

# 小鼠血浆中白藜芦醇含量测定及药动学研究\*

梁力<sup>1</sup>, 李晰<sup>1</sup>, 王庆伟<sup>2</sup>, 刘雪英<sup>1</sup>, 张生勇<sup>1</sup>

(1. 第四军医大学药理学系药物化学教研室, 西安 710032; 2. 第四军医大学唐都医院药剂科, 西安 710038)

**摘要** 目的 建立测定小鼠血浆中白藜芦醇的高效液相色谱法, 并研究白藜芦醇在小鼠体内的药动学。方法 色谱柱为 C<sub>18</sub> 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水(32:68), 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 306 nm, 血浆样品用乙酸乙酯萃取法预处理。结果 白藜芦醇线性范围 0.1~10.0 μg·mL<sup>-1</sup>, r=0.999 5。日内 RSD<10%, 日间 RSD<15%, 回收率 98.0%~102.0%。小鼠灌服给予白藜芦醇主要药动学参数为 30 min 后血浆药物浓度达峰值, C<sub>max</sub> 为 3.589 μg·mL<sup>-1</sup>, t<sub>1/2α</sub> 为 10.5 min, t<sub>1/2β</sub> 为 172.7 min。结论 该方法灵敏度高, 操作方便, 适用于白藜芦醇在小鼠体内的药动学研究。

**关键词** 白藜芦醇; 色谱法; 高效液相; 药动学; 小鼠

中图分类号 R969.1 文献标识码 A 文章编号 1004-0781(2012)07-0846-03

## Content Determination of Quantification of Resveratrol in Mice Plasma and Its Application in Pharmacokinetic Study

LIANG Li<sup>1</sup>, LI Xi<sup>1</sup>, WANG Qing-wei<sup>2</sup>, LIU Xue-ying<sup>1</sup>, ZHANG Sheng-yong<sup>1</sup> (1. Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Department of Pharmacy, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

**ABSTRACT Objective** To develop a HPLC-UV method for quantitative determination of resveratrol in mice plasma and to study the pharmacokinetics of resvetrol in mice after oral administration. **Methods** Chromatographic separation was achieved on an Ultimate AQ- C<sub>18</sub> column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) using acetonitrile-water (32:68, V:V) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The UV detection wavelength was set at 306 nm, and the assay was executed at 30 °C.

**Results** The method was validated and found to be linear in the range of 0.10-10.00 μg·mL<sup>-1</sup>. The assay accuracy and precision were within the range of 98.0% - 102.0%. The main pharmacokinetic parameters of resveratrol, C<sub>max</sub> was 3.589 μg·mL<sup>-1</sup>, t<sub>max</sub> was 30 min, t<sub>1/2α</sub> was 10.5 min, t<sub>1/2β</sub> was 172.7 min. **Conclusion** The method was sensitive, simple and successfully applied in the study of pharmacokinetics of resveratrol in mice.

**KEY WORDS** Resveratrol; HPLC; Pharmacokinetics; Mouse

白藜芦醇(resveratrol)化学名称为3,5,4'-三羟基-二苯乙烯,是一种多酚类植物抗毒素,具有抗氧化活性,主要存在于葡萄<sup>[1]</sup>、葡萄汁、红酒及其他植物提取物中<sup>[2-4]</sup>,是植物在恶劣环境下或被病原体侵害时,自身分泌的一种可抵御真菌感染的抗菌物质。白藜芦醇具有抗心血管疾病、抗肿瘤、抗炎、调节免疫、抗菌、抗病毒、抗衰老及雌激素样活性等多种药理作用<sup>[5-7]</sup>,但有关其在小鼠体内药动学的研究笔者尚未见报道。为阐明白藜芦醇在小鼠体内的药动学过程,笔者建立

以液液萃取为前处理的反相高效液相色谱法,并研究单次灌服给予白藜芦醇后在小鼠体内的药动学过程。

### 1 仪器

**1.1 药品与试剂** 白藜芦醇对照品(中国食品药品检定研究院,批号:11535-200502);芦醇原料药和根皮素购自西安小草植物科技有限公司,含量>98%;乙腈为进口色谱纯(美国 TEDIA 公司);其他试剂为国产分析纯;色谱用水为超纯水。

