

RP-HPLC 法测定 beagle 犬血浆中芦丁的含量

★ 汪红英 (江西中医院 南昌 330006)

★ 刘清飞 罗国安* 王义明 (清华大学分析中心 北京 100084)

★ 张的风 (江西中医学院 南昌 330006)

摘要:目的:建立复方芦丁片中芦丁在 beagle 犬血浆中含量测定的 RP-HPLC 法。方法:色谱柱为 Merck C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.2%冰醋酸溶液(20:80);流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长为 360 nm;柱温 25 ℃;进样量 20 μL。结果:芦丁峰形对称,血浆中内源性杂质不干扰芦丁的测定,保留时间在 10 分钟左右。血浆中平均回收率为 98.92%~112.33%,芦丁最低检出量为 0.18 ng。结论:RP-HPLC 可用于犬血浆中芦丁的含量测定。

关键词:HPLC;复方芦丁片;芦丁;beagle 犬血浆

中图分类号:TQ 460.7⁺2 **文献标识码:**A

复方芦丁片为中药复方制剂,内含珍珠层粉、野菊花膏粉、芦丁等,具清热解毒、平肝潜阳、凉血止血之功效,可软化血管、增加血管弹性,用于预防和治疗各种类型的高血压^[1]芦丁为其主要组成成分。

国内外已见报道采用 HPLC 法测定中药制剂或血浆中芦丁含量^[2~5],多采用水中加多种添加剂作流动相,操作复杂,且有些方法中酸的用量较多,对色谱柱的损伤较大。此外,血样处理方法复杂,操作较为繁琐。本试验用磺基水杨酸一次性处理血样,采用 HPLC 法测定犬血浆中芦丁的含量,方法简单、快速、重复性好且灵敏度高,为复方芦丁片的体内药动学研究提供了方法。

1 仪器与试剂

仪器:Agilent1100s 高效液相色谱仪;MIKRO 22R 低温高速离心机;MS2 Minishaker 涡流振荡仪;KQ-100B 型超声波清洗器。

试剂:乙腈为色谱纯,水为超纯水,冰醋酸、磺基水杨酸等为分析纯。芦丁对照品,购于中国药品生物制品检定所;复方芦丁片,自制,每片含芦丁 30 mg。

实验动物:beagle 犬,雄性,体重 13.8 kg,北京玛斯生物技术有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱选用 MerckC₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.2%冰醋酸溶液(20:80);流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长为 360 nm;

柱温为 30 ℃。该色谱条件下,芦丁的保留时间在 10 分钟左右。

2.2 标准曲线的制备 精密称取芦丁对照品 9.00 mg,置 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取上述溶液 1.0 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀备用,浓度为 36.00 μg·mL⁻¹。依法制备浓度分别为 18.00, 9.00, 4.50, 1.80, 0.18, 0.09 μg·mL⁻¹ 的样品溶液,分别进样,以峰面积 A 对浓度 C 进行线性回归,得线性方程为 $A = 21.866 0C + 4.294 1$, $r = 0.999 8$,可见在 0.09~36.00 μg·mL⁻¹ 范围内,芦丁浓度与其峰面积呈现良好的线性相关。

2.3 精密度试验 在上述色谱条件下,对同一样品重复进样 5 次,测得峰面积的 RSD 为 4.67% ($n = 5$),表明精密度良好。

2.4 重现性试验 在上述色谱条件下,对同一批样品按同一制备方法平行制备 6 份,分别进样,测得峰面积的 RSD 为 5.59% ($n = 6$),表明方法的重现性较好。

2.5 检出限 按信噪比≥3 计,本方法中芦丁最低检出浓度为 0.009 μg·mL⁻¹,即最低检出量为 0.18 ng。

2.6 含药血浆的制备 Beagle 犬口服给药(复方芦丁片)20 片,2 小时取血,血液用肝素钠抗凝,每毫升血液用肝素钠 0.1 mg。全血离心(3000 r/min, 15 分钟)分离得血浆即为待测血样。

* 通讯作者。

大黄素、盐酸小檗碱在醇沉工艺中的含量变化

★ 涂兴明 (广州中医药大学附属骨伤科医院药剂科 广州 510240)
★ 黄有仲 欧阳毅 (广东省广州市芳村区人民医院 广州 510370)
★ 朱涛 (广东省广州市暨南大学第一附属医院中医科 广州 510360)

