

表 2 L₉(3⁴) 正交试验结果

Table 2 Results of L₉(3⁴) orthogonal test

实验号	A	B	C	D(空白)	出油量 /(mL)	α-亚麻 酸/%	综合 评分
1	1	1	1	1	64	66.29	3.81
2	1	2	2	2	50	66.07	-1.66
3	1	3	3	3	40	63.18	-8.23
4	2	1	2	3	56	67.08	1.58
5	2	2	3	1	45	64.25	-5.31
6	2	3	1	2	60	71.60	7.50
7	3	1	3	2	40	63.35	-8.07
8	3	2	1	3	75	69.92	11.49
9	3	3	2	1	60	69.20	5.15
K ₁	-6.08	-2.68	22.80	3.65			
K ₂	3.77	4.52	5.07	-2.23			
K ₃	8.57	4.42	-21.61	4.84			
R	14.65	7.20	44.41	7.07			

表 3 方差分析表

Table 3 Variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	38	2	19	4.75	
B	12	2	6	1.5	
C	334	2	167	41.75	P<0.05
D(误差)	8	2	4		
总和	392	8			

$F_{0.05}(2, 2) = 19$ $F_{0.01}(2, 2) = 99$

RP-HPLC 法测定大鼠血浆中苦参碱的含量

何盛江^{1,2}, 宋力², 栾立标^{2*}

(1. 南京海陵中药制药工艺技术研究所有限公司, 江苏 南京 210049; 2. 中国药科大学 药剂学教研室, 江苏 南京 210009)

苦参碱类生物碱以苦参碱为代表, 来源于豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait.、苦豆子 *S. alpeceuroides* L. 及扁豆根 *S. subprostrata* Chun et T. Chen 中^[1]。苦参碱有多方面的药理作用和功效, 如抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗过敏、抗心律失常、消肿利尿、免疫及生物反应调节作用等^[2]。本实验建立了 RP-HPLC 法测定大鼠血浆中苦参碱含量的方法, 为进行苦参碱的药动学研究提供了一个灵敏、可靠的检测手段。

1 仪器与试药

岛津 LC—10AT 高效液相色谱仪, SPD—10A 紫外检测器(日本岛津公司); N—2000 双通道色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所); BS110S 型

高, 容易获得。

3.2 采用超临界萃取技术进行中药的研究开发及产业化具有许多独特的优点: 对提取温度和(或)压力的改变可改变溶解度, 可选择性的进行中药中多种物质的分离, 从而可减少杂质, 使有效成分高度富集, 便于减小剂量和质量控制, 产品外观大为改善; 操作温度低, 可较好地保存有效成分不被破坏, 不发生生化。因此, 特别适合于对热敏感性强、容易氧化分解破坏的成分的提取; 提取时间快、生产周期短, 一般 2~4 h 便可完全提取; 流程简单, 操作方便, 污染小等。

References:

[1] Wang Y Q, Lai B S, Yan X L, et al. Quantitative determination of α-linolenic acid from *Perilla Frutescens* seeds oil [J]. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 1998, 19(2): 91-92.

[2] Zhuang S H, Li M L. The ingredients analysis of the seeds oil of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. [J]. *Acta Agric Boreali-occidentalis Sin* (西北农业学报), 2002, 11(2): 43-45.

[3] Zhen Q, Zhang H. The technology of supercritical-CO₂ fluid extraction of herbal medicine and its issues of industrialization [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2000, 11(12): 1137-1138.

[4] Wang J D, Li X Y, Xu Z C, et al. Determination of α-linolenic acid in the *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. seeds oil by GC [J]. *China New Med* (中国新医药), 2003, 2(10): 17-18.

电子天平(北京赛多利斯天平公司); KQ—250DE 型超声处理仪(昆山市超声仪器有限公司)。

苦参碱对照品(宁夏盐池制药厂提供, 批号: 020711, 纯度为 98.9%), 乙腈(江苏双邦科技有限公司, 色谱纯), 其他试剂均为分析纯, 水为重蒸水。苦参碱氯化钠注射液(5 mL 50 mg)由本实验室自制。

SD 大鼠, 200~250 g, 由中国药科大学实验动物中心提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: ODS C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 大连依立特公司, 5 cm 预柱); 流动相: 乙腈-水(10:90, 磷酸盐缓冲液调 pH 至 2.7); 体积流量: 0.7 mL/min; 检测波长: 220 nm; 柱温: 25; 灵

* 收稿日期: 2003-12-13
作者简介: 何盛江(1975—), 男, 硕士研究生。Tel: (025) 83505999-2888 E-mail: herbsj@elong.com

敏度: 0.02 AUFS。理论塔板数按苦参碱计不低于 2 800。

2.2 方法专属性考察: 将大鼠的空白血浆经预处理后^[3], 取 20 μL 供 HPLC 分析, 所得色谱图见图 1。可见, 在上述色谱条件下, 空白血浆对苦参碱的分析测定无干扰, 方法专属性良好。

