

基于中空纤维液相微萃取的大鼠体内大黄素及其代谢物分析

田 杰², 陈 璇¹, 白小红^{1*}

(1. 山西医科大学药学院, 山西 太原 030001; 2. 山西医科大学第一医院药剂科, 山西 太原 030001)

摘要: 建立了中空纤维液相微萃取(HFLPME) 耦合高效液相色谱法(HPLC) 用于测定血浆和尿液中大黄素及其代谢物的浓度, 比较了中药有效成分大黄素在不同性别大鼠体内的吸收和代谢能力, 阐述了大黄素在体内的代谢和转化过程。本实验以聚偏氟乙烯纤维为溶剂载体, 正辛醇为萃取溶剂, 对血浆和尿液样品进行 HFLPME 处理, 萃取后挥发有机溶剂, 用 50 μ L 甲醇溶解, 进行 HPLC 测定。在优化的微萃取条件下, 血浆和尿液样品中大黄素及其代谢物标准曲线线性良好(相关系数(r) 大于 0.996 0); 检出限为 0.1 ~ 3.0 μ g/L; 富集倍数为 12.2 ~ 26.3; 日内、日间精密度(以相对标准偏差(RSD) 计) 小于 11.0%; 血浆和尿液中代谢物的平均回收率为 97.9% ~ 103%。HFLPME 操作简单, 富集倍数高, 能有效去除生物样品中复杂基体的干扰, 适用于复杂样品中微量、痕量成分分析物的分析测定。

关键词: 中空纤维液相微萃取; 高效液相色谱; 大黄素及其代谢物; 生物转化

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012) 05-0507-08

Analysis of emodin and its metabolites based on hollow fiber liquid phase microextraction

TIAN Jie², CHEN Xuan¹, BAI Xiaohong^{1*}

(1. College of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

2. The Pharmacy of the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract: Hollow fiber liquid phase microextraction (HFLPME) coupled with high performance liquid chromatography (HPLC) has been developed to analyze the emodin and its metabolites in plasma and urine samples. The abilities of the absorption and metabolism for the active components in traditional Chinese medicines between the male and female rats were compared, and the biological metabolism and transmutation of the analyte were detailed discussed. Emodin and its metabolites in plasma and urine samples were extracted into *n*-octanol (acceptor) in hollow fiber. The acceptor phase was dried and dissolved by 50 μ L methanol and then analyzed by HPLC. Under the optimal conditions, the linearities of the analytes were all very good in biological samples ($r > 0.996 0$), the detection limits of the analytes were within the ranges of 0.1 ~ 3.0 μ g/L. The enrichment factors were 12.2 to 26.3. The relative standard deviations for intra-day and inter-day precision were lower than 11.0%. The average recoveries of the analytes in plasma and urine samples were all in the range of 97.9% to 103%. HFLPME-HPLC can eliminate interference from complex biological samples, improve the sensitivity and reduce the detection limit, thus this method is suitable for the determination of trace compounds in complex sample.

Key words: hollow fiber liquid phase microextraction; high performance liquid chromatography (HPLC); emodin and its metabolites; biological transformation

蒽醌类化合物主要来源于蓼科植物掌叶大黄根茎, 其中大黄素不仅具有泻下、抗菌消炎、抗肿瘤、免

疫抑制、保肝、抗纤维化等^[1]药理作用; 亦可用于保健和日用化工品中, 亦有人把它列为天然色素。但

* 通讯联系人: 白小红, 教授, 研究方向为体内药物及其代谢物分析以及复杂样品的提取、分离与富集。E-mail: bxh246@163.com.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81041084)、山西省自然科学基金项目(No. 2011011035-2) 和山西省高等学校优秀创新创业团队基金项目(2011)。

收稿日期: 2011-12-01

近来研究表明,由于蒽醌类化合物在可见光区具有较高的光敏活性,可以通过光化学作用产生高活性的物质对生物分子或细胞产生一系列的破坏作用^[2,3];另外,中药大黄中的蒽醌类提取物有肾毒性^[4],同时,药物进入体内起效或毒性部位可能是原形药物,也可能是其代谢产物。因此,建立简单、快速、灵敏地测定生物样品中大黄素及其代谢产物浓度的方法,研究大黄素及其代谢产物在生物体内的作用机制和转化过程,对探讨蒽醌类化合物对生物分子或细胞产生破坏作用及对器官毒性的研究具有重要意义。大黄素及其代谢产物的研究已有报道^[5-9]。但是,常用的大黄素生物样品前处理方法,大多操作复杂,需经过水解后进行液-液提取等步骤^[6,7]。随着检测技术灵敏度的提高和样品预处理浓缩、净化能力的改善,生物样品中微量或痕量的代谢物可能被发现。中空纤维液相微萃取(HFLPME)技术是由 Dasgupta 等^[10]和 Cantwell 等^[11]在 1996 年首先提出的一种新的样品前处理技术。该法操作简单,有机溶剂用量少,富集倍数高,净化能力强,适用于复杂生物样品中微量甚至痕量分析物的测定,已成功地应用于生物样品中中药活性成分及其代谢物分析^[12,13]。但 HFLPME 作为生物样品中大黄素及其代谢产物的预处理方法用于研究大黄素在生物体内的转化及代谢机理尚未见报道。本文以大鼠为受试对象,用 HFLPME 作为生物样品的前处理技术,结合高效液相色谱法(HPLC),对大黄素及其可能代谢产物芦荟大黄素、大黄酸、丹蒽醌、大黄酚和大黄素甲醚的分离、浓缩、净化和鉴定进行了探索,讨论了大黄素在雌、雄性大鼠体内的吸收、分布和代谢能力,研究了大黄素及其代谢物在大鼠体内的转化过程。但大黄素及其代谢物都可通过光化反应产生高活性蒽醌的母体结构,它们在动物体内存留是否对生物分子或细胞产生破坏作用或引起肾毒性还有待于进一步研究。

