



HPLC 测定大鼠血清中靛玉红的含量 及其药代动力学研究

殷志爽, 王维聪, 游远, 宋学英, 夏彬彬, 王桥*

(首都医科大学 化学生物学与药学院, 北京 100069)

[摘要] 目的:建立测定血清中靛玉红含量的高效液相色谱(HPLC)方法,并应用于靛玉红在大鼠体内的药代动力学研究。方法:采用 ODS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(75:25),流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 289 nm,柱温 35 °C,进样量为 20 μL,内标物为炔雌醇。给大鼠颈静脉插管后,分别按 2.0, 4.0 mg · kg⁻¹ 经插管静脉注射靛玉红,用 HPLC 测定给药后不同时刻大鼠血清中靛玉红的浓度。采用 Winnonlin 5.0 软件拟合,计算药动学参数。结果:靛玉红在 0.031 ~ 2.48 mg · L⁻¹ 线性关系良好($R^2 = 0.9996$),最低检测限 31 μg · L⁻¹。回收率大于 98%,其日内、日间 RSD 均小于 10%。靛玉红在大鼠体内的药代动力学过程符合二室模型。结论:本方法操作简便、准确,灵敏度高、重复性好,可用于靛玉红血药浓度的监测及其药代动力学研究。

[关键词] 靛玉红;高效液相色谱法;药代动力学

靛玉红(Indirubin)又称炮弹树碱-B,主要存在于青黛、板蓝根、蓼蓝以及大青叶等植物中,可通过使白血病细胞呈肿胀、溶解性坏死而起到治疗慢性粒细胞白血病的作用^[1]。近几年研究发现,靛玉红可通过作用于人体内的蛋白依赖性激酶(cylin-dependent kinases, CDKs)抑制多种人体肿瘤的生长,此发现为其在抗癌领域中的应用提供了有利的证据^[2-3]。此外,有研究指出,靛玉红可通过阻断真核转录延伸因子 P-TEFb 介导的基因表达抑制病毒 HIV-1 的复制,从而对野生型及药物诱导的 HIV-1 产生良好的抑制作用^[4]。还有研究证实靛玉红可以显著抑制细胞因子 IFN-γ 和 IL-6 的释放,对迟发型变态反应和自身免疫性疾病的治疗有着潜在的应用价值^[5]。由此可见,靛玉红在抗肿瘤、抗炎、调节免疫等方面都拥有广阔的应用前景,因而建立靛玉红血药浓度的检测方法,进一步研究其药代动力学就显得尤为重要。

据报道,靛玉红血药浓度测定可以采用放射性标记法^[6],但放射性标记法操作复杂、设备要求高,

不适合广泛应用。最近,又有文献报道了用 RP-HPLC 测定大鼠血浆中靛玉红浓度的方法,但该方法取血量较大(每次需取血 0.3 mL)且采用外标法进行测定^[7]。作者在文献的基础上,改进了测定靛玉红血药浓度的 HPLC 方法,选择炔雌醇为内标物,采用内标法以提高精密度。本方法简捷、快速、准确,且灵敏度高(每次仅需取血 0.1 mL 即可),可应用于临床对靛玉红血药浓度的监控及其在体内药代动力学的研究。

1 材料

1.1 仪器 美国 Waters 2695 型高效液相色谱系统(含四元梯度泵、2996 型二极管阵列紫外检测器、在线真空脱气机、自动进样器、柱温箱、Empower 色谱工作站);样品干燥器(美国 Pierce 公司);台式高速冷冻离心机 MIKRO 22R(德国 IKA 公司);Minishaker MS1 型漩涡混合器(北京博威兴业科技发展有限公司)。

1.2 试剂和药品 靛玉红(批号 200204)和炔雌醇(批号 10052-200308,内标物, I. S.)均购于中国药品生物制品鉴定所(纯度均大于 98%),甲醇为色谱纯(美国 Fisher 公司),水为双蒸水,其他试剂均为分析纯。

