

# 高效液相色谱法测定大鼠血浆中牡荆素-2''-O-鼠李糖苷浓度及药动学研究<sup>\*</sup>

英锡相<sup>1</sup>, 张文洁<sup>1</sup>, 冷爱晶<sup>2</sup>, 王思源<sup>1</sup>, 刘荀<sup>1</sup>, 康廷国<sup>1\*\*</sup>

(1. 辽宁中医药大学药学院, 大连 116600; 2. 大连医科大学附属一院, 大连 116011)

**摘要** 目的: 建立测定大鼠血浆中牡荆素-2''-O-鼠李糖苷(VOR)浓度的HPLC法, 研究体内的药动学过程。方法: 血浆样品加内标物橙皮苷, 以甲醇沉淀蛋白; 采用Dianonsil ODS C<sub>18</sub>色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 乙腈-0.1%甲酸(20:80)为流动相, 流速为1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长为270 nm。柱温: 室温; 进样量: 20 μL。结果: 最低检测限为0.04022 μg·mL<sup>-1</sup>, 线性范围0.1070~21.41 μg·mL<sup>-1</sup>, 平均提取回收率(n=6)为97.9%, 日内、日间精密度试验的RSD分别小于7.4%和8.5%; 大鼠静脉注射VOR 15, 30, 60 mg·kg<sup>-1</sup> 3个剂量后, 发现VOR的AUC<sub>0-90</sub>与给药量之比呈线性关系, 测得消除半衰期(t<sub>1/2β</sub>)、系统清除率(CL)及表观分布容积(V<sub>c</sub>)无显著性差异。结论: 建立的测定大鼠体内VOR含量的HPLC方法简单、专属性强, 适用于VOR在大鼠体内的药代动力学研究。

**关键词:** 牡荆素-2''-O-鼠李糖苷; 药代动力学; 高效液相色谱; 大鼠血浆

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)01-0044-04

## HPLC determination of vitexin-2''-O-rhamnoside concentration in rat plasma and its pharmacokinetic study<sup>\*</sup>

YING Xi-xiang<sup>1</sup>, ZHANG Wen-jie<sup>1</sup>, LENG Ai-jing<sup>2</sup>,

WANG Si-yuan<sup>1</sup>, LIU Xun<sup>1</sup>, KANG Ting-guo<sup>1\*\*</sup>

(1. School of Pharmacy Liaoning University of TCM, Dalian 116600 China; 2. First A affiliated Hospital of Dalian Medical University Dalian 116011, China)

**Abstract Objective** To develop a simple and specific HPLC method for the pharmacokinetic study of vitexin-2''-O-rhamnoside(VOR) in rat after intravenous administration. **Methods** The plasma samples were deproteinized with methanol after addition of hesperidin( internal standard). HPLC analysis was performed on a Dianonsil ODS C<sub>18</sub> analytical column(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), using acetonitrile-0.1% formic acid(20:80) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup> with UV detection at 270 nm. The column temperature was room temperature. Injection volume was 20 μL. **Results** The calibration curve was linear over the range of 0.1070-21.41 μg·mL<sup>-1</sup> in rat plasma. The average extraction recovery(n=6) of VOR was 97.9%, and the relative standard deviations of the intra- and inter- day precisions were less than 7.4% and 8.5%, respectively. The limit of detection (LOD) was 0.04022 mL·min<sup>-1</sup>. The AUC<sub>0-90</sub> of VOR was proportional to the dose after intravenous administration of 15, 30 and 60 mg·kg<sup>-1</sup>, and the elimination half-life(t<sub>1/2β</sub>), systemic clearance(CL) and apparent volume of distribution(V<sub>c</sub>) were not significantly different among the three doses. **Conclusion** The developed HPLC method for the pharmacokinetic study of VOR in rat after intravenous administration is simple and specific.

