

表 1 无机陶瓷微滤膜的清洗效果

Table 1 Cleaning effects of inorganic ceramic micro-filtration membrane

清洗方法	膜通量恢复率/%					
	清洗 10 min	清洗 20 min	清洗 30 min	清洗 40 min	清洗 50 min	清洗 60 min
热水	22	35	53	70	78	82
NaClO 溶液	16	24	37	50	56	62
NaOH 溶液	17	23	32	42	48	55
热水+NaClO 溶液	22	33	55	69	80	87
热水+NaOH 溶液	22	34	52	74	88	92

当的条件下渗入容胀并破坏静电作用和化学键,再通过水流冲刷去除。热水与清洗剂的交替清洗较好地破坏了中间层和吸附层的结构,使清水通量在很大程度上得以恢复。此外,在高温下 NaClO 的氧化性可能受到了某些限制,致使其清洗效果较热水+NaOH 低。因此,确定微滤膜的清洗方法为热水与 1%NaOH 溶液交替清洗并伴有间歇、短时反向清洗。

3 讨论

采用无机陶瓷微滤膜纯化虫草粗多糖溶液,工艺可行、操作稳定。由试验确定微滤的操作条件为:

料液的 pH 值在 7~8、温度为 60 ℃,操作压差为 0.3~0.4 MPa。在该条件下微滤处理虫草粗多糖溶液,多糖收率较传统的醇提工艺高约 30%,同时可除去大部分不溶固体物和蛋白质胶体等大分子有机物杂质。清洗结果表明,在伴有间歇、短时反冲洗的操作方式下,采用 80 ℃热水与 1%NaOH 溶液交替对污染后的微滤膜进行清洗,可使膜的清水通量恢复率能达到 90%以上。另外,微滤清洗和运行过程中均建议采用带间歇、短时反冲洗式的操作方式。

参考文献:

- [1] 陈红霞,贾晓斌.冬虫夏草多糖的药理学研究进展[J]. 江苏大学学报,2005,15(1):74-78.
- [2] 余晓斌,罗长才,缪静.冬虫夏草多糖提取工艺的优化[J]. 中草药,2002,33(12):1086-1087.
- [3] Burrell K J, Gill C, Mckechnie M T, et al. Advance in separation technology for the brewer; ceramic cross-flow micro-filtration of rough beer [J]. *MBAA Technic Quart*, 1994,31(2):42-50.
- [4] Ma H, Hakim L F, Bowman C N, et al. Factors affecting membrane fouling reduction by surface modification and backpulsing [J]. *J Membr Sci*, 2001,189:255-270.
- [5] 曲春香,沈颂东,王雪峰,等.用考马斯亮蓝测定植物粗提液中可溶性蛋白质含量方法的研究[J]. 苏州大学学报,2006,22(2):82-85.
- [6] 林颖,吴敏敏,吴雯,等.天然产物中的多糖含量测定方法正确性研究[J]. 天然产物研究与开发,1996,8(3):5-8.
- [7] 许振良.膜法水处理技术[M]. 北京:化学工业出版社,2001.

HPLC 法测定小鼠血浆中杠柳毒苷的血药浓度

阙红玉,谢跃生,王跃飞,戚爱榛*,潘桂湘,刘虹

(天津中医药大学中医药研究院 教育部省部共建方剂学重点实验室,天津 300193)

摘要:目的 建立小鼠血浆中杠柳毒苷的 HPLC 测定方法,对其药动学进行研究。方法 血浆样品中加入内标地高辛,用甲醇沉淀蛋白-C₁₈固相萃取处理,氮气吹干后流动相复溶进样。色谱条件:色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm,5 μm)和保护柱 Agilent Zorbax C₁₈柱(12.5 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(25:75);体积流量:1.0 mL/min;柱温:25 ℃;检测波长:220 nm;进样量:20 μL。结果 此法空白血浆中无内源性物质干扰样品测定,血药浓度线性范围为 0.02~2.0 mg/L(r=0.999 8),最低定量限为 0.02 mg/L,平均提取回收率大于 81.8%,批内、批间精密性 RSD 均小于 4.64%,准确度试验的结果在 101.3%~111.7%。结论 本方法简便,准确,灵敏度高,并用于小鼠尾静脉注射杠柳毒苷的药时曲线研究。

