论著

文章编号:1000-5404(2014)03-0270-04

反相高效液相色谱法测定和厚朴酚的血浆浓度

徐才兵[1],田 睿[2],甘 露[1],郭 锋[1],谷萌辉[1],张良珂[1] (400016 重庆,重庆医科大学:药物高校工程研究中心和生物化学与分子药理学重点实验室[1],实验教学中心[2])

[摘要] **目的** 建立反相高效液相色谱测定和厚朴酚血浆浓度的方法,并测定了灌胃给药后大鼠血浆中和厚朴酚的浓度及药动学参数。**方法** 血浆样品用乙酸乙酯进行液液萃取,吴茱萸碱为内标,色谱柱为 Lichrospher C_{18} 柱,流动相为甲醇-水 80∶20(体积比),流速 1 mL/min,检测波长 292 nm。**结果** 内标物质和和厚朴酚的保留时间分别为 4.1 min 和 5.1 min,血浆中的内源性物质不干扰测定;和厚朴酚在 0.035 5 ~ 9.090 9 μg/mL 质量浓度范围内与和厚朴酚和内标物质色谱峰面积比值线性关系良好(r = 0.999 6);和厚朴酚的最低定量限为 20 ng/mL;样品日内日间精密度的 RSD 均小于 8.02%,平均提取回收率 106.87% ,平均方法回收率 104.44%。**结论** 建立了以吴茱萸碱为内标的和厚朴酚体内分析方法,本法快捷、灵敏、准确,可用于和厚朴酚大鼠体内血药浓度的测定和药代动力学研究。

[关键词] 和厚朴酚;反相高效液相色谱;血浆;内标;吴茱萸碱
[中图法分类号] R282.71; R927.2; R969.1 [文献标志码] A

Determination and pharmacokinetic study of honokiol in rat plasma by RP-HPLC

Xu Caibing[1], Tian Rui[2], Gan Lu[1], Guo Feng[1], Gu Menghui[1], Zhang Liangke[1] ([1] Medicine Engineering Research Center, Chongqing Key Laboratory of Biochemical & Molecular Pharmacology, [2] Experimental Teaching Center, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish a reverse phase HPLC (RP-HPLC) method for the determination of honokiol in rat plasma and its pharmacokinetics study. **Methods** Liquid-liquid extraction with ethyl acetate was used for plasma sample treatment and evodiamine was chosen as an internal standard. The study was performed on Lichrospher C_{18} column with the mobile phase of methanol-water (80∶20, V/V) at a flow rate of 1 mL/min. The eluent was detected at wavelength of 292 nm. **Results** The results of chromatographic method showed a good specificity between analytes and matrix, and the retention time of honokiol and internal standard was 5.1 min and 4.1 min, respectively. It showed good linearity over a range of 0.035 5 to 9.090 9 g/mL(r = 0.999 6). The lower limit of quantitation (LLOQ) was 20 ng/mL. The mean extraction and method recovery rates were 106.87% and 104.44%, respectively, while inter-day and intra-day precision RSDs were all less than 8.02%. **Conclusion** The reverse phase HPLC method for honokiol determination in rat plasma is established using evodiamine as the internal standard. The developed method is fast, sensitive and accurate for determination and pharmacokinetic study of honokiol in rat plasma.

[**Key words**] honokiol; RP-HPLC; plasma; internal standard; evodiamine

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2012jjA10021), the Research Fund for Doctoral Program of Higher Education of China (20125503120003), the Research and Innovation Experimental Project for Students of Chongqing Medical University (201244, 201229, 201217) and the Project of Science and Technology Research of Chongqing Comittee of Education (KJ110323). Corresponding author: Zhang Liangke, E-mail: zlkdyx@126.com

和厚朴酚(honokiol)是从中药厚朴或凹叶厚朴中提取的具有生物活性的化学物质。现代研究表明,和厚朴酚具有明显的抗肿瘤、抗炎、抗氧化活性;对心血管系统具有抗忧郁、抗焦虑、抗应激、抗卒中和抗阿尔茨海默病活性;对循环系统具有血管舒张作用、抗动脉粥样硬化及抗血小板聚集活性;对胃肠道系统具有抗食管阻塞、抗胃溃疡、抗痢疾及保护肝脏活性[1-5]。但