关键词: 大黄素; 盐酸小檗碱; 醇沉法; 复方大黄喷雾液

中图分类号: TQ 460.7⁺2 文献标识码: A

醇沉是中药水提液澄清处理的常用工艺, 近年来随着研究日益增多, 发现醇沉对中药各种有效成分均有影响, 尤其是对生物碱, 韩桂茹等^[1]报道 70% 浓度醇沉苦参碱、麻黄碱分别损失 22.94%、54.85%; 也有人研究比较了醇沉法、大孔树脂吸附法和超滤法对芍药苷含量的影响, 结果表明醇沉有

一定的优越性^[2], 说明具体到每个不同的复方制剂, 其精制法应根据所含成分的不同特性进行选择。本文在复方大黄喷雾液的醇沉工艺过程中, 对大黄素、盐酸小檗碱进行了全程追踪, 发现二者在醇沉过程中各有特点, 大黄素损失不多, 盐酸小檗碱虽损失近一半, 但经采用酸醇处理后也可大幅度降低损失,

2.7 血浆样品的处理 取磺基水杨酸, 配制为 5.0 mg/mL 的溶液。每毫升血样加入磺基水杨酸溶液 10 μ L, 涡流混匀后离心 (8 000 r/min, 15 分钟), 取上清液直接进样测定。

2.8 回收率测定 取高、中、低 3 种不同浓度的芦丁对照品溶液 1 mL, 50 $^{\circ}$ C 氮气吹干后加入空白血浆 1 mL, 涡流混匀后照血浆样品处理方法进行操作, 测定峰面积, 以实测量与加入量之比求算相对回收百分率。测定结果见表 1。回收率在 98.92% ~ 112.33% 之间, 表明该方法的准确度符合生物样品分析要求。

表 1 血浆中芦丁回收率测定结果 ($n=3$)

加入浓度 / μ g $\cdot$ mL ⁻¹	测定浓度 / μ g $\cdot$ mL ⁻¹	回收率 (%)	RSD (%)
100.00	112.33 $\pm$ 0.31	112.33 $\pm$ 0.26	0.28
50.00	50.55 $\pm$ 0.15	101.10 $\pm$ 0.31	0.31
5.00	4.95 $\pm$ 0.23	98.92 $\pm$ 0.46	0.47

3 讨论

用全波长扫描观测时可以看出芦丁峰在 260 nm 和 360 nm 处紫外吸收比较强, 260 nm 处峰比 360 nm 处响应值低, 且 260 nm 处杂质峰较强, 故本实验选择了 360 nm 作为检测波长。

本实验曾选用甲醇^[6]处理血样, 将血样用甲醇进行多次提取, 合并上清液, 低温氮气吹干, 甲醇定

容后测定。但该方法回收率较低 (< 80%), 且因进行多次提取, 操作繁琐, 误差较大, 经筛选后选用磺基水杨酸处理血样。该法操作简便, 经磺基水杨酸处理后的血样色谱图中干扰峰少, 且样品回收率高。具体操作时发现磺基水杨酸的用量对测定结果具有明显影响。用量过少, 则沉淀蛋白不完全; 过多则会影响测定, 出现干扰峰, 本实验中每毫升血浆所需磺基水杨酸的用量为 50 μ g。因磺基水杨酸为固体, 微克级不易定量, 故用其水溶液进行血样处理, 以体积进行定量。

参考文献

- [1] 江苏新医学院编. 上海科学技术出版社出版. 中药大辞典[M], 1495, 2128, 2 435
- [2] 闫花丽, 吉曙光, 黄安军. HPLC 测定珍菊降压片中氢氯噻嗪和芦丁的含量[J]. 中成药, 2004, 26(7): 547
- [3] Yi Sun, Tao Guo, Yin Sui, et al. Quantitative determination of rutin, quercetin, and adenosine in Flos Carthami by capillary electrophoresis[J]. Journal of Separation science, 2003, 26, 1 203 ~ 1 206
- [4] 叶晓镭, 支月芳, 周萍. HPLC 法测定珍菊降压片中绿原酸、氢氯噻嗪和芦丁的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2005, 19(1): 43
- [5] 邓富良, 陈国华. RP HPLC 测定老鼠血浆中芦丁的含量[J]. 药物分析杂志, 2004, 24(3): 253 ~ 255
- [6] 肖小华. 复方芦丁的药代动力学研究[J]. 局解手术学杂志, 2004, 13(6): 367

(收稿日期: 2005-09-15)