

# 切换波长 HPLC 法同时测定大鼠体内补骨脂 3 种有效成分<sup>Δ</sup>

张 昫<sup>1,2\*</sup>, 刘 路<sup>2</sup>(1.河南大学民生学院,河南开封 475004;2.河南大学药学院,河南开封 475004)

中图分类号 R285.5;R969.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2887-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.03

**摘要** 目的:建立同时测定大鼠血清、肝脏、肾脏中补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚含量的方法。方法:大鼠灌胃补骨脂药材粉末(3.0 g/kg)30 min后取血清、肝脏、肾脏样品,以切换波长高效液相色谱法测定血清、肝脏、肾脏样品中补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚质量浓度。色谱柱为 Agilent ODS-C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 3.5 μm),流动相为 0.1% 甲酸水-乙腈(梯度洗脱),流速为 1.0 ml/min,柱温为 30 ℃,检测波长为 295 nm(氯霉素)、246 nm(补骨脂素、异补骨脂素)、260 nm(补骨脂酚)。结果:在大鼠血清、肝脏匀浆液、肾脏匀浆液中,补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚质量浓度均在 0.1~10.0 mg/L 范围内同各指标成分与内标物峰面积之比呈良好线性关系,精密度的 RSD<7%,加样回收率的 RSD<5%。结论:该方法简便、准确,可用于同时测定给药后血清、肝脏、肾脏中补骨脂素、异补骨脂素和补骨脂酚的含量。

**关键词** 切换波长法;高效液相色谱法;补骨脂素;异补骨脂素;补骨脂酚;血药浓度

## Simultaneous Determination of 3 Kinds of Active Components in *Psoralea corylifolia* of Rats by Wavelength Switching HPLC Method

ZHANG Yun<sup>1,2</sup>, LIU Lu<sup>2</sup>(1.Minsheng College of Henan University, Henan Kaifeng 475004, China; 2.College of Pharmacy, Henan University, Henan Kaifeng 475004, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of psoralen, isopsoralen and bakuchiol in serum, liver and kidney of rats. METHODS: The rats were given *Psoralea corylifolia* powder 3.0 g/kg intragastrically. The serum, liver and kidney homogenate were collected at 30 min. Wavelength switching HPLC method was adopted to determine the concentrations of psoralen, isopsoralen and bakuchiol. The determination was performed on Agilent ODS-C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 3.5 μm) column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 30 ℃. The detection wavelength was set at 295 nm for chloramphenicol, 246 nm for psoralen and isopsoralen and 260 nm for bakuchiol. RESULTS: All of the three components showed good linear relationship at the range of 0.1-10.0 mg/L, and which can be separated in serum, liver and kidney homogenate. RSDs of precision tests were less than 7%, RSDs of recoveries were less than 5%. CONCLUSIONS: This method is simple and accurate, and can be used for simultaneous determination of psoralen, isopsoralen and bakuchiol in serum, liver and kidney of rats.

**KEYWORDS** Wavelength switching method; HPLC; Psoralen; Isopsoralen; Bakuchiol; Blood concentration

补骨脂具有温补脾肾、壮阳止泻之功效,现代研究表明其含有黄酮类、香豆素类、皂苷类、萘酚类等三十余种化合物。其中,补骨脂素和异补骨脂素可抑制人胃癌细胞的生长,具有抗氧化作用。另外,其挥发油中的主要成分为补骨脂酚,可降低 2 型糖尿病患者血糖值,具有抗炎抗菌、保护肝细胞等作用。但是病理切片研究表明,补骨脂素、异补骨脂素和补骨脂酚具有毒性,尤其是补骨脂酚具有较大毒性。研究表明,高剂量补骨脂酚可损害成年小鼠的生育能力,对肾脏毒性较大<sup>[1-5]</sup>。

目前,对于补骨脂的体内研究主要针对补骨脂素和异补骨脂素<sup>[6-7]</sup>,对补骨脂酚的含量测定研究较少,且未见同时测定上述 3 种成分文献报道<sup>[8-14]</sup>。因此,本研究旨在建立一种同时测定大鼠血清、肝脏、肾脏中补骨脂素、异补骨脂素和补骨脂酚含量的方法,为上述成分药动学研究奠定基础。

