

HPLC-MS/MS法测定血浆中莪术醇浓度及 Beagle犬体内的药代动力学研究

张蕊¹, 王本杰¹, 赵恒利², 李小利¹, 魏春敏¹, 郭瑞臣^{1*}

(1. 山东大学齐鲁医院临床药理研究所, 山东 济南 250012; 2. 山东大学第二医院药剂科, 山东 济南 250033)

摘要: 建立 HPLC-MS/MS法测定血浆中莪术醇含量, 研究其在 Beagle犬体内药代动力学特征。Beagle犬 9只, 随机分为 3组, 分别静脉推注不同剂量 (7.5, 10.0和 12.5 mg·kg⁻¹)的莪术油脂肪乳剂, 按设定时间股静脉取血, 采用 HPLC-MS/MS法测定莪术油脂肪乳剂主要有效成分莪术醇血浆浓度, 计算莪术醇药代动力学参数。莪术醇血浓度线性范围为 0.25 ~ 100 ng·mL⁻¹; 相对回收率为 91.33% ~ 103.17%, 绝对回收率为 31.61% ~ 37.20%, 单次静脉注射不同剂量莪术油脂肪乳剂后, 其主要有效成分莪术醇 Beagle犬体内代谢过程基本符合三室模型, 莪术醇主要药代动力学参数 AUC呈明显剂量相关性。本法操作简便、快速、灵敏度高、专属性强, 可用于莪术醇体内药代动力学的研究。

关键词: 莪术油脂肪乳剂; 莪术醇; 药代动力学; HPLC-MS/MS

中图分类号: R917; R969 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)09 - 0973 - 05

Determination of curcumol in plasma by HPLC-MS/MS method and its pharmacokinetics in Beagle dogs

ZHANG Rui¹, WANG Ben-jie¹, ZHAO Heng-li², LI Xiao-li¹, WEI Chun-min¹, GUO Rui-chen^{1*}

(1. Institute of Clinical Pharmacology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China;

2. Department of Pharmacy, the Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, China)

Abstract: To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with tandem mass spectrometry quantitative detection method for the determination of curcumol, the main ingredient of zedoary tumeric oil fat emulsion, and investigate its pharmacokinetics in Beagle dogs, nine healthy Beagle dogs were divided into three groups, and blood samples were collected at scheduled time points after intravenous injection of 7.5, 10 and 12.5 mg·kg⁻¹ zedoary tumeric oil fat emulsion. The concentrations of curcumol were determined and pharmacokinetics was calculated. A good linearity was obtained from 0.25 to 100 ng·mL⁻¹ in plasma. The relative recoveries were from 91.33% to 103.17%, and the absolute recoveries were from 31.61% to 37.20%. The intra-day and inter-day variances (RSD) were < 15%. The main pharmacokinetic parameters of curcumol after intravenous injection of 7.5, 10 and 12.5 mg·kg⁻¹ zedoary tumeric oil fat emulsion were as follows, $T_{1/2}$: (2.0 ± 0.4), (1.7 ± 0.2) and (2.3 ± 0.8) h, $AUC_{0-\infty}$: (15.1 ± 2.7), (18.3 ± 2.0) and (29.5 ± 4.0) ng·mL⁻¹·h; MRT: (0.9 ± 0.1), (0.8 ± 0.2) and (0.8 ± 0.1) h, CL: (21.9 ± 4.0), (24.9 ± 6.0) and (18.4 ± 1.2) L·h⁻¹·kg; V_d : (65.4 ± 26.5), (62.0 ± 13.4) and (61.2 ± 19.8) L·kg⁻¹, respectively. The developed method was rapid, highly sensitive and specific and could be used in curcumol pharmacokinetic studies *in vivo*. A three-compartment model was best fit to the plasma concentration - time curves obtained in Beagle dogs and the plasma AUC was increased proportionally with doses.

收稿日期: 2007-01-05.

