25 min, 260 nm(补骨脂酚); 进样量: 20 μL。

2.2 对照品储备液的配制

精密称取补骨脂酚对照品至 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 定容, 摇匀, 储存于 4 °C 冰箱待用。

2.3 内标标准溶液的配制

精密称取氯霉素对照品置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 定容, 摇匀, 储存于 4 °C 冰箱待用。

2.4 供试品溶液的制备

2.4.1 血清供试品溶液的制备 精密吸取内标溶液 20 μL 置具塞离心管中, 于缓和氮气流下吹干溶剂, 加入血清样品 200 μL, 乙酸乙酯-正己烷(8 : 1) 800 μL, 涡旋 2 min, 低温离心 10 min(12 000 r·min⁻¹), 取上层有机相置另一试管中, 于氮气流下吹干溶剂, 残渣用 100 μL 甲醇溶解, 即得。

2.4.2 肝脏供试品溶液的制备 称取肝脏相同部位 0.3 g, 加生理盐水 0.5 mL, 10 000 r·min⁻¹ 匀浆离心 10 min(5 000 r·min⁻¹), 取上清液 200 μL 置于氮气流下吹干的含有 20 μL 内标标准液的具塞离心管中, 加入乙酸乙酯-正己烷(8 : 1) 800 μL, 涡旋 2 min, 低温离心 10 min(12 000 r·min⁻¹), 取上层有机相置另一试管中, 氮气流下吹干溶剂, 残渣用 100 μL 甲醇溶解, 即得。

2.4.3 肾脏供试品溶液的制备 称取肾脏相同部位 0.5 g, 同“2.4.2”项下方法操作处理, 即得。

2.5 专属性考察和氯霉素回收率试验

分别取空白血清、空白肝脏和空白肾脏及含药血清、含药肾脏和含药肝脏, 按“2.4”项下方法进行处理, 高效液相色谱图见图 1, 结果 3 种空白样品中均未检测出补骨脂酚, 说明本方法具有较好的专属性。

精密吸取 150 μg·mL⁻¹ 内标溶液 20 μL 置具塞离心管中, 于缓和氮气流下吹干溶剂, 残渣用 100 μL 甲醇溶解, 即得。测得峰面积为 A_0 。

分别精密吸取 150 μg·mL⁻¹ 内标溶液 20 μL 置具塞离心管中, 于缓和氮气流下吹干溶剂, 分别加入空白血清、空白肝匀浆液、空白肾匀浆液各

200 μL , 乙酸乙酯-正己烷(8:1)800 μL , 涡旋 2 min, 低温离心 10 min ($12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$), 分取上层有机相置另一试管中, 于氮气流下吹干溶剂, 残渣用 100 μL 甲醇溶解, 即得。测得血清中氯霉

素的峰面积为 A_1 , 肝匀浆液中氯霉素的峰面积为 A_2 , 测得肾匀浆液中氯霉素的峰面积为 A_3 。则氯霉素在血清中的绝对回收率为 81.3%, 肝匀浆液绝对回收率为 79.5%, 肾匀浆液绝对回收率为 78.9%。