**1.2 动物及给药方式** 昆明种小鼠,体质量 18~22 g,雌雄各半,为第四军医大学实验动物中心提供,动物许可证号:ACXK(军)2007-007,白藜芦醇给药剂量 300 mg·kg<sup>-1</sup>,给药方式为灌胃。

**1.3 仪器** Agilent 1100 液相色谱仪(Agilent 1100 泵,Agilent1100 DAD 检测器,Agilent 1100 色谱工作站),电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱:Ultimate AQ- C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm,5 μm, Welch Materials. Inc., USA); C<sub>18</sub> 保护

收稿日期 2012-01-04 修回日期 2012-02-16

基金项目 \* 国家科技重大专项课题(2010ZXJ0900X-007)

**作者简介** 梁力(1986-),男,山东济宁人,在读硕士,研究方向:药物代谢动力学。电话:(0)18991848374, E-mail: liangli907@163.com。

**通讯作者** 刘雪英(1972-),女,山东人,博士,研究方向:新药设计合成及药理学研究。电话:029-84774473-809, E-mail: weiyixuan427@163.com。

柱(10 mm × 4.6 mm, 江苏汉邦科技有限公司); 流动相: 乙腈: 水 = 32: 68; 流速: 1 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长: 306 nm, 进样量: 20 μL, 柱温: 30 °C。

## 2.2 标准溶液及内标溶液配制

**2.2.1 标准溶液的制备** 精密称量白藜芦醇对照品 5.00 mg, 置 50 mL 棕色量瓶, 以甲醇溶解并释至刻度, 摇匀, 制成对照品储备液, -20 °C 避光保存备用。

**2.2.2 内标溶液的制备** 精密称量根皮素对照品 50.00 mg, 置 50 mL 量瓶, 以甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成对照品储备液, -20 °C 避光保存备用。

**2.3 血浆样品预处理** 取小鼠血浆 0.2 mL, 置 1.5 mL 离心管, 加 640 μg · mL<sup>-1</sup> 内标物根皮素 10 μL, 涡旋振荡 30 s, 加乙酸乙酯 1 mL, 涡旋 3 min。12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液 800 μL, 通风橱中氮气流吹干, 加甲醇 80 μL, 涡旋振荡 3 min, 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液 20 μL 进行 HPLC 分析。

**2.4 方法的专属性** 取小鼠空白血浆 0.2 mL, 按“2.3”项方法, 将一定浓度的白藜芦醇标准溶液和内标溶液加入空白血浆, 同法操作; 取小鼠灌服给药后收集的血浆样品, 同法操作。按“2.1”项的色谱条件进样分析。结果显示, 空白血浆内源性物质不干扰白藜芦醇和内标测定, 白藜芦醇保留时间为 5.2 min, 内标的保留时间 8.0 min, 见图 1。

上述对照品系列溶液和内标溶液各 10 μL, 分别加入 200 μL 血浆中, 按“血浆样品预处理”, 处理后系列标准溶液最终浓度为 0.10, 0.55, 1.00, 3.25, 5.50, 10.00 μg · mL<sup>-1</sup>, 取上清液 20 μL 进行高效液相分析。以白藜芦醇色谱峰面积( $A_1$ )与内标色谱峰面积( $A_2$ )之比( $Y$ )对白藜芦醇对照品浓度( $C$ , μg · mL<sup>-1</sup>)进行加权最小二乘法回归。回归方程为:  $Y = 0.001X - 0.029$ ,  $r = 0.9995$  ( $n = 5$ ), 权重:  $1/C^2$ ; 线性范围: 0.10 ~ 10.00 μg · mL<sup>-1</sup>。

**2.6 精密度考察** 按照标准曲线制备方法制备白藜芦醇含量为 0.325, 3.250, 8.875 μg · mL<sup>-1</sup> 的血浆样品, 作为质控样品。上述各质控样品在同 1 d 连续进样 5 次, 测定峰面积, 分别计算白藜芦醇的日内相对标准误差(RSD)。连续 3 d 进样 5 次, 测定峰面积, 计算白藜芦醇的日间 RSD。结果见表 1。

**2.7 提取回收率实验** 取小鼠空白血浆 0.2 mL 若干份, 加入不同浓度的标准溶液 10 μL, 按“血浆样品预处理”, 使白藜芦醇的浓度分别为 0.325, 3.250, 8.875 μg · mL<sup>-1</sup>, 并进行测定。计算样品的测得浓度, 与配制浓度对照, 求得本法的加样回收率及 RSD。结果见表 1。