* 通讯作者 Tel: 86 - 531 - 82169636, E-mail: grc7636@126.com

Key words: zedoary turmeric oil fat emulsion; curcumin; pharmacokinetics; HPLC-MS/MS

莪术油 (zedoary turmeric oil) 是从姜科莪术干燥根茎中提取的挥发油, 具有抗病毒、抗炎、抗肿瘤、抗菌等作用。莪术油脂乳剂主要用于病毒性感染、呼吸系统及消化系统疾病, 也用于癌症、心血管疾病、心脑血管疾病、生殖系统和皮肤病。

莪术油含有莪术醇、莪术烯、吉马酮、莪术二酮等多种成分。莪术醇 (curcumin) 体外能抑制金黄色葡萄球菌、伤寒杆菌、大肠杆菌等的生长, 对呼吸道合胞体病毒 (RSV) 有直接抑制作用, 对流感病毒 A1 和 A3 型有直接灭活作用, 对风疹、水痘病毒、副流感病毒等其他病毒也有抑制作用, 是莪术油抗菌、抗病毒的主要有效成分^[1]。本实验旨在建立 HPLC-MS/MS 方法测定生物样品中莪术油的主要有效成分莪术醇含量, 计算其药代动力学参数, 评价静脉推注不同剂量莪术油脂乳剂后莪术醇在 Beagle 犬体内的药代动力学特征, 为临床应用提供依据。

材料与amp;方法

仪器与试剂 Agilent 1100 HPLC (Agilent) -API 4000 MS/MS (Applied Biosystem) 联用系统。

莪术油脂乳剂 (山东居仁生物医药技术研究所, 规格 200 mg/100 mL, 批号 051213); 莪术醇对照品 (中国药品生物制品检定所, 含量 99.1%, 批号 100185-200405); 奥硝唑 (omidazole, IS, 湖南精细化工品研究所, 含量 $\geq 99.6\%$)。

实验动物 雄性 Beagle 犬, 体重 9 ~ 12 kg, 广州医药工业研究院提供, 合格证号 SCXK (粤) 2003-0007。

Beagle 犬药代动力学实验 将 9 只 Beagle 犬随机分为 3 组, 适应性喂养 1 周。取空白血浆后, 分别恒速股静脉滴注不同剂量 (7.5, 10.0 和 12.5 mg·kg⁻¹) 莪术油脂乳剂, 于给药后 5, 10, 20, 30, 45 min 和 1.0, 1.25, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0 h 由股静脉取血 4 mL, 迅速加入盛有肝素的塑料管中, 3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取血浆于 -20 °C 贮存, 备用。

色谱条件 Diamonsil™ 色谱柱 C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (0.3 mol·L⁻¹ 醋酸铵, 0.1% 甲酸) 水 (0.1% 甲酸) (95:5), 流速 1 mL·min⁻¹; 进样量 40 μL。

质谱条件 采用 MRM (multiple reaction monitor-

ing) 模式, 离子源温度 550 °C, 雾化电压 5.5 kV, 雾化气 70 psi (1 psi ≈ 6.9 kPa), 辅助气 40 psi, 碰撞电压: 12.5 V (莪术醇), 20 V (内标)。采集离子对 (*m/z*): 254.3/219.3 (莪术醇), 220.3/128.2 (内标)。

溶液配制 精密称取莪术醇对照品 0.010 38 g, 置 50 mL 量瓶中, 用流动相稀释成 0.2 mg·mL⁻¹ 的储备液, 备用。

样品处理 取备测血浆 1 mL, 加入内标 (奥硝唑 0.05 μg·mL⁻¹) 15 μL 和 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠 100 μL, 混匀, 再加入提取剂氯仿-异丙醇 (95:5) 5 mL, 涡旋 2 min, 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取有机相于 37 °C 水浴氮气吹干, 残渣以流动相 100 μL 溶解, 进样 40 μL。

数据处理 根据所测莪术醇血浆浓度-时间数据, 利用 DAS 2.0 计算其主要药代动力学参数 $T_{1/2}$, AUC_{0-1} , $AUC_{0-\infty}$, MRT, CL 和 V_d 。

结果

1 方法专属性

按“样品处理”项操作, 如图 1 所示, 得空白血浆色谱图 (A)、空白血浆中莪术醇和内标色谱图 (B) 以及犬血浆样品色谱图 (C)。在上述色谱条件下, 内标和莪术醇保留时间分别为 1.80 和 3.20 min。莪术醇和内标一级和二级质谱图如图 2 所示。

2 标准曲线制备

配制质量浓度分别为 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 和 100 ng·mL⁻¹ 的血浆样品, 按“样品处理”项操作。以莪术醇与内标峰面积比值对莪术醇浓度进行线性回归, 所得回归方程为 $Y = -0.037 83 + 0.058 8X$, $r = 0.998 8$ 。在 0.25 ~ 100 ng·mL⁻¹ 线性良好, 可以满足生物样品中莪术醇浓度的测定。