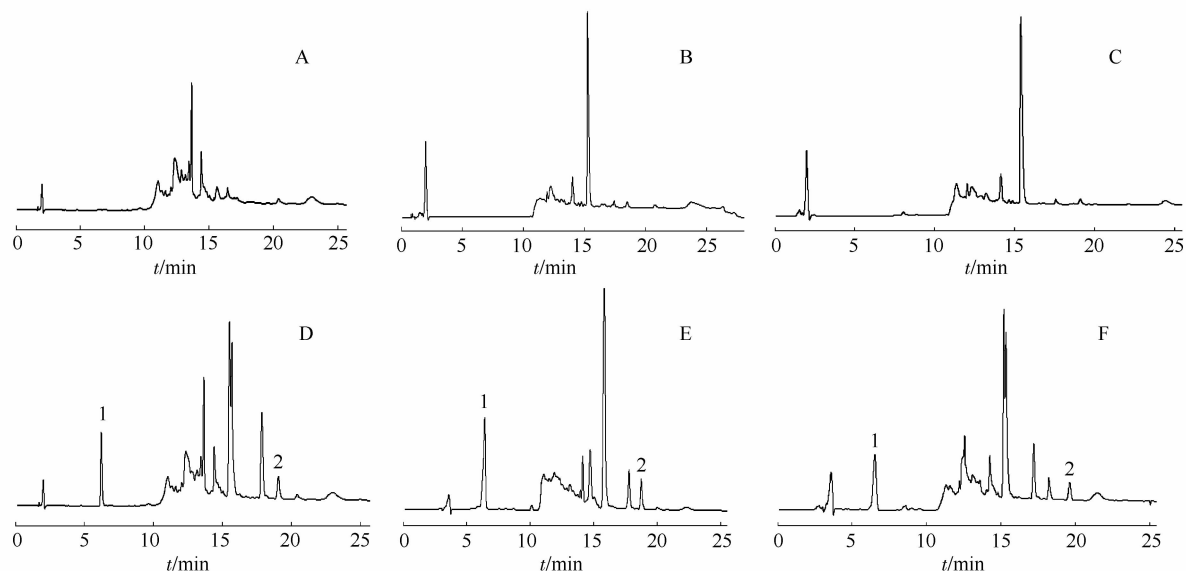


图 1 高效液相色谱图

A-空白血清; B-空白肝匀浆液; C-空白肾匀浆液; D-含药血清; E-含药肝脏; F-含药肾脏; 1-氯霉素; 2-补骨脂酚。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-blank of serum; B-blank of liver; C-blank of kidney; D-sample solution of serum; E-sample solution of liver; F-sample solution of kidney; 1-chloramphenicol; 2-bakuchiol.

2.6 线性关系考察和检测限

精密吸取内标溶液 20 μL 及一定体积的对照品溶液于离心管中, 于氮气流吹干溶剂, 分别加入空白血清、肝和肾匀浆 200 μL , 分别配制补骨脂酚浓度为 10, 6, 3, 1, 0.5, 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血清、肝和肾匀浆样品溶液, 分别按“2.4”项下操作, 建立血清、肝脏和肾脏标准曲线。分别以各样品补骨脂酚的浓度(X)为横坐标, 补骨脂酚与内标峰面积之比(Y)为纵坐标, 求得补骨脂酚在血清、肝脏、肾脏中的线性回归方程分别为 $Y=0.312\,7X+0.003\,4$, $r=0.999\,7$; $Y=0.304\,4X+0.021\,1$, $r=0.999\,9$; $Y=0.345\,2X+0.016\,9$, $r=0.999\,5$ 。表明补骨脂酚在 0.1~10.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 内线性关系良好。精密吸取补骨脂酚对照品贮备液适量, 进行梯度稀释后, 精密吸取各稀释液进行分析, 以信噪比 $\geq 3:1$ 为标准, 测定补骨脂酚的定量限为 11 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 以信噪比 $\geq 10:1$ 为标准, 测定补骨脂酚的定量限为 48 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.7 日内日间精密度试验

大鼠空白血清、肝匀浆和肾匀浆中分别加入

已知量的补骨脂酚对照品, 分别各自制成高、中、低浓度(8, 2, 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的样品, 分别按“2.4”项下方法操作, 结果加补骨脂酚对照品的血清高、中、低浓度样品日内精密度 $\text{RSD}(n=6)$ 值依次为 2.87%, 2.41%, 3.12%; 日间精密度 $\text{RSD}(n=3)$ 值依次为: 7.92%, 8.35%, 10.46%。加补骨脂酚对照品的肝匀浆液高、中、低浓度样品日内精密度 $\text{RSD}(n=6)$ 值依次为 2.96%, 2.18%, 3.37%; 日间精密度 $\text{RSD}(n=3)$ 值依次为 7.49%, 8.72%, 10.43%。加补骨脂酚对照品的肾匀浆高、中、低浓度样品日内精密度 $\text{RSD}(n=6)$ 值依次为 2.27%, 2.89%, 3.35%; 日间精密度 $\text{RSD}(n=3)$ 值依次为 7.76%, 8.83%, 10.26%。

2.8 稳定性试验

取同一血清、肝脏和肾脏样品, 分别于 0, 2, 6, 12, 24 h 进样, 测得补骨脂酚在血清、肝脏和肾脏中的 RSD 值分别为 2.81%, 2.44%, 2.65%, 说明补骨脂酚的血清、肝脏和肾脏样品均在 24 h 内稳定。

