

· 药物代谢 ·

补骨脂中苯并呋喃苷类成分在大鼠血浆中的移行特征

颜冬梅^{1*}, 高秀梅², 康立源², 王跃飞², 常艳旭²

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] 目的:考察补骨脂中苯并呋喃苷类化合物(补骨脂苷、异补骨脂苷)在大鼠血浆的移行特征。方法:大鼠灌胃给予苯并呋喃苷部位提取物,采用 HPLC-UV 测定大鼠血浆中补骨脂苷、异补骨脂苷的含量,流动相 0.1% 甲酸水溶液-乙腈梯度洗脱,检测波长 246 nm,血药浓度-时间数据采运用 SPSS 11.0 软件分析。结果:补骨脂苷和异补骨脂苷在 15 min 后在血液中可检测到,于 1.5 h 均达峰浓度,苯并呋喃苷类成分在大鼠体内吸收较快,补骨脂苷、异补骨脂苷在大鼠体内能转化为补骨脂素、异补骨脂素。结论:苯并呋喃苷类成分血浆 HPLC 特征性及专属性好,适用于该部位血浆移行成分的分析,为补骨脂相关制剂的临床前药动学研究提供参考。

[关键词] 补骨脂; 苯并呋喃苷; 补骨脂素; 补骨脂苷; 异补骨脂苷

[中图分类号] R969.1;R284.1;R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)11-0085-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015110085

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150414.1128.014.html>

[网络出版时间] 2015-04-14 11:28

Transitional Features of Benzofuran Glycosides Part from Psoraleae Fructus in Rat Plasma

YAN Dong-mei^{1*}, GAO Xiu-mei², KANG Li-yuan², WANG Yue-fei², CHANG Yan-xu² (1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330004, China; 2. Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate transitional features of rat plasma after administration of benzofuran glycosides part from Psoraleae Fructus. **Method:** A HPLC-UV method was established to determine contents of psoralenoside and isopsoralenoside in rat plasma after administration of benzofuran glycosides part, mobile phase composed of acetonitrile and 0.1% formic acid water in gradient elution, detection wavelength was set at 246 nm. Plasma concentration-time data were dealt with SPSS 11.0 software. **Result:** Psoralenoside and isopsoralenoside appeared in plasma after 15 min of administration of benzofuran glycosides with 0.003 g·g⁻¹, and reached the peak concentration in 1.5 h, also their metabolites (psoralen and isopsoralen) were found in plasma. **Conclusion:** Specificity and characteristic of plasma HPLC are good, which is successfully used for quantification of psoralenoside and isopsoralenoside in rat plasma after administration of benzofuran glycosides part, benzofuran glycosides can be transformed into corresponding coumarins in rat.

[Key words] Psoraleae Fructus; benzofuran glycosides; psoralen; psoralenoside; isopsoralenoside

补骨脂始载于《雷公炮炙论》^[1],具有温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻之功效,外用消风祛斑,临床用于治疗肾阳不足、阳痿遗精、遗尿尿频等证,外用治白癜风、斑秃^[2]。苯并呋喃苷类成分(补骨脂苷、异补骨脂苷)为补骨脂水提液(汤剂)的主要成

分^[3]。研究显示补骨脂水提液能促进成骨细胞的增殖与分化,抑制骨质丢失,可预防或治疗骨质疏松^[4-12],提示补骨脂苷、异补骨脂苷可能在该效应中贡献了力量,但至今尚无有关其体内情况的研究报道。HPLC, UPLC 等方法已被用于补骨脂药材的定

[收稿日期] 20140910(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202911);江西省自然科学基金项目(20114BAB215043)

[通讯作者] * 颜冬梅,博士,讲师,从事活性成分筛选及中药炮制研究, Tel:0791-87118995; E-mail:yanli1999@163.com

量分析^[13-14],但关于生物样品中补骨脂苷和异补骨脂苷分析方法的报道极少。本实验拟建立 HPLC 同时测定大鼠血浆中补骨脂苷、异补骨脂苷的含量,为补骨脂水提液的体内代谢过程研究提供实验依据。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),3K30 型冷冻离心机(德国 Sigma 公司),Milli-QB 型超纯水净化系统(美国 Millipore 公司)。补骨脂药材(河北安国药材市场,经天津中医药大学李天祥副教授鉴定为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* 的果实,标本存于天津中医药大学中药研究院),补骨脂苷、异补骨脂苷对照品(自制,HPLC 归一化法测得纯度均 >98%,结构经 NMR 及 MS 鉴定^[8]),苯并呋喃苷部位(自制,补骨脂苷、异补骨脂苷质量浓度分别为 12.124,9.719 g·L⁻¹),淫羊藿苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110737-200415),甲酸、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