1 实验部分

1.1 仪器

高效液相色谱仪(Agilent Technologies 1200 Series)。聚偏氟乙烯中空纤维(天津膜天膜工程技术有限公司,型号:MOF503,内径为 0.8 mm,孔径为 0.2 μm)。

1.2 试剂

芦荟大黄素(aloe-emodin,批号:110795-200806),大黄酸(rhein,批号:110757-200206),大黄素(emodin,批号:110756-200110),大黄酚(chry-

sophanol,批号:110796-200716),大黄素甲醚(physcione,批号:110758-200611),丹蒽醌(danthron,批号:0829-9702)对照品均由中国生物制品检定所提供,供含量测定用。灌胃大黄素,纯度 98%(批号:AE090420),由陕西森弗科技公司提供。正辛醇(天津市光复精细化工研究所,分析纯),甲醇(天津市科密欧化学试剂有限公司,色谱纯),肝素钠(12 500 单位/2 mL),实验用水为二次蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

1.3 实验动物

成年 Wistar 大鼠,雄性和雌性各 6 只,重(220 ± 20) g,由山西医科大学实验动物中心提供(实验动物许可证号:SCXK(晋)2009-0001)。

1.4 液相微萃取条件

以聚偏氟乙烯(MOF503)纤维为溶剂载体,正辛醇为萃取溶剂,血浆样品供相中 HCl 浓度为 20 mmol/L,供相体积为 5 mL,在 900 r/min 转速下萃取 40 min;尿液样品供相中 HCl 浓度为 12 mmol/L,供相体积为 10 mL,在 600 r/min 转速下萃取 40 min。

1.5 色谱条件

Eclipse XDB-C18 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm, Agilent Technologies),流动相:0.6% 磷酸(A)和甲醇(B),用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。梯度洗脱程序:0 ~ 6 min, 30%A(0.8 mL/min); 6 ~ 13 min, 22%A(0.8 mL/min); 13 ~ 20 min, 15%A(1.0 mL/min)。柱温:37 °C。进样体积:20 μL。检测波长:434 nm。

1.6 溶液配制

1.6.1 对照品储备液的制备

准确称取一定量的芦荟大黄素、大黄酸、丹蒽醌、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品,用甲醇溶解,配制成质量浓度分别为 50、25、60、60、50 和 40 mg/L 的对照品储备液。根据需要取上述对照品储备液一定量混合后配制成适当浓度的混合对照品溶液,于 4 °C 冰箱保存。

1.6.2 生物样品的制备

血浆样品的制备:取正常 Wistar 大鼠 12 只,禁食 12 h,收集空白血浆;用大黄素和生理盐水配制的混悬液灌胃(50 mg/kg 给药)后收集 0.09、0.17、0.25、0.5、1、4、5、6、8、12、24 h 时的血浆,采用眼底取血法,每次取血 1 mL,取出的血液用肝素钠溶液抗凝,在 5 000 r/min 下离心 5 min,取上清液放入 Eppendorf (EP) 微型离心管中,在 -20 °C 冰箱中保存待用。

尿液样品的制备:取正常 Wistar 大鼠,收集空白尿液,禁食 12 h,灌胃后收集 12、24、36、48 h 尿液于 EP 管中,在 -20°C 冰箱中保存待用。

1.6.3 萃取工作液的制备

将 1.6.1 节所述的芦荟大黄素、大黄酸、丹蒽醌、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品储备液取一定量混合后稀释,配制成各为 5.0、2.5、6.0、6.0、5.0 和 4.0 mg/L 的对照品混合溶液,取该混合溶液 500 μL 于 5 mL 西林瓶中,加入空白血浆(空白尿液) 0.5 mL,加入浓度为 100 mmol/L 的 HCl 溶液 1 mL(0.6 mL),用二次蒸馏水稀释至 5 mL(10 mL),制备成相应的血浆(尿液)基质对照品溶液,即为液相微萃取工作液。

1.6.4 供试品分析溶液的制备

取 1.6.2 节中制得的血浆(尿液)样品 0.5 mL 于 5 mL(10 mL)西林瓶中,加入 100 mmol/L HCl 溶液 1 mL(0.6 mL),甲醇 0.5 mL(1 mL),用二次蒸馏水补足 5 mL(10 mL),即为供试品分析溶液。

