

HPLC 法测定大鼠血浆中丹参酚酸 A 的浓度

张向荣, 潘卫三*

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 建立大鼠血浆中丹参酚酸 A 的含量测定方法。方法 利用 HPLC, 色谱柱: Hypersil ODS 柱(4.6 mm × 200 mm, 10 μm), 流动相: 乙腈-水(1 : 2.65, 甲酸调 pH 值至 2.5), 流速: 0.9 mL/min, 检测波长: 285 nm, 以桂皮酸作为内标物。结果 方法回收率在 98.9% ~ 106.9%, 提取回收率大于 83%, 日内、日间精密度均低于 8.4%。结论 该法可作为丹参酚酸 A 在大鼠体内药物动力学研究的检测手段。

关键词: 血浆; 丹参酚酸 A; HPLC

中图分类号: R285.6; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)05-0410-03

Quantitative determination of salvianolic acid A in rat plasma by HPLC

ZHANG Xiang-rong, PAN Wei-san

(College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang Liaoning 110016, China)

Abstract: **Object** To develop a method for the quantitative determination of salvianolic acid A in rat plasma. **Methods** HPLC method and Hypersil ODS column (4.6 mm × 200 mm, 10 μm) were used, the mobile phase was acetonitrile-water (1 : 2.65, adjusted pH to 2.5 with formic acid), at a flow rate of 0.9 mL/min, the UV detection wavelength was 285 nm. Cinnamic acid was used as internal standard. **Results**

The recovery of the method was in the range of 98.9% ~ 106.9%, the recovery of the extraction was over 83%. The within-day precision and the day-to-day precision were both lower than 8.4%. **Conclusion**

The method is appropriate for the determination of salvianolic acid A when pharmacokinetics of salvianolic acid A is studied in rat plasma.

Key words: plasma; salvianolic acid A; HPLC

丹参酚酸 A (salvianolic acid A, Sal A) 为丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的水溶性酚酸类成分, 具有抗脑缺血及体内外抗氧化、保护心、脑等生理作用^[1-3]。血浆中丹参素和原儿茶醛及丹参酮的含量测定方法已有文献报道^[4-6], 而血浆样品中 Sal A 含量的测定方法未见报道。本实验以桂皮酸为内标建立了 HPLC 法测定大鼠血浆样品中 Sal A 含量的分析方法, 为进行 Sal A 的药物动力学研究提供了一个灵敏、可靠的检测手段。

1 材料

1.1 仪器: 高效液相色谱仪(日本 Jasco 公司), 包括 Jasco UV-975 检测器, Jasco PU-980HPLC 泵, Ckchrom Data System 数据处理工作站; SLJ- 型电动离心机(沈阳市理化仪器厂); YKH- 型液体快速混合器(江西医疗器械厂); SCQ-50 型超声波清洗机(上海申波超声公司); PHS-2C 型酸度计(上海伟业仪器厂)。

1.2 试剂: Sal A (自制, 经核磁、红外、紫外光谱确证), 桂皮酸(上海正翔化学试剂研究所, 分析纯), 甲

醇、乙腈为色谱纯, 其它试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 色谱条件: 色谱柱: Hypersil ODS (4.6 mm × 200 mm, 10 μm); 流动相: 乙腈-水(1 : 2.65, 甲酸调 pH 至 2.5); 流速: 0.9 mL/min, 紫外检测波长: 285 nm; 柱温: 室温。

2.2 对照品溶液及内标溶液的配制: 精密称取约 25 mg Sal A 置 50 mL 容量瓶中, 用流动相溶解稀释至刻度, 得 500 μg/mL 的对照品贮备液, 以此来配制系列浓度的对照品溶液。精密称取内标物桂皮酸 25.0 mg 溶于 250 mL 蒸馏水中, 精密量取 1.0 mL 置 25 mL 容量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 得 4 μg/mL 内标溶液。以上溶液均置冰箱中(4 ℃) 保存备用。

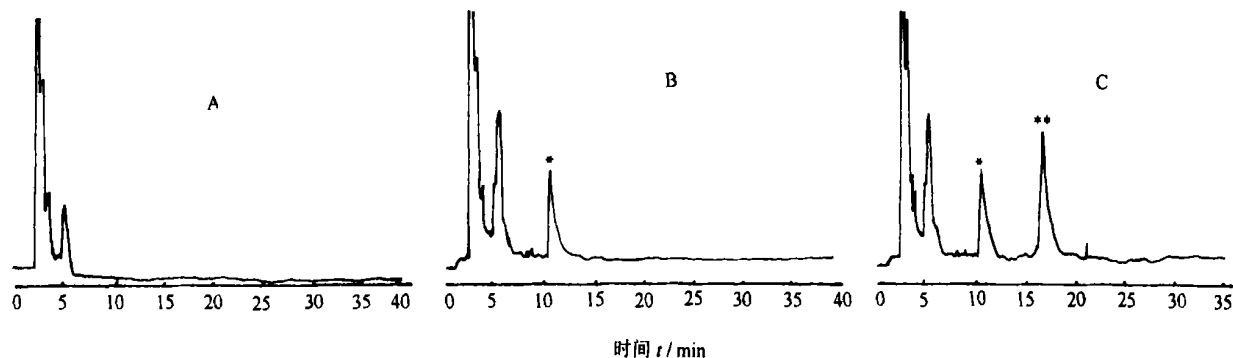
2.3 血浆样品预处理: 取大鼠空白血浆 0.1 mL 置 5.0 mL 离心管中, 加 0.5 mol/L HCl 50 μL, 超声振荡 5 min, 加入内标溶液 30 μL, 再加乙腈 0.4 mL 沉淀蛋白, 置混合器上涡旋 5 min。离心(3 000 r/min) 10 min, 吸取上清液, 置 5 mL 具塞试管中, 于 40

