

LC-MS 考察 α -香附酮在 Caco-2 细胞模型中转运特性

胡律江^{1,2}, 郭慧玲^{2*}, 胡志方³, 闫柏屹², 赵晓娟², 肖小梅²

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 江西中医药大学, 南昌 330004;
3. 江西中医药高等专科学校, 江西 抚州 344000)

[摘要] 目的:考察 α -香附酮在 Caco-2 细胞模型中转运机制。方法:建立 Caco-2 细胞模型,考察体积分数和时间对 α -香附酮双向转运过程的影响。采用 LC-MS 测定 α -香附酮含量,流动相甲醇(A)-水(B)梯度洗脱(0~5 min,30%~70% A; 5~10 min,70%~100% A;15~20 min,30% A),流速 0.25 mL·min⁻¹,计算不同条件下表观渗透系数(P_{app})。结果: α -香附酮在 2 h 内转运量与时间、体积分数呈正相关。不同体积分数 α -香附酮从 BL 侧到 AP 侧的 P_{app} 与 AP 侧到 BL 侧的 P_{app} 比值均在 0.5~1.5。结论: α -香附酮在 Caco-2 细胞模型中转运特性为被动扩散转运方式。

[关键词] LC-MS; α -香附酮; Caco-2 细胞; 转运特性; 表观渗透系数; 香附

[中图分类号] R945; R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)05-0035-04

[doi] 10.11653/syfy2014050035

Transport Characteristics of α -Cyperone in Caco-2 Cell Model by LC-MS

HU Lv-jiang^{1,2}, GUO Hui-ling^{2*}, HU Zhi-fang³, YAN Bai-yi², ZHAO Xiao-juan², XIAO Xiao-mei²

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;
2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330004, China;
3. Jiangxi College of TCM, Fuzhou 344000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate transport mechanisms of α -cyperone in Caco-2 cell model by LC-MS. **Method:** Caco-2 cell model was established, effects of volume fraction and time on bidirectional transport process of α -cyperone were investigated. LC-MS was adopted to determine the content of α -cyperone with mobile phase of methanol (A) -water (B) (0-5 min, 30%-70% A; 5-10 min, 70%-100% A; 15-20 min, 30% A) and a flow rate of 0.25 mL·min⁻¹, values of apparent permeability coefficient (P_{app}) under different conditions were calculated. **Result:** Both transport amounts of AP-to-BL and BL-to-AP increased with increasing of volume fraction and time within 2 h. P_{app} kept 0.5-1.5 at different volume fractions of α -cyperone. **Conclusion:** α -Cyperone could be transported through intestinal mucosa via a passive diffusion mechanism.

[Key words] LC-MS; α -cyperone; Caco-2; transport characteristics; permeability coefficient; Cyperi Rhizoma

香附为中医常用妇科良药,具疏肝理气、调经止痛之功效^[1]。其干燥根茎中挥发油的有效成分为 α -香附酮,属于倍半萜类中桉烷型倍半萜^[2]。目前国内有关香附的研究报道较多^[3-8],主要集中于成

分分析和药理效应方面,研究表明 α -香附酮为主要效应成分。香附中 α -香附酮在 Caco-2 细胞模型中的转运机制研究尚未见报道。本实验拟采用 LC-MS 考察 α -香附酮在 Caco-2 细胞模型中的转运特性,为香附的临床应用提供实验依据。

1 材料

6410 型质谱仪(美国安捷伦科技公司), Multiskan MK3 型酶标仪(芬兰 Thermo Labsystems 公司), MC-0175 型二氧化碳培养箱(日本三洋),

[收稿日期] 20131023(007)
[第一作者] 胡律江,博士,从事中药制剂新技术研究,Tel: 0791-86363831,E-mail:380085581@qq.com
[通讯作者] *郭慧玲,教授,从事中药制剂新剂型与新技术研究,Tel:0791-87118645,E-mail:ghl6262@126.com

Millicell ERS-2 型电阻仪(美国 Millipore 公司),SW-80A 微型涡流混合仪(上海青浦沪西仪器厂)。

Caco-2 细胞株(中国科学院上海细胞库,实验所用代数在 21~45),DMEM 培养液、胎牛血清(赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司),0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸、非必须氨基酸(美国 Gibco 公司),Hanks 液(HBSS)、二甲基亚砜(DMSO)、噻唑蓝(MTT)、青霉素-链霉素(北京索莱宝科技有限公司),荧光素钠(上海试剂三厂),碱性磷酸酶试剂盒(南京建成生物工程研究所), α -香附酮对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110748-200608),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 Caco-2 细胞模型的建立 Caco-2 细胞生长在 T-25 培养瓶中,培养液为 DMEM(含 10% 胎牛血清,1% 青-链霉素和 1% 非必需氨基酸),在 37℃,含 5% CO₂ 培养箱中培养(相对湿度 90%)。3~4 d 传代 1 次,取对数生长期的细胞接种于 12 孔培养板上,接种密度为每孔 1.0×10^5 个/mL,培养板内加入细胞悬液 500 μ L,基底侧加入培养液 1 500 μ L,接种 24 h 后更换培养液,1 周内隔天换液,1 周后每日换液。细胞培养 21 d 后,对细胞模型进行验证,选取跨膜电阻 $> 500 \Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ 及碱性磷酸酶分布不对称出现明显极化性的细胞进行药物转运试验。