3 回收率和精密度

用空白血浆配制质量浓度为 0.5, 10.0 和 80.0 ng·mL⁻¹ 的样品, 按“样品处理”项操作, 计算相对回收率; 用上述浓度的血浆提取后测得的峰面积与对应浓度的莪术醇对照溶液测得的峰面积之比, 计算绝对回收率; 上述 3 个浓度的血样, 于一日内测定 5 次, 或每日 1 次, 连续 5 日测定, 计算日内、日间精密度, 结果见表 1。

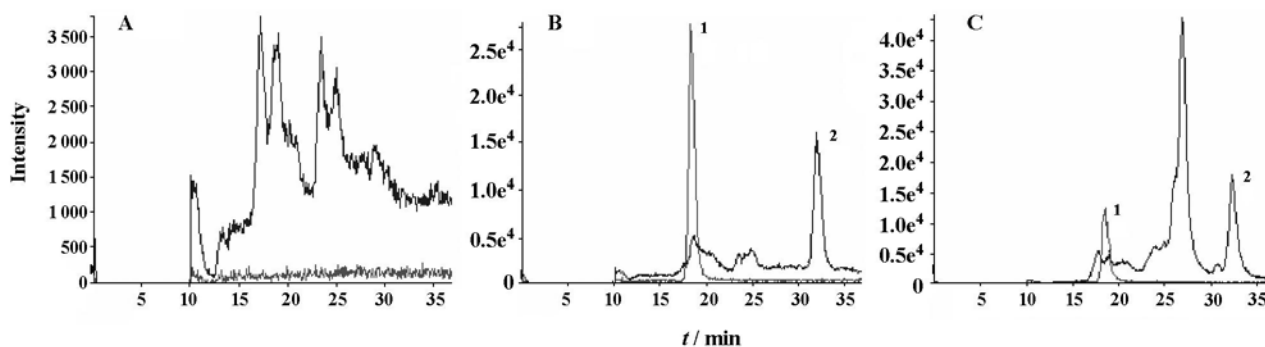


Figure 1 Chromatograms of blank plasma (A), blank plasma spiked with curcumol and IS (B), plasma sample spiked with IS (C). 1: IS, omidazole; 2: Curcumol