**Key words** vitexin-2''-O-rhamnoside; pharmacokinetics; HPLC; rat plasma

黄酮类化合物存在于许多植物中, 并且具有多种生物活性和药理作用, 如预防冠心病、抗肿瘤、抗氧化、抗炎等<sup>[1-5]</sup>。牡荆素-2''-O-鼠李糖苷(VOR)是山里红叶中主要黄酮类成分<sup>[6]</sup>, 具有强烈抑制MCF-7人乳腺癌细胞DNA合成作用<sup>[7]</sup>。近

年来, 已有报道通过电泳<sup>[8,9]</sup>及LC-UV/LC-MS法<sup>[10-12]</sup>测定植物中VOR及牡荆素等成分, HPLC<sup>[13]</sup>及UPLC-MS/MS<sup>[14]</sup>法测定大鼠血浆中VOR。但是还未见3个剂量大鼠静脉给药VOR的分析报道。因此, 建立一个比较完善的评价VOR药

\* 辽宁省自然科学基金项目(200720773)

\*\* 通讯作者 Tel: (0411)87586006 E-mail: kangtg@lnu.tcm.edu.cn

代动力学的方法是十分必要的。本实验建立了体内 VOR 含量测定的 HPLC 法, 研究 3 种剂量静脉给药后, 大鼠血浆中 VOR 的药代动力学行为。

## 1 仪器及试剂

日本岛津高效液相色谱系统, LC-10AT 泵, SPD-10A VP 紫外-可见检测器, Chromato-Solution Light workstation 色谱工作站; 内标物: 橙皮苷 (中国药品生物制品检定所, 批号: 10062-0007); 乙腈为色谱纯; 实验用水均来自于 Milli-Q<sup>5</sup> 生物超纯水系统; 其他试剂均为分析纯 (中国上海医药有限公司)。

## 2 VOR 对照品的制备

取山里红叶 3 kg 用 70% 的乙醇 24 L 提取 3 次, 合并提取液, 减压回收乙醇, 并浓缩至 3 L, 然后过大孔树脂 (AB-8 中国天津), 用 5 L 蒸馏水洗脱除去杂质, 再用 15 L 60% 乙醇溶液洗脱后, 减压回收乙醇, 得到溶液 4 L。分别用总量为 4 L 氯仿和 4 L 正丁醇分次萃取, 正丁醇层减压蒸发得到浸膏 (100 g), 上硅胶 (280~300 目) 柱 ( $\varnothing 12\text{ cm} \times 200\text{ cm}$ ) 分离, 用氯仿-甲醇 (50:1, 25:1, 10:1, 4:1, 2:1) 混合液梯度洗脱, 以薄层色谱跟踪, 其中含 VOR 部分合并, 上硅胶 (400 目) 柱 ( $\varnothing 2\text{ cm} \times 100\text{ cm}$ ) 分离, 用乙酸乙酯-丙酮-甲酸-水 (4:3:3:1) 洗脱, 得到 VOR 结晶 1.0 g, 经 HPLC 测定, 纯度为 99%, 与文献<sup>[15]</sup>对照, 确定该化合物结构与 VOR 具有相同的结构特征。

## 3 系列浓度对照品血浆、质控 (QC) 样品及内标溶液的制备

取 VOR 对照品约 10 mg 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得  $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  对照品储备液, 于 4℃ 冰箱保存。通过用空白血浆稀释方法得到不同浓度 (0.1070, 0.2141, 0.4282, 1.070, 2.676, 5.352, 10.70, 21.41  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的 VOR 对照品血浆。再分别制备 0.185, 1.85, 18.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  3 种浓度的 QC 样品, 置冰箱中, 备用。

取橙皮苷对照品约 9.50 mg 置 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得浓度约为  $400\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的内标储备液。取储备液适量, 用甲醇稀释制成  $40\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的内标溶液, 于 4℃ 冰箱保存, 备用。

## 4 色谱条件

色谱柱: Diamonsil ODS C<sub>18</sub> (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$  迪马公司); 流动相: 乙腈-0.1% 甲酸溶液 (20:80); 流速:  $1\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 柱温: 室温; 检测波长: 270 nm。