水浴下氮气吹干,残余物中加入流动相 200 μL , 超声溶解,离心(2 000 r/min) 5 min, 取上清液 20 μL 进样。

2.4 系统适用性试验:在选定的条件下,注入上述血浆样品溶液,记录色谱图。按 Sal A 计算得到色谱柱的最小理论板数为 26 192,血浆中 Sal A 与桂皮酸的分离度 $R > 1.5$,拖尾因子为 0.97,均符合药典

要求。

2.5 方法专属性的考察:将实验动物的血浆按上述方法处理后,取 20 μL 注入高效液相色谱仪。同法处理空白血浆样品,所得色谱图见图 1。可见,在上述色谱条件下,Sal A 与内标物桂皮酸具有良好的分离度,空白血浆对 Sal A 及内标物的分析测定无干扰,因此本方法具有良好的专属性。



A-空白血浆 B-对照品溶液 C-血浆样品 * -Sal A ** -内标物桂皮酸

图 1 HPLC 图谱

2.6 标准曲线的制备:精密量取空白大鼠血浆 0.1 mL, 分别加入 Sal A 系列贮备液,使血浆浓度分别为 10, 25, 50, 100, 150, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 按上述样品处理过程分析,以 Sal A 与内标物峰面积比值为纵坐标,Sal A 浓度为横坐标绘制标准曲线,计算得血浆中 Sal A 的标准曲线方程为: $Y = 0.0132X - 0.027$, $r = 0.9993$ 。

2.7 最低检测浓度的测定:按峰高为基线噪音 3 倍计算,血浆中 Sal A 最低检测浓度为 2.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.8 精密度试验:用空白血浆配制含 Sal A 25.0, 100.0, 300.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 样品各 5 管,分别计算日内精密度和日间精密度,结果见表 1。

表 1 血浆中 Sal A 的精密度试验 ($n = 3$)

浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	日内精密度		日间精密度	
	均值(%)	RSD(%)	均值(%)	RSD(%)
25	23.6	4.4	24.5	8.4
100	98.3	2.5	95.8	2.0
300	297.4	1.4	288.4	1.4

2.9 回收率试验:分别于空白血浆中准确加入一定量的 Sal A,按上述处理及分析方法测定,重复 4 次,测定结果与标准曲线中的相应浓度比较,得方法回收率。用未经试验处理的 Sal A 对照品溶液 25, 100, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度在已确定 HPLC 条件下测定,计算绝对回收率。结果见表 2。

结果表明,Sal A 在血浆中的绝对回收率较高,均在 83% 以上,方法回收率在 98.9% ~ 106.9%,能够满足测定要求。

表 2 回收率试验结果 ($n = 4$)

浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	方法回收率		绝对回收率	
	均值(%)	RSD(%)	均值(%)	RSD(%)
25	98.9	1.6	83.0	2.3
100	100.8	2.3	85.0	3.3
300	106.9	4.8	87.5	2.5

3 讨论

本实验考察了乙腈与水不同比例组成的流动相及加入不同的缓冲液调整流动相 pH,以甲酸调 pH 值的分离效果最好。当甲酸调 pH 为 2.5 时,Sal A 的保留时间约为 10.5 min,Sal A 及内标与血浆中的内源性物质得到良好的分离。

血浆预处理过程中,如果不加 0.5 mol/L HCl 50 μL ,则药物峰不出现,可能是药物与血浆蛋白有一定结合的原因,当酸化后,药物则游离出来。

血浆的预处理方法一般采用提取法和沉淀法,本实验采用乙醚或乙酸乙酯为溶媒提取不如以乙腈为溶媒沉淀血浆处理后所测 Sal A 的回收率高。

致谢:实验过程中得到本校天然药化教研室李锐教授、王金辉副教授的大力支持,深表感谢。

参考文献:

- [1] 吴俊芳,王洁,张均田.总丹酚酸对小鼠和大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].中草药,2001,32(3):227-229.
- [2] 王洁,吴俊芳,张均田.总丹酚酸的抗脑缺血研究[J].中国药理学通报,1999,15(2):164-166.
- [3] Li L N. Water soluble active components of *Salvia miltiorrhiza* and related plants[J]. J Chinese Pharmaceutical Sciences, 1997,6(2):57-64.
- [4] 庄燕梨,晁若冰.高效液相色谱法测定大鼠血浆中丹参素和原儿茶醛[J].药学报,1999,34(8):613-616.