1.3 动物 雄性 SD 大鼠,体重(250 ± 10) g,由中国医学科学院药物研究所实验动物部提供,合格证号 SCXK2006-0009。

[稿件编号] 20090929008

[基金项目] 北京市属市管高等学校人才强教计划资助项目

[通信作者] * 王桥, Tel: (010) 83911524, E-mail: qiaow@ccmu.edu.cn



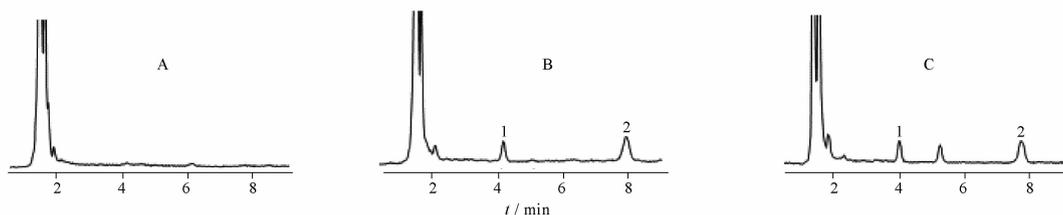
2 方法与结果

2.1 色谱条件 ODS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水溶液(75:25), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 289 nm, 柱温 35 °C, 进样量 20 μL。

2.2 靛玉红标准溶液的配制 精密称取适量靛玉红用少量 DMSO 溶解后, 加入甲醇稀释配制成质量浓度为 0.40 g · L⁻¹ 的靛玉红储备液。精密吸取储备液适量, 用甲醇分别稀释成 0.031, 0.124, 0.248,

0.496, 0.620, 1.24, 2.48 mg · L⁻¹ 的标准系列。

2.3 血清样品的制备 取 50 μL 靛玉红(质量浓度 0.620 mg · L⁻¹) 和 50 μL 炔雌醇(内标物, 质量浓度 5.00 mg · L⁻¹) 置于 1.5 mL 离心管中, 用样品干燥器在 60 °C 通氮气吹干。加入 50 μL 大鼠血清涡旋混合 3 min, 再加入 600 μL 丙酮涡旋混合 3 min。离心(12 000 r · min⁻¹, 4 °C) 20 min 后取上清液在 60 °C 通氮气吹干, 加入 50 μL 流动相溶解, 即得血清标准品溶液。取 20 μL 进样, 用 HPLC 进行分析, 见图 1。



A. 阴性对照; B. 对照品和内标; C. 给药血浆; 1. 内标; 2. 靛玉红。

图1 对照品及血清样品 HPLC 图

2.4 稳定性、线性范围和灵敏度 取 500 μL 靛玉红标准溶液(0.620 mg · L⁻¹) 和 500 μL 炔雌醇(5.00 mg · L⁻¹) 置于离心管中, 在样品干燥器中 60 °C 通氮气吹干, 加入 500 μL 流动相溶解, 涡旋混合 3 min, 密封, 2~4 °C 保存。按 2.1 色谱条件, 分别在配制后的第 0, 12, 24, 36, 48, 72 h 进样分析, 测得靛玉红峰面积的 RSD 3.6%, 内标炔雌醇峰面积的 RSD 4.1%。结果表明靛玉红及炔雌醇溶液在 72 h 内性质稳定, 峰形良好, 且重复性符合要求。

取 50 μL 靛玉红标准溶液(0.031, 0.124, 0.248, 0.496, 0.620, 1.24, 2.48 mg · L⁻¹) 和 50 μL 炔雌醇(5.00 mg · L⁻¹) 置于 1.5 mL 离心管中, 用样品干燥器在 60 °C 通氮气吹干。按照 2.3 项下操作, 制得血清标准品溶液。分别取 20 μL 进样, 用 HPLC 进行分析测定。以靛玉红峰面积与内标物峰面积的比值 Y 对靛玉红浓度 X 进行线性回归, 得到回归方程为: $Y = 2.4278X - 0.0234$, $R^2 = 0.9996$; 最低定量限 31 μg · L⁻¹。

2.5 萃取回收率的测定 采用低、中、高 3 个浓度的靛玉红标准溶液进行回收率试验。在离心管中分别加入 50 μL 质量浓度分别为 0.124, 0.496, 2.48 mg · L⁻¹ 的靛玉红标准溶液和 50 μL 内标物溶液(5.00 mg · L⁻¹), 用氮气吹干后