### 1 材料

Δ 基金项目:河南省教育厅研究项目(No.14B350009);河南大学民生学院教育教学改革研究项目(No.MS1G2013-41)

\* 讲师,硕士。研究方向:中药质量标准。电话:0371-23880680。  
E-mail:201zhangyun@sina.com.cn

### 1.1 仪器

AE200S 型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海有限公司)];1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Sorvall Stratos 全能台式冷冻高速离心机(德国 Thermo 公司)。

### 1.2 药材

补骨脂购自开封市张仲景大药房,经笔者鉴定为真品。

### 1.3 药品与试剂

氯霉素对照品(批号:130303-200614)、补骨脂素对照品(批号:110739-201115)、异补骨脂素对照品(批号:110738-201012)均购自中国食品药品检定研究院;补骨脂酚对照品(成都西亚化工股份有限公司,批号:6650,纯度:≥98%);甲醇、乙腈(色谱纯,天津四友精细化学品有限公司);水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

### 1.4 动物

SD 大鼠 24 只,♀♂ 兼半,体质量 200~250 g,由河南省动物实验中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(豫)2010-0002]。

### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ODS-C<sub>18</sub> (150 mm×4.6 mm, 3.5 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~5 min, 28%→34%B; >5~10 min, 34%→45%B; >10~22 min, 45%→80%B; >22~42 min, 80% B); 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 30 ℃; 检测波长: 0~8 min, 295 nm(氯霉素); >8~18 min, 246 nm(补骨脂素、异补骨脂素); >18~42 min, 260 nm(补骨脂酚); 进样量: 20 μl。

## 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取经五氧化二磷减压干燥至恒质量的补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚对照品各适量, 用甲醇溶解并定容至同一 10 ml 量瓶中, 制备成补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚质量浓度均为 500 mg/L 的混合对照品母液。精密移取混合对照品母液 0.40、0.24、0.12、0.04、0.02、0.004 ml, 分别置 20 ml 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 混匀, 得补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚质量浓度均为 10、6、3、1、0.5、0.1 mg/L 的混合对照品系列溶液。4 ℃ 贮藏, 备用。

2.2.2 内标溶液的制备 精密称取经五氧化二磷减压干燥至恒质量的氯霉素对照品适量, 以甲醇溶解制得质量浓度为 10 mg/L 的内标溶液。4 ℃ 贮藏, 备用。

## 2.3 血清、肝脏、肾脏样品的处理

2.3.1 血清样品的处理 大鼠取血后, 全血经乙酸乙酯-正己烷(8:1, V/V) 800 μl 涡旋 2 min, 4 ℃ 下以离心半径为 5 cm、14 000 r/min 离心 10 min, 分取上层有机相, 置于氮气吹干的含有 20 μl 内标溶液的具塞离心管中, 加入乙酸乙酯-正己烷(8:1, V/V) 800 μl, 涡旋 2 min, 4 ℃ 下以离心半径为 5 cm、14 000 r/min 离心 10 min, 取上层有机相置另一试管中, 氮气吹干溶剂, 残渣用 100 μl 甲醇溶解, 即得。

2.3.2 肝脏样品的处理 取大鼠肝脏相同部位 0.3 g, 加生理盐水 0.5 ml, 以离心半径为 5 cm、10 000 r/min 匀浆后, 再以离心半径为 5 cm、5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 200 μl 置于氮气吹干的含有 20 μl 内标溶液的具塞离心管中, 加入乙酸乙酯-正己烷(8:1, V/V) 800 μl, 涡旋 2 min, 4 ℃ 下以离心半径为 5 cm、14 000 r/min 离心 10 min, 取上层有机相置另一试管中, 氮气吹干溶剂, 残渣用 100 μl 甲醇溶解, 即得。

