

# 总姜黄素在大鼠体内的药动学研究

朱庆华, 刘彩霞, 陈 婧, 朱晓薇, 国大亮

**摘要:** [目的] 建立大鼠灌胃总姜黄素溶液后血浆中姜黄素的高效液相色谱(HPLC)测定方法, 进行大鼠体内药动学研究。 [方法] 大鼠灌胃总姜黄素溶液后, 不同时间眼底静脉丛取血, 制备血浆, 血浆样品经液-液萃取以后, 以大黄素为内标, 进行 HPLC 检测。色谱条件 Hypersil C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-2.0% 醋酸水溶液 (46:54), 检测波长为 UV 420 nm。 [结果] 姜黄素的线性范围为 2~300 mg/L, 最低定量限为 2 mg/L, 日内、日间峰面积 (RSD) 分别 ≤5.08% 和 ≤7.93%。 [结论] 此法灵敏、快速、准确, 可用于大鼠血浆中姜黄素浓度的测定和临床前药代动力学研究。

**关键词:** 姜黄素; 液相色谱法; 液-液萃取

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1673-9043(2008)04-0266-03

## In vivo pharmacokinetics study of total curcumin in rats

ZHU Qing-hua, LIU Cai-xia, CHEN Jing, et al

(Tianjin University of TCM, Tianjin Key Laboratory of Chinese Medicine Chemistry and Analysis, Tianjin 300193, China)

**Abstract:** [Objective] To carry out a in vivo pharmacokinetics study on total curcumin and establish a HPLC determination method of blood curcumin. [Methods] The plasma of total curcumin was prepared and the content of total curcumin determined. Using Hypersil C18 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was a mixture of acetonitrile-acetic acid (46:54) and the wavelength was 420 nm. [Results] The line range of total curcumin was 2~300 μg/L, the lowest limit of quantity was 2 μg/L and RSD was between 5.08% and 7.93%. [Conclusion] The method is simple, accurate and can be used to control the quality of total curcumin and in pre-clinic pharmacokinetics study.

**Key words:** total curcumin; chromatography; liquid-liquid extraction

总姜黄素是从姜科植物姜黄 (*Curcuma longa* L.) 的根茎中提取的有效部位, 主要含有姜黄素 (Cur)、去甲氧基姜黄素 (Cur)、二去甲氧基姜黄素 (Cur), 具有抗肿瘤、抗炎、抗人类免疫缺陷病毒 (HIV)、抗菌、抗氧化等多种药理作用, 且毒性低, 具有良好的临床应用潜力, 受到国内外广泛的关注。

国内外对姜黄素类化合物的研究大多集中在药理药效方面, 有关其体内药动学及体内分析方法的报道较少<sup>[1-3]</sup>, 笔者建立一种准确可靠的高效液相色谱法 (HPLC) 测定大鼠灌胃总姜黄素溶液后大鼠血浆中姜黄素的浓度, 并对其药物动力学进行了初步研究。

## 1 仪器与材料

Waters 600E 高效液相色谱仪及工作站 (美国);

作者单位: 300193 天津中医药大学

作者简介: 朱庆华 (1960-), 男, 实验师, 主要研究方向为中药制剂分析及其质量控制。

AX205 型十万分之一电子天平 (瑞士 METTLER TOLEDO 公司)。

姜黄素、大黄素对照品 (中国药品生物制品检定所); 总姜黄素由神威药业集团提供, 姜黄素含量为 50%; 乙腈 (色谱纯, 天津四友生物医学有限公司); 水为重蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。

清洁级 SD 大鼠 10 只, 雄性, 体质量 200~250 g, 购自天津药物研究院动物中心。

## 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液和内标溶液的制备** 精密称取姜黄素对照品 5.0 mg, 用甲醇配制成 50 mg/L 的储备液, -20℃保存, 临时以甲醇稀释至所需浓度。精密称取大黄素 2.19 mg, 用甲醇配制成 43.8 mg/L 的储备液, -20℃保存, 临时配制成 2.19 mg/L 大黄素内标溶液。

**2.2 色谱条件的选择** 色谱柱: Hypersil C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×

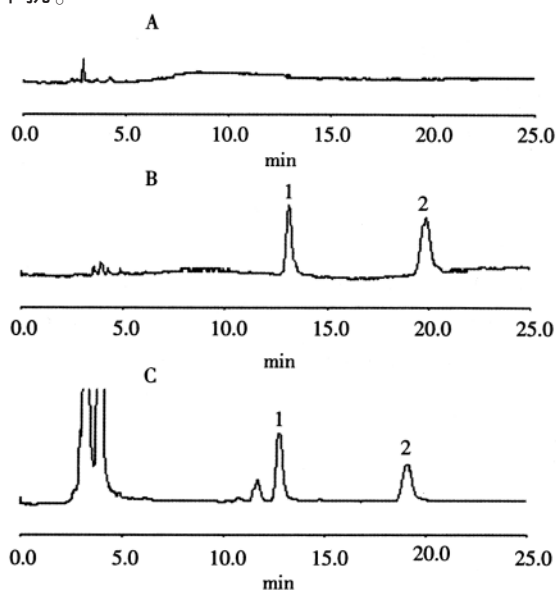
4.6 mm, 5 μm); 柱温: 25 °C; 流动相: 乙腈-2.0% 醋酸水溶液(46:54); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 420 nm。

