

上述色谱条件重复进样 5 次,测定峰面积,结果 $RSD=0.15\%$,表明精密度良好。

3.8 重现性试验:取本品 2.5 g 共 5 份,精密称定,同法测定。梓醇含量为 0.495 mg/g , $RSD=2.07\%$ 。

3.9 回收率试验:精密称取已知含量的样品,精密加入梓醇对照品,按供试品溶液制备方法提取测定,测得梓醇峰面积并计算含量,平均回收率为 97.7% , $RSD=1.54\%$ ($n=5$)。

3.10 样品测定:分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 $10 \mu\text{L}$,按上述色谱条件测定,以外标一点法计算样品中梓醇的含量,结果见表 1。

表 1 阿胶远志膏中梓醇含量 ($n=3$)

Table 1 Content of catalpol in Ejiao Yuanzhi Extractum ($n=3$)

批号	梓醇 $/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$RSD/\%$
000506	0.359	2.01
000508	0.156	1.68
000528	0.200	0.63

4 讨论

4.1 当归中主要含有挥发油、有机酸、糖类、维生素等多种成分,文献报道的定性方法以检测挥发油和

有机酸类的阿魏酸为主。本品中难以检出挥发油成分,同时阿魏酸鉴别阴性有干扰,经过反复摸索,建立了当归其他特征成分的检测方法,也为当归中挥发油、有机酸成分以外的其他当归的水溶性成分建立了很好的薄层鉴别方法。

4.2 在供试品溶液的制备中,经过多方筛选,确定了用大孔吸附树脂柱进行分离纯化。经检验,水洗脱时洗脱液中无梓醇,经过 $200 \text{ mL } 20\%$ 甲醇溶液的洗脱,再用甲醇洗脱,经检测甲醇洗脱液中不含梓醇成分,故确定收集 20% 甲醇洗脱液部分。在流动相的选择上,根据文献报道^[1]进行了反复试验,当减少水的含量而增加乙腈的含量时,虽然洗脱能力增强,但是梓醇的色谱峰与其他色谱峰相互叠加分离不开,干扰严重;当增加水的含量达到水-乙腈 ($99:1$) 时,虽然互不干扰,但是对梓醇的洗脱能力明显减弱,几乎检测不出梓醇的色谱峰,故最终确定流动相为水-乙腈 ($98.5:1.5$)。

References

- [1] Miao M S, Li Z G. *Modern Practical Controlling Technology of Chinese Medicine Qualities* (现代实用中药质量控制技术) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000.

HPLC法测定兔血浆中蛇床子素的含量

安芳,王书华,张丹参,张力*

(河北北方学院 化学药理学教研室,河北 张家口 075029)

蛇床子素又名甲基欧芹酚 (osthol, Ost),是从伞形科植物蛇床成熟果实中提取的香豆素。国产蛇床子主要含香豆素类,其中蛇床子素的含量最高^[1-2]。蛇床子素具有抑制心脏、扩张血管、镇静、镇痛作用,对记忆的保持作用、抗诱变、抗癌作用等^[3-9]。蛇床子素的测定方法报道较多,但在组织和血液中采用 HPLC 法测定蛇床子素的浓度方法未见报道。本实验以丹皮酚为内标,建立了 HPLC 法测定兔血浆样品中蛇床子素含量的分析方法,适用于该药品的临床监控、药动学和生物利用度研究。

1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (美国); D-37520 冷冻离心机 (德国 Heraeus); GR-202 AND 分析天

平 (日本); 756MC 紫外可见分光光度计 (上海)。

蛇床子素 (购自南京药物研究所植化室,纯度为 99%), 乙腈、甲醇为色谱纯; 丹皮酚 (中国药品生物制品检定所,批号 0708-9704); 肝素钠 (北京市海淀区微生物培养基制品厂); 实验用水为三重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 YWG C_{18} ($10 \mu\text{m}$, $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$), 流动相为甲醇-水 ($80:20$), 流速为 1 mL/min , 检测波长为 322 nm , 柱温为 25°C , 进样量为 $10 \mu\text{L}$ 。

2.2 检测波长选择: 精确称取蛇床子素, 加入 N,N -二甲基甲酰胺溶解, 聚山梨酯 80 助溶, 用生理盐水稀释为 $30 \mu\text{g/mL}$ (N,N -二甲基甲酰胺最终浓度

* 收稿日期: 2003-04-18

基金项目: 河北省科技攻关项目 (d00276147)

作者简介: 安芳,男,河北省张家口市人,硕士,副教授,主要从事中药分析与提纯及体内检测的药理研究,发表论文数十篇,其中被 SC 收录 2 篇。Tel (0313) 8045184 E-mail anfang1965@yahoo.com.cn

为 10% ,聚山梨酯 80 的最终浓度为 2%) 精确称取丹皮酚 ,加入乙腈配成 30 μ g/mL 的溶液 ,在 200~350 nm 扫描 ,结果蛇床子素在 203, 257, 322 nm 处有 3 个吸收峰 ,丹皮酚在 214, 277, 313 nm 处有 3 个吸收峰 为减少干扰峰 ,经预试选择 322 nm 作为检测波长。