2.3.3 肾脏样品的处理 取大鼠肾脏相同部位 0.5 g, 加生理盐水 0.5 ml, 以离心半径为 5 cm、10 000 r/min 匀浆后, 再以离心半径为 5 cm、5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 200 μl 置于氮气吹干的含有 20 μl 内标溶液的具塞离心管中, 加入乙酸乙酯-正己烷(8:1, V/V) 800 μl, 涡旋 2 min, 4 ℃ 下以离心半径为 5 cm、14 000 r/min 离心 10 min, 取上层有机相置另一试管中, 氮气吹干溶剂, 残渣用 100 μl 甲醇溶解, 即得。

## 2.4 方法学考察

2.4.1 方法专属性 分别取空白血清、空白肝脏匀浆液、空白

肾脏匀浆液、血清+对照品+内标、肝脏匀浆液+对照品+内标、肾脏匀浆液+对照品+内标各 0.2 ml, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。由色谱图可以看出, 在相应的对照品色谱峰保留时间处, 空白样品溶液的色谱图中不存在色谱峰, 表明该方法的专属性符合要求。色谱见图 1。

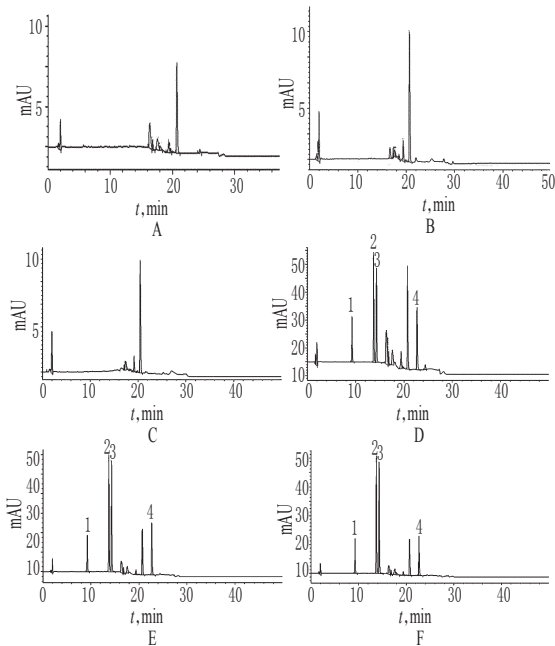


图 1 高效液相色谱图

A. 空白血清; B. 空白肝脏匀浆液; C. 空白肾脏匀浆液; D. 血清+对照品+内标; E. 肝脏匀浆液+对照品+内标; F. 肾脏匀浆液+对照品+内标; 1. 氯霉素; 2. 补骨脂素; 3. 异补骨脂素; 4. 补骨脂酚

## Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank serum; B. blank liver homogenate; C. blank kidney homogenate; D. serum+control substance+inter stand; E. blank liver homogenate+control substance+inter stand; F. blank kidney homogenate+control substance+inter stand; 1. chloramphenicol; 2. psoralen; 3. isopsoralen; 4. bakuchiol

2.4.2 标准曲线的制备 取“2.2”项下混合对照品系列溶液, 按“2.3”项下方法处理, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以待测物的质量浓度(x)为横坐标, 待测物与内标物峰面积比值(y)为纵坐标, 进行线性回归。回归方程见表 1。结果表明, 补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚质量浓度均在 0.1~10.0 mg/L 范围内同待测物与内标物峰面积比值呈良好线性关系。

2.4.3 精密度试验 在大鼠空白血清、空白肝脏匀浆液、空白

表 1 回归方程

Tab 1 Regression equations

对照品	血清		肝脏匀浆液		肾脏匀浆液	
	回归方程	相关系数	回归方程	相关系数	回归方程	相关系数
补骨脂素	$y=0.160x+0.0012$	$r=0.9986$	$y=0.166x+0.0097$	$r=0.9996$	$y=0.166x+0.0054$	$r=0.9999$
异补骨脂素	$y=0.178y+0.0071$	$r=0.9994$	$y=0.182x+0.0127$	$r=0.9996$	$y=0.181x+0.0100$	$r=0.9995$
补骨脂酚	$y=0.072x+0.0168$	$r=0.9984$	$y=0.082x+0.0208$	$r=0.9994$	$y=0.077x+0.0227$	$r=0.9994$

肾脏匀浆液中分别加入已知量的补骨脂素、异补骨脂素和补骨脂酚对照品, 分别制备高、中、低质量浓度的供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定日间精密度(6次)、日内精密度(6d)。精密度试验结果见表 2。