**2.3 给药与采血** 大鼠禁食 12 h 后(自由饮水)灌胃总姜黄素溶液, 剂量以姜黄素计为 500 mg/kg, 于给药前及给药后 2、5、15、30 min 和 1、2、3、4、6、8、12、16 h 由眼眶后静脉丛取血 1 mL, 置经肝素处理的试管中, 立即 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血浆, 置-20 °C 冰箱中冷冻待测定。

**2.4 血浆样品的处理** 精密量取血浆 0.5 mL, 置 10 mL 具塞离心管中, 加入内标溶液(2.19 mg/L 大黄素甲醇溶液)30 μL, 0.1 mol/L 柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液(pH3.0)60 μL, 混匀, 加入乙酸乙酯 3 mL, 涡旋 3 min, 4 000 r/min 离心 5 min。分取上层有机相, 于氮气流下吹干, 残留物用 100 μL 流动相溶解, 涡流 30 s, 置暗处静置 10 min, 涡旋 30 s, 离心后吸取 20 μL 进样测定。

### 2.5 分析方法学验证

**2.5.1 方法专属性实验** 分别取 6 只大鼠的空白血浆 0.5 mL, 按“血浆样品的处理”操作(不加内标); 将一定浓度的姜黄素标准溶液加入空白血浆中, 并加入内标, 同法操作; 大鼠灌胃总姜黄素溶液后, 取 0.25 h 的血浆样品 0.5 mL, 补加 30 μL 甲醇, 并加入内标, 同法操作; 各色谱图见图 1。姜黄素及内标的保留时间分别为 13.0 min 和 19.7 min。结果表明, 血浆中内源性物质在姜黄素和内标大黄素出峰位置无干扰。



A 空白血浆, B 大鼠空白血浆加入姜黄素和内标, C 大鼠灌胃总姜黄素后的血浆样品

图 1 样品的色谱图

**2.5.2 标准曲线和线性范围** 取空白大鼠血浆 0.5 mL, 置 10 mL 具塞离心管中, 分别加入姜黄素系列标准溶液 30 μL, 配制成浓度为 2、6、12、30、60、120、300 μg/L 的含药血浆样品, 按“2.4 血浆样品的处理”操作, 进样 20 μL, 测定。以姜黄素峰面积与内标大黄素峰面积之比(Y)为纵坐标, 以血浆中姜黄素浓度(X)为横坐标作图, 以加权最小二乘法进行回归, 得标准曲线回归方程:  $Y=2.96 \times 10^{-2}X-1.96 \times 10^{-3}$ ,  $r=0.995 8$ , 本法在 2~300 μg/L 范围内线性良好, 最低定量限为 2 μg/L。

**2.5.3 方法的精密度与准确度实验** 取空白血浆 0.5 mL, 精密加入姜黄素对照溶液配制成浓度为 6、30、120 μg/L 的姜黄素低、中、高浓度的血浆样品各 5 份, 按“2.4 血浆样品的处理”方法操作, 连续测定 3 d, 并与标准曲线同时进行, 记录姜黄素和内标峰面积, 以姜黄素与内标大黄素峰面积之比代入标准曲线计算质量浓度, 求得本法的精密度, 以峰面积(RSD)表示。以(实测浓度-理论浓度)/理论浓度×100%为准确度, 数据见表 1。

表 1 方法的精密度与准确度结果(日内 n=5; 日间 n=3)

加入浓度 (μg/L)	测得浓度 ( $\bar{x} \pm s$ )	精密度 RSD(%)	准确度 RE(%)
日内			
6	5.30±0.27	5.08	-11.62
30	28.32±0.44	1.55	- 5.59
120	109.85±3.43	3.13	- 8.46
日间			
6	5.17±0.23	4.35	-13.85
30	27.74±1.81	6.91	- 7.54
120	115.70±9.18	7.93	- 3.58

**2.5.4 提取回收率实验** 取空白血浆 0.5 mL, 精密加入姜黄素对照溶液配制成 6、30、120 μg/L 的姜黄素低、中、高质量浓度的血浆样品各 5 份, 按 2.4 项下方法操作, 测定。以提取后的峰面积与提取前的峰面积之比, 考察样品的提取回收率。

经测定, 本法姜黄素在低、中、高浓度下的提取回收率分别为: 79.08%、83.94%和 87.18%。同法考察内标的回收率为 84.45%。

**2.5.5 样品稳定性实验** 取空白血浆 0.5 mL, 精密加入姜黄素对照溶液配制成 6、30、120 μg/L 的姜黄素低、中、高质量浓度的血浆样品, 按 2.4 项下方法操作, 分别考察 1) 血浆样品室温放置 4 h 的稳定性; 2) 血浆样品经液-液萃取处理后, 室温(约 20 °C)下放置 24 h 的稳定性。3) 血浆样品反复冻融 3 次的稳