## 5 给药剂量及给药方式

取雄性 Wistar 大鼠, 体重 250~300 g 由辽宁中医药大学实验动物中心提供, 于试验前 1 周开始于实验室饲养, 可自由饮水, 试验前禁食 12 h, 大鼠随机分成 3 组, 每组 5 只, 按 15, 30, 60  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  由尾静脉注射给予 VOR 溶液后, 于 3, 5, 8, 12, 17, 23, 30, 38, 47, 57, 90 min 在眶静脉采血约 0.4 mL (每次采血后应及时给大鼠补充相应的生理盐水), 置于预先肝素化的试管中,  $1300\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 得到的血浆置 -20℃ 条件下贮存, 待测。

## 6 血浆样品处理

取血浆 200  $\mu\text{L}$ , 依次加入醋酸 20  $\mu\text{L}$ , 内标溶液 100  $\mu\text{L}$ , 甲醇 1 mL, 旋涡混合 1 min,  $3000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min 收集上清液, 于 50℃ 氮气流下吹干, 残渣用 200  $\mu\text{L}$  流动相溶解,  $12700\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min 取上清液 20  $\mu\text{L}$ , 进样分析。

## 7 方法的选择性

取大鼠空白血浆、空白血浆 + VOR + 内标及给药 VOR 后血浆样品 + 内标, 分别按“6”方法操作, 进行色谱分析, 结果见图 1。由图可知, VOR 及内标的保留时间分别约为 4.5 min 和 10.5 min, 总的运行时间为 13 min, 所测定色谱峰完全达基线分离, 说明方法的选择性良好。

## 8 线性关系

按“3”项下方法制备系列浓度对照品血浆, 按“6”项下方法处理后进样分析, 以 VOR 与内标峰面积之比为纵坐标, 以 VOR 浓度为横坐标, 用加权最小二乘法进行回归<sup>[16]</sup>计算, 回归方程为:

$$Y = 0.5238X + 0.01106 \quad r = 0.9980$$

结果: VOR 浓度在 0.1070~21.41  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  内, 线性良好。当信噪比 (S/N) 等于 3 时, 检测限为 0.04022  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 最低定量限为 0.1070  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

## 9 精密度及准确度

通过对低、中、高 3 个浓度 (0.185, 1.85, 18.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的 QC 样品的分析, 评价日内、日间精密度。对于日内精密度的计算, 应在同一天对每个浓度的 QC 样品进行 5 样本分析; 对于日间精密度的计算, 同样是对每个浓度的样品进行 5 样本分析, 连续测定 3 d 结果见表 1。从表中可知, 日内、日间精密度的 RSD 分别小于 7.4% 和 8.5%, RE 在 -4.9%~0.86% 之间。结果表明该法重复性、准确性良好。

## 10 回收率

制备低、中、高 3 个浓度 (0.185, 1.85, 18.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的 QC 样品各 6 份, 分别按“6”项下方法处理后

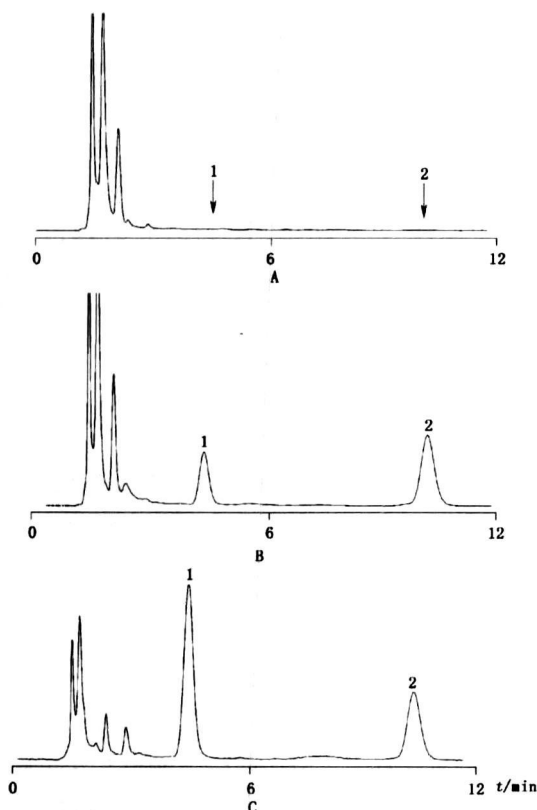


图 1 空白血浆 (A)、空白血浆 + 牡荆素 - 2''-O-鼠李糖苷 + 内标 (B) 及静脉给药 47 min 后血浆样品 + 内标色谱图 (C)