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2012jjA10021);高等学校博士学科点专项科研基金(20125503120003);重庆医科大学大学生科研与创新实验项目(201244,201229,201217);重庆市教育委员会科学技术研究项目(KJ110323)
[通信作者] 张良珂,E-mail: zlkdyx@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131107.1612.001.html(2013-11-07)

和厚朴酚在水中几乎不溶,且生物利用度低,易氧化,这些特点制约了其临床的开发利用[6-8]。为了改善上述性质,科研工作者将其制备成不同剂型,如和厚朴酚自微乳、和厚朴酚包合物等。本实验建立了以吴茱萸碱(evodiamine)为内标的和厚朴酚 RP-HPLC 体内分析方法,该方法简单、快捷、准确和灵敏,内源性杂质不干扰测定,旨在为和厚朴酚的体内分析提供参考。

1　材料与方法

1.1　仪器、试药及动物

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent);Lichrospher C_{18}高效液相色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm,江苏汉邦科技);AR 2140 精密电子天平(美国 OHAUS 公司)。

和厚朴酚(西安小草植物科技有限公司,纯度 >98.48%);吴茱萸碱(武汉远程科技有限公司,纯度 99.13%);甲醇(色谱纯,百灵威科技有限公司);乙酸乙酯[分析纯,川东化工(集团)有限公司试剂厂]超纯水;其余试剂均为分析纯。

雄性 SD 大鼠,体质量(200±20)g,由重庆医科大学实验动物中心提供,动物使用许可证号:SYXK(渝)2012-0001。

1.2　方法

1.2.1　色谱条件　　色谱柱:汉邦 Lichrospher C_{18}柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm);柱温 30 ℃,流动相:甲醇-水 80∶20(体积比);流速:1 mL/min;检测波长 292 nm;进样量 20 μL。

1.2.2　标准溶液的配制　　精密称取 10.0 mg 和厚朴酚置于 10 mL 容量瓶中,甲醇溶解并定容至刻度,得浓度为 1 mg/mL 的和厚朴酚储备溶液。

1.2.3　内标溶液的配制　　精密称取 10.0 mg 吴茱萸碱于 100 mL 容量瓶中,甲醇溶解并定容至刻度,得浓度为 100 μg/mL 的内标溶液,精密移取该溶液 2 mL 于 10 mL 容量瓶中,甲醇定容至刻度,得浓度为 20 μg/mL 的内标储备液。

1.2.4　血浆样品的处理　　精密量取 200 μL 血浆置于离心管中,加入 20 μL 内标溶液(20 μg/mL),涡旋 1 min,加入 1.5 mL 乙酸乙酯,涡旋 5 min,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液于离心管中,减压干燥挥干有机溶剂,将残留物用 0.1 mL 甲醇溶解,12 000 r/min 离心 10 min,取 20 μL 进样。

1.2.5　动物给药与血浆采集　　受试动物为 6 只 SD 大鼠,大鼠给药前禁食 12 h(不禁水),口服和厚朴酚混悬液,给药剂量为 80 mg/kg(以和厚朴酚计)。于给药后 0.083、0.25、0.5、1、2、4、6、10、12、24、48 h,从大鼠眼眶取血 0.5 mL,置于肝素化离心管中,离心(3 000 r/min,10 min)取上层血,-20 ℃保存。按血浆样品处理方法处理后,在上述色谱条件下检测,根据检查结果绘制血药浓度-时间曲线图[9-10]。

2　结果

2.1　方法专属性

在上述优化的色谱条件下,分别考察了空白血浆、空白血浆+内标+和厚朴酚及给药后血浆样品的色谱行为,结果见图 1。由图 1 可见内标和和厚朴酚分离良好,保留时间分别为 4.1 min 和 5.1 min,内源性物质峰不干扰测定。

