

RP-HPLC内标法测定大鼠血浆中甘草次酸的浓度

郭波红^{1,2} 林绿萍¹ 林德晖¹ 程怡¹

(1. 广州中医药大学 中药学院 广东 广州 510006; 2. 广东药学院 药科学院 广东 广州 510006)

摘要: 目的 建立大鼠血浆中甘草次酸浓度的测定方法。方法 采用 RP-HPLC 内标法, 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(4.6 mm×25 cm 5 μm), 流动相为甲醇-水-乙酸(体积比 86:13.6:0.4), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 250 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量 20 μL, 内标为丙酸睾酮。结果 甘草次酸质量浓度在 0.1~3.0 mg·L⁻¹ 内线性关系良好($r=0.999\ 9$), 最低定量限为 0.1 mg·L⁻¹, 高、中、低 3 种质量浓度的日内 RSD 和日间 RSD 均 <6%。结论 建立的 RP-HPLC 内标法方法简便、快速、准确, 适合于甘草次酸的血液浓度测定及药动学研究。

关键词: 甘草次酸; 高效液相色谱法; 血药浓度; 丙酸睾酮

中图分类号: R927.2 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1006-8783.2011.01.012

文章编号: 1006-8783(2011)01-0048-03

Determination of glycyrrhetic acid in rat plasma by RP-HPLC

GUO Bo-hong^{1,2} LIN Lü-ping¹ LIN De-hui¹ CHENG Yi¹

(1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510006, China; 2. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical College, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: Objective To develop a HPLC assay for the determination of glycyrrhetic acid in rat plasma.

Methods Analytical column was Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm×25 cm 5 μm) at 30 ℃ with the mobile phase consisted of methanol, water and acetic acid (86:13.6:0.4). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the UV detection was set at 250 nm. The sample size was 20 μL, and testosterone propionate was used as the internal standard. **Results** The linear calibration curve was obtained in the concentration range of 0.1~3.0 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$). The lower limit of qualification was 0.1 mg·L⁻¹. The intra-day and inter-day RSD were less than 6%. **Conclusion** The method is simple, rapid and suitable for the determination of glycyrrhetic acid in rat plasma and the study of pharmacokinetics.

Key words: glycyrrhetic acid; HPLC; plasma drug concentration; testosterone propionate

甘草次酸为中药甘草的主要有效成分, 主要从甘草的根部或根茎提取而得, 属五环三萜皂苷类化合物, 具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤和防癌作用^[1-2]。甘草次酸的血液浓度测定方法国内外皆有报道^[3-5], 但检测方法以质谱居多且血样处理方法繁琐、成本较高。本研究采用 RP-HPLC, 以丙酸睾酮为内标物测定大鼠血浆中甘草次酸的浓度, 此方法具有专属性强、灵敏、准确、快捷方便等特点, 适用于甘草次酸的体内药动学研究。

1 材料与仪器

1.1 仪器

Dionex 高效液相色谱仪(P680 型泵, PDA-100 型检测器, ASI-100 自动进样器, 美国戴安公司); ZH-2 旋涡混合仪(天津药典标准仪器厂); pH 计(上海雷磁仪器厂); TLL-C 台式高速冷冻离心机(北京四环科学仪器厂); 氮气吹干仪(自制); Sartorius BS110S 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司)。

收稿日期: 2010-12-17

基金项目: 国家自然科学基金(30772790)

作者简介: 郭波红(1976 -), 女, 讲师, 博士, 主要从事药物新剂型的研究; 通讯作者: 程怡(1955 -), 女, 教授, 博士生导师, 电话: 020-39358041, Email: ncchengyi@21cn.com。

网络出版时间: 2011-01-21 16:23 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1413.R.20110121.1623.016.html>

1.2 药品与试剂

丙酸睾酮对照品(中国药品生物制品检定所,批号008-9404);甘草次酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号723-92031);甘草次酸原料(甘肃兰特植物化学有限公司,质量分数>98%);肝素钠注射液(江苏万邦生化有限公司);甲醇为色谱纯,其他药品、试剂均为国产分析纯。

1.3 实验动物

SD 雄性大鼠 10 只,体质量(210 ± 20) g,由广州中医药大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(粤)2008-0020。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C_{18} 柱(4.6 mm $\times$ 25 cm, 5 μ m);保护柱: Fusion-RP(4.0 mm $\times$ 3.0 mm 5 μ m),流动相: 甲醇-水-乙酸(体积比 86:13.6:0.4, pH 值 3.4)^[6],流速: 1.0 mL/min,检测波长: 250 nm,柱温: 30 $^{\circ}$ C,进样量: 20 μ L,内标: 丙酸睾酮。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取甘草次酸对照品 25.0 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,即得质量浓度为 250 mg $\cdot$ L⁻¹的对照品储备液,置冰箱中 4 $^{\circ}$ C 保存。