Fig 1 Representative chromatograms of blank plasma (A), plasma spiked with vixetin-2''-O-rhamnoside and hesperidin (B), and plasma sample at 47 min after an intravenous administration (C)

1 牡荆素 - 2''-O-鼠李糖苷 (vixetin-2''-O-rhamnoside) 2 内标橙皮苷 (hesperidin internal standard)

进样分析, 记录色谱图; 另按相同的方法 (除不加对照品溶液及内标溶液) 处理空白血浆, 得到上清液, 然后加入对照品溶液及内标溶液, 制备相应浓度的溶液进样分析, 以每一浓度 QC 样品获得的峰面积与在空白血浆加入对照品溶液及内标溶液的峰面积之比计算提取回收率。3 种浓度 QC 样品的提取回收率见表 2。VOR 和内标物的平均提取回收率 ( $n=18$ ) 分别为 97.9% 和 96.9%, 结果表明大鼠血浆在甲醇沉淀蛋白时 VOR 的损失是可以忽略不计的, 说明 VOR 在甲醇中提取回收率较高。

### 11 稳定性

制备 2 个浓度 ( $0.185, 18.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的 QC 样品, 冻融稳定性试验是样品置  $-20^\circ\text{C}$  条件下冷冻 24 h, 再于室温条件下融 2~3 h 的 3 个冻-融循环后测定; 长期稳定性是 QC 样品置  $-20^\circ\text{C}$  条件下贮藏 2 周后进行测定; 样品处理后的稳定性是将 2 个浓度的 QC 样品按血浆样品处理后, 在  $25^\circ\text{C}$  条件下放置 6 h 后测定来评价。试验结果见表 3。从表中

表 1 精密度和准确度 ( $n=6$ )

Tab 1 Precision and accuracy

| 加入浓度<br>(added<br>conc.) /<br>$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ | 日内精密度<br>(intra-day)               |     |      | 日间精密度<br>(inter-day)               |     |      |
|------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----|------|------------------------------------|-----|------|
|                                                                  | 平均检测浓度                             |     |      | 平均检测浓度                             |     |      |
|                                                                  | (mean detected<br>conc.)           | RSD | RE   | (mean detected<br>conc.)           | RSD | RE   |
|                                                                  | $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ | %   | %    | $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ | %   | %    |
| 0.185                                                            | $0.1762 \pm 0.012$                 | 7.3 | -4.9 | $0.1790 \pm 0.014$                 | 7.9 | -3.2 |
| 1.85                                                             | $1.830 \pm 0.135$                  | 7.4 | -1.1 | $1.828 \pm 0.154$                  | 8.5 | -1.6 |
| 18.5                                                             | $18.52 \pm 0.853$                  | 4.6 | 0.13 | $18.66 \pm 1.34$                   | 7.2 | 0.86 |

表 2 回收率 ( $n=6$ )

Tab 2 Recovery

| 加入浓度<br>(added conc.)<br>$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ | 平均检测浓度<br>(mean detected conc.)<br>$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ | 回收率<br>(recovery)<br>% | RSD<br>% |
|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------|----------|
| 0.185                                                       | $0.1776 \pm 0.009$                                                    | $96.0 \pm 4.64$        | 4.8      |
| 1.85                                                        | $1.779 \pm 0.118$                                                     | $96.2 \pm 6.38$        | 6.6      |
| 18.5                                                        | $18.78 \pm 0.847$                                                     | $101.5 \pm 5.94$       | 6.0      |