2.2　线性范围及定量限测定

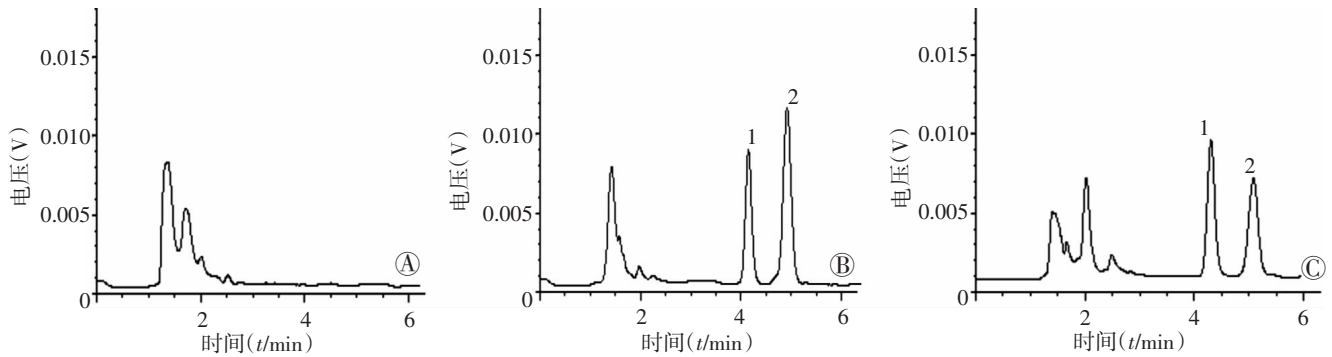
精密移取和厚朴酚储备液,分别配制 0.391、0.781、1.562、3.125、6.25、12.5、25、50、80、100 μg/mL 和厚朴酚标准溶液,在 200 μL 血浆中加入 20 μL 标准溶液按血浆样品处理方法处理,得到血浆浓度为 0.035 5、0.071 0、0.142 1、0.284 1、0.568 2、1.136 4、2.272 7、4.545 4、7.272 7、9.090 9 μg/mL 的标准溶液。进样记录和厚朴酚峰面积(A_s)和内标峰面积(A_i),以 A_s 和 A_i 的比值 R($R=A_s/A_i$) 对和厚朴酚的质量浓度 C 进行线性回归。$R=0.389\,0\,C+0.0249$($r=0.999\,6$),表明和厚朴酚在 0.035 5~9.090 9 μg/mL 质量浓度范围内线性关系良好,最低定量限(S/N=10)为 20 ng/mL。

2.3　精密度测定

精密移取 200 μL 空白血浆,分别加入适量的和厚朴酚储备液及内标溶液,配制低、中、高 3 个质控浓度(0.045 0、2.272 7、9.090 9 μg/mL)的血浆样品。依据 2.1 色谱条件每个浓度在 1 d 内平行测定 5 次,计算日内精密度;每天平行测定 1 次,连续 5 d,计算日间精密度。结果显示,低、中、高 3 个质控样品日内精密度的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)分别为 3.06%、3.33%、1.40%,日间精密度的 RSD 为 8.02%、6.19%、7.08%。

2.4　方法回收率和提取回收率测定[11-12]

2.4.1　提取回收率　　精密移取 200 μL 新鲜空白血浆,分别加入适量的低、中、高 3 种浓度的和厚朴酚溶液及内标溶液,配制低、中、高 3 个质控浓度(0.045 0、2.272 7、9.090 9 μg/mL)的血浆样品,依照血浆样品处理方法处理后进样测定,所得 A_s 和 A_i 值分别与相应质量浓度的和厚朴酚标准溶液和内标溶液直