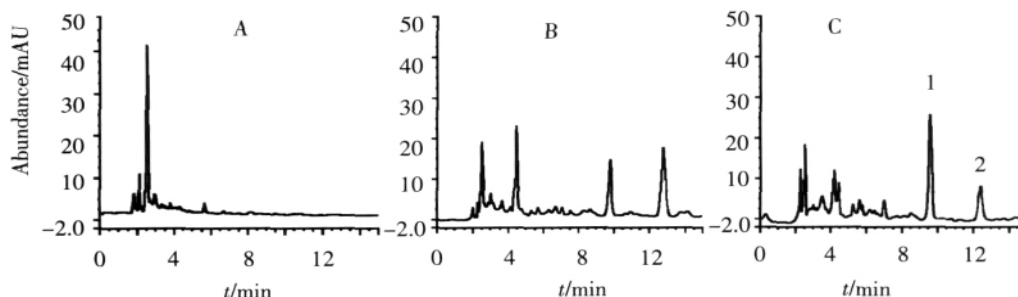
2.2.2 内标溶液的制备 精密称取丙酸睾酮对照品 5.0 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,即得质量浓度为 50 μ g $\cdot$ mL⁻¹的内标液。

2.3 血浆样品处理

精密移取血浆样品 100 μ L,加入内标液 10 μ L,漩涡混匀后加入乙酸乙酯 3 mL,漩涡混合 5 min 后离心 10 min(10 000 r $\cdot$ min⁻¹),取上清液 40 $^{\circ}$ C 水浴氮气吹干,用 100 μ L 流动相溶解残渣,涡旋 5 min,离心 10 min(10 000 r $\cdot$ min⁻¹),吸取上清液置内衬管中,进样 20 μ L,记录色谱图。

2.4 专属性考察

按“2.3”条件下依法操作,在此条件下,内标物丙酸睾酮及甘草次酸的保留时间分别为 9.97 min 和 12.56 min,且血浆中内源性成分对甘草次酸与内标的测定无干扰,满足分析测定的要求(图 1)。



A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 甘草次酸 + 丙酸睾酮对照品; C. 大鼠给药后血浆 + 丙酸睾酮; 1. 丙酸睾酮; 2. 甘草次酸

图1 高效液相色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms

2.5 标准曲线绘制

取 5 mL 具塞离心管数支,加入甘草次酸系列对照品溶液 20 μ L,氮气吹干,再加入 100 μ L 空白血浆,配成质量浓度为 0.1、0.3、0.6、1.2、1.8、2.4、3.0 mg $\cdot$ L⁻¹的血浆样品,再分别加内标溶液 10 μ L,每个质量浓度 3 个样本,按“2.3”项处理血浆样品,进样 20 μ L,测定样品及内标的峰面积,以峰面积比值(Y)对血浆质量浓度(ρ)进行线性回归,得回归方程为: $\rho = 2.202Y - 0.0065$, $r = 0.9999$ 。表明本方法在 0.1 ~ 3.0 mg $\cdot$ L⁻¹内线性关系良好。最低定量限为 0.1 mg $\cdot$ L⁻¹。

2.6 回收率及精密度

按“2.5”项下制备低、中、高 3 个质量浓度分别为 0.3、1.2、2.4 mg $\cdot$ L⁻¹的血浆样品,按“2.3”项下

进行操作,各质量浓度日内重复测定 5 次,并连续测定 3 d,每天 5 份,计算其方法回收率及日内、日间的精密度。结果见表 1。

2.7 提取回收率

按“2.5”项下制备低、中、高 3 个质量浓度分别为 0.3、1.2、2.4 mg $\cdot$ L⁻¹的血浆样品,按“2.3”项下进行操作,另用甲醇配制相应低、中、高 3 个质量浓度的甘草次酸溶液,不经任何处理取 20 μ L 直接进样,以此为标准,将两组峰面积进行比较计算甘草次酸的提取回收率。其结果见表 1。

2.8 稳定性考察

按“2.5”项下方法制备质量浓度为 1.2 mg $\cdot$ L⁻¹对照品血浆 12 份,其中 3 份按“2.3”项下方法进行操作,计算样品的质量浓度,记为初质量浓度。

余下样品中 3 份在室温放置 12 h, 3 份在 -20 ℃ 冰冻条件下保存 30 d, 3 份反复冻融 4 次, 再按“2.3”项下方法进行操作, 计算样品的质量浓度, 记为终质量浓度。比较初质量浓度和终质量浓度计算 RSD 值。结果室温放置、冰冻保存、冻融条件下的 RSD 分别为 5.62%、2.13%、3.87%, 表明对照品血浆在室温放置 12 h、冰冻保存 30 d 以及反复冻融 4 次条件下稳定性良好。

表 1 HPLC 法测定大鼠血浆中甘草次酸的回收率与精密度
Table 1 Recovery and precision of glycyrrhetic acid in rat plasma (n = 5)

加入量/ (mg · L ⁻¹)	提取回 收率 / %	方法回 收率 / %	RSD / %	
			日内	日间
0.3	81.03 ± 1.68	94.45 ± 1.51	2.78	5.84
1.2	98.18 ± 6.40	95.72 ± 5.90	3.42	5.92
2.4	82.29 ± 5.48	99.02 ± 5.04	0.74	1.43