可知, RSD 小于 9.0%, RE 在  $-4.1\% \sim 3.1\%$  之间。结果表明 VOR 在上述 3 种试验条件下稳定性良好。

表 3 稳定性 ( $n=6$ )

Tab 3 Stability

| 稳定性<br>(stability)          | 加入浓度<br>(added conc.)<br>$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ | 平均检测浓度<br>(mean detected conc.)<br>$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ | RSD<br>% | RE<br>% |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|----------|---------|
| 冻-融<br>(freeze-thaw)        | 0.185                                                       | $0.1775 \pm 0.012$                                                    | 7.2      | -4.1    |
|                             | 18.5                                                        | $19.07 \pm 0.968$                                                     | 5.1      | 3.1     |
| 长期<br>(long-term)           | 0.185                                                       | $0.1786 \pm 0.014$                                                    | 8.1      | -3.5    |
|                             | 18.5                                                        | $18.77 \pm 0.687$                                                     | 3.7      | 1.5     |
| 样品处理后<br>(post-preparative) | 0.185                                                       | $0.1798 \pm 0.016$                                                    | 9.0      | -2.8    |
|                             | 18.5                                                        | $19.04 \pm 0.841$                                                     | 4.4      | 2.9     |

### 12 实验结果

分组后的大鼠按  $15, 30, 60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  由尾静脉注射给予 VOR 溶液后, 测得的主要药动学参数经 DAS 软件 (Beijing Boson Science & Technology Co., Ltd) 处理。由分析结果可知, 血浆中 VOR 的检出率仅达 90 min。大鼠静脉注射 VOR 后的药动学符合二室开放模型 (权重系数  $W=1/x$ ), VOR 在大鼠血浆中的浓度-时间曲线见图 2。测得的主要药动学参数: 系统清除率 (CL) 为  $(0.290 \pm 0.047) \sim (0.343 \pm 0.037) \text{ L} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; 消除半衰期 ( $t_{1/2\beta}$ ) 为  $(45.34 \pm 24.0) \sim (61.69 \pm 13.2) \text{ min}$ ; 表观分布容

积 ( $V_c$ ) 为  $(5.587 \pm 5.58) \sim (11.33 \pm 1.55) \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。  $\text{AUC}_{0-90}$  的值与给药量之比呈线性关系。结果表明:大鼠静脉注射 3 种浓度的 VOR 后,在体内迅速消除,且消除速率与给药量呈线性消除关系。

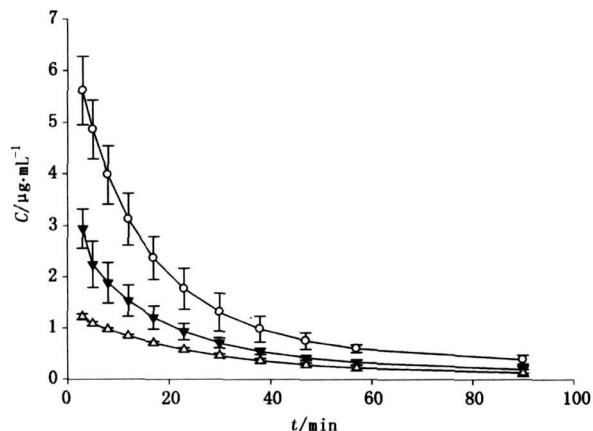


图 2 静脉给药牡荆素-2''-O-鼠李糖苷 (VOR) 15( $\Delta$ )、30( $\nabla$ )、60( $\bigcirc$ )  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  后平均浓度-时间曲线图 (平均值  $\pm$  SD,  $n=5$ )

Fig 2 Mean plasma concentration-time curves of vitexin-2''-O-rhamnoside in rats after an intravenous administration of doses of 15( $\Delta$ ), 30( $\nabla$ ) and 60( $\bigcirc$ )  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (mean  $\pm$  SD,  $n=5$ )

