

• 制剂与质量 •

复方丹参缓释片钙拮抗作用及体外缓释作用的综合评价

邱明丰^{1,2}, 莫尚武³, 罗海燕², 杨远友³, 刘 宁³, 贾 伟¹, 彭 腾²

(1. 上海交通大学药学院, 上海 200030; 2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610075;

3. 四川大学原子核科学技术研究所, 四川 成都 610041)

摘 要:目的 采用⁴⁵Ca跨膜内流测量技术确认复方丹参缓释片及其组分对电压依赖性钙通道(potential dependent Ca²⁺ channel, PDC)钙离子内流的拮抗作用, 探讨其体外缓释作用的综合评价方法。方法 将缓释制剂释放度测定法与⁴⁵Ca跨膜内流测量技术相结合, 在规定的时点取复方丹参缓释片体外释放样品测定。取 Wistar 大鼠胸主动脉, 分成小段依次置于复合电解质溶液(PSS)、⁴⁵Ca-PSS+药”混合液、⁴⁵Ca-PSS+高钾+药”混合液中, 取出动脉环用冷 EGTA 洗涤, 消化。用液体闪烁计数器测量复方丹参缓释片、其组分及体外释放样品的放射性活度。结果 复方丹参缓释片、复方丹参片、丹参脂溶性部位、丹参水溶性部位、三七总皂苷、丹参酮Ⅰ_A、丹参素、原儿茶醛、人参皂苷 Rb1 和三七皂苷 R1 均有极显著的钙拮抗作用, 冰片有显著的钙拮抗作用; 复方丹参缓释片 4 h 开始有显著钙拮抗作用, 6 h 后有极显著钙拮抗作用, 而自制复方丹参片 1 h 即有显著钙拮抗作用, 2 h 后有极显著钙拮抗作用。结论 复方丹参缓释片为钙拮抗剂; 丹参脂溶性部位、丹参水溶性部位、三七总皂苷为钙拮抗有效部位, 丹参酮Ⅰ_A、丹参素、原儿茶醛、人参皂苷 Rb1、三七皂苷 R1 和冰片为钙拮抗有效成分; 与自制复方丹参片比较, 复方丹参缓释片具有延缓起效作用, 通过体外释放样品钙拮抗作用测定, 可以治疗心血管疾病的中药及天然药物制剂的体外缓释作用进行综合评价。

关键词: 复方丹参缓释片; ⁴⁵Ca跨膜内流测量技术; 体外缓释作用; 综合评价

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)03-0354-05

Calcium antagonizing effect of Compound Danshen Sustained-release Tablet and comprehensive evaluation of sustained-release effect *in vitro*

QIU Ming-feng^{1,2}, MO Shang-wu³, LUO Hai-yan², YANG Yuan-you³,
LIU Ning³, JIA Wei¹, PENG Teng²

(1. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China; 2. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 3. Institute of Nuclear Science and Technology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: **Objective** To study the calcium antagonizing effect of Compound Danshen Sustained-release Tablet (CDST) and its ingredients on potential-dependent calcium channel (PDC), comprehensive evaluation method of sustained-release effect *in vitro* by ⁴⁵Ca determination of transmembrane influx technique. **Methods** Samples from release solution of CDST at different time points were taken and tested according to stripping analysis method of sustained-release preparation and ⁴⁵Ca determination of transmembrane influx technique. The small aortic rings from the heart of Wistar rats were prepared and equilibrated in the following solutions: physical saline solution (PSS), ⁴⁵Ca-PSS+drug, and ⁴⁵Ca-PSS+KCl+drug one by one, then rinsed with cold EGTA solution, and finally digested. The radioactivity of the above samples was measured with liquid scintillation counter. **Results** The samples with extremely notable calcium antagonizing effect included CDST, Compound Danshen Tablet (CDT), water-insoluble and water-soluble fractions of Danshen, total saponin from Sanqi (notoginseng), tanshinone I_A, danshensu, protocatechuicaldehyde, ginsenoside Rb1, notoginsenoside R1, and borneol. CDST showed the significant calcium antagonizing effect 4 h later after being taken and extremely significant in 6 h, while the self-prepared CDT showed the significant calcium antagonizing effect 1 h later and extremely significant in 2 h. **Conclusion** It shows that CDST has notable calcium antagonizing effect, whereas water-insoluble and water-soluble fractions of Danshen and total saponin from Sanqi are active fractions of

收稿日期: 2004-10-03

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(30000223)

作者简介: 邱明丰(1970—), 男, 山东省滕州人, 上海交通大学药学院副教授, 中药药理学博士, 主要从事中药新剂型和新制剂研究。
Tel: (021) 62932146 Fax: (021) 62932400 E-mail: mfqiu@sjtu.edu.cn

calcium antagonizing; tanshinone I_A , danshensu, protocatechuic aldehyde, ginsenoside Rb_1 , notoginsenoside R_1 , and borneol are active ingredients. Compared to self-prepared CDT, the slower released effect of CDST is available. Therefore, such a radiolabeled technique is a feasible method for the comprehensive evaluation of calcium antagonizing effect as well as the sustained-release effect *in vitro* of Chinese medicine or natural medicine agents to treat vascular disorders.

