

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01264

HPLC 法测定 Beagle 犬血浆中芹菜素的浓度

HPLC in determination of apigenin in plasma of Beagle dogs

朱亮, 李盈

浙江大学附属第一医院药剂科, 杭州 310003

[关键词] 芹菜素; 高效液相色谱法; 血药浓度

[中图分类号] R 927.2 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2008)10-1264-02

芹菜素(apigenin)属于黄酮类化合物,广泛存在于水果、蔬菜、豆类、茶叶中^[1],其中芹菜含量最高。车前子、络石藤、藿香等药用植物中均含有大量芹菜素^[2]。研究发现,其有抗癌、抗病毒、抗菌、抗过敏,抗血管脆性和血小板聚集及抗糖尿病并发症等多种生理活性与药理作用,对人类的肿瘤、衰老、心血管病等退行性疾病的治疗和预防有重要意义^[3-4]。

许多研究表明,黄酮类在肝脏二相代谢酶的作用下,可发生葡萄糖醛酸化和硫酸化反应,因此芹菜素在血浆中有部分以葡萄糖醛酸结合物和硫酸结合物存在^[5],导致游离的芹菜素含量降低,无法准确测得结果^[6]。我们将芹菜素静脉给药后的犬血浆样品经葡萄糖醛酸酶及硫酸酯酶水解后发现,血浆药物芹菜素浓度显著高于未水解血浆。因此将含药血浆酶解后再进行测定,使其葡萄糖醛酸、硫酸酯及其他结合物均能水解成游离的单体进行测定以考察其浓度更为合理。目前芹菜素的血药浓度测定和药代动力学研究尚在起步阶段,动物模型建立不多。本实验采用酶解法,建立 HPLC 法测定 Beagle 犬血浆中芹菜素浓度,为芹菜素的临床研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器 HPLC-Agilent 1100 (VWD, 手动进样器); ChemStation for LC (Agilent CO. LTD); XW-80A 漩涡混合器(上海精科实业有限公司); Eppendorf Centrifuge 5415 R (Eppendorf AG 22331 Hamburg)。

1.2 试剂 芹菜素对照品 (Lot 111K1520, SIGMA-ALDRICH CO.); β -葡萄糖苷酶(IX-A)和硫酸酯酶(H-1)均购自 Sigma 公司; 甲醇(色谱纯); 醋酸铵(分析纯); 乙酸乙酯(分析纯); 盐酸(分析纯); 超纯水。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil ODS C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-0.2% 醋酸铵溶液 (50 : 50, V/V); 流速: 1.0 ml·min⁻¹; 紫外检测波长: 336 nm; 进样量: 50 μ l; 柱温: 25℃。色谱图见图 1。芹菜素保留时间 9.5 min, 空白血浆色中, 杂质峰不干扰测定, 表明该方法专属性好。