2.4.4 稳定性试验 取“2.4.3”项下血清、肝脏匀浆液、肾脏匀浆液中质量浓度的供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别于

0、2、4、6、12、24 h 进样测定。结果, 在上述 3 种溶液中补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚的 RSD<1.5%, 表明各供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.5 回收率试验 在大鼠空白血清、空白肝脏匀浆液、空白肾脏匀浆液中加入已知量的补骨脂素、异补骨脂素和补骨脂酚对照品, 分别制备高、中、低质量浓度的供试品溶液, 按“2.1”

项下色谱条件进样测定,计算回收率,结果见表3。

表2 精密度试验结果

Tab 2 Results of precision tests

供试品	质量浓度, mg/L	补骨脂素		异补骨脂素		补骨脂酚	
		日内	日间	日内	日间	日内	日间
		RSD, %	RSD, %	RSD, %	RSD, %	RSD, %	RSD, %
血清	8.0	0.46	1.52	0.69	1.02	0.51	2.69
	2.0	0.80	2.02	0.81	2.17	1.00	3.39
	0.5	1.67	4.44	1.19	4.55	1.70	6.52
肝脏匀浆液	8.0	0.53	1.70	0.27	2.56	0.30	2.53
	2.0	0.98	1.89	0.95	2.96	1.00	2.69
	0.5	1.26	4.35	1.16	3.34	1.20	4.56
肾脏匀浆液	8.0	0.59	2.07	0.37	1.66	0.46	1.59
	2.0	0.99	2.02	0.82	2.15	0.90	4.61
	0.5	1.16	5.55	1.14	5.55	2.38	6.01

表3 回收率试验结果(n=6)

Tab 3 Results of recovery tests(n=6)

供试品	质量浓度, mg/L	补骨脂素		异补骨脂素		补骨脂酚	
		回收率, %	RSD, %	回收率, %	RSD, %	回收率, %	RSD, %
		血清	8.0	95.65	2.37	96.33	2.67
	2.0	93.42	2.80	92.58	2.47	93.42	3.11
	0.5	90.00	3.72	89.33	3.66	89.67	4.33
	肝脏匀浆液	8.0	96.48	2.26	96.60	2.58	96.27
	2.0	93.17	2.99	93.33	2.77	93.25	3.74
	0.5	90.67	3.86	91.00	3.61	90.00	4.22
	肾脏匀浆液	8.0	96.63	2.34	96.77	1.92	96.04
	2.0	94.00	2.65	93.83	2.18	93.08	3.10
	0.5	90.67	4.56	90.33	4.30	88.33	4.39

### 2.5 样品含量测定

精密称取补骨脂药材粉末,大鼠按3.0 g/kg的剂量ig给药,30 min后摘除眼球,眼眶取血,按“2.3”项下方法制备血清、肝脏、肾脏匀浆液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,以内标法计算各样品中补骨脂素、异补骨脂素和补骨脂酚的含量。样品含量测定结果见表4。

表4 样品含量测定结果(n=3)

Tab 4 Results of content determination of samples(n=3)

样品	补骨脂素, mg/L	异补骨脂素, mg/L	补骨脂酚, mg/L
血清	5.13	4.76	3.64
肝脏匀浆液	4.78	4.02	2.17
肾脏匀浆液	2.88	2.47	1.38

### 3 讨论

本研究首次建立了在大鼠体内对补骨脂中3种主要成分补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚同时检测的方法。预实验中,笔者对不同粒径的色谱柱进行了比较,可知粒径越小分离效果越好,通过对不同品牌粒径为5 μm的普通ODS柱的考察,均无法对补骨脂酚实现完全分离,故选用Agilent ODS-C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 3.5 μm)进行实验。结果,该3种有效成分可完全与其他组分分离,分离度良好。笔者对血清、肝脏、肾脏不同预处理方法做了初步考察,筛选了不同的萃取溶剂,发现丙酮、氯仿等回收率低或有干扰,因此改为对不同配比的乙酸乙酯-正己烷进行考察,其中乙酸乙酯-正己烷(8:1, V/V)提取效果最好,回收率高,故确定最佳萃取溶剂为乙酸乙酯-正己烷(8:1, V/V)。对低温离心速度也进行了考察,发现10 000、12 000 r/min在补骨脂酚位置有微小的干扰峰,14 000 r/min时干扰杂质消失,故确定离心速度为14 000 r/min。