2.2 α -香附酮溶液的配制 精密吸取 α -香附酮对照品甲醇溶液(15 mL $\cdot$ L⁻¹),加入空白 HBSS 缓冲液稀释成 α -香附酮体积分数分别为 3,30,60,90,120,150 μ L $\cdot$ L⁻¹ 的系列溶液,备用。

2.3 分析样品处理 精密量取 α -香附酮跨膜转运液 200 μ L,加甲醇 800 μ L 涡旋 3 min,于 4℃ 以 16 000 r $\cdot$ min⁻¹ 的转速离心 10 min,取上清液。

2.4 色谱条件 Phenomenex C₁₈ 色谱柱(2.0 mm $\times$ 150 mm,3 μ m),流动相甲醇(A)-水(B)梯度洗脱(0~5 min,30%~70% A;5~10 min,70%~100% A;15~20 min,30% A),流速 0.25 mL $\cdot$ min⁻¹,进样量 5 μ L,柱温 30℃。

2.5 质谱条件 离子源 ESI,离子化模式正离子,毛细管电压 3 000 V,干燥温度 350℃,干燥气流速 8 L $\cdot$ min⁻¹,雾化温度 425℃,喷雾器压力 206.85 kPa,延迟时间 200 ms,定量模式多反应监测模式(MRM),定量离子 m/z [M+H]⁺ 219.3 $\rightarrow$ m/z 163.1。

2.6 方法学考察

2.6.1 标准曲线的建立 精密吸取 α -香附酮对照

品甲醇溶液,加空白 HBSS 缓冲液分别制成 0.001,0.003,0.006,0.03,0.15,0.3 μ L $\cdot$ L⁻¹ 系列溶液,按上述检测方法测定,以 α -香附酮体积分数为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 24\,385X + 213.569$ ($r = 0.998\,7$),线性范围 0.001~0.3 μ L $\cdot$ L⁻¹。

2.6.2 专属性考察 分别取空白 HBSS 缓冲液和 α -香附酮体积分数 0.03 μ L $\cdot$ L⁻¹ 的对照品溶液各 200 μ L,按 2.3 项下方法制备样品溶液,按 2.4,2.5 项下方法测定,结果见图 1,表明 HBSS 空白基质对 α -香附酮的测定无干扰。

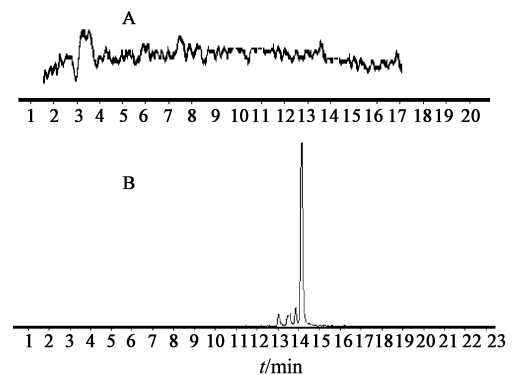


图 1 空白 HBSS 缓冲液(A)和 α -香附酮对照品溶液(B)的 LC-MS

2.6.3 精密度考察 制备体积分数分别为 0.001,0.03,0.3 μ L $\cdot$ L⁻¹ 的 α -香附酮对照品溶液,1 d 取样 6 次,按 2.4,2.5 项下方法测定 α -香附酮含量,计算日内精密度 RSD 依次为 3.16%,2.88%,0.53%;1 周内连续 5 d 取样测定 α -香附酮含量,计算日间精密度 RSD 分别为 1.93%,1.07%,1.89%,均符合生物样品分析方法的要求。

2.6.4 回收率试验 取 2.6.3 项下低、中、高体积分数的 α -香附酮对照品溶液,按 2.3 项下方法制备样品溶液,按 2.4,2.5 项下方法测定。取空白 HBSS 缓冲液同法操作,向上清液中加入相应体积分数的 α -香附酮对照品溶液,计算回收率($\bar{x} \pm s, n = 5$)依次为 (90.18 $\pm$ 5.58)%, (87.01 $\pm$ 8.31)%, (98.25 $\pm$ 3.53)%, RSD 分别为 6.14%,9.55%,3.78%。