### 13 讨论

HPLC法测定大鼠静脉给药血浆中 VOR 的含量,此法简单,专属性好。试验中用甲醇沉淀蛋白,不仅可以提取 VOR,同时也能很好地溶解内标物,并且提取率高,价格低廉。由于黄酮类成分 VOR 显酸性,在血浆中加入 20  $\mu\text{L}$  醋酸后使 VOR 呈游离状态,增加 VOR 在甲醇中的提取率。另外,流动相乙腈-水溶液 (20:80) 中加入 0.1% 甲酸溶液,有助于改善峰形; VOR 在紫外光谱条件下,于 270 nm 和 340 nm 处有最大吸收峰,而内标的最大吸收峰在 280 nm,因此检测波长定为 270 nm 是可行的。

文献报道<sup>[14]</sup>,口服给药山楂叶提取物 (相当于 VOR 120 mg),药动学结果说明, VOR 在大鼠体内浓度较低 ( $C_{\text{max}} = 0.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),因此,有必要研究 VOR 静脉给药后的大鼠体内药动学行为。进行大鼠静脉给药 VOR (15 30 60  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 3 个剂量的药代动力学研究的分析结果表明,大鼠静脉注射 VOR 符合一级动力学行为。实验结果表明,药物应用要以药动学研究为基础,选择正确给药途径,本实验对将来指导 VOR 临床用药具有一定的意义。

### 参考文献

- 1 Delf Agli M, Buscila A, Bosisio E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc Res*, 2004, 63(4): 593
- 2 Baner JA, Singletary KW, Wallig MA, et al. Inhibition of TPA-induced tumor promotion in CD-1 mouse epidermis by a polyphenolic fraction from grape seeds. *Cancer Lett*, 1999, 135(2): 151

- 3 Haque AM, Hashimoto M, Katakura M, et al. Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. *J Nutr*, 2006, 136(4): 1043
- 4 Lapidot T, Granit R, Kanner J. Lipid hydroperoxidase activity of myoglobin and phenolic antioxidants in simulated gastric fluid. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(9): 3391
- 5 Rahman I, Biswas SK, Kirkan PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72(11): 1439
- 6 DING Xing-bao (丁杏苞), JIANG Yan-qing (姜岩青), ZHONG Ying (仲英), et al. Chemical constituents of the leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. (山楂叶化学成分研究). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1990, 15(5): 295
- 7 Ninfali P, Bacchiocca M, Antonelli A, et al. Characterization and biological activity of the main flavonoids from Swiss Chard (*Beta vulgaris* subspecies *cylindrica*). *Phytomedicine*, 2007, 14: 216
- 8 Urbonaviciute A, Jakstas V, Komysova O, et al. Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single-styled hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) ethanolic extracts. *J Chromatogr A*, 2006, 1112(1): 339
- 9 Sladkovskii R, Urbnek M, Solich P. High performance liquid chromatography for determination of flavonoids in plant. *Chromatographia*, 2003, 58(3): 187
- 10 Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, et al. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits and teas. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 571
- 11 Rehwal H, Meier B, Sticher O. Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in *Passiflora incarnata* L. *J Chromatogr A*, 1994, 677: 25
- 12 Kite GC, Porter EA, Denison FC, et al. Data-directed scan sequence for the general assignment of C-glycosylflavone O-glycosides in plant extracts by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2006, 1104(1): 123
- 13 Ying XX, Gao S, Zhu WL, et al. High-performance liquid chromatography determination and pharmacokinetics study of vitexin-2''-O-rhamnoside in rat plasma after intravenous administration. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(3): 802
- 14 Ying XX, Lu XM, Sun XH, et al. Determination of vitexin-2''-O-rhamnoside in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study. *Talanta*, 2007, 72(4): 1500
- 15 SUN Jing-yong (孙敬勇), YANG Shu-bin (杨书斌), SONG Hong-xia (谢鸿霞), et al. Study on the constituents of hawthorn leaves (山楂叶化学成分研究). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(6): 483
- 16 ZHONG Da-fang (钟大放). Some aspects in establishing standard curves in bioanalyses with the weighted least squares method (以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1996, 16(5): 343

(本文于 2007 年 7 月 9 日收到)