通过预实验发现,空白血清、肝脏匀浆液、肾脏匀浆液在补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚相同的保留时间处没有干扰。但是,如果大鼠有脂肪肝或高脂血症,则在补骨脂素和异补骨脂素相同的保留时间处有干扰,具体原因有待进一步考察。因此,在选择大鼠时应注意检测血脂水平。笔者对不同月龄的大鼠也进行了预实验,发现24月龄大鼠的样品图谱,在补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚相同的保留时间处有干扰,2、3月龄大鼠没有干扰。具体几月龄产生干扰,还有待于进一步的考察。对于♂鼠与♀鼠,预实验发现对上述3种有效成分的代谢速度不一样,具体差异需做进一步研究。综上所述,在测定补骨脂在体内的分布及代谢时,应选用2月龄左右的大鼠,♂♀兼半,同时给予低脂饲料。

临床研究表明,长时间大量服用补骨脂,会对肝、肾功能产生一定的损伤。本研究建立了一种快速分析大鼠体内(血清、肝脏、肾脏)补骨脂素、异补骨脂素和补骨脂酚含量的方法,具有高灵敏度、操作简单等特点,可为上述3种成分的药理学研究提供必要的参考。

### 参考文献

- [1] Zhao G, Zang SY, Zheng YW, et al. Bakuchiol analogs inhibit monoamine transporters and regulate monoaminergic functions[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75(9): 1 835.
- [2] Bapat K, Chintalwar GJ, Pandey U, et al. Preparation and in vitro evaluation of radioiodinated bakuchiol as an anti-tumor anget[J]. *Appl Radiat Isot*, 2005, 62(3): 389.
- [3] 周昆,代志,柳占彪,等.补骨脂水提物引起的大鼠肝损害[J]. *天津中医药大学学报*, 2013, 32(4): 221.
- [4] 辛丹,颜冬梅,王跃飞,等.补骨脂及其相关化学成分的药理与毒理研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2009, 11(7): 70.
- [5] 邱蓉丽,李璘,乐巍.补骨脂的化学成分与药理作用研究进展[J]. *中药材*, 2010, 33(10): 1 656.
- [6] 姚兰,王运军,刘晓英,等. RP-HPLC法同时测定四神丸中补骨脂素、异补骨脂素、五味子醇甲和吴茱萸碱的含量[J]. *中国药房*, 2010, 21(43): 4 095.
- [7] 李俊娟,李军. HPLC法测定补骨脂药材中补骨脂素和异补骨脂素[J]. *中成药*, 2012, 34(8): 1 545.
- [8] 明磊国,葛宝丰,陈克明,等. 异补骨脂素对体外培养骨髓间充质干细胞增殖与成骨性分化的研究[J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(15): 2 124.
- [9] 塔娜,谭明生,移平,等. 异补骨脂素对小鼠胚胎前成骨细胞 TGF-β受体影响的实验研究[J]. *中华中医药学刊*, 2011, 29(4): 820.
- [10] 修彦凤,施贝,潘凌云,等. 补骨脂水煎液在大鼠体内组织分布的研究[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(8): 1 242.
- [11] 常艳旭,朱子微,李晋,等. 补骨脂抗氧化活性指纹图谱研究[J]. *天津中医药*, 2011, 28(2): 158.
- [12] 常燕琴,岳嘉,蒯美玲,等. 补骨脂对去卵巢肥胖大鼠血脂和丙二醛的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2013, 40(3): 572.
- [13] 韦妍妍,张紫佳,徐颖,等. 补骨脂对去卵巢大鼠雌激素样作用研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(13): 158.
- [14] 梁建军,徐亚莉,田树喜,等. 补骨脂研究现状及前景[J]. *河北中医*, 2013, 35(12): 1 904.

(收稿日期:2014-02-07 修回日期:2014-06-10)