A:空白血浆;B:空白血浆+和厚朴酚+内标;C:血浆样品　1:内标物质;2:和厚朴酚

图 1　和厚朴酚和吴茱萸碱在大鼠血浆中的高效液相色谱图

接进样所得A值相比,分别计算和厚朴酚和内标的提取回收率。低、中、高3个质控样品中和厚朴酚的提取回收率分别为112.91%、106.84%、100.88%,RSD分别为8.80%、5.71%、2.48%(n=5);内标物质的提取回收率分别为104.96%、107.03%、101.31%,RSD分别为8.52%、4.43%、5.24%(n=5)。和厚朴酚的提取回收率与内标物质的提取回收率接近,内标物质的提取不受血浆样品中和厚朴酚浓度的影响,表明该内标物质的选择是合适的。

2.4.2 方法回收率 精密移取200 μL空白血浆,分别加入适量的低、中、高3种浓度的和厚朴酚溶液及内标溶液,配制低、中、高3个质控浓度(0.045 0、2.272 7、9.090 9 μg/mL)的血浆样品,依2.4处理后进样测定,将A_s和A_i的比值R代入回归方程计算得出的药物浓度与真实药物浓度相比,计算方法回收率。低、中、高3个质控样品的方法回收率分别为111.91%、105.68、111.2%,RSD分别为5.24%、7.08%、3.25%(n=5)。

2.5 稳定性实验

2.5.1 室温稳定性实验 考察和厚朴酚血浆样品的室温稳定性。精密移取200 μL新鲜空白血浆,同法配制低、中、高3个质控浓度(0.045 0、2.272 7、9.090 9 μg/mL)的血浆样品。室温放置24 h后,依照血浆样品处理后进样测定,结果低、中、高3个浓度的样品测的浓度分别为标示浓度的98.14%、104.00%、99.17%,RSD分别为2.33%、4.51%、1.92%(n=5)。说明在0.045 0~9.090 9 μg/mL范围内和厚朴酚血浆样品在24 h内稳定性良好。

2.5.2 冷冻保存稳定性实验 考察和厚朴酚血浆样品的冷冻保存稳定性(-20 ℃)。同法配制低、中、高3个质控浓度(0.045 0、2.272 7、9.090 9 μg/mL)的血浆样品,在-20 ℃条件下保存14 d,依血浆样品处理后进样测定。结果显示低、中、高3个浓度的样品测的浓度为标示浓度的98.7%、102.07%、99.74%,RSD分别为5.02%、6.17%、3.93%(n=5)。

2.6 方法学的运用

大鼠血浆中和厚朴酚的药时曲线的绘制,采用本法测定大鼠单剂量灌胃和厚朴酚混悬液的平均血药浓度-时间曲线图,结果见图2。用DAS 2.1.1对药动学数据进行统计矩(非房室模型)拟合,主要药学参数:AUC_{0-t}(5.00±0.60) mg·h/L、$AUC_{0-\infty}$(7.25±1.58) mg·h/L、MRT_{0-t}(7.82±0.65) h、C_{max}(0.70±0.21) mg/L、T_{max}(0.47±0.15) h、$t_{1/2}$(14.11±3.57) h、V(211.93±39.47) L/kg、CL(11.63±3.44) L/(h·kg)。

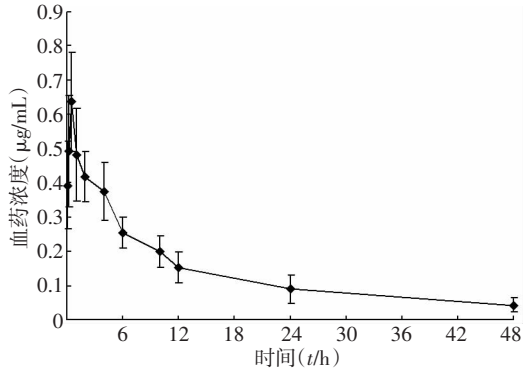


图2 大鼠灌胃给药80 mg/kg和厚朴酚混悬液血浆中和厚朴酚的平均血药浓度-时间曲线(n=6)