关键词:杠柳毒苷;血药浓度;药动学;HPLC

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)10-1493-04

Determination of periplocin concentration in mouse plasma by HPLC

KAN Hong-yu, XIE Yue-sheng, WANG Yue-fei, QI Ai-di, PAN Gui-xiang, LIU Hong

(Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medical Formulae, Ministry of Education Research Center of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

收稿日期:2007-12-10

基金项目:天津市科技发展计划项目(05YFZJC01102);天津市高等学校科技发展基金资助项目(20050310);天津市卫生局中医、中西医结合科研基金资助项目(2005072);天津市科委应用基础研究计划项目(07JCYBJC01800)

作者简介:阙红玉(1982-),女,河北人,天津中医药大学 2006 级硕士研究生,研究方向为药物分析。E-mail: khy820527@sina.com

* 通讯作者 戚爱榛 Tel:13803009082 E-mail: qiaidi@tjutc.edu.cn

Abstract: Objective To establish an accurate and reliable HPLC-UV method for determination of periplocin concentration in mouse plasma and apply to pharmacokinetic studies. **Methods** The mouse plasma spiked with digoxin as the internal standard was deproteinized by methanol, followed by solid-phase extraction with a C_{18} extraction cartridge, boasted the extracted solution with N_2 , and then redissolve with the mobile phase, finally injected this solution into the HPLC instrument for determination using a Agilent Zorbax SB- C_{18} column (150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) with acetonitrile-water (25 : 75) as mobile phase, the flow rate was 1.0 mL/min, column temperature was 25 $^{\circ}$ C, and UV detection wavelength was 220 nm. **Results** There was no internal substance in plasma interfered with the determination of the samples. The linear range was between 0.02–2.0 mg/L ($r=0.9998$), the lower limit quantization was 0.02 mg/L, the average recovery was more than 81.8%, the RSD of precision was less than 4.64%, and the accuracy was between 101.3%–111.7%. **Conclusion** This method is convenient, the result is accurate, and the sensitivity is higher. It could be successfully applied to determination of periplocin concentration in mouse plasma during its pharmacokinetic and bioavailability studies and providing scientific basis.

Key words: periplocin; blood concentration; pharmacokinetics; HPLC

杠柳毒苷又名杠柳苷、杠柳苷 G、萝藦毒苷,是一种具有甾核和不饱和五元内酯环结构的甲型强心苷^[1],主要用于治疗慢性充血性心力衰竭^[2]。杠柳毒苷是香加皮中的重要效应成分^[3],同时也是香加皮中的有毒成分^[4]。临床上使用香加皮有不良反应和致死病例的报道,这与人们对于杠柳毒苷的体内过程认识不清楚导致用量过大、时间过长有密切关系,所以,研究杠柳毒苷在动物体内的药动学过程对于含香加皮中药制剂的安全使用具有重要的意义。本实验建立了甲醇沉淀蛋白-固相萃取前处理小鼠血浆样品,采用 HPLC 法测定杠柳毒苷血药浓度的方法,为研究该药物在动物体内的动态变化过程提供了依据。

1 仪器与试药

Waters 515 高效液相色谱仪、Waters 2487 双波长紫外检测器(美国 Waters 公司),Gilson AS-PEC Xli 型全自动固相萃取仪(法国 Gilson 公司),8W 型高速离心机(美国 Tomos 公司),N-EAVP™111 氮吹仪(美国 Organomation 公司), C_{18} 型固相萃取小柱(天津双吉仪器有限公司),微型旋涡混合仪,AX205 十万分之一天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

杠柳毒苷对照品(天津中医药大学中医药研究院自制,质量分数大于 98%);地高辛对照品(中国药品生物制品检定所,批号:100015-200308);昆明种雌性小鼠购自天津药物研究院,体质量(20 \pm 5)g。

乙腈(色谱纯,天津市康科德科技有限公司),超纯水为 Millipore 超纯水净化系统制得。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为 Agilent Zorbax SB- C_{18} 柱

(150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)和保护柱 Agilent Zorbax C_{18} 柱(12.5 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-水(25 : 75);体积流量:1.0 mL/min;柱温:25 $^{\circ}$ C;检测波长:220 nm;进样量:20 μ L。