2.7 安全体积分数范围考察 将 Caco-2 细胞悬液以每孔密度 8×10^4 个/mL 接种于 96 孔培养板,置 5% CO₂,37℃ 培养箱内培养,待 96 孔内细胞贴壁并长成片状细胞后,加入空白 HBSS 缓冲液和不同体积分数 α -香附酮对照品溶液 200 μ L ($n = 8$),置于 CO₂ 培养箱中继续培养 4 h,加入 MTT 溶液(5 g $\cdot$ L⁻¹)20 μ L 继续培养 4 h,小心吸干孔内溶液,加入

DMSO 溶液 150 μL,于微型振荡器振荡 10 min,用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度(A),计算细胞存活率。结果发现 α-香附酮在体积分数分别为 90, 120 μL·L⁻¹时,Caco-2 细胞存活率依次为 99.8%, 94.6%;之后随着 α-香附酮体积分数的增加,Caco-2 细胞存活率降低,至 150 μL·L⁻¹时细胞存活率 84.7%,对 Caco-2 细胞具有生长抑制作用,但不适合进行转运试验,故选择安全体积分数 3~120 μL·L⁻¹。

细胞存活率 = (A_{试验组} - A_{空白组}) / (A_{阴性组} - A_{空白组}) × 100%

2.8 α-香附酮的转运试验 用 HBSS 缓冲液将培养 21 d 的 Caco-2 单层细胞膜冲洗 3 次,最后 1 次在 37 ℃培养箱中平衡 20 min。药物从 AP 侧转运至 BL 侧为分别吸取 2.2 项下不同体积分数 α-香附酮对照品溶液 500 μL 加入 AP 侧作为供给池,同时 BL 侧加入 pH 7.4 的空白 HBSS 缓冲液 1.5 mL 作为接收池;药物从 BL 转运至 AP 侧为分别吸取 2.2 项下不同体积分数 α-香附酮对照品溶液 1.5 mL 加入 BL 侧作为供给池,同时 AP 侧加入 pH 7.4 的空白 HBSS 缓冲液 500 μL 作为接收池。置于 37 ℃,55 r·min⁻¹ 的恒温摇床上孵育,分别于载药后 30,60, 90,120 min 于接收液侧采样 200 μL,同时补加相同体积 HBSS 缓冲液,每组平行 3 个孔,计算 α-香附酮在 Caco-2 细胞单层累积转运量及表观渗透系数(P_{app}),α-香附酮从 AP→BL 及 BL→AP 的转运量随时间的变化趋势见图 2。结果表明在 30~120 min 内,体积分数为 30,60,90,120 μL·L⁻¹ 的 α-香附酮对照品溶液在 Caco-2 细胞模型中转运量与体积分数和时间呈正相关。

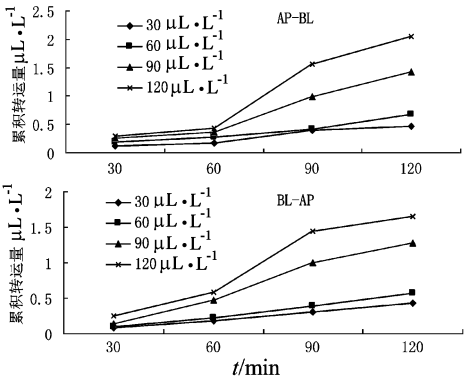


图2 α-香附酮双向跨膜转运量(̄x ± s, n = 3)

考察 30,60,90,120,150 μL·L⁻¹ 的 α-香附酮对照品溶液在 Caco-2 细胞模型中 30,60,90,120 min 的吸收转运(AP→BL)和分泌转运(BL→AP),按

2.3 项下方法制备样品溶液,按 2.4,2.5 项下方法测定,以 P_{app} 作为参考进行数据处理。

P_{app} = ΔQ / (Δt × A × C₀)

式中 ΔQ/Δt 表示转运时间 Δt 内的药物转运速率,A 为聚碳酸酯膜表面积(1.12 cm²),C₀ 为初始给药体积分数,结果见表 1,表明外排率(ER)均在 0.5~1.5,α-香附酮双向 P_{app} 无显著性差异,即考察的体积分数范围内双侧的 P_{app} 相近,故推断 α-香附酮在 Caco-2 细胞模型中转运机制以被动扩散为主。

表1 不同体积分数 α-香附酮的双向 P_{app} 和 ER(̄x ± s, n = 3)

体积分数 /μL·L ⁻¹	P _{app} /cm·s ⁻¹ , × 10 ⁻⁶		
	AP→BL	BL→AP	ER
30	1.94 ± 0.22	1.81 ± 0.57	0.93 ± 0.67
60	1.40 ± 0.52	1.18 ± 0.27	0.84 ± 0.87
90	1.95 ± 0.14	1.76 ± 0.72	0.90 ± 0.46
120	2.11 ± 0.22	1.71 ± 0.99	0.81 ± 0.96