**2.8 稳定性实验** 按照“2.5”项方法制备白藜芦醇含量为 0.325, 3.250, 8.875 μg · mL<sup>-1</sup> 的血浆样品, 作为质控样品。冻融稳定性: 将质控样品置于低温冰箱(-20 °C)充分冷却, 然后取出融化至室温, 如此反复 3 次, 考察冻融稳定性; 短期稳定性: 质控样品平行做 3 份, 室温放置 4 h 后, 进行测定, 考察测定浓度的变化情况; 长期稳定性: 将质控样品置于低温冰箱(-20 °C)放置 7 d, 取出测定长期冻存条件下血浆样品的浓度变化情况。结果见表 2, 结果表明样品在这些实验中都很稳定, 所以说明在样品常规分析中不会出现与样品稳定性有关的问题。

**2.9 实验设计与样品采集与处理** 60 只小鼠禁食过夜, 随机分成 12 组, 每组 5 只, 按 300 mg · kg<sup>-1</sup> 灌服白藜芦醇, 分别于给药后 2, 5, 10, 15, 30 min 和 1.0, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8 h, 每个时间点 5 只小鼠, 摘眼球取血, 收集于肝素化的离心管内, 1 500 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 分离出血浆并于 -20 °C 冻存待测。取上述样品血浆 0.2 mL 置于 1.5 mL 离心管, 加 640 μg · mL<sup>-1</sup> 内标物根皮素甲醇溶液 10 μL, 涡旋振荡 30 s, 加乙酸乙酯 1 mL, 涡旋 3 min。12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液 800 μL, 通风橱中氮气流吹干, 加甲醇 80 μL, 涡旋振荡 3 min, 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液 20 μL 进行 HPLC 分析。

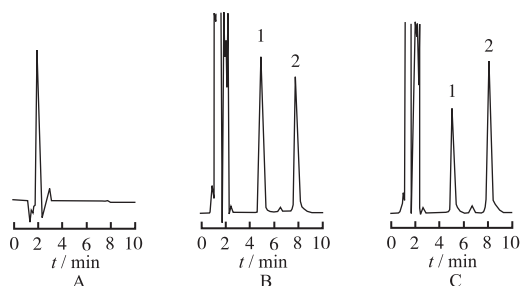


图 1 白藜芦醇及内标根皮素的色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆中加入白藜芦醇对照品及内标根皮素; C. 小鼠灌服白藜芦醇后血浆样品加入内标; 1. 白藜芦醇; 2. 根皮素

## Fig. 1 HPLC chromatograms of resveratrol and phloretin as internal standard (I. S.)

A. blank plasma sample; B. blank plasma spiked with resveratrol and I. S.; C. plasma sample spiked with I. S. after oral administration of resveratrol; 1. resveratrol; 2. I. S.

**2.5 标准曲线绘制** 精密量取白藜芦醇对照品储备液, 以甲醇逐步稀释成 1.0, 5.5, 10.0, 32.5, 55.0, 100.0 μg · mL<sup>-1</sup> 白藜芦醇对照品溶液。分别精密吸取

表 1 白藜芦醇测定方法精密度和提取回收率

Tab.1 Precision and recovery of the method for determining resveratrol

对照品/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	日内测得浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	日内 RSD/ %	日间测得浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	日间 RSD/ %	回收率/ %	RSD/ %
0.325	0.320±0.009 4	2.9	0.319±0.014 4	4.5	98.0±3.7	3.8
3.250	3.325±0.134 3	4.0	3.280±0.083 6	2.5	101.3±3.3	3.2
8.875	8.922±0.200 5	2.2	8.908±0.179 3	2.0	102.0±1.5	1.5

表 2 白藜芦醇的稳定性实验

Tab.2 Stability test of resveratrol

条件	0.325 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	3.250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	8.875 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
冻融稳定性	98.7±2.9	97.9±3.9	95.1±2.1
短期稳定性	97.4±3.0	96.8±4.0	93.7±1.9
长期稳定性	92.1±3.6	94.3±2.5	90.4±0.94