Key words: Compound Danshen Sustained-release Tablet (CDST); ^{45}Ca determination of transmembrane influx technique; sustained-release effect *in vitro*; comprehensive evaluation

近代医学研究证明,细胞外的 Ca^{2+} 大量流入心血管细胞被认为是冠心病发病的重要原因,用钙拮抗药物阻滞 Ca^{2+} 内流是西医临床常用的治疗方法。这类药物称为钙拮抗剂(calcium antagonist, Ca-A),又名钙通道阻滞剂(Ca^{2+} channel blocker, CCB),它的发展是近20年来心血管药物研究的一大突破^[1]。自Fleckenstein 1969年首次提出以来^[2],30多年的时间中已取得长足进步^[3]。20世纪80年代初,国内陈可冀教授率先提出关于中药钙拮抗剂(Chinese medicine calcium antagonist, CMCA)的研究方向,目前已经发现140多种中药具有钙拮抗作用^[4,5]。中药复方制剂,特别是新型制剂方面的钙拮抗作用研究尚未见文献报道。为探讨治疗冠心病类复方缓释制剂的缓释作用评价方法,本实验以典型的钙拮抗剂盐酸维拉帕米注射液为阳性对照,采用 ^{45}Ca 跨膜流动测量技术,以治疗冠心病名优产品复方丹参片的新型制剂、体外12 h延缓释放、适于长期用药的“复方丹参缓释片”为样本,研究了复方丹参缓释片、其组分及体外释放样品对电压依赖性钙通道(potential-dependent Ca^{2+} channel, PDC)钙离子内流拮抗作用。

1 仪器和试药

FJ—210TP 液体闪烁计数器(西安二六二厂),ZRS—8G 智能溶出试验仪(天津大学无线电厂),旋转薄膜蒸发仪(上海玻璃仪器二厂),离心机(北京医用离心机厂)。放射性同位素 $^{45}\text{CaCl}_2$ (1 570 MBq/g Ca , 英国 Amersham 公司产品),其余试剂均为市售分析纯。

盐酸维拉帕米注射液(江苏省连云港制药厂,批号为991115,2 mL:5 mg $\times$ 10支)。丹参酮 I_A 、隐丹参酮、丹参酮 I、原儿茶醛、原儿茶酸、人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Rg_1 、三七皂苷 R_1 均购自中国药品生物制品检定所,供含量测定用。丹参素购自上海医科大学药物化学室,经 HPLC 测定纯度在98%以上。Wistar 大鼠,体重(200 $\pm$ 20) g,雌雄各半,华西医科大学实验动物中心提供。

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza*

Bunge 的干燥根及根茎,购自四川省新世界丹参生产基地。三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen 的干燥根,购自成都同仁堂。冰片为合成冰片,又称“合成龙脑”,购自成都同仁堂。均经成都中医药大学药学院严铸云副教授鉴定。

市售复方丹参片由广州白云山中药厂生产,批号为010308。复方丹参缓释片和自制复方丹参片由成都中医药大学中药炮制与药剂教研室提供。

复方丹参缓释片:取丹参,乙醇回流两次(10倍、8倍),每次1.5 h,滤过,减压回收乙醇,浓缩至相对密度为1.15 (50~60 $^{\circ}\text{C}$),喷雾干燥,得脂溶性部位;丹参醇回流后的药渣,水煎煮3次,每次10倍水、1.5 h,浓缩至相对密度为1.15 (50~60 $^{\circ}\text{C}$)时,醇沉,滤过,减压回收乙醇,稀释至规定浓度上大孔吸附树脂柱,水洗除杂,醇洗,收集醇液,减压回收乙醇,真空干燥,得水溶性部位。取三七,粉碎成最粗粉,乙醇回流两次,每次加醇8倍量、回流1.5 h,滤过,减压回收乙醇,浓缩后稀释至规定浓度上D-101皂苷吸附树脂柱,水洗除杂,醇洗,减压回收乙醇近干,真空干燥,即得三七总皂苷。将冰片粉碎成细粉,过筛,备用。依次称取羟丙基甲基纤维素、三七总皂苷粉、丹参脂溶性部位和丹参水溶性部位,等量递加法混匀,乙醇润湿制粒,50 $^{\circ}\text{C}$ 以下烘干,过16目筛整粒,再过50目筛,筛出细粉与冰片、硬脂酸镁、微粉硅胶混匀,然后与颗粒全部混匀,压片。每片0.5 g,含丹参酮 I_A 5.67 mg、丹参素 13.82 mg、原儿茶醛 2.61 mg、三七总皂苷 48.24 mg、龙脑 33.21 mg。