雄性 Wistar 大鼠,SPF 级,体重 180 ~ 220 g,由天津市山川红实验动物科技有限公司提供,合格证号 SCXK(津)2009-001。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 20 min,90% A;20 ~ 45 min,90% ~ 68% A;45 ~ 50 min,68% A),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 246 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液 精密称取补骨脂苷、异补骨脂苷对照品 7.44,18.85 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,得对照品储备液。取各储备液适量,加甲醇配成补骨脂苷(0.063 984 ~ 63.984 mg·L⁻¹)和异补骨脂苷(0.120 64 ~ 120.64 mg·L⁻¹)的混合系列对照品溶液,置于 4 ℃ 冰箱中保存备用。

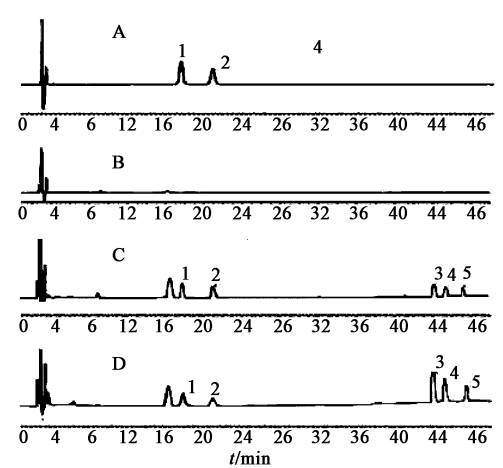
2.2.2 内标液 精密称取淫羊藿苷对照品 9.35 mg,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,得储备液。精密移取该储备液 300 μL,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇配成 28.05 mg·L⁻¹内标液,置于 4 ℃ 冰箱中保存备用。

2.3 血浆样品的处理 冰存大鼠血浆于水浴(室温)中融化,涡旋 1 min。取大鼠血浆 200 μL 于 1.5 mL 离心管中,精密加入内标液 25 μL,混匀 30 s,加入二氯甲烷-甲醇(1:2)混合液 1 mL,涡旋 1 min,静置 5 min,离心(4 ℃,14 000 r·min⁻¹,下同)10 min,移取上层有机相至 1.5 mL 离心管中,于 40 ℃ 水浴

中用空气吹干。残渣加甲醇 100 μL,涡旋混匀震荡 2 min,超声 5 min,将溶解液置于离心机中,离心 5 min,取上清液进样。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 分别取 6 只大鼠的空白血浆各 200 μL,不加入内标液。取空白血浆,加入混合对照品溶液 25 μL。取健康大鼠灌胃给予苯并呋喃苷部位后的血浆样品。均按 2.3 项下方法操作,按 2.1 项下色谱条件测定,见图 1。结果显示在选定的色谱条件下,血浆中内源性成分不干扰补骨脂苷、异补骨脂苷及内标物(淫羊藿苷)的检测,分离度 > 1.5,补骨脂苷、异补骨脂苷、淫羊藿苷出峰时间分别为 17.58,21.53,47.50 min。



A. 对照品;B. 空白血浆;C. 空白血浆 + 对照品;D. 供试品;1. 补骨脂苷;2. 异补骨脂苷;3. 补骨脂素;4. 异补骨脂素;5. 淫羊藿苷

图 1 补骨脂中苯并呋喃苷部位血浆样品 HPLC
Fig.1 HPLC of plasma samples after administration of benzofuran glycosides part from *Psoraleae Fructus*

2.4.2 标准曲线的绘制和最低定量限的测定 取空白血浆 200 μL,加入混合对照品溶液,按 2.3 项下方法操作(n = 2),按 2.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标,利用加权最小二乘法结合分段回归法进行回归运算,得补骨脂苷回归方程 $Y = 0.737\ 7 + 0.001\ 9X$ (0.159 960 ~ 7.998 mg·L⁻¹), $Y = 0.615\ 3 + 0.059\ 9X$ (7.998 ~ 159.960 μg·L⁻¹);异补骨脂苷的回归方程 $Y = 0.686\ 5 + 0.023\ 3X$ (0.015 08 ~ 0.301 60 mg·L⁻¹), $Y = 0.577\ 5 + 0.152\ 9X$ (0.301 6 ~ 15.08 mg·L⁻¹)。补骨脂苷、异补骨脂苷的最低定量限依次为 2.419,3.036 μg·L⁻¹。