**2.10 小鼠灌服给药后的药动学** 小鼠灌服白藜芦醇后各时间点所测得的血药浓度-时间曲线见图 3。采用中国药理学学会数学药理委员会编制的 DAS2.0 实用药动学软件处理血药浓度数据,分别按一二三室模型进行模拟,获得 AIC 值和相关系数  $r$ 。根据 AIC 值最小和  $r$  值最大原则,判定白藜芦醇在正常型小鼠血浆中的药-时过程均符合二室开放模型。并求得其药动学参数,结果:A 为  $18.994 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $\alpha$  为  $0.066 \text{ min}^{-1}$ , B 为  $1.111 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $\beta$  为  $0.004 \text{ min}^{-1}$ ,  $t_{1/2\alpha}$  为  $10.5 \text{ min}$ ,  $t_{1/2\beta}$  为  $172.7 \text{ min}$ ,  $V1/F$  为  $44.987 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $CL/F$  为  $0.823 \text{ L} \cdot \text{min} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $AUC_{0-t}$  为  $313.796 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  为  $364.557 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $K_{10}$  为  $0.018 \text{ min}^{-1}$ ,  $K_{12}$  为  $0.038 \text{ min}^{-1}$ ,  $K_{21}$  为  $0.014 \text{ min}^{-1}$ ,  $Ka$  为  $0.094$ ,  $t_{1/2Ka}$  为  $7.404 \text{ min}$ ,  $C_{\text{max}}$  为  $3.589 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

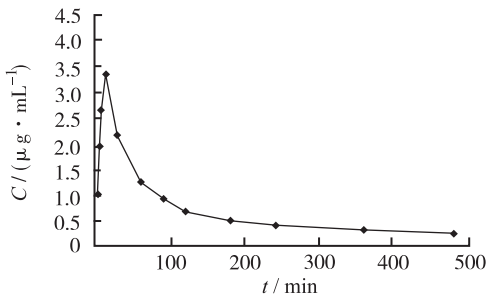


图 2 小鼠灌服白藜芦醇后血药浓度-时间曲线

Fig. 2 The plasma concentration - time profiles of resveratrol after oral administration

3 讨论

本实验结果表明,小鼠灌服白藜芦醇后药物从胃

肠道吸收快,2 min 即可测到原型药,约 30 min 血药浓度达峰  $C_{\text{max}}$  为  $3.589 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。小鼠灌服白藜芦醇后主要药动学参数为  $t_{1/2\alpha}$  为  $10.5 \text{ min}$ ,  $t_{1/2\beta}$  为  $172.7 \text{ min}$ ,说明本品在小鼠体内吸收分布迅速消除慢。影响药物吸收的主要因素是药物的理化性质,一般认为药物脂溶性越高越易被吸收,小分子水溶性药物易吸收。白藜芦醇脂溶性较高,并且具有三个酚羟基,具有一定的水溶性,因此吸收分布很快,同时由于脂溶性较高导致白藜芦醇在小鼠体内的消除比较慢。

本实验建立高效液相色谱法测定小鼠血浆中白藜芦醇含量,能够有效地测定药物在血浆中含量的变化情况,灵敏度高,重复性好,操作简便快捷,对准确考察白藜芦醇的小鼠药动学具有参考意义。

参考文献

- [1] FULDA S, DEBATIN K M. Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival; a mini-review [J]. Cancer Det Prev, 2006, 30(3): 217-223.
- [2] BAUR J A, SINCLAIR D A. Therapeutic potential of resveratrol; the *in vivo* evidence [J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(6): 493-506.
- [3] SHANKAR S, SINGH G, SRIVASTAVA R K. Chemoprevention by resveratrol; molecular mechanisms and therapeutic potential [J]. Front Biosci, 2007, 12(4): 4839-4854.
- [4] SHAKIBAEI M, HARIKUMAR K B, AGGARWAL B B. Resveratrol addiction; to die or not to die [J]. Mol Nutr Food Res, 2009, 53(1): 115-128.
- [5] LIN H S, HO P C. A rapid HPLC method for the quantification of 3,5,4'-trimethoxy-trans-stilbene (TMS) in rat plasma and its application in pharmacokinetic study [J]. J Pharma Biomed Anal, 2009, 49(2): 387-392.
- [6] SAVOURET J F, QUESNE M. Resveratrol and cancer; a review [J]. Biomed Pharmacother, 2002, 56(2): 84-87.
- [7] MOHAMMAD A, JUNG H B. Resveratrol; a review of pre-clinical studies for human cancer prevention [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2007, 224(3): 4274-4283.