加入 50 μL 流动相溶解, 即得未萃取的标准溶液测定液。取 20 μL 该溶液用 HPLC 测定靛玉红及内标物的峰面积, 每个浓度平行做 3 份。

离心管中分别加入 50 μL 质量浓度为 0.124, 0.496, 2.48 mg · L⁻¹ 的靛玉红标准溶液和 50 μL 内标物溶液(5.00 mg · L⁻¹), 氮气吹干后加入 50 μL 空白血清, 按照 2.3 项下操作, 制得萃取后的标准溶液测定液。取 20 μL 用 HPLC 测定靛玉红及内标物的峰面积, 每个浓度平行做 6 份。

计算相同浓度下, 萃取样品的峰面积与未萃取样品的峰面积的比值为萃取回收率, 回收率大于 98.08%, RSD 小于 5.7%。

2.6 精密度及准确度 在离心管中分别加入 50 μL 质量浓度为 0.031, 0.124, 0.620, 2.48 mg · L⁻¹ 的靛玉红标准溶液和 50 μL 内标物溶液(5.00 mg · L⁻¹), 用氮气吹干后加入 50 μL 空白血清, 按照 2.3 项下操作, 制得血清标准品溶液。每个浓度平行做 6 份, 连续测定 5 d, 日内、日间 RSD 均小于 8.0%。

2.7 在药动学研究中的应用 SD 大鼠 6 只体重(250 ± 10) g, 用水合氯醛麻醉(ip 350 mg · kg⁻¹ 体重)后, 施颈静脉插管术, 恢复 3 d。禁食 12 h 后, 按 2.0 mg · kg⁻¹ 体重的剂量经插管静脉注射靛玉红, 分别在给药前和给药后 2, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120,

180 min 经插管取血 0.1 mL, 置于离心管中。离心 (8 000 r · min⁻¹, 4 °C) 20 min, 取出血清于 -80 °C 冰箱内保存, 待 HPLC 测定。待大鼠恢复 5 d 后, 按 4.0 mg · kg⁻¹ 体重的剂量经插管静脉注射靛玉红, 给药后取血并进行血样处理。

取 50 μL 内标物溶液 (5.00 mg · L⁻¹) 置于 1.5 mL 离心管中, 在 60 °C 通氮气吹干后加入给药后大鼠血清 50 μL, 涡旋混合 3 min。再加入 600 μL 丙酮, 涡旋混合 3 min。离心 (12 000 r · min⁻¹, 4 °C) 20 min 后取上清液, 用氮气吹干, 加入 50 μL 流动相溶解, 取 20 μL 进样, 用 HPLC 进行分析。静脉给药后大鼠血清中靛玉红药-时曲线见图 2, 用 Winnonlin 5.0 程序拟合并计算药动学参数见表 1。

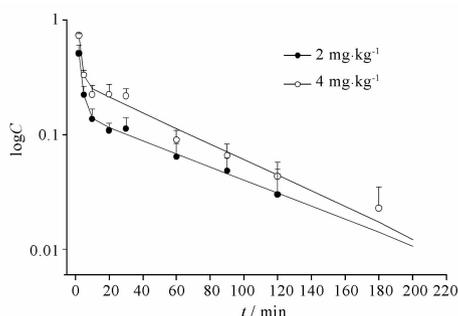


图2 静脉给药后大鼠血清中靛玉红药-时曲线

表1 Winnonlin 5.0 程序拟合并计算药动学参数 (n = 6)

参数	2.0 mg · kg ⁻¹	4.0 mg · kg ⁻¹
C _{max} / mg · L ⁻¹	1.15 ± 0.22	1.98 ± 0.75
t _{1/2α} / min	1.39 ± 0.22	1.06 ± 0.35
t _{1/2β} / min	52.4 ± 3.20	43.8 ± 5.09
k ₁₂ / min ⁻¹	0.35 ± 0.06	0.47 ± 0.18
k ₂₁ / min ⁻¹	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.02
k ₁₀ / min ⁻¹	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.03
V ₁ / mL · kg ⁻¹	1 746 ± 329	2 017 ± 766
CL / mL · kg ⁻¹ · min ⁻¹	150 ± 4.85	193 ± 13.47
AUC / min · μg ⁻¹ · mL ⁻¹	13.4 ± 0.43	20.7 ± 1.48