2.9 大鼠药动学

取健康 SD 雄性大鼠 10 只, 尾静脉注射甘草次酸 (10 mg · kg⁻¹), 给药后 5、10、15、20、30、45、60、120、240、360 min 定时从眼眶静脉采血 0.3 mL, 肝素抗凝 3 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 分离出血浆置 -20 ℃ 冷冻保存, 1 周内测定。用本法测定血浆中甘草次酸质量浓度, 计算得平均血药质量浓度-时间曲线见图 2。数据用 DAS2.0 药动学软件拟合, 结果表明, 甘草次酸的大鼠血药质量浓度-时间曲线符合二室开放模型, 主要药动学参数见表 2。

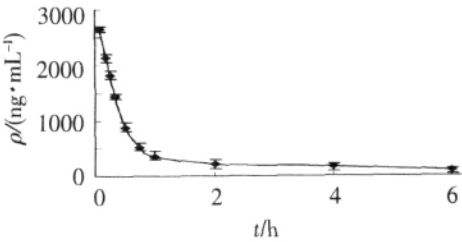


图 2 大鼠尾静脉注射甘草次酸的平均血药质量浓度-时间曲线

Figure 2 Mean plasma concentration-time curve after iv administration of glycyrrhetic acid in rats (n = 6)

3 讨论

3.1 本实验曾选用乙腈、甲醇作为提取溶剂, 结果内源性物质干扰大, 采用乙酸乙酯作为提取溶剂, 回收率高, 重现性好, 内源性杂质干扰小, 较文献[5]的固相萃取法更简单、经济, 是较理想的甘草次酸提取方法。

3.2 选择内标时, 根据甘草次酸的结构与理化性质, 分别考察了丙酸睾酮和黄体酮。结果表明, 经过

色谱条件优化, 将二者完全分开时黄体酮的保留时间约为 6 min, 与内源性物质干扰严重; 丙酸睾酮保留时间为 9.97 min, 在甘草次酸保留时间之前, 且无干扰, 结构与甘草次酸相似, 稳定性高, 能够满足内标物质的选择要求, 故选择丙酸睾酮作为内标。

表 2 大鼠静注甘草次酸的药动学参数

Table 2 Pharmacokinetic parameters after iv administration of glycyrrhetic acid in rats (n = 10)

药动学参数	$\bar{x} \pm s$
$t_{1/2\alpha}$ /h	0.19 ± 0.032
$t_{1/2\beta}$ /h	3.91 ± 0.854
V_d / (L · kg ⁻¹)	2.43 ± 0.758
CL / (L · h ⁻¹ · kg ⁻¹)	3.46 ± 0.267
$AUC(0-6\text{ h})$ / (mg · h · L ⁻¹)	1.95 ± 0.312
$AUC(0-\infty)$ / (mg · h · L ⁻¹)	2.89 ± 0.471
K_{10} /h ⁻¹	1.43 ± 0.064
K_{12} /h ⁻¹	2.46 ± 0.086
K_{21} /h ⁻¹	0.44 ± 0.037

3.3 本实验对 10 只大鼠尾静脉注射甘草次酸, 发现其体内分布符合二室模型, 药动学参数消除半衰期 $t_{1/2\beta} > t_{1/2\alpha}$, 表明甘草次酸在体内主要以消除为主, 并且消除较快, 在大鼠体内分布迅速, 维持有效血药浓度的时间短。通过本实验建立的甘草次酸体内药物分析方法准确、简单、灵敏, 能满足生物样品分析的要求, 可用于甘草次酸动物体内血药浓度的测定, 为进一步研究甘草次酸体内测定方法奠定了基础。

参考文献:

[1] 黄炜, 黄挤群, 张东方, 等. 18β-甘草次酸和甘草酸对人肝癌细胞增殖的抑制和诱导分化作用[J]. 中国中医药科技 2002, 9(2): 92-93.

[2] 周荣汉. 中国资源学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993: 92.

[3] 赵文静, 王本杰, 魏春敏, 等. 高效液相色谱-质谱法测定人血浆中甘草次酸浓度及人体药代动力学研究[J]. 山东大学学报: 医学版 2008, 46(11): 1110-1112.

[4] ZHAO W J, WANG B J, WEI C M et al. Determination of glycyrrhetic acid in human plasma by HPLC-MS method and investigation of its pharmacokinetics [J]. J Clin Pharm Ther 2008, 33(3): 289-294.

[5] LIN Zhong-ping, QIU Sheng-xiang, WU Fu-er A, et al. Simultaneous determination of glycyrrhizin, a marker component in Radix Glycyrrhizae, and its major metabolite glycyrrhetic acid in human plasma by LC-MS/MS [J]. J Chromatogr B 2005, 814(2): 201-207.

[6] LU Yang, LI Juan, WANG Guang-ji. In vitro and in vivo evaluation of mPEG-PLA modified liposomes loaded glycyrrhetic acid[J]. Int J Pharm 2008, 356(1-2): 274-281.

(责任编辑: 陈翔)