2.2 对照品溶液和内标溶液的制备:分别精密称取杠柳毒苷对照品 10.4 mg 和内标地高辛 10.2 mg,加适量甲醇配制成 1.04 mg/mL 对照品储备液和 0.2 μ g/mL 内标溶液,4 $^{\circ}$ C 冰箱内保存备用。

2.3 标准曲线的制备:取 1.04 mg/mL 杠柳毒苷对照品储备液适量,稀释成 0.05、0.1、0.25、0.5、1.0、2.5、5.0 ng/mL 系列对照品溶液,平行操作 3 份,进样 20 μ L 测定,记录杠柳毒苷峰面积。以峰面积(Y)为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程 $Y=22050C+674.74$, $r=0.9994$ 。

2.4 校正曲线的制备:取空白血浆样品 0.25 mL,加入地高辛内标溶液 0.05 mL 和系列杠柳毒苷对照品溶液 0.1 mL,配制成 0.02、0.04、0.1、0.2、0.4、1.0、2.0 μ g/mL 含药血浆样品,按血浆样品处理项下操作,测定,以杠柳毒苷与内标地高辛峰面积比值(Y)为纵坐标,以杠柳毒苷质量浓度(C)为横坐标,得回归方程 $Y=0.1971C+0.0148$ ($r=0.9995$),结果表明血浆中杠柳毒苷在 0.02~2.0 μ g/mL 线性关系良好。

2.5 给药方法与样品采集:选取健康雄性小鼠 40 只,随机分为 5 组,每组 8 只(每只小鼠作为一个取血点,每组为一条药时曲线)。小鼠实验前 12 h 禁食不禁水。按 1 mg/kg 给药,采用尾静脉注射方式给药,自给药后 2、5、10、15、20、30、40、60 min 摘眼球取血置于肝素化试管中,3 000 r/min 离心 10 min,分离血浆,-20 $^{\circ}$ C 保存至测定。

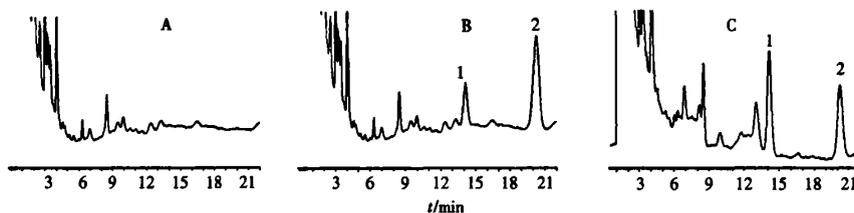
2.6 血浆样品处理:取小鼠血浆样品 0.25 mL 置离心管中,加入 1 mL 甲醇,旋涡 1 min,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液于 50 ℃ 水浴氮气吹干,1 mL 超纯水复溶,旋涡 1 min。上已预先经过 1 mL 甲醇和 1 mL 水活化处理好的 C₁₈ 型固相萃取小柱(规格 100 mg),上样保持 1 min,先用 1 mL 40% 甲醇洗脱 2 次,每次 0.5 mL,弃去洗脱液,再用 1 mL 甲醇洗脱 2 次,每次 0.5 mL,收集洗脱液,于 50 ℃ 水浴氮气吹干,残渣以 100 μL 流动相复溶,旋涡 1 min,13 000 r/min 离心 5 min,取上清液 20 μL,即得。

2.7 最低定量限的测定:取空白血浆 0.25 mL 5 份,各加入内标地高辛溶液 0.05 mL 和 0.05 μg/mL 杠柳毒苷对照品溶液 0.1 mL,按血浆样品处理项下

操作,测定,结果血浆中杠柳毒苷最低定量限为 0.02 μg/mL,RSD 为 5.13%。

2.8 方法专属性试验:取小鼠空白血浆 0.25 mL;空白血浆加入 1.0 μg/mL 杠柳毒苷对照品溶液 0.1 mL 和 10.2 μg/mL 地高辛内标溶液 0.05 mL;取健康小鼠尾静脉注射杠柳毒苷后的血浆样品,加 10.2 μg/mL 地高辛内标溶液 0.05 mL,按血浆样品处理项下方法处理,测定,得色谱图 1。结果表明,该法处理后小鼠空白血浆在杠柳毒苷和地高辛出峰处均无内源性物质干扰,峰形良好,保留时间分别为 15.4 min 和 22.5 min。