1.7 实验步骤

在固定于磁力搅拌器上装有微型搅拌子的西林瓶中,加入大黄素及其代谢物的血浆基质对照品混合溶液或血浆供试品溶液 2 mL,用 34 mmol/L HCl 溶液稀释到 5 mL;或尿液基质对照品混合溶液或尿

液供试品溶液 4 mL,用 10 mmol/L HCl 溶液稀释到 10 mL。取 4 根 12 cm 长的中空纤维洗净吹干后,注入正辛醇,并使之弯成 U 形浸入到供相溶液中。开启磁力搅拌器,血浆基质在 1 200 r/min、尿液基质在 600 r/min 转速下萃取 40 min。萃取结束后,精密吸取中空纤维中的正辛醇 50 μL 于小烧杯中,在 90°C 的鼓风干燥箱中蒸干,用 50 μL 甲醇溶解,进行 HPLC 分析。

2 结果与讨论

2.1 液相微萃取条件的优化

2.1.1 供相酸浓度的选择

由于蒽醌类化合物在碱性介质中易于发生水解,LPME 萃取效率降低,且不同的生物基质中其酸碱度不同。因此,本实验分别考察了血浆和尿液基质中 HCl 浓度对大黄素及其代谢物萃取效率的影响,结果见图 1a、b。由图 1a、b 可以看出 HCl 浓度对大黄酸的萃取效率影响较大;当血浆和尿液样品中 HCl 浓度分别为 20 mmol/L 和 12 mmol/L 时,大黄素及其多数代谢物的萃取效率都在这一点达到最大。为了使多数的被分析物萃取效果达到最好,本实验选择血浆和尿液基质的 HCl 浓度分别为 20 mmol/L 和 12 mmol/L。

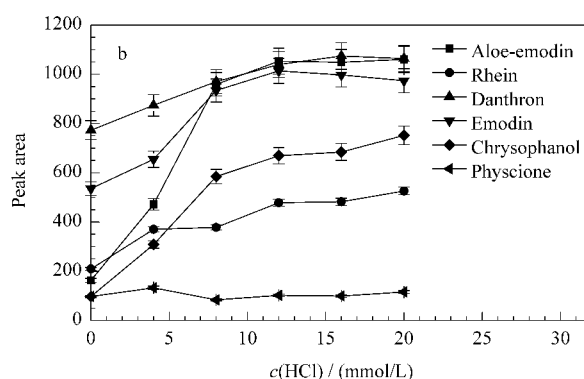
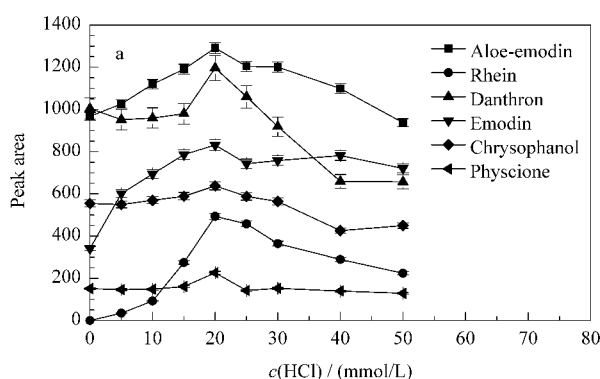


图 1 HCl 浓度对 (a) 血浆和 (b) 尿液样品中分析物萃取效率的影响
Fig. 1 Effects of HCl concentration in the donor on the extraction efficiencies of analytes in (a) plasma and (b) urine samples

2.1.2 萃取时间的选择

考察了血浆萃取时间为 10、20、40、60、80、100、120 min 和尿液萃取时间为 10、20、30、40、50、60 min 时对大黄素及其代谢产物萃取效率的影响(见图 2)。实验发现,以血浆和尿液为基质的微萃取达平衡时间均为 40 min。故本实验选择 40 min 作为血浆和尿液中大黄素及其代谢产物的萃取时间。

2.1.3 搅拌速度的选择

提高搅拌速度可以增加分析物的扩散和传质速

度,缩短平衡时间,提高萃取效率。本实验分别考察了转速为 300、600、900、1 200、1 500、1 800 r/min 和 300、600、900、1 200、1 500 r/min 对血浆及尿液样品中大黄素及其代谢产物萃取效率的影响。实验发现:血浆和尿液的最佳搅拌速度分别为 1 200 r/min 和 600 r/min。因为血浆样品黏稠度大,需要较大的转速提高分析物在供相中的扩散速度。

2.1.4 供相体积的选择

供相体积与接收相体积的比值越大,浓缩倍数

越高^[4]。本实验分别考察了在一定的接收相体积下,血浆样品体积分别为 1.5、3.0、5.0、10、15 mL 及尿液样品体积分别为 1.5、3.0、5.0、10、15、20 mL 对