2.4.3 精密度、准确度试验 配制含高、中、低 3 个质量浓度(补骨脂苷质量浓度分别为 3.199 2,

0.799 8,0.079 98 mg·L⁻¹,异补骨脂苷质量浓度依次为 6.032,1.508,0.150 8 mg·L⁻¹)混合对照品的血浆样品,按 2.3 项下方法操作(*n* = 5),按 2.1 项下色谱条件测定,结果日内低、中、高质量浓度的补骨脂苷 RSD 分别为 2.1%,11.8%,4.9%;异补骨脂苷 RSD 依次为 4.0%,5.4%,4.8%。日间低、中、高质量浓度的补骨脂苷 RSD 分别为 3.3%,6.7%,3.2%;异补骨脂苷的 RSD 依次为 7.6%,3.4%,2.3%。

2.4.4 提取回收率的测定 配制低、中、高质量浓度的血浆样品,按 2.3 项下方法操作(*n* = 5),按 2.1 项下色谱条件测定,计算补骨脂苷、异补骨脂苷与内标物峰面积的比值。另配制不含血浆的低、中、高质量浓度混合对照品样品,加入内标液 25 μL,涡旋混匀,于 40 ℃ 水浴,空气吹干,残渣加入甲醇 100 μL,涡旋震荡 2 min,超声 5 min,离心 5 min,取上清液按 2.1 项下色谱条件测定,计算补骨脂苷、异补骨脂苷与内标物峰面积的比值。计算补骨脂苷、异补骨脂苷的提取回收率分别为 94.33%,96.06%,107.29%;101.59%,98.12%,106.22%,RSD 分别为 1.0%,2.3%,3.0%;3.1%,2.5%,2.4%。

2.4.5 稳定性试验 按 2.4.3 项下配制高、中、低 3 个质量浓度混合对照品的血浆样品,按 2.3 项下方法操作(*n* = 5),按 2.1 项下色谱条件测定,考察血浆样品的稳定性,考察内容包括①未经处理的血浆样品室温放置 4 h 的稳定性;②未经处理的血浆样品室温放置 8 h 的稳定性;③未经处理的血浆样品 -20 ℃ 冻存 24 h 的稳定性;④未经处理的血浆样品 -20 ℃ 反复冻融 3 次后稳定性;⑤经预处理、流动相复溶后的样品在 20 ℃ 样品盘放置 0 h 的稳定性;⑥经预处理、流动相复溶后的样品在 20 ℃ 样品盘放置 24 h 的稳定性。结果低、中、高质量浓度样品测定值的 RSD 补骨脂苷分别为 10.3%,9.1%,7.8%;异补骨脂依次为 9.2%,7.5%,6.2%。表明样品在该试验条件下稳定。

2.5 移行特征试验 取 Wistar 大鼠 10 只,等分成 2 组,试验前 12 h 禁食,自由饮水。给药前每只大鼠均眼眶取血 0.5 mL,按生药量 0.003 g·g⁻¹ 灌胃给药,给药结束后按下述时间点取血。第 1 组于给药结束后 0.25,0.75,2,4,8 h 取血,第 2 组于给药结束后 0.5,1.5,3,6,12 h 取血。血液样品于 4 ℃ 下 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,移取上层血浆,-20 ℃ 保存。按 2.3 项下方法处理血浆样品,按 2.1 项下色谱条件测定,血药浓度-时间数据采用 SPSS 11.0 软件分析,结果见图 2。

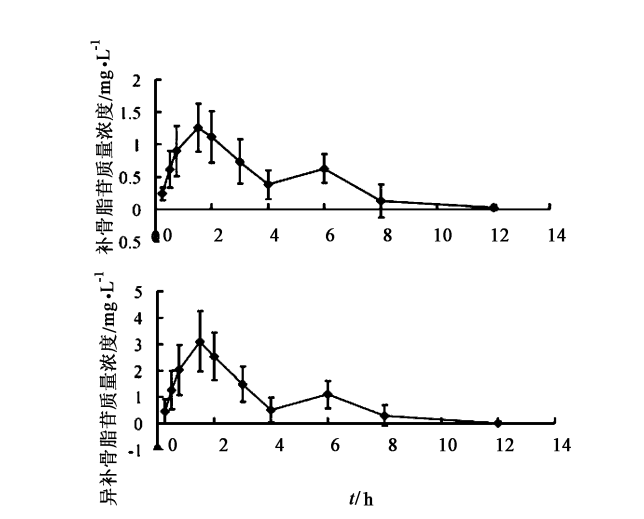


图 2 补骨脂中苯并呋喃苷部位给药后平均药-时曲线($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves of psoralenoside and isopsoralenoside in rats after administration of benzofuran glycosides part from Psoraleae Fructus ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3 讨论