3 讨论

在优化 HPLC 色谱条件时, 本研究比较了乙腈、甲醇等多种溶剂与水按不同比例混合配制流动相的分离效果, 结果表明选用甲醇-水溶液 (75: 25) 为流动相可以有效地分离靛玉红, 且靛玉红与内标物的保留时间恰当, 分离效果良好, 血浆内源性物质及其他杂质不干扰样品的分离测定。本研究还比较了紫外检测器与荧光检测器测定靛玉红的差异, 结果表明由于靛玉红对荧光的吸收较弱, 用荧光检测器检测靛玉红的灵敏度相对较低, 故作者选用紫外检测器并用靛玉红的最大吸收波长 289 nm 作为检测波长。

在优化萃取条件的过程中, 作者比较了丙酮、氯仿等溶剂的萃取效果, 发现丙酮效果最好, 靛玉红及内标物峰形较好、谱图干净没有杂质峰的干扰, 且回收率较高 (均大于 98%), 故选用丙酮对血清中的靛玉红进行萃取。

[参考文献]

- [1] Bradbury J. From Chinese medicine to anticancer drugs [J]. Drug Discov Today, 2005, 10(17): 1131.
- [2] Kim S A, Kim Y C, Kim S W, et al. Antitumor activity of novel indirubin derivatives in rat tumor model [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13: 253.
- [3] Marko D, SehatZle S, Friedel A, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK1) by indirubin derivatives in human tumour cells [J]. Br J Cancer, 2001, 84: 238.
- [4] Heredia A, Davis C, Bamba D, et al. Indirubin-3'-monoxine, a derivative of a Chinese antileukemia medicine, inhibits P-TEFb function and HIV-1 replication [J]. Aids, 2005, 19: 2087.
- [5] Kunikata T, Tatefuji T, Aga H, et al. Indirubin inhibits inflammatory reactions in delayed-type hypersensitivity [J]. Eur J Pharmacol, 2000, 410: 93.
- [6] 李长玲, 籍秀娟. 靛玉红及其乙基和十八烷基衍生物在动物体内命运的比较 [J]. 药理学报, 1983, 18 (5): 332.
- [7] 李珂佳, 蒋学华. RP-HPLC 测定大鼠静脉注射靛玉红后的血药浓度 [J]. 华西药学杂志, 2007, 22 (3): 333.



Determination of indirubin in serum by HPLC and its application to pharmacokinetics in rats

YIN Zhishuang, WANG Weicong, YOU Yuan, SONG Xueying, XIA Binbin, WANG Qiao*

(School of Chemical Biology and Pharmaceutical Sciences,

Capital Medical University, Beijing 100069, China)

[**Abstract**] **Objective:** To improve the method of indirubin in serum by HPLC and apply to pharmacokinetics in rats. **Method:** Chromatographic separation was conducted on an C_{18} column (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), using a mixture of methanol-water (75:25) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL min^{-1} with UV detection at 289 nm, the column temperature was at 35 $^{\circ}\text{C}$ and ethinyl estradiol was used as an internal standard. Rats were administered i. v. bolus of indirubin in doses of 2.0 and 4.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ through a jugular vein catheter, respectively. Serial blood samples (about 100 μL) were individually collected at 2, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180 min after administration, and the concentrations of indirubin determined were in rat serum by HPLC. The pharmacokinetic parameters were calculated with the Winnonlin 5.0 software. **Result:** The calibration curve for indirubin was linear ($R^2 = 0.9996$) in the range of 0.031-2.48 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and the limit of detection (LOD) was 31 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. The average recovery of indirubin in rat serum was more than 98% and the relative standard deviations of intra-day and inter-day were both less than 10%. The pharmacokinetics of Indirubin in rats was fitted to two-compartment model. **Conclusion:** The method is simple and accurate with a high sensitivity and a good repeatability, and it can be applied to the evaluation of pharmacokinetic parameters of indirubin in rats and blood concentration of indirubin in clinical controlling.

[**Key words**] indirubin; HPLC; pharmacokinetics

doi: 10.4268/cjcm20100914

[责任编辑 王亚君]