2.9 准确度试验

大鼠空白血清、肝匀浆、肾匀浆中分别加入已知量的补骨脂酚对照品,分别制成高、中、低浓度(8, 2, 0.5 mg·L⁻¹)的样品,分别按“2.4”项下方法操作,结果空白血清中平均回收率($n=6$)依次为:100.7% (RSD=3.26%), 105.2%(RSD=3.87%), 108.3%(RSD=5.69%);肝匀浆中平均回收率($n=6$)值依次为:100.7%(RSD=3.94%), 105.2%(RSD=4.05%), 109.6%(RSD=4.77%);肾匀浆中平均回收率($n=6$)值依次为:100.4%(RSD=4.34%), 104.7% (RSD=4.35%), 107.9%(RSD=5.26%)。结果表明,该方法符合要求。

2.10 样品测定

精密称取补骨脂药材粉末(过4号筛),SD大鼠(体质量200~250 g),♀♂各3只,按3.0 g·kg⁻¹大鼠灌胃给药,1 h后眼眶取血,按“2.4”项下方法操作,制备血清、肝、肾供试品,内标法计算各供试品中补骨脂酚的含量。结果,补骨脂酚在血清中含量为1.67 mg·L⁻¹,在肝脏中含量为0.63 mg·L⁻¹,在肾脏中含量为0.25 mg·L⁻¹。

3 讨论

本实验首次建立了在大鼠体内对补骨脂挥发油中主要成分补骨脂酚的检测方法。采用紫外检测器,操作简单可行。通过对不同类型C₁₈色谱柱的考察,发现粒径均为5 μm的色谱柱,长度为250 mm的分离度良好,长度为150 mm的均无法对补骨脂酚实现完全分离。对血清、肝、肾不同预处理方法做了初步考察,筛选了不同的萃取溶剂,丙酮、氯仿等回收率低或有干扰,对不同配比的乙酸乙酯-正己烷进行考察,其中乙酸乙酯-正己烷(8:1)提取效果最好,回收率高。故确定最佳萃取溶剂为乙酸乙酯-正己烷(8:1)。本实验筛选了不同物质做内标物,考察了采用乙腈-0.1%甲酸水(75:25, 80:20, 85:15)等不同比例的等度洗脱方法来测量,杂质峰比较多。在补骨脂酚峰的附近找不到可以添加内标物出峰的位置,故而

采用梯度洗脱的方法。通过实验,氯霉素与补骨脂酚分离效果好,尽管时间相距较大,但方法学研究结果证实,可满足体内样品测定的需要,故选择氯霉素为内标物。

通过预试验发现,雌鼠与雄鼠对补骨脂酚的代谢速度不一样,具体差异需做进一步研究。补骨脂的有效成分还有补骨脂素和异补骨脂素,对这两者的测定已做了一定的研究,能否对三者同时测定还需更深层的探索。

目前,对补骨脂的研究越来越深入,人们发现补骨脂在治疗皮肤病、抗白血病、抗肿瘤、抗衰老、抗骨质疏松等方面,具有独特之处,但长期大剂量服用,具有较大的肝肾损伤。因此,研究补骨脂酚在体内的代谢及蓄积,有利于降低在使用补骨脂时产生的毒性。因此,本实验建立了一种快速分析大鼠体内血清、肝、肾中补骨脂酚含量的方法。该方法具有高灵敏度、操作简单等特点,为补骨脂酚的药代动力学研究以及在体内的分布,提供了必要的参考。

REFERENCES

- [1] HSU P J, MILLER J S, BERGER J M. Bakuchiol, an antibacterial component of *Psoraleidium tenuiflorum* [J]. Nat Prod Res, 2009, 23(8): 781-788.
- [2] YU Y, WANG Y J, PI J X, et al. Research progress in bakuchiol [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med(山东中医药大学学报), 2013, 37(2): 174-176.
- [3] LI A F, SHEN G L, JIAO S Y, et al. Metabolic detoxification of bakuchiol is mediated by cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes [J]. J Peking Univ(Health Sci)(北京大学学报:医学版), 2012, 44(3): 431-436.
- [4] CHEN H L, FENG H J, LI Y C. *In vitro* antitumor activity and synthesis of the key intermediate of bakuchiol [J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 2010, 45(4): 467-470.
- [5] QI J, YANG S Q, LIU S Z. Protective effects of Shuxuening inject liquid on myocardial ischemia [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2009, 26(3): 193-197.
- [6] MIAO L, MA S W, FAN S W, et al. Bakuchiol inhibits the androgen induced-proliferation of prostate cancer cell line LNCaP through suppression of AR transcription activity [J]. Tianjin J Tradit Chin Med(天津中医药), 2013, 30(5): 291-293.

收稿日期: 2013-10-25