实验过程中发现大鼠灌胃给予苯并呋喃苷部位后,可在血浆中检测到 4 个化合物,比给药部位新增了 2 个峰。经与补骨脂素、异补骨脂素的保留时间、光谱行为及给药部位的色谱图比对,初步判定为补骨脂素、异补骨脂素。该结果预示苯并呋喃苷类成分在大鼠体内经一定条件部分物质可转化为其他化合物,且转化速度较快,致使补骨脂素、异补骨脂素体内血药浓度在给药 1.5 h 后迅速上升,但苯并呋喃苷类成分在体内的转化机制还有待探究。

补骨脂苷、异补骨脂苷的药-时曲线出现了前高型双峰曲线,这将导致时间曲线下面积的增大,吸收量增加。造成该现象发生的原因可能为①肝肠循环。补骨脂苷、异补骨脂苷的相对分子质量均 > 300,形成的二次峰较第一峰小,两峰距离又非常接近,推测补骨脂苷、异补骨脂苷极可能经胆汁或部分经胆汁排入肠道,在肠道中又被重吸收,经门静脉又返回肝脏。②胃排空延迟和胃肠蠕动。补骨脂苷、异补骨脂苷均为高水溶性药物,部分剂量可能在胃内延迟排空,当胃内暂留的这部分剂量药物被排空至小肠时即产生双峰。③胃肠道多吸收位点。关于双峰现象为学者们最广泛接受的机制是胃肠道存在多个吸收位点。这些位点被吸收非常低的区域分隔开来。Godfrey 等^[15]认为这是从生理学角度出发最合理的解释,并将其作为描述数集的理论基础应用于建立双峰药动力学模型。此外,亦有研究认为 P-糖蛋白在肠道的不均匀分布也有可能是双峰现象产生

的原因。

预试验中设计了采血时间跨度 24 h,但在 18, 24 h 的血样未检出目标化合物,未获得具体药代动力学参数。推测需要更精密和更灵敏的检测技术,通过对在体动物中血药浓度的动态检测,从药代动力学方面研究苯并呋喃苷类成分的体内变化情况,为相关制剂的设计提供参考,以保障临床用药的有效性和安全性。

[参考文献]

[1] 雷敦. 雷公炮炙论[M]. 合肥:安徽科学技术出版社, 1991 :69.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:174.

[3] Yan D M, Chang Y X, Kang L Y, et al. Quality evaluation and regional analysis of Psoraleae Fructus by HPLC-DAD-MS/MS plus chemometrics [J]. Chinese Herbal Medicines,2010,2(3) :216-223.

[4] Lim S H, Ha T Y, Kim S R, et al. Ethanol extract of *Psoralea corylifolia* L. and its main constituent, bakuchiol, reduce bone loss in ovariectomised Sprague-Dawley rats[J]. Brit J Nutr,2009,101(7) :1031-1039.

[5] 邓平香,徐敏. 补骨脂对去卵巢大鼠骨转换及血脂代谢影响的实验研究[J]. 新中医,2005,37(7) :94-96.

[6] Tsai M H, Huang G S, Hung Y C, et al. *Psoralea corylifolia* extract ameliorates experimental osteoporosis in ovariectomized rats[J]. Am J Chinese Med,2007,35 (4) :669-680.

[7] 蔡玉霞. 补骨脂水煎液对去卵巢大鼠骨质疏松模型的影响[D]. 太原:山西医科大学,2009.

[8] 安亚兰,王建舫,许水明,等. 补骨脂水提液及补骨脂素对体外培养成骨细胞的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2009,40(2) :266-271.

[9] 王建华,王艳,潘永梅. 补骨脂素对大鼠成骨细胞增殖与分化的影响[J]. 天然产物研究与开发,2007,19 (5) :844-846.

[10] 刘小雨,王行宽,曾英,等. 补骨脂汤对老年性骨质疏松症患者骨密度、血清 IL-6、TNF、IGF-Ⅱ 的影响[J]. 中医杂志,2002,43(1) :40-42.

[11] 张军芳. 异补骨脂素结合锌对大鼠成骨细胞生物活性影响的实验研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2009.

[12] Xiong Z L, Guo X J, Meng F H, et al. Osteoblastic proliferative activity of extracts of Qing'e pill and its disassemble formulae [J]. Pharm Biol, 2003, 41 (6) : 434-438.

[13] Qiao C F, Han Q B, Song J Z, et al. Quality assessment of fructus psoraleae [J]. Chem Pharm Bull, 2006, 54 (6) :887-890.

[14] Wang Y F, Wu B, Yang J, et al. A rapid method for the analysis of ten compounds in *Psoralea corylifolia* L. by UPLC[J]. Chromatographia,2009,70(1/2) :199-204.

[15] Gofrey K R, Arundel P A, Dong Z, et al. Modelling the double peak phenomenon in pharmacokinetics [J]. Comput Methods Programs Biomed, 2011, 104 (2) : 62-69.

[责任编辑 刘德文]