- [5] 何怀冰,王 蓓,陈 筠,等. 荧光光谱法测定家兔中丹参素血浓度及其药代动力学参数[J]. 药学通报, 1983, 18(2): 48-49.
- [6] 赵福芹,王爱莲,王 林. 中药制剂中丹参素的家兔体内分布研究[J]. 中国药理学杂志, 1994, 29(5): 291-293.

HPLC 法测定不同品种柴胡中的柴胡皂苷 a、c、d 的含量

茅仁刚¹, 林东昊¹, 王智华², 洪筱坤², 潘胜利^{3*}

(1. 上海师范大学新康制药厂, 上海 200234; 2. 上海中医药大学中药学院, 上海 200032;
3. 复旦大学药学院, 上海 200032)

摘要: 目的 考察不同品种柴胡中柴胡皂苷 a、c、d 的含量, 以期扩大柴胡药用品种的范围。方法 采用 RP-HPLC 法, 使用 LUNA C₁₈ 柱、乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 检测波长为 210 nm, 以柴胡皂苷 a、c、d 含量为指标进行比较。结果 不同品种柴胡中的柴胡皂苷 a、c、d 含量差异悬殊, 其中云南会泽产多枝柴胡中的含量最高。结论 研究所建立的方法适合不同品种柴胡中柴胡皂苷 a、c、d 的定量分析, 并且结果准确可靠。

关键词: 柴胡; 品种; 柴胡皂苷 a、c、d; HPLC 法

中图分类号: R282. 2; R286. 02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)05-0412-03

Quantitative analysis of saikosaponin a, c, d in different species of *Radix Bupleuri* by HPLC

MAO Ren-gang¹, LIN Dong-hao¹, WANG Zhi-hua², HONG Xiao-kun², PAN Sheng-li³

(1. Xinkang Pharmaceutical Factory, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China;
2. College of TCM, Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China;
3. Pharmaceutical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: **Object** To observe the content of saikosaponin a, c, d (ss a, ss c, ss d) in different species of *Radix Bupleuri* and exploit the medical use of them. **Methods** An optimal RP-HPLC method was set up. The samples were separated by LUNA C₁₈ column with acetonitrile-water as mobile phase in a gradient elution, and detected with UV 210 nm. Comparison was done with the index of ss a, ss c, ss d. **Results** The amount of ss a, ss c, ss d in a variety of species was remarkably different. Among those, the content of *Bupleurum polyclonum* Y. Li et S. L. Pan yielded in Huize, Yunnan Province was the highest. **Conclusion** The HPLC method is suitable and accurate for the quantitative analysis of ss a, ss c, ss d in different species of *Radix Bupleuri*.

Key words: *Radix Bupleuri*; species; saikosaponin a, c, d (ss a, ss c, ss d); HPLC method

柴胡是伞形科(Umbelliferae)柴胡属(*Bupleurum* L.)植物的干燥根, 具有解表和里、疏肝解郁、升举阳气之功效, 为中医治疗少阳证的首选要药。

《中华人民共和国药典》2000 年版规定北柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 和狭叶柴胡 *Bupleurum scorzonerifolium* Willd. (习称南柴胡、红柴胡) 为正品。然而由于我国柴胡属植物品种众多, 除海南外, 全国各地均有分布^[1], 各地对柴胡的用品种意见不一, 加之近年柴胡出口转畅, 内需增加, 市场需求量较大, 而野生资源量减少, 人工栽培生产周期长、产量低, 因此根据当地所产柴胡而作为习惯用药的较为普遍, 各地供以药用的除南、北柴胡外还有同属 20

余个品种^[2]。为考察不同品种柴胡的质量, 本研究采用 RP-HPLC 法对 23 种柴胡样品中柴胡皂苷 a、c、d (saikosaponin a、c、d, 简称 ss a、ss c、ss d) 进行了定量分析。

1 仪器和材料

1.1 仪器、药品: PERKIN ELMER 高效液相色谱仪(series 200 LC 泵、DAD 235 C 型检测器)。甲醇、乙腈(均为国产色谱纯), 氨水(国产分析纯), 柴胡皂苷 a、c、d 对照品由上海医药工业研究院提供。

1.2 实验材料: 不同品种柴胡共 23 个样品, 由复旦大学药学院潘胜利教授鉴定和提供。

2 实验方法及结果

* 收稿日期: 2001-08-07

作者简介: 茅仁刚(1968-)男, 上海人, 工程师, 硕士, 现任上海师范大学新康制药厂技术副厂长, 主要从事中药、天然产物活性成分和制剂研究。Tel: (021) 64322290 E-mail: rgm.ao@eastday.com