注:ER = P_{app}_{BL-AP} / P_{app}_{AP-BL}。

3 讨论

在 Caco-2 细胞模型中,通常用 P_{app} 评价药物在肠道的吸收情况,文献研究表明在不同体积分数条件下,P_{app} 无显著性差异,双向转运试验中 ER < 1.5,提示该活性成分为被动转运,ER > 1.5 则可能存在主动转运^[9-10]。本文考察了 α-香附酮在 Caco-2 细胞模型中双向转运机制,结果表明 α-香附酮对体积分数和时间均存在依赖性,且随体积分数增加转运量呈线性增加,P_{app} 基本无显著性变化,ER < 1.5 范围,提示 α-香附酮在 Caco-2 细胞模型中转运特性为被动转运。

[参考文献]

[1] 刘成彬,张少聪,李青天. 香附的现代药理研究进展[J]. 光明中医,2009,24(4):787.
[2] 温东婷,张蕊,陈世忠. 香附化学成分的分离及对未孕大鼠离体子宫肌收缩的影响[J]. 北京大学学报:医学版,2003,35(1):110.
[3] 胡志方,胡律江,郭慧玲,等. 基于均匀设计法的建昌帮四制香附炮制工艺评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(16):39.
[4] 陈艳红,吴秋云,蔡佳仲. 17 批不同产地香附中有效成分的含量测定[J]. 临床医学工程,2010,17(11):41.

贯叶连翘提取物缓释片的处方工艺优选

宋宏新*, 邢红香, 李楠
(陕西科技大学生命科学与工程学院, 西安 710021)

[摘要] 目的:优选贯叶连翘提取物凝胶骨架缓释片的处方并考察其体外释药机制。方法:以贯叶连翘提取物中金丝桃素在不同时间点的累积释药率为综合评价指标,采用正交试验考察乳糖和 MCC 质量比、骨架材料及 HPMC 用量对处方工艺的影响。利用体外释放度试验考察缓释片的释药机制。结果:优选的处方工艺为 HPMC K15M 用量 30%,MCC 用量 6.4%,乳糖用量 12.6%,硬脂酸镁用量 1%。贯叶连翘提取物凝胶骨架缓释片在 2 h 释药率 15%~30%,6 h 释药率 40%~75%,12 h 释药率>85%,释药行为符合 Ritger-Peppas 方程,释药过程为药物扩散和骨架溶蚀的协同作用。结论:优选的处方工艺合理、简单。制备的缓释片体外释药缓慢、平稳,药物释放机制符合释放动力学模型。

[关键词] 贯叶连翘提取物;缓释片;体外释放度;金丝桃素;模型拟合方程

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)05-0038-04

[doi] 10.11653/syfy2014050038

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131218.1405.002.html>

[网络出版时间] 2013-12-18 14:05

Optimization of Formula of Hyperici Perforati Herba Extract
Sustained-release Tablets

SONG Hong-xin*, XING Hong-xiang, LI Nan

(College of Life Science & Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize formula of Hyperici Perforati Herba extract sustained-release tablets and evaluate its *in vitro* release mechanism. **Method:** With cumulative release rate of hypericin at different time points as comprehensive evaluation index, orthogonal test was adopted to optimize formula of Hyperici Perforati Herba extract sustained-release tablets by taking quality ratio of MCC to lactose, framework materials and the amount of HPMC as factors. Release mechanism of sustained-release tablets was investigated by *in vitro* release

[收稿日期] 20131014(007)
[基金项目] 陕西省教育厅 2012 年科学研究项目(12JK1031)
[通讯作者] * 宋宏新,硕士,教授,从事食品与药品安全检测研究,Tel:13891089061,E-mail:hongxinsong@163.com

[5] 胡律江,胡志方,郭慧玲,等. 四制香附与生品香附挥发油成分的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(22):112.

[6] 胡志方,谢颖,胡律江,等. 香附不同炮制方法的品质比较[J]. 江西中医学院学报,2010,22(6):48.

[7] 冯毅凡,郭晓玲,孟青. 香附超临界 CO₂ 萃取物化学成分分析[J]. 中药材,2006,29(3):232.

[8] 温东婷,张蕊,陈世忠. 香附化学成分的分离及对未孕大鼠离体子宫肌收缩的影响[J]. 北京大学学报:医学版,2003,35(1):110.

[9] Liang E, Proudfoot J, Yazdanian M. Mechanisms of transport and structure-permeability relationship of sulfasalazine and its analogs in Caco-2 cell monolayers [J]. Pharm Res,2000,17(10):1168.

[10] 冯志强,谢智勇,廖琼峰,等. 氧化槐果碱在 Caco-2 细胞模型中的吸收机制研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(17):2399.

[责任编辑 全燕]