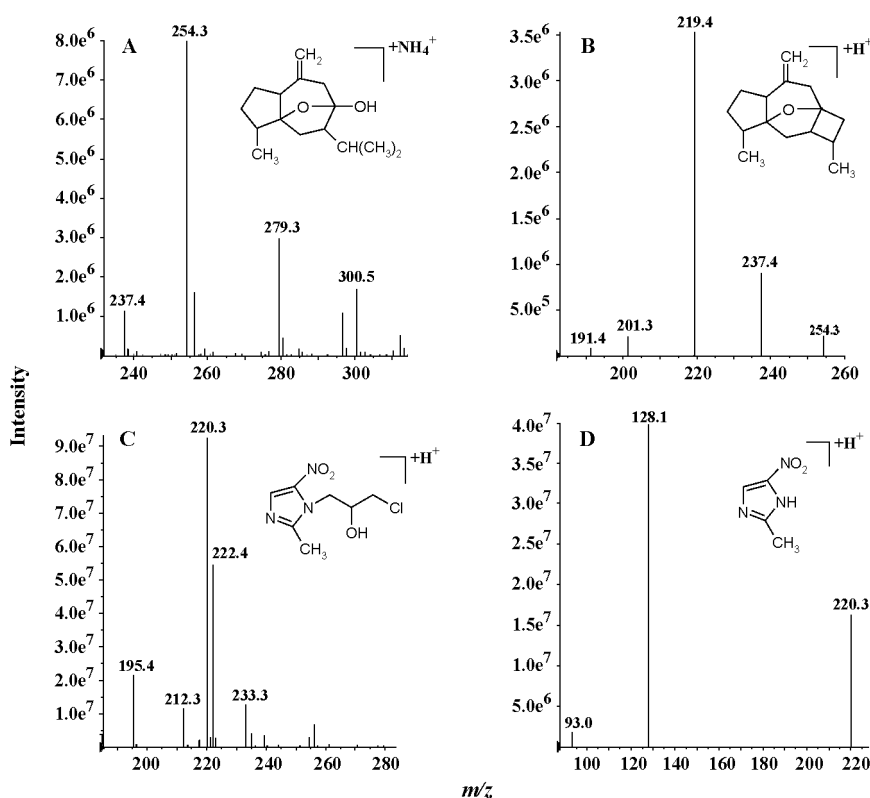


Figure 2 First mass-spectrogram of curcumol (A), the second mass-spectrogram of curcumol (B), the first mass-spectrogram of IS (C), the second mass-spectrogram of IS (D). Ions monitored in the multiple reaction monitoring (MRM) mode: m/z 254.3 (precursor ion) to m/z 219.4 (product ion) for curcumol and m/z 220.3 (precursor ion) to m/z 128.1 (production) for IS. Spray voltage: 5.5 kV; Nebulizer gas: 70 psi (1 psi \approx 6.9 kPa); Ion source temperature: 550 $^{\circ}$ C; Collision energy: 12.5 V (curcumol) and 20 V (IS)

Table 1 Precision and recovery rate of curcumol in plasma ($n=5$)

$C/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	Relative recovery/%	Absolute recovery/%	Intra-day RSD/%	Inter-day RSD/%
0.5	91 \pm 9	32 \pm 3	6.1	13.7
10	103 \pm 8	37 \pm 1	4.1	2.7
80	98 \pm 2	32 \pm 1	9.9	14.5

4 稳定性试验

取低、中、高 (0.5, 10 和 80 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3 个浓度的质量控制样品, 分别进行反复冻融 2 次、-20 $^{\circ}$ C 冻存 1 周的稳定性试验。结果样品在冻融前、冻融 1 次、冻融 2 次、冷冻 24 h 和冷冻 7 d 后, 其测定的标准偏差小于 5%, 稳定性良好。

5 质量控制试验

在未知样品测定过程中, 随行测定低、中、高 (0.5, 10 和 80 ng·mL⁻¹) 浓度的质量控制样品, 使其均匀分布在未知样品测试顺序中, 以考察方法的稳定性。结果 3 个浓度质量控制样品的相对标准偏差小于 12%, 符合体内药物分析的要求。

6 平均血药浓度-时间曲线

采用 HPLC-MS/MS 法测定 Beagle 犬单剂静脉推注莪术油脂肪乳剂后莪术醇血药浓度, 低 (7.5 mg·kg⁻¹), 中 (10.0 mg·kg⁻¹), 高 (12.5 mg·kg⁻¹) 3 个剂量组莪术醇平均血药浓度-时间曲线见图 3。

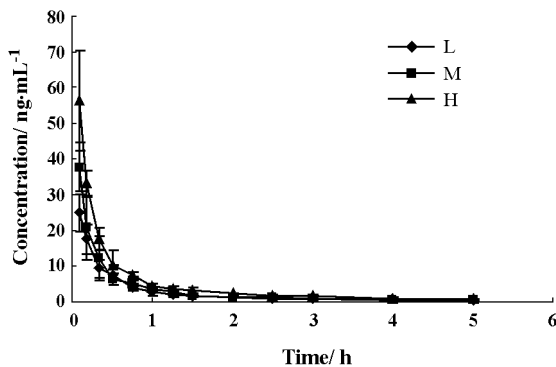


Figure 3 Representative curves of curcuminol average concentrations versus time profiles in Beagle dogs plasma. L: Low dose; M: Middle dose; H: High dose

7 药代动力学参数

将静脉推注莪术油脂肪乳剂后的血药浓度-时间数据用 DAS 2.0 软件处理进行拟合, 结果表明其主要成分莪术醇在 Beagle 犬体内代谢过程基本符合三室模型, 其主要药代动力学参数见表 2。

Table 2 Pharmacokinetic parameters of curcuminol after low, middle and high doses of zedoary turmeric oil fat emulsion in Beagle dogs. (n=9, $\bar{x} \pm s$)

Parameter	Dose / mg·kg ⁻¹		
	7.5	10.0	12.5
T _{1/2} /h	2.0 ± 0.4	1.7 ± 0.2	2.3 ± 0.8
C ₀ /ng·mL ⁻¹	24.9 ± 5.3	37.5 ± 6.8	56.2 ± 14.2
AUC _{0-5h} /ng·mL ⁻¹ ·h	13.9 ± 3.1	17.2 ± 1.9	26.8 ± 3.2
AUC _{0-∞} /ng·mL ⁻¹ ·h	15.1 ± 2.7	18.3 ± 2.0	29.5 ± 4.0
MRT/h	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.1
CL/L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	21.9 ± 4.0	24.9 ± 6.0	18.4 ± 1.2
V _d /L·kg ⁻¹	65.4 ± 26.5	62.0 ± 13.4	61.2 ± 19.8