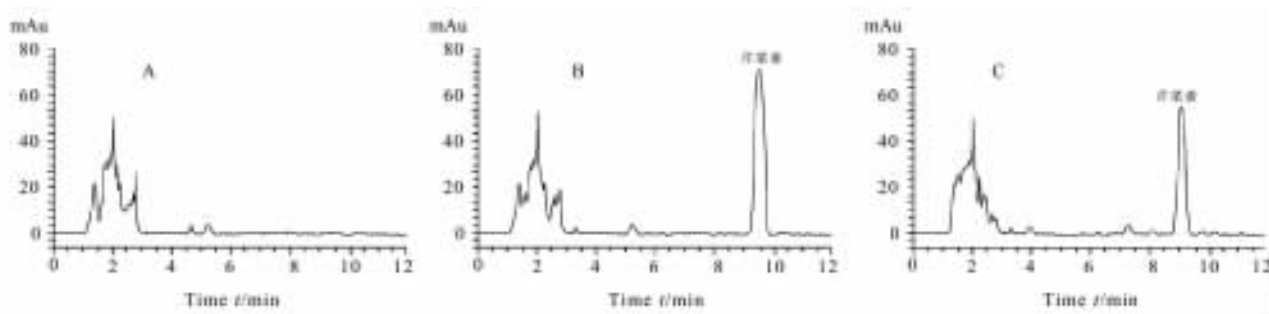


图 1 Beagle 犬血浆 HPLC 色谱图

A: 空白血浆; B: 空白血浆+对照品; C: 血浆样品

2.2 血样采集 受试 Beagle 犬(体质量 12.0 ~ 15.0 kg, 浙江大学医学院实验动物中心提供)禁食 12 h, 于后肢静脉给芹菜素(60 mg·ml⁻¹)10 ml。分别于给药后 0、0.2、8.0 h 由前肢取静脉血约 0.5 ml, 300×g 离心 10 min, 分离出血浆, 冷冻保存。

2.3 血浆预处理 精密移取血浆 0.3 ml, 漩涡震荡加入 0.23 mol·L⁻¹ 盐酸 30 μ l, 使酸化。加入 β -葡萄糖苷酶(300 U·ml⁻¹)和硫酸酯酶(15 U·ml⁻¹)各 5 μ l, 38℃ 水浴振荡水解 1.5 h 后, 置于冰浴中加入 3.0 ml 乙酸乙酯, 立即密封, 漩涡振荡 5 min, 400×g 离心 10 min, 精密移取 2.0 ml 上清液于另

[收稿日期] 2008-03-21 [接受日期] 2008-05-28

[作者简介] 朱亮, 主管药师, E-mail: liang8233@163.com

一干净试管中,于真空干燥器中抽干。测定前加流动相 200 μl 溶解,1 000 $\times g$ 离心 5 min,取上清液 50 μl 进样。

2.4 标准溶液的配制及标准曲线的制备 精密称取芹菜素对照品 50.0 mg,置 50 ml 量瓶中,加甲醇溶解稀释至刻度,摇匀,即成芹菜素标准储备液。临用前以甲醇稀释成所需浓度的标准液。

于 0.3 ml 空白血浆中分别加入系列浓度的芹菜素标准液,使其血浆药浓分别为 0.673 2、2.681、10.70、21.43、32.15、42.88 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$,按 2.3 项下条件操作。以样品峰面积为 Y ,以血浆芹菜素浓度为 X ,进行线性回归,其直线方程 $Y=59.07X+2.962$, $r=0.9997$ ($n=6$)。血浆芹菜素最低检测浓度为 0.083 73 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($S/N\geq 3$)。

2.5 方法学观察

2.5.1 绝对回收率 精密量取芹菜素标准储备液适量,加入空白血浆,配置成芹菜素浓度为 0.673 2、10.70、42.88 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的低、中、高浓度的标准血样溶液各 5 份,按 2.3 项下条件操作,记录峰面积与对应浓度的芹菜素标准溶液所得峰面积之比,得绝对回收率为 95.65%~98.58%。

2.5.2 加样回收率 精密量取芹菜素标准储备液适量,加入空白血浆,配置成芹菜素浓度为 0.673 2、10.70、42.88 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的低、中、高浓度的标准血样溶液各 5 份,按 2.3 项下条件操作,将峰面积代入标准曲线得到各质量浓度测定值,与加入量之比得到加样回收率为 98.98%~101.9%。

2.5.3 精密度考察 按加样回收率项下,配制浓度为 0.673 2、10.70、42.88 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的血浆样品各 5 份,依 2.3 项下条件操作,于 1 d 内测定,计算日内 RSD 为 0.9%~1.2%;间隔 1~2 d,于 2 周内考察,所得的日间 RSD 为 3.0%~4.1%。

2.5.4 稳定性实验 取芹菜素血浆浓度为 0.673 2、42.88 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的低、高浓度样品各 3 份,按 2.4 项下处理操作。在冷冻保存 24 h 后,于室温(25 $^{\circ}\text{C}$)解冻,连续测定 3 次,各浓度下的回收率为 97.44%~103.5%,表明冻融后样品稳定。

2.5.5 酶解与未酶解血样比较 Beagle 犬静脉给药后,按 2.2 项条件采集血样。将血样分别按照经酶解及未经酶解过程,其余均按照 2.3 项下条件操作,各时间点血药浓度见表 1。