3 讨论

目前对含和厚朴酚生物样品的分析前处理方法有液液萃取法、直接蛋白沉淀法、固相萃取法和液相微萃取-非水后萃取法等[13]。直接蛋白沉淀法虽有利于自动化操作,但是不适宜应用于较低血药浓度药物的处理;固相萃取法所需样品量少,萃取效率高,但其操作过程复杂,重现性差,不利于大批量样品的处理,且成本高;液相微萃取-非水后萃取法是一种集采样、纯化和浓缩于一体的新技术,其有效性有待进一步验证;液液萃取法是最常用的方法之一,其在消除内源性杂质干扰的同时,还能起到富集血浆样品中药物的作用,适合于血样中低浓度药物的测定。本实验选择液液萃取法作为和厚朴酚血浆样品的前处理方法。

对于体内药物含量测定,内标法的测定结果更为准确、可靠。通过测量内标和待测组分峰面积的相对值进行计算,在一定程度上消除了实验条件和人为操作等因素变化所引起的误差,尤其是内标物质的加入可以消除待测组分在样品前处理过程中的损失。本实验选择内标法进行含量测定。

本实验利用吴茱萸碱作内标检测血浆样品中和厚朴酚的浓度,在系统条件下,内标物质与和厚朴酚的保留时间分别为4.1 min和5.1 min,该物质与和厚朴酚分离度好,回收率实验结果表明该物质不影响和厚朴酚的提取,说明选择吴茱萸碱作为本方法的内标是合理的。本实验建立了和厚朴酚在大鼠血浆样品中的分析方法,该方法减少了无机缓冲盐的使用[14],具有出峰时间短,分离度高等特点。该方法专属性强,准确度和精密度均符合生物样品体内分析要求,适合大鼠血浆中和厚朴酚的测定及动力学研究。

参考文献:

[1] Kaushik G, Ramalingam S, Subramaniam D, *et al*. Honokiol induces cytotoxic and cytostatic effects in malignant melanoma cancer cells[J]. Am J Surg, 2012, 204(6): 868-873.

[2] Ku T H, Lee Y J, Wang S J, *et al*. Effect of honokiol on activity of GAD(65) and GAD(67) in the cortex and hippocampus of mice[J]. Phytomedicine, 2011, 18(13): 1126-1129.

[3] Alexeev M, Grosenbaugh D K, Mott D D, *et al*. The natural products magnolol and honokiol are positive allosteric modulators of both synaptic and extra-synaptic GABA(A) receptors[J]. Neuropharmacology, 2012, 62(8): 2507-2514.

[4] Weeks B S. Formulations of dietary supplements and herbal extracts for relaxation and anxiolytic action: Relarian[J]. Med Sci Monit, 2009,

15(11): RA256 – RA262.
[5] 张卿, 张良珂, 袁佩, 等. 和厚朴酚固体脂质纳米粒的制备及性质研究[J]. 中草药, 2011, 42(4): 691 –693.
[6] 徐才兵, 贾运涛, 田睿, 等. 和厚朴酚羟丙基-β-环糊精包合物制备及验证[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(16): 1385 –1388.
[7] Wang X, Deng L, Cai L, *et al*. Preparation, characterization, pharmacokinetics, and bioactivity of honokiol-in-hydroxypropyl-β-cyclodextrin-in-liposome[J]. J Pharm Sci, 2011, 100(8): 3357 –3364.
[8] 娄杰, 徐才兵, 田睿, 等. 眼用和厚朴酚包合物温敏原位凝胶的制备及性质研究[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(21): 2340 –2343.
[9] 方罗, 范云, 罗吕宏, 等. 聚乙二醇修饰的多柔比星脂质体在我国肿瘤患者体内的药动学研究[J]. 中国药学杂志, 2012, 47(3): 223 – 228.
[10] 曹小帅, 沙美, 欧阳强, 等. 黄蜀葵花中 4 种黄酮类成分体内整合药动学研究[J]. 中草药, 2010, 41(2): 255 –259.
[11] Liu Y F, Yang X W, Lu W, *et al*. Determination and pharmacokinetic study of tussilagone in rat plasma by RP-HPLC method[J]. Biomed Chromatogr, 2008, 22(11): 1194 –1200.
[12] 张娓, 杨宏图, 项琪, 等. RP-HPLC 法研究鹿角缩酮 B 在新西兰兔体内的药代动力学[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(8): 1346 –1350.
[13] 王丹, 冯芳. 厚朴酚与和厚朴酚的体内药物分析方法及药代动力学研究近况[J]. 药学进展, 2011, 35(9): 396 –400.
[14] Wu X, Chen X, Hu Z. High-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of honokiol and magnolol in rat plasma[J]. Talanta, 2003, 59(1): 115 –121.