大黄素及其代谢物萃取效率的影响,结果见图 3。可以看出,本实验中血浆和尿液的最佳供相体积分别为 5 mL 和 10 mL。

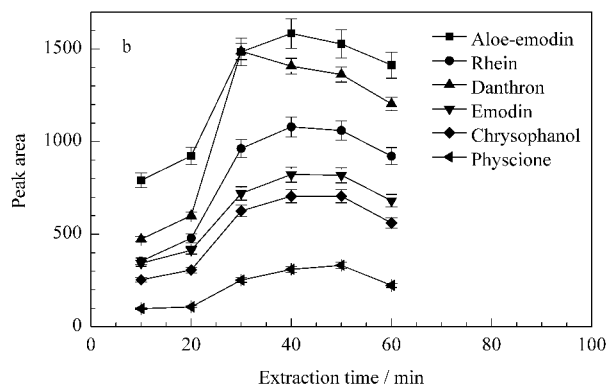
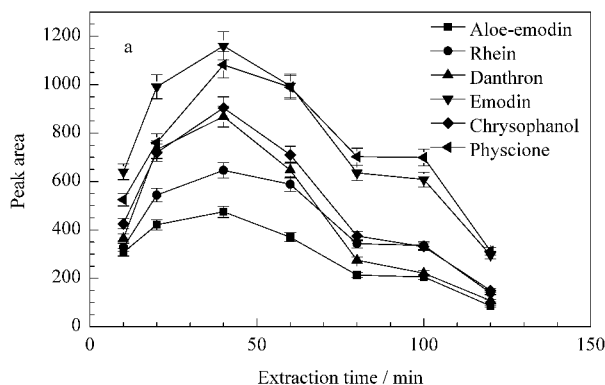


图 2 萃取时间对 (a) 血浆和 (b) 尿液样品中分析物萃取效率的影响

Fig. 2 Effects of extraction time on the extraction efficiencies of analytes in (a) plasma and (b) urine samples

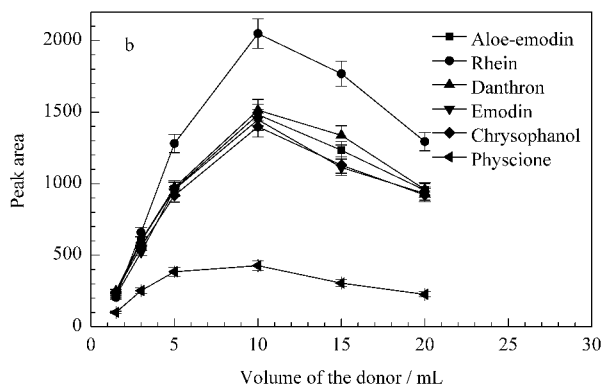
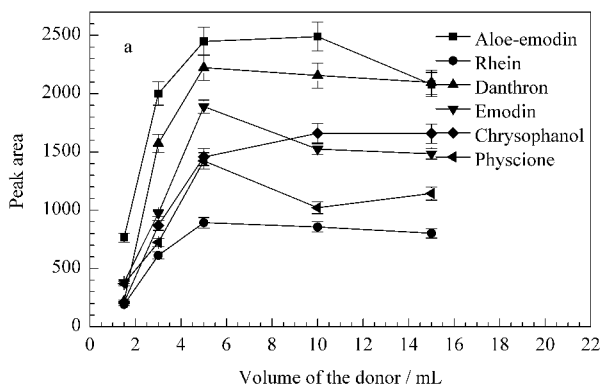


图 3 供相体积对 (a) 血浆和 (b) 尿液样品中分析物萃取效率的影响

Fig. 3 Effects of volume of the donor on extraction efficiencies of analytes in (a) plasma and (b) urine samples

2.1.5 盐浓度的选择

一般情况下供相中离子强度大小对分析物萃取效率有一定的影响。为此,本实验考察了供相中 NaCl 浓度分别为 50, 100, 150 和 200 g/L 时对大黄素及其代谢物的萃取效率的影响,结果发现:随着盐浓度的增加,分析物的萃取效率降低。故本实验供相中没有加盐。

2.2 富集倍数

为了验证 HFLPME 对大黄素及其代谢物的萃取和富集效果,本文将大黄素及其代谢物标准溶液经 HFLPME 萃取前后的色谱图进行比较,并计算富集倍数(EF): $EF = C_1/C_0$,其中 C_1 和 C_0 分别为接收相和样品溶液中分析物的浓度。结果见表 1。

2.3 工作曲线

将 1.6.1 节所述对照品储备液稀释,配制成系列混合对照品溶液。芦荟大黄素和大黄酚的质量浓度分别为 1.6×10^{-3} , 8.0×10^{-3} , 4.0×10^{-2} , 0.2, 1.0, 5.0, 10.0 mg/L; 丹蒽醌和大黄素的质量浓度

分别为 1.92×10^{-4} , 1.0×10^{-3} , 4.8×10^{-3} , 0.2, 1.2, 6.0, 12.0 mg/L; 大黄酸的质量浓度分别为: 8.0×10^{-4} , 4.0×10^{-3} , 2.0×10^{-2} , 0.1, 0.5, 2.5, 5.0 mg/L; 大黄素甲醚的质量浓度分别为 1.3×10^{-3} , 6.4×10^{-3} , 3.2×10^{-2} , 0.2, 0.8, 4.0, 8.0 mg/L。按 1.7 节所述操作。以色谱峰面积 y 对分析物的质量浓度 x (mg/L) 进行线性回归,结果见表 1。按信噪比为 3 确定检出限(将供相溶液逐级稀释,按照 1.4 节进行萃取,直到色谱峰高为噪声 3 倍时所对应的浓度即为检出限),结果见表 1。