2.9 提取回收率的测定:取空白血浆,加杠柳毒苷配制成质量浓度分别为 0.04、0.4、2.0 μg/mL 样品



A-空白血浆 B-空白血浆中加入杠柳毒苷和地高辛 C-血浆样品加地高辛 1-杠柳毒苷 2-地高辛

A-blank plasma B-blank plasma spiked with periplocin and digoxin

C-plasma sample after iv administration spiked with digoxin 1-periplocin 2-digoxin

图 1 血浆样品 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of plasma sample

各 5 份,处理,进样测定,记录杠柳毒苷峰面积 (A_s);另取质量浓度分别为 0.04、0.4、2.0 μg/mL 杠柳毒苷对照品直接进样 20 μL,测定,记录峰面积为 (A_{sd}),计算提取回收率 $R = (A_s / 2.5) / A_{sd} \times 100\%$,结果分别为 82.6%、81.8%、88.2%,RSD 分别为 2.2%、4.3%、4.1% ($n=5$)。3 个质量浓度的提取回收率均大于 81.8%,符合生物样品测定关于提取回收率的要求。

2.10 精密度和准确度试验:取空白血浆,加杠柳毒苷配制质量浓度分别为 0.04、0.4、2.0 mg/L 血浆样品各 5 份,内标地高辛溶液为 10.2 mg/L,处理,测定,记录杠柳毒苷峰面积和内标峰面积,计算杠柳毒苷与内标地高辛峰面积比值,带入回归方程计算质量浓度,并计算测得质量浓度/理论质量浓度,作为精密度试验结果,以 RSD 表示;用测得质量浓度的平均值/理论质量浓度 $\times 100\%$ 作为准确度试验结果。同法处理 3 批血浆样品,测定,分别计算,结果见表 1。结果表明本法精密度和准确度均符合生物样品测定要求。

2.11 小鼠血浆样品的测定:测定小鼠血浆样品时

加入内标地高辛对照品溶液 0.05 mL,处理,进样 20 μL,测定不同时间杠柳毒苷的血药浓度,结果见图 2。

2.12 数据分析:血药浓度-时间数据采用中国药理学学会数学药理专业委员会 DAS 实用药动学计算程

表 1 精密度和准确度试验结果 ($n=5$)

Table 1 Results of precision and accuracy test ($n=5$)

理论质量浓度 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	测定质量浓度 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	批内 RSD/%	批间 RSD/%	准确度试验/%
0.040	0.045 ± 0.008	2.72	4.64	111.7 ± 3.04
0.400	0.410 ± 0.020	1.69	2.63	101.3 ± 3.61
2.000	2.020 ± 0.180	3.63	2.52	103.1 ± 2.90

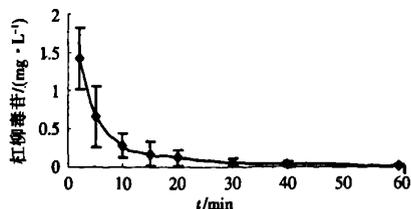


图 2 小鼠体内杠柳毒苷的平均血药浓度-时间曲线

Fig. 2 Mean periplocin blood concentration-time curve of mice

序软件进行拟合。对各种模型的处理结果进行比较,选择其中残差平方和(SUM)值最小、拟合度(r^2)最佳、AIC 值最小者定为所测药物的最佳室型。结果表明本法测定的杠柳毒苷在小体内符合二室代谢模型, $C_{(t_0)}$ 为 1.39 $\mu\text{g/mL}$, $t_{1/2\alpha}$ 为 2.04 min, $t_{1/2\beta}$ 为 13.9 min,CL 为 0.0314 L/min,AUC_{0~60}为 30.84 mg/L·min,MRT_{0~60}为 8.20 min,VRT_{0~60}141.0 min²。

3 讨论

3.1 前处理方法的选择:本实验根据杠柳毒苷的理化性质及极性对血浆预处理方法进行了研究,主要进行了液液萃取、沉淀蛋白和固相萃取 3 种方法的摸索。

液液萃取法中考察了叔丁基甲醚-二氯甲烷(2:1)、醋酸乙酯-丙酮(5:1)、醋酸乙酯-乙醇(15:1,8:1,5:1)、醋酸乙酯-异丙醇(20:1,10:1,5:1)、氯仿-异丙醇(95:5,9:1,5:1,1:1)、氯仿-正丁醇(9:1)、二氯甲烷-异丙醇(10:1,5:1,3:1),结果回收率均不能达到要求。