(**收稿**:2013-08-11;**修回**:2013-09-05)
(编辑　邓强庭)

文章编号:1000-5404(2014)03-0273-01

个案与短篇

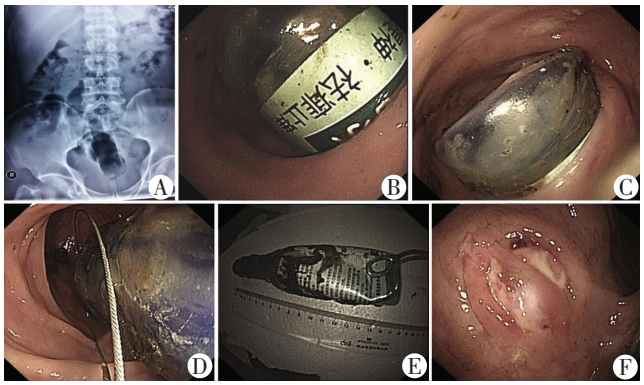
结肠镜引导下直肠巨大异物取出术 1 例

聂绪彪,彭　学,谯秋健,宋元鲲,李先来,柏健鹰,于　劲　(400037 重庆,第三军医大学新桥医院消化内科)

[**关键词**]　直肠异物;结肠镜
[**中图法分类号**]　R574.63　[**文献标志码**]　B

1　临床资料

患者,男性,49 岁,于 2013 年 8 月 24 日以“直肠异物 1 d”为主诉收入院。患者自诉 1 d 前因肛门瘙痒用花露水瓶摩擦肛门止痒,不慎意外滑倒臀部着地,将塑料花露水瓶插入直肠内,无法自行取出,在当地医院取异物未成功遂至本院。患者直肠内及下腹胀满不适,精神、饮食及睡眠欠佳,小便正常,肛门已排气但未排便。查体:神清,下腹部稍隆起,并可扪及一肿物,直肠指检未能触及异物,下腹轻微压痛感,无反跳痛及肌紧张。X 线腹部平片示:肠管少量积气,盆腔内可见一瓶状异物(图 1A)。全身静脉麻醉下,患者取左侧卧位,常规进镜,于直乙交界距肛门约 12 cm 处可见一瓶状异物嵌顿(图 1B),异物底部位于直乙交界处(图 1C),循异物边缘缓缓进镜,可见异物尖端位于乙状结肠内(图 1D),整个异物至右上斜向左下,取出过程中尝试用鼠齿异物钳夹取、针刀切割、单纯圈套器取出异物均失败,后改用卵圆钳在内镜引导下辅以圈套器夹住异物底部,边退镜边循肠腔缓缓向外拖拽异物,完整取出一长约 18 cm,直径约 4 cm 的塑料花露水瓶(图 1E)。再次进镜观察,见原嵌顿处局部溃疡形成,周围黏膜片状充血,未见穿孔(图 1F),密切观察患者无异常,1 d 后出院。



A:X 线片表现;B:异物镜下观;C:异物底部位于直乙交界处;D:异物尖端位于乙状结肠内;E:取出的异物大体观;F:异物取出后直肠镜下观

图 1　结肠镜引导辅以卵圆钳加圈套器经肛门取出异物过程观察

2　讨论

直肠异物的来源可分为 5 类:口源性异物、肛源性异物、外伤性异物、内源性异物、迁移性异物[1]。临床上常见的为肛源性异物,且多为性自慰所导致。Cohen 等[2]报道 11 年期间诊治

(下转 282 页)

[**通信作者**]　于　劲,E-mail:yujing124@126.com
[**优先出版**]　http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131011.1728.007.html(2013-10-11)