2.4 精密度试验

分别精密吸取一定体积的对照品储备液,配制高、中、低 3 种浓度的混合对照品溶液,按 1.7 节所述实验步骤萃取后,经 HPLC 检测,每个浓度水平平行操作 3 次,尿液样品和血浆样品中各目标分析物浓度测定的日内精密度和日间精密度(以相对标准偏差(RSD)计)均小于 11.0%,结果分别见表 2 和表 3。

表 1 中空纤维液相微萃取法测定尿液和血浆样品中分析物的线性关系、检出限和富集倍数

Table 1 Linear relationships, detection limits and enrichment factors (EF) of analytes in urine and plasma samples obtained by HFLPME

Matrix	Analyte	Regression equation	Correlation coefficient (r)	Linear range / (mg/L)	Detection limit / (μg/L)	EF
Urine	aloe-emodin	$y = 1094.5x + 47.3$	0.9983	$8.0 \times 10^{-3} - 10$	3.0	17.8
	rhein	$y = 1213.1x - 26.2$	0.9995	$4.0 \times 10^{-3} - 5.0$	2.0	18.6
	danthron	$y = 897.6x + 9.2$	0.9997	$1.0 \times 10^{-3} - 12$	0.2	19.6
	emodin	$y = 827.7x + 41.4$	0.9999	$1.0 \times 10^{-3} - 12$	0.1	26.3
	chrysophanol	$y = 552.9x + 23.7$	0.9991	$8.0 \times 10^{-3} - 5.0$	2.0	21.6
Plasma	physcione	$y = 140.4x + 14.3$	0.9960	$6.4 \times 10^{-3} - 4.0$	3.0	12.2
	aloe-emodin	$y = 1310.5x - 30.6$	0.9997	$8.0 \times 10^{-3} - 10$	3.0	18.0
	rhein	$y = 1106.6x - 24.1$	0.9985	$4.0 \times 10^{-3} - 5.0$	1.5	19.3
	danthron	$y = 1091.7x - 22.3$	0.9997	$1.0 \times 10^{-3} - 12$	0.6	20.5
	emodin	$y = 729.2x - 43.6$	0.9983	$1.0 \times 10^{-3} - 12$	0.4	24.3
	chrysophanol	$y = 704.3x - 22.3$	0.9999	$8.0 \times 10^{-3} - 5.0$	2.0	23.3
	physcione	$y = 184.1x + 7.6$	0.9983	$6.4 \times 10^{-3} - 4.0$	3.0	17.5

y: peak area; x: mass concentration, mg/L.

表 2 尿液样品中分析物的日内和日间精密度的结果($n=3$)Table 2 Results of intra-day and inter-day precision test of analytes in urine samples ($n=3$)

Analyte	Spiked / (mg/L)	Intra-day precision		Inter-day precision	
		Found / (mg/L)	RSD / %	Found / (mg/L)	RSD / %
Aloe-emodin	8.00×10^{-3}	8.03×10^{-3}	7.5	7.83×10^{-3}	11
	0.200	0.199	6.0	0.183	9.5
	5.00	4.97	5.0	4.98	5.1
Rhein	4.00×10^{-3}	3.90×10^{-3}	7.7	3.93×10^{-3}	8.2
	0.100	0.104	3.9	0.104	5.8
	2.50	2.50	5.6	2.50	5.7
Danthron	9.60×10^{-4}	9.47×10^{-4}	5.3	9.80×10^{-4}	11
	0.240	0.234	6.5	0.232	7.7
	6.00	6.18	5.0	6.18	5.6
Emodin	9.60×10^{-4}	9.43×10^{-4}	7.1	9.10×10^{-4}	9.1
	0.240	0.244	6.6	0.237	6.5
	6.00	6.00	2.4	5.99	2.3
Chrysophanol	8.00×10^{-3}	8.51×10^{-3}	8.9	7.97×10^{-3}	8.9
	0.200	0.206	7.0	0.205	8.8
	5.00	5.04	5.6	4.99	5.8
Physcione	6.40×10^{-3}	6.56×10^{-3}	11	6.07×10^{-3}	7.6
	0.160	0.160	7.5	0.166	6.2
	4.00	4.05	3.7	4.02	5.3

表 3 血浆样品中分析物的日内和日间精密度的结果($n=3$)Table 3 Results of intra-day and inter-day precision test of analytes in plasma samples ($n=3$)