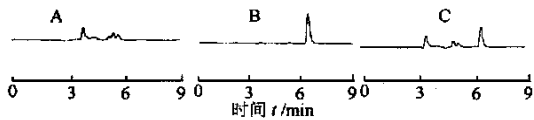


图 1 空白血浆(A)、苦参碱对照品(B)和含苦参碱血浆(C)HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC of blank plasma (A), matrine reference substance (B), and matrine in plasma (C)

2.3 标准曲线及线性范围: 精密称取苦参碱对照品 10 mg, 置 10 mg 量瓶中, 加蒸馏水至刻度。用蒸馏水分别稀释成 0, 2.5, 5.0, 12.5, 25.0, 50.0, 75.0, 125.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液。取试管 8 支, 加大鼠空白血浆 0.2 mL 及上述稀释液各 0.2 mL, 蒸馏水 0.1 mL, 20% 氢氧化钠溶液 0.4 mL, 混合后用乙醚 5 mL 提取, 涡旋振荡 1 min, 离心吸取乙醚层, 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴通氮气挥干乙醚, 残渣加 50 μL 流动相溶解。离心, 取上清液 20 μL 供高效液相色谱分析。对苦参碱峰面积(A)和质量浓度(C)回归, 得到苦参碱在血浆中的标准曲线 $A = 21\,970\,C + 27\,938$, $r = 0.999\,5$, 苦参碱在 1~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与峰面积线性关系良好。

2.4 精密度试验: 用空白血浆配制含苦参碱对照品溶液 5.0, 25.0, 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 分别进样 5 次, 每次 20 μL , 测定峰面积; 计算日内精密度及日间精密度, 结果见表 1。

表 1 精密度试验结果 ($n = 5$)

质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	日内精密度		日间精密度	
	均值	RSD	均值	RSD
	$/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$/\%$	$/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$/\%$
5.0	4.1	3.92	3.9	4.31
25.0	24.3	3.21	24.1	3.62
50.0	48.9	2.12	48.5	2.41

2.5 稳定性试验: 精密吸取含苦参碱的同一样品的溶液 20 μL , 每隔 1 h 进样, 共 4 次, 测定苦参碱峰面积, 计算, 结果 RSD 为 1.39%。说明苦参碱在本色

谱条件下 3 h 内保持稳定, 可适用于体内血药浓度测定。

2.6 加样回收率试验: 精密称取已知含量的苦参碱血浆供试品 3 份, 分别加入苦参碱对照品, 按 2.3 项下方法测定含量, 把结果代入标准曲线, 计算回收率, 结果见表 2。结果表明该方法回收率较高, 能够满足血浆中苦参碱的测定要求。

表 2 回收率试验结果 ($n = 5$)

Table 2 Result of recovery test ($n = 5$)				
质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	加入量 $/\mu\text{g}$	测得量 $/\mu\text{g}$	回收率 $/\%$	RSD $/\%$
5.0	5.0	4.92	98.51	2.11
25.0	12.5	12.42	99.31	1.09
50.0	25.0	24.77	99.12	1.13

2.7 测定结果: 大鼠尾静脉注射 6 mg/kg 后, 血浆中的质量浓度在 1.0~30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。未见到干扰。符合一级消除模型。

3 讨论

实验中血浆处理采用 20% 氢氧化钠碱化, 再用乙醚提取的方法, 使苦参碱在碱性环境下呈分子状态而被乙醚萃取, 内源性杂质含量少, 方法回收率较高。

预试验考察了乙腈与水不同比例的流动相及不同 pH 值对苦参碱出峰时间的影响, 在文献^[4]条件下, 流动相 pH 在 7.6 左右, 苦参碱为分子形式, 即使加入扫尾剂三乙胺, 仍有较为明显的拖尾现象。当用磷酸调节 pH 为 2.7, 在酸性环境下, 苦参碱离子峰形无拖尾, 对称性较好, 能与血浆中的内源性物质得到良好分离。

采用流动相中加入离子对试剂, 血浆中与内源性物质难以分离, 稳定性受影响。在本实验色谱条件下苦参碱的 HPLC 峰出峰时间适宜, 重现性好, 且无离子对试剂, 能延长色谱柱的寿命。

References:

[1] Ch P (中国药典) [S]. Vol . 2000.
[2] Zhang P, Chen W Z. Basic research and clinical application progress of matrine [J]. *People's Mil Surg* (人民军医), 2002, 45(3): 166-167.
[3] Wang P Q, Chen S X, Zhou X B, et al. Pharmacokinetics of matrine in rats [J]. *Acta Univ Med Second Shanghai* (上海第二医科大学学报), 1996, 16(4): 250-253.
[4] Qian F, Shao Y F, Ma Y J, et al. Research of matrine capsule pharmacokinetics and bioavailability [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 1999, 20(5): 333-334.