2.3 给药方式与血浆样品处理: 实验前用 20% 氨基甲酸乙酯麻醉 (5 mL/kg) 新西兰白兔 ,耳 iv 蛇床子素溶液 10 mg/kg ,于注射后不同时间分别由颈动脉插管取血 0.3 mL ,置肝素管中 (内含 1% 肝素 0.5 μ L, 80 $^{\circ}$ C 烘干) ,4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 5 min 取上清液 0.1 mL ,加入 0.2 mL 乙腈 (内含 2 μ g/mL 丹皮酚) ,10 000 r/min 离心 5 min ,上清液过膜 ,取 10 μ L 进样分析。

2.4 方法专属性考察: 在本实验采用的色谱条件下 ,蛇床子素的峰形良好 ,无杂峰干扰 ,见图 1 可见本方法具有较高的专属性 ,灵敏度高 ,分离度较好 ,能准确测定蛇床子素的浓度。

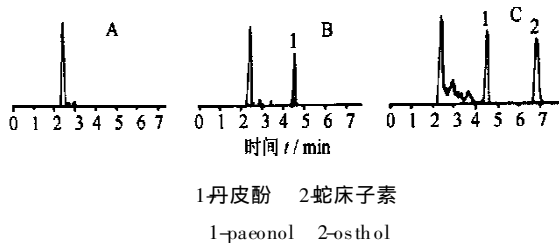


图 1 空白血浆 (A)、内标物丹皮酚 (B) 和供试品 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of plasma (A), internal substance paeonol (B) , and sample (C)

2.5 标准曲线的制备: 精确称取蛇床子素 ,按上法配制 20 μ g/mL 的蛇床子素溶液 分别取兔新鲜血浆 1 mL 加入蛇床子素溶液 ,使其浓度分别为 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 12.0 μ g/mL ,按血样处理方法进行处理分析 以蛇床子素与内标物丹皮酚峰面积比为纵坐标 ,蛇床子素浓度为横坐标 ,绘制标准曲线。以 CASIO fx-570S 上储存的直线回归方程进行回归 ,得标准曲线方程 $Y=0.2410X+0.0101$, $r=0.99998$,线性范围为 0.25~12 μ g/mL

2.6 回收率与精密度试验: 用空白血浆分别配制含蛇床子 3, 6, 12 μ g/mL 的样品 ,按血样处理法处理 ,在日内和日间对每种浓度重复进样 6 次 ,记录峰面积比 ,计算日内和日间 RSD 将峰面积比代入标准

曲线计算血浆浓度 ,计算回收率。结果见表 1 表明蛇床子素的回收率在 97.2%~99.7% ,日内和日间 RSD 均小于 4% ,符合目前生物分析方法指导原则的要求

表 1 血浆中蛇床子素的回收率与精密度试验 (n= 3)

蛇床子 浓度 / (μ g $\cdot$ mL $^{-1}$)	日内精密度与回收率			日间精密度与回收率		
	均值 /	RSD	回收	均值 /	RSD	回收
	(μ g $\cdot$ mL $^{-1}$)	%	率 %	(μ g $\cdot$ mL $^{-1}$)	%	率 %
3.0	2.94 $\pm$ 0.098	3.30	98.02	2.95 $\pm$ 0.100	3.39	98.33
6.0	5.83 $\pm$ 0.120	2.02	97.21	5.98 $\pm$ 0.090	1.53	98.17
12.0	11.96 $\pm$ 0.330	2.76	99.69	11.89 $\pm$ 0.300	2.52	99.08

3 讨论

本实验考察了乙腈-水-三乙胺-甲醇-水不同流动相以及不同比例组成的流动相对分离效果的影响 ,结果显示用甲醇-水 (80:20) 作为流动相 ,操作省时、简便 ,精密度及重现性均较好 ,分离效果较好。以丹皮酚为内标 ,利用 HPLC-UV 法测定兔血浆中蛇床子素的浓度 ,血浆中的内源性物质不干扰蛇床子素及内标的测定 ,适于快速、大量的血浆样品分析。

References

[1] Cheng D D, Zhao J. Determination of coumarin content in *Fructus Cnidii* [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1987, 7(1): 112.

[2] Xiang R D, Zhang X Y, Han Y, *et al.* Effect of active component in *Fructus Cnidii* water-solubility distillation [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(11): 813-815.

[3] Xu S B. Effects of osthol on the electro-physiological activity of isolated cardiac muscle of guinea pig [J]. *J Sun Yat-sen Univ* (中山大学学报), 1990, 29(2): 135.

[4] Li L, Zhuang F E, Zhao G S. Calcium-antagonistic effect of osthol on isolated rabbit aortic strips [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1992, 8(3): 227.

[5] Lian Q S, Hu X, Shuang G Z, *et al.* Effect of osthol on sedation [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2000, 11(4): 244.

[6] Shen L X, Zhang D S, Zhang L, *et al.* Action of osthol on learning and memory and its mechanism analysis [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 1999, 34(6): 405-409.

[7] Shen L X, Jin L Q, Zhang D S, *et al.* Effects of osthol on memory impairment of mice in AlCl₃-induced acute senile model [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 2002, 37(3): 178-180.

[8] Liu D X, Yin X J, Wang H C, *et al.* Effect of osthole water-solubility distillation on antimutagen [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1998, 13(11): 40.

[9] Yin X J, Xiang R D, Liu D X, *et al.* Effect of chemical component in Chinese traditional medicine osthol water-solubility distillation on antimutagen [J]. *Carcinog Teratog Multag* (癌变·畸变·突变), 1999, 11(2): 65.