Analyte	Spiked / (mg/L)	Intra-day precision		Inter-day precision	
		Found / (mg/L)	RSD / %	Found / (mg/L)	RSD / %
Aloe-emodin	8.00×10^{-3}	7.77×10^{-3}	7.1	7.93×10^{-3}	8.2
	0.200	0.217	7.0	0.217	7.5
	5.00	5.073	5.1	5.13	4.4
Rhein	4.00×10^{-3}	3.83×10^{-3}	9.2	3.87×10^{-3}	9.1
	0.100	0.104	6.4	0.114	8.3
	2.50	2.34	3.2	2.36	4.1
Danthron	9.60×10^{-4}	9.83×10^{-4}	11	9.93×10^{-4}	9.8
	0.240	0.235	9.1	0.239	10
	6.00	6.00	3.2	6.00	2.6
Emodin	9.60×10^{-4}	1.06×10^{-3}	11	9.40×10^{-4}	5.9
	0.240	0.236	7.2	0.241	5.5
	6.00	5.98	3.3	6.09	3.1
Chrysophanol	8.00×10^{-3}	7.87×10^{-3}	7.0	7.83×10^{-3}	8.2
	0.200	0.194	4.1	0.195	5.4
	5.00	4.92	5.7	4.99	5.8
Physcione	6.40×10^{-3}	6.55×10^{-2}	8.2	6.00×10^{-3}	9.1
	0.160	0.157	7.7	0.156	8.1
	4.00	3.97	4.2	4.01	4.3

2.5 回收率试验

分别精密吸取一定体积的对照品溶液于空白血浆和尿液,配制低、中、高 3 种浓度的生物基质标准溶液,按 1.7 节的实验步骤操作,经 HPLC 检测。每个浓度水平平行测定 3 次,测得血浆和尿液中的平均加标回收率为 97.9% ~ 103%,结果分别见表 4 和表 5。

表 4 血浆样品中分析物的加标回收试验结果

Table 4 Results of recovery test of analytes in plasma samples

Analyte	Spiked/ μg	Found/ μg	Recovery/ %	RSD/% (n = 9)
Aloe-emodin	4.00×10^{-2}	3.88×10^{-2}	97.1	6.40
	1.00	1.09	109	
	25.0	25.4	101	
Rhein	2.00×10^{-2}	1.92×10^{-2}	95.8	6.20
	0.500	0.521	104	
	12.5	11.7	93.6	
Danthron	4.80×10^{-3}	4.90×10^{-3}	102	7.70
	1.20	1.18	98.0	
	30.0	30.0	100	
Emodin	4.80×10^{-3}	4.90×10^{-3}	102	7.10
	1.20	1.18	98.5	
	30.0	29.9	99.7	
Chrysophanol	4.00×10^{-2}	3.93×10^{-2}	98.3	5.60
	1.00	0.970	97.0	
	25.0	24.6	98.4	
Physcione	0.320	0.317	99.1	6.40
	0.800	0.785	98.1	
	20.0	19.9	99.3	

表 5 尿液样品中分析物的加标回收试验结果

Table 5 Results of recovery test of analytes in urine samples

Analyte	Spiked/ μg	Found/ μg	Recovery/ %	RSD/% (n = 9)
Aloe-emodin	4.00×10^{-2}	4.02×10^{-2}	100	6.10
	1.00	0.997	99.7	
	25.0	24.8	99.4	
Rhein	2.00×10^{-2}	1.93×10^{-2}	96.7	5.30
	0.500	0.519	104	
	12.5	12.5	99.8	
Danthron	4.80×10^{-3}	4.70×10^{-3}	98.6	5.50
	1.20	1.17	97.4	
	30.0	30.9	103	
Emodin	4.80×10^{-3}	4.70×10^{-3}	98.3	5.30
	1.20	1.22	102	
	30.0	30.0	100	
Chrysophanol	4.00×10^{-2}	4.30×10^{-2}	106	7.10
	1.00	1.03	103	
	25.0	25.2	101	
Physcione	0.320	0.328	103	7.30
	0.800	0.798	99.8	
	20.0	20.3	101	

2.6 生物样品中大黄素及其代谢物的含量测定

按 1.6 节制备血浆和尿液生物样品及供试品分析溶液,按 1.7 节的实验步骤操作,用 HPLC 法作为血浆和尿液样品前处理方法,测定了不同给药时间血浆和尿液中代谢物的含量,结果分别见表 6 和表 7。其中给药 0.5 h 的血浆和 24 h 的尿液样品中大黄素及其代谢物的色谱图见图 4a、b。

表 6 雄性、雌性大鼠血浆中大黄素及其代谢物的含量 (n = 6)

Table 6 Contents of emodin and its metabolites in plasma samples of male and female rats (n = 6)

mg/L

Rat	Analyte	Administration time											
		5 min	10 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h
Male	aloe-emodin	1.82	2.25	2.64	3.85	4.30	7.43	8.35	18.4	15.1	14.8	14.0	2.27
	rhein	ND	ND	ND	1.20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	danthron	1.07	1.48	1.98	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	emodin	5.56	5.97	5.62	4.79	4.17	4.46	4.97	4.42	4.12	3.88	3.60	3.45
	chrysophanol	3.04	5.00	1.67	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	physcione	2.30	3.20	1.61	0.96	1.09	1.56	1.26	0.98	0.86	0.76	0.73	0.61
Female	aloe-emodin	1.30	2.37	2.57	3.13	3.49	4.47	14.7	16.29	25.2	9.97	1.98	1.17
	rhein	ND	ND	ND	ND	1.25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	emodin	3.18	3.50	3.53	3.32	3.30	3.42	3.58	3.81	3.95	4.02	3.55	3.42
	physcione	ND	0.430	ND	ND	0.660	0.430	ND	ND	ND	0.61	ND	ND

ND: not detected.