讨论

莪术油葡萄糖注射液 (含莪术油 0.4 g·L⁻¹) 的人体常用剂量为 500 ~ 750 mL 次, 即 0.2 ~ 0.3 g 次。根据不同种属动物间等效剂量的换算方法^[1] 计算 Beagle 犬的给药剂量为 5.5 ~ 8.2 mg·kg⁻¹, 结合动物实验剂量递增原则^[2], 选择 5.0, 7.5 和 10.0 mg·kg⁻¹ 为低、中、高 3 个剂量进行预试验, 结果低剂量组 2.5 h 后未测出, 因此确定 7.5, 10.0 和 12.5 mg·kg⁻¹ 3 个剂量进行实验。

莪术油含有多种成分, 该类药物的药代动力学研究多采用有效成分血药浓度法^[3]。有研究以吉马酮为目标成分, 采用 HPLC 法研究莪术油在大鼠体内的药代动力学特征^[4], 但吉马酮的药理活性不如莪术醇, 因此选择莪术醇作为含量测定的目标成分, 并计算其体内药代动力学参数, 说明莪术油脂肪乳剂的体内处置过程。

莪术醇的含量测定方法有红外分光光度法^[5]、双波长薄层扫描法^[6] 和气相色谱法^[7], 这些方法都无法满足生物样品中微量药物测定的要求。生物样品中莪术醇含量测定方法仅见放射性同位素示踪法^[8], 虽具有较高的灵敏度, 但选择性相对较差, 易受代谢产物干扰, 且具有放射性污染。本文方法操作简单, 灵敏度高, 专属性强, 重现性好, 且血浆中内源物对测定无干扰, 经方法学考察确证其回收率和日内、日间精密度均符合生物样品测定的要求, 可用于动物体内药代动力学的研究。

该药为挥发油成分, 在样本提取过程中易损失, 优先采用蛋白沉淀的方法提取, 但由于莪术醇的含量过低, 该方法提取后检测限达不到测定的要求, 改用有机溶剂提取浓缩的方法, 结果表明其绝对回收率稳定, 相对回收率较高, 精密性 RSD < 15%, 符合分析的要求。

单次静脉推注不同剂量莪术油脂肪乳剂后, 莪术醇在 Beagle 犬体内代谢过程基本符合三室模型, 主要药代动力学参数经方差分析, 3 个剂量组中 T_{1/2} 无统计学差异; AUC 呈明显剂量相关性; CL 无剂量相关性, 表明莪术醇体内清除较快; V_d 在 61.2 ~ 65.4 L·kg⁻¹ 表明莪术醇血管外分布较广, 莪术油脂肪乳剂具有良好的脂溶性。

实验过程中, 3 个剂量组的试验动物均未出现异常反应, 提示在此剂量范围内莪术油脂肪乳剂安全无毒。

References

- [1] Zhao Y, Yang RG, Luo M. Progress in pharmacological action and clinical application of zedoary tumeric oil [J]. Intem Med J Pract Tradit Chin Med Sci (实用中医内科杂志), 2006, 20: 125 - 126.
- [2] Xu SY, Bian RL, Chen X. Empirical Method of Pharmacology (药理实验方法学) [M]. 3rd ed. Beijing: People's Health Press, 2002: 202 - 204.
- [3] Zhang YX. New Introduction to Traditional Chinese Medicine Pharmacology (中药药理学新论) [M]. Beijing: People's Health Press, 2004: 42 - 46.
- [4] You J, Li QP, Yu YW, et al. Pharmacokinetic studies of zedoary oil by HPLC [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2005, 40: 380 - 382.
- [5] Yang SD, Chen JM, Chen YH. Determination of curcumol in zedoary tumeric oil of *Curcumol wenyu jin* [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 1979, 14: 356 - 360.
- [6] Tian SJ, Liang WF. Study of zedoary tumeric oil — determination of curcumol and curdione in *Curcumol wenyu jin* with thin-layer scanning method [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 1985, 5: 136 - 138.
- [7] Gu XM, Yang Y. Determination of curcumol in zedoary tumeric oil and peppermint oil by vapor phase chromatography [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 1982, 2: 75 - 78.
- [8] Su CY, Liu JY, Xu HX, et al. The metabolism of ^3H -curcumol in normal rats and tumor-bearing mice [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 1980, 15: 257-262.