定性。4) 血浆样品 -20℃ 冷冻 4 周的稳定性。每一浓度进行 3 样本分析, 稳定性结果见表 2。结果表明姜黄素在这些条件下基本稳定。

方法学验证表明该方法符合目前生物分析方法有关要求<sup>[3]</sup>, 可用于药动学研究。

表 2 姜黄素在大鼠血浆中的稳定性 (n=3)  $\mu\text{g/L}$

样品条件	6		30		120	
	检测量	姜黄素剩 余比例 (%)	检测量	姜黄素剩 余比例 (%)	检测量	姜黄素剩 余比例 (%)
室温 4 h	5.32	89.00	27.21	90.65	108.30	90.25
复溶 24 h	5.16	86.00	28.64	95.47	106.32	88.60
-20℃ 4周	5.57	92.83	27.78	92.60	115.25	96.04
冻融 1 次	5.28	87.99	26.77	89.22	120.54	99.55
冻融 2 次	5.42	90.31	28.42	94.74	118.51	98.75
冻融 3 次	5.37	89.57	29.61	98.79	114.65	95.54

2.6 姜黄素在大鼠体内的药动学研究 10 只 SD 大鼠单剂量灌胃总姜黄素溶液后, 用本方法测定了姜黄素的血药浓度(平均药—时曲线见图 2), 大鼠的  $T_{\text{peak}}$  和  $C_{\text{max}}$  采用实测值,  $t_{1/2(\text{ka})}$ 、 $t_{1/2(\text{ke})}$ 、MRT、VRT 和 AUC 采用 3p87 程序(中国药理学会数学药理委员会编制)中的统计矩法计算, 得出药动学参数(见表 3)。

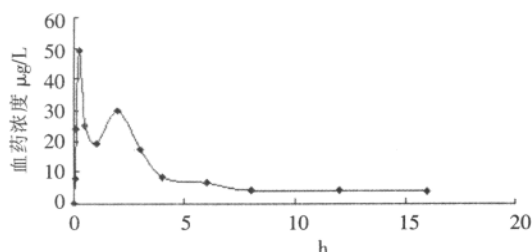


图 2 姜黄素的平均血药浓度—时间曲线

表 3 药动学参数 (n=5)

参数	单位	数值
$T_{\text{peak}(1)}$	h	0.25
$T_{\text{peak}(2)}$	h	2.00
$C_{\text{max}(1)}$	$\mu\text{g/L}$	49.17
$C_{\text{max}(2)}$	$\mu\text{g/L}$	30.05
$t_{1/2(\text{ka})}$	h	0.05
$t_{1/2(\text{ke})}$	h	3.83
MRT	h	4.72
VRT	h $\times$ h	20.17
AUC	$\mu\text{g/L}$	145.90

### 3 讨论

3.1 血浆样品预处理 本实验血浆样品预处理采用液—液萃取法, 分别考察了乙酸乙酯、乙酸乙酯—异丙醇、乙酸乙酯—甲醇、乙醚等不同的提取溶剂, 并对其用量进行了优化, 经比较发现以乙酸乙酯 3 mL 为提取溶剂 1 次液—液萃取处理, 血浆样品乳化现象较轻, 样品中杂质不干扰样品及内标物出峰, 提取率高且重现性好。且单一溶剂 1 次萃取操作简便、快速, 故选用该方法作为样品处理方法。

血浆样品处理时考察了加入不同 pH 的酸水对测定结果的影响, 结果发现每 0.5 mL 血浆样品加入 60  $\mu\text{L}$  pH3.0 的酸水酸化后再萃取处理, 可以提高姜黄素及内标大黄素的稳定性, 保证测定结果的准确重现。

3.2 定量测定 本实验采用内标法定量测定, 可减少由仪器系统或操作过程带来的误差, 从而提高分析的准确度。实验中考察了多个化合物, 结果表明姜黄素保留时间合适, 无内源性杂质干扰, 适宜作姜黄素体内测定的内标物。

大鼠灌胃总姜黄素溶液后, 血药浓度下降很快, 而后又有所升高, 考虑是否可能存在肠肝循环或其他原因, 有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Dennis D. Heath, Milagros A. Pruitt, Dean E. Brenner, et al. Curcumin in plasma and urine: quantitation by high-performance liquid chromatography[J]. J of Chro B, 2003, (783): 287-295.
- [2] Liu AC, Lou HX, Zhao LX, et al. Validated LC/MS/MS assay for curcumin and tetrahydrocurcumin in rat plasma and application to pharmacokinetic study of phospholipid complex of curcumin[J]. J of Pharm and Bio Anal, 2006, (40): 720-727.
- [3] Shah VP, Midha KK, Digh S, et al. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies[J]. J Pharm Sci, 1992, 81: 309-312.

(收稿日期: 2008-06-20)