由表 6、7 和图 4 可以看出: (1) 雄性大鼠血浆和雄性、雌性大鼠尿液中均检测到了代谢物丹蒽醌,这与本课题组的另一研究结论^[8]一致,说明丹蒽醌作为大黄素的代谢产物是稳定而可靠的。(2) 在大鼠体内,代谢物芦荟大黄素的浓度水平最高。用药后雄性、雌性大鼠芦荟大黄素药-时曲线分别在 5 h 和 6 h 达到峰值,血药质量浓度分别为 18.4 mg/L 和 25.2 mg/L,在 24 h 分别降到 2.27 mg/L 和 1.17

mg/L; 雄性、雌性大鼠 12 h 的尿样中芦荟大黄素的质量浓度分别为 108 mg/L 和 193 mg/L。(3) 雄性、雌性大鼠血浆中检测到的代谢物有一定的差异,有些只在雄性大鼠血浆样品中发现,而在雌性大鼠血浆样品中未发现。如雄性大鼠血浆样品中有代谢物丹蒽醌和大黄酚,而雌性大鼠未见此两种化合物。(4) 雄性、雌性大鼠尿液中均检测到了大黄素及其代谢物芦荟大黄素、大黄酸、丹蒽醌和大黄素甲醚。

表7 雄性、雌性大鼠尿液中大黄素及其代谢物的含量

Table 7 Contents of emodin and its metabolites in urine samples of male and female rats mg/L

Rat	Analyte	Administration time/h			
		12	24	36	48
Male	aloe-emodin	108	24.0	3.83	1.53
	rhein	1.61	2.90	3.39	1.77
	danthron	1.28	3.57	2.88	0.56
	emodin	121	467	474	148
	physcione	27.6	46.9	40.0	5.42
Female	aloe-emodin	193	49.5	1.72	1.34
	rhein	ND	1.90	1.87	2.84
	danthron	ND	0.800	0.662	0.125
	emodin	59.1	448	374	198
	physcione	11.4	21.5	11.7	1.97

ND: not detected.

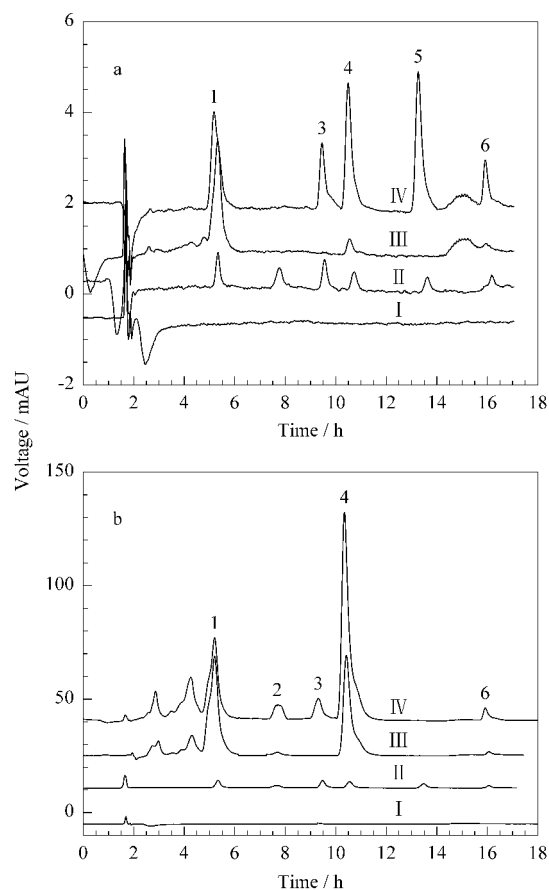


图4 (a) 血浆和(b) 尿液样品中分析物的色谱图

Fig. 4 Chromatograms of analytes in (a) plasma and (b) urine samples

Administration time: a. 0.5 h; b. 24 h.

I. blank; II. standard solution of analytes; III. female rat; IV. male rat.

1. aloe-emodin; 2. rhein; 3. danthron; 4. emodin; 5. chrysophanol; 6. physcione.