表 1 Beagle 犬静注 600 mg 芹菜素后血样经酶解与未酶解处理后的血药浓度

($n=5$)

给药后时间 t/h	经酶解	未经酶解
0	20.24 \pm 0.38	14.80 \pm 0.12*
0.2	11.02 \pm 0.11	7.526 \pm 0.105*
8	1.177 \pm 0.015	0.803 8 \pm 0.088*

* $P<0.05$ 与经酶解血样比较

由表 1 可见,各时间点的血样经酶解过程后所得芹菜素浓度均高于未经酶解过程处理的血样($P<0.05$),由此证明芹菜素在体内有部分结合体存在,无法直接准确测定,需要通过

酶解测定。

3 讨论

流动相中加入醋酸铵溶液可抑制芹菜素的酚羟基电离,改善分离效果,减少拖尾,并因为其酸性,使峰形尖锐。采用乙酸乙酯为提取溶剂,回收率理想,并且不影响芹菜素的稳定性。采用 336 nm^[7] 为检测波长,比较灵敏且干扰较少。

芹菜素在体内存在部分葡萄糖醛酸及硫酸酯结合物^[8]。表 1 的结果显示,未酶解的血浆样品的芹菜素含量明显低于酶解的血浆样品,因此不经水解或酶解直接测定其中的芹菜素不能准确反映总浓度,从而不能合理反映芹菜素在体内的吸收、利用情况。曾考虑使用盐酸水解,经预实验发现色谱图中有较多杂质峰干扰实验。后参考文献^[9]使用 β -葡萄糖苷酶及硫酸酯酶,更具有针对性,且对芹菜素图谱无干扰。此外通过正交实验最终确定酶的浓度为 β -葡萄糖苷酶(300 U $\cdot\text{ml}^{-1}$)和硫酸酯酶(15 U $\cdot\text{ml}^{-1}$),在此条件下可酶解完全。

综上所述,本方法用于测定 Beagle 犬血浆中芹菜素,不仅方法准确、方便,而且干扰少、灵敏度高,可满足药代动力学及临床研究的要求。

[参考文献]

- [1] 赵秀娟,吴 坤. 芹菜素代谢动力学研究进展[J]. 中国公共卫生,2007,23:1020-1021.
- [2] 王杰松,张俊平,张 珉,钱定华. 芹菜素抑制 IL-1 和脂多糖诱导软骨细胞产生 NO[J]. 第二军医大学学报,1999,20: 362-364.
- [3] Gai H,Boocock D J,Steward W P,Gescher A J. Tissue distribution in mice and metabolism in murine and human liver of apigenin and tricetin, flavones with putative cancer chemopreventive properties[J]. Cancer Chemother Pharmacol,2007,60:257-266.
- [4] Shukla S,MacLennan G T,Flask C A,Fu P,Mishra A,Resnick M I,et al. Blockade of beta-catenin signaling by plant flavonoid apigenin suppresses prostate carcinogenesis in TRAMP mice [J]. Cancer Res,2007,67:6925-6935.
- [5] 潘兰英,李丽萍,蒋惠娣. 大鼠口服菊花提取物后血浆中木犀草素及芹菜素测定方法的研究[J]. 中国药理学杂志,2007,42: 374-378.
- [6] Li L,Jiang H,Wa H,Zeng S. Simultaneous determination of luteolin and apigenin in dog plasma by RP-HPLC[J]. J Pharm Biomed Anal,2005,37:615-620.
- [7] Cai H,Raynaud D,Steward W P,Gescher A J. A simple HPLC method for the determination of apigenin in mouse tissues[J]. Biomed Chromatogr,2006,20:1038-1042.
- [8] Gradolatto A,Canivene-Lavier M C,Basly J P,Siess M H,Teyssier C. Metabolism of apigenin by rat liver phase I and phase II enzymes and by isolated perfused rat liver[J]. Drug Metab Dispos,2004,32:58-65.
- [9] 陈 婷,蒋惠娣,鲁鑫炎,曾 苏. 大鼠胆汁中木犀草素和芹菜素 HPLC 测定方法的建立及应用[J]. 药物分析杂志,2007,27: 490-493.

[本文编辑] 尹 茶