沉淀蛋白法中考察了甲醇、乙腈、甲醇-乙腈(1:1)为沉淀剂的方法。结果乙腈沉淀蛋白后,杠柳毒苷的提取回收率仅 60%。以甲醇为沉淀剂,提取回收率虽然较高(约 80%),但干扰峰较多,不稳定。以甲醇-乙腈(1:1)为沉淀剂,提取回收率可达 80%,干扰较少。实验初期曾经甲醇-乙腈(1:1)沉淀的方法作为血浆预处理方法并进行了方法学验证,方法定量限 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 。小鼠尾静脉注射杠柳毒苷中剂量(1 mg/kg)后,于不同时间点采血进行测定。结果此方法给药 40 min 后杠柳毒苷已经低于定

量限,无法满足更低剂量的研究。

最后采用沉淀蛋白-固相萃取法,选择反相 C₁₈ 型固相萃取小柱进行实验,其上样量、洗脱溶剂用量及成本方面都较合适,即 1 mL 上样液,1 mL 40% 甲醇洗杂质、100% 甲醇 1 mL 两次洗脱杠柳毒苷和地高辛,每次 0.5 mL,每处理 5 个样品换一个固相萃取小柱。结果回收率符合药动力学研究要求。

3.2 色谱柱的选择:使用了 Tiahe C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),结果血浆中检测杠柳毒苷时杂峰很多,回收率很低。改用窄径柱 Agilent C₁₈(100 mm×2.1 mm,3.5 μm)测定,色谱图中仍然有干扰峰。最后选用色谱柱 Agilent Zorbax SB-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm,5 μm)及保护柱 Agilent Zorbax C₁₈柱(12.5 mm×4.6 mm,5 μm),结果表明,血浆中检测杠柳毒苷的最低定量限可以达到测定要求,并且杂峰较少,符合要求。

3.3 流动相比比例的选择:方法建立初期,流动相采用乙腈-水(27:73),有杂峰干扰且峰型不好,改流动相比比例为乙腈-水(23:77)以减少样品出峰处的干扰,但出峰时间太长。最后选择流动相为乙腈-水(25:75),色谱图中样品峰型较好且无干扰峰出现,符合要求。

参考文献:

- [1] Sakuma S, Kawanishi S, Shoji J. Constituents of Chinese crude drug "Wujiapi". VI. On the structure of glucoside E of Beiwujiapi [J]. *Chem Pharm Bull*, 1972, 20(3):469.
- [2] 董波,万玉,李婷.益气强心饮治疗慢性心力衰竭 34 例分析[J]. *中医药学刊*, 2004, 22(6):1132.
- [3] 张援虎,陈东林.峨嵋杠柳化学成分的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2006, 18:772-774.
- [4] 李玉红,高秀梅,张伯礼,等.香加皮提取物对离体心脏功能的影响[J]. *辽宁中医学院学报*, 2005, 7(4):396-397.

微波提取黄芪中多糖的工艺研究

许海燕,杨义芳,黄春跃

(上海医药工业研究院,上海 200040)

摘要:目的 优选提取黄芪中多糖的最佳方法和工艺参数。方法 比较微波、超声、碱水、酶法、加热回流提取黄芪,对其中最佳的微波提取法的工艺条件分别进行了单因素和正交试验研究,以最佳工艺条件为基础进行放大实验。结果 黄芪多糖的最佳提取工艺为微波提取,控温 70 $^{\circ}\text{C}$,提取 3 次,每次 10 min。该工艺条件同样适用于放大实验,与小试试验的条件一致。结论 优选的黄芪多糖微波提取法工艺稳定可行。

关键词:黄芪;多糖;微波提取;正交试验

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)10-1496-04

收稿日期:2008-01-05

作者简介:许海燕(1979-),女,湖南省邵东县人,上海医药工业研究院中药研究室 2003 级硕士,研究方向为中药制剂。

Tel:(021)62479808-464 E-mail:swalxh@yahoo.com.cn