2.7 大黄素及其代谢物的生物转化过程

从雄性大鼠血浆中大黄素代谢物的检测结果(表6)看,大黄素的代谢顺序为:首先大黄素代谢出大黄素甲醚和大黄酚,随后大黄素甲醚转化成大黄

酚并迅速转化为芦荟大黄素,在5 min 的血浆样品色谱图中即有芦荟大黄素峰出现,与文献[6]报道一致;在5 min 的雄性大鼠血浆和12 h 的雄性、24 h 的雌性大鼠尿液中检测到丹蒽醌(见表7),说明大黄酚到丹蒽醌的转化过程很快,丹蒽醌在体内存在一定时间后由尿液排出,并且雄性大鼠对丹蒽醌的转化和排出速度大于雌性大鼠;在30 min 的雄性和1 h 的雌性大鼠血浆中检测到了大黄酸,但在随后的时间中未检测到,在12 h 的雄性、24 h 的雌性大鼠尿液中检测到大黄酸,说明大黄酸在血浆中存在时间较短,很快由尿液中排出,同样雄性大鼠对芦荟大黄素转化成大黄酸和对大黄酸的排除速度大于雌性大鼠;在本实验条件下,雌性大鼠血浆中未测到大黄酚和丹蒽醌。大黄素在大鼠体内的可能代谢途径见图5。

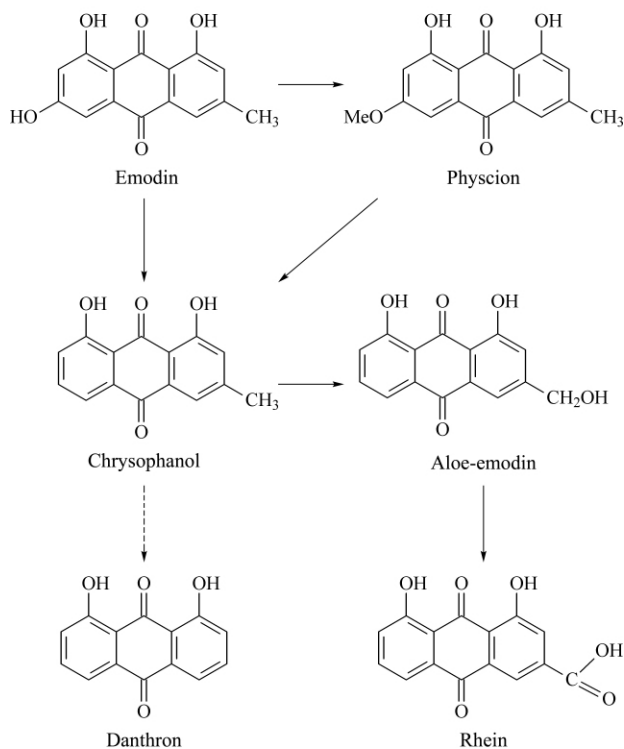


图5 大黄素在大鼠体内的代谢过程

Fig. 5 Metabolic process of emodin in rat

3 结论

本文建立了 HFLPME-HPLC 测定血浆和尿液中大黄素及其代谢物浓度的方法,比较了中药有效成分大黄素在雄、雌不同性别大鼠体内的吸收和代谢能力,阐述了大黄素在体内的代谢和转化过程。该法操作简单、富集倍数高、灵敏度高,对常规前处理方法难以分析的复杂样品中微量、痕量成分的分析具有重要意义。

参考文献:

- [1] He D X, Chen B, Tian Q Q, et al. J Pharm Biomed Anal, 2009, 49(4): 1123
- [2] Rajendran M, Gandhidasan R, Murugesan R. J Photochem Photobiol A: Chem, 2004, 168: 67
- [3] Mothilal K K, Inbaraj J J, Gandhidasan R, et al. J Photochem Photobiol A: Chem, 2004, 162: 9
- [4] Wang J B, Zhao Y L, Xiao X H, et al. J Ethnopharmacol, 2009, 124(1): 18
- [5] Yang X W, Hao M R, et al. Metabolite Analysis for Chemical Constituents of Traditional Chinese Medicines. Beijing: China Medical Science Press (杨秀伟, 郝美荣, 等. 中药成分代谢分析. 北京: 中国医药科技出版社), 2003: 658
- [6] Jiang Y, Hao X H, Liu H J. Chinese Traditional and Herbal Drugs (蒋晔, 郝晓花, 刘红菊. 中草药), 2007, 38(1): 57
- [7] Peng J, Song Z F, Ma C. World Science and Technology: Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica (彭娟, 宋增锋, 马辰. 世界科学技术: 中医药现代化), 2008, 10(1): 64
- [8] Yao S K, Jiang Y, Hao X H, et al. China Journal of Chinese Materia Medica (姚树坤, 蒋晔, 郝晓花, 等. 中国中药杂志), 2005, 30(6): 463
- [9] Tian J, Chen X, Bai X H. J Sep Sci, 2012, 35: 145
- [10] Liu H H, Dasgupta P K. TrAC Trends Anal Chem, 1996, 15(9): 468
- [11] Jeannot M A, Cantwell F F. Anal Chem, 1996, 68(13): 2236
- [12] Chen X, Bai X H, Wang X, et al. Chinese Journal of Chromatography (陈璇, 白小红, 王晓, 等. 色谱), 2010, 28(12): 1144
- [13] Wang J, Hu S, Bai X H. Chromatographia, 2010, 72(5/6): 453
- [14] Zhang X, Chen X, Bai X H. Chemical Journal of Chinese Universities (张茜, 陈璇, 白小红. 高等学校化学学报), 2011, 32(2): 269