自制复方丹参片:除将可溶性淀粉代替羟丙基甲基纤维素外,均按复方丹参缓释片工艺制备。

复合电解质溶液(PSS溶液): NaCl 137 mmol/L、 CaCl_2 1.5 mmol/L、 MgCl_2 1.0 mmol/L、 KCl 3.0 mmol/L、HEPES 20 mmol/L、葡萄糖 10 mmol/L;高钾 PSS 溶液: KCl 100 mmol/L、 NaCl 400 mmol/L,其余同 PSS 溶液;无 Ca^{2+} -EGTA[钙螯合剂,乙二醇双(α -氨基乙酸)醚四乙酸]洗涤液:EGTA 10 mmol/L,其余成分同 PSS 溶液(无 CaCl_2)。以上溶液用重蒸水配制,pH 7.4。甲苯闪烁液:PPO 5.0 g,

乙二醇乙醚 300 mL, 加甲苯定容至 1 000 mL。

2 实验方法

2.1 样品溶液的制备

2.1.1 制剂供试液: 取复方丹参缓释片、自制复方丹参片和市售复方丹参片分别研细, 前两者取 1 片, 后者取相当剂量的 4.5 片, 精密称重, 分别加 200 mL 重蒸水超声振荡 20 min, 滤过, 备用。

2.1.2 化学成分与提取部位供试液: 取丹参脂溶性部位、丹参水溶性部位、三七总皂苷、丹参酮Ⅱ_A、丹参素、原儿茶醛、冰片等, 加重蒸水超声振荡 20 min 配制成与制剂供试液中成分质量浓度相当的溶液, 质量浓度分别为 0.72、0.73、0.24、0.03、0.07、0.01、0.36 mg/mL, 备用。另取人参皂苷 Rb1、三七皂苷 R1、隐丹参酮、丹参酮Ⅰ、原儿茶酸、人参皂苷 Rg1 等, 精密称重, 加入重蒸水超声振荡 20 min, 配制成质量浓度均为 0.01 mg/mL 的溶液, 备用。

2.1.3 空白对照溶液: 以重蒸水为空白对照溶液。

2.1.4 阳性对照溶液: 以盐酸维拉帕米注射液为阳性对照溶液。

2.1.5 体外释放供试液: 复方丹参缓释片的凝胶骨架材料易吸水膨胀并产生较大的黏性, 易粘于溶出杯底, 故采用转篮法进行测定。取复方丹参缓释片及自制复方丹参片各 1 片, 采用体外释放度测定方法测定, 转速为 (100 ± 1) r/min, 温度为 (37 ± 0.5) °C, 释放介质为蒸馏水 1 000 mL。在上述条件下, 于不同时间点取液 5 mL (取液后立即补加同温度 5 mL 相同介质), 微孔滤膜滤过, 备用。

2.1.6 100% 释放样品供试液: 取复方丹参缓释片和自制复方丹参片, 研细, 取平均片重细粉, 置于 1 000 mL 量瓶中, 加重蒸水至刻度, 超声 20 min, 滤过, 备用。

2.2 ⁴⁵Ca 跨膜内流的测定: 按文献方法^[6~8]。击晕 Wistar 大鼠, 取出胸主动脉, 并置于 PSS 溶液中, 轻轻去除血管外结缔组织, 切成长 2~3 mm 的动脉环 (约 5 mg), 将动脉环置于 PSS 液中 37 °C 下保温 1 h, 顺次移入 “⁴⁵Ca-PSS+药” 混合液中平衡 10 min, “⁴⁵Ca-PSS 高钾+药” 混合液处理 10 min。以上步骤都是在 37 °C 和通 O₂ 条件下进行。再将动脉环取出, 置于 0~2 °C 无钙的 EGTA 溶液中洗涤 1 h, 然后用滤纸吸干动脉环, 称质量, 放入测量瓶中, 加入 70% HClO₄ 25 μL、30% H₂O₂ 50 μL, 于 80 °C 水浴中消化 20 min, 冷却后加入甲苯闪烁液 4 mL, 黑暗中放置 3 h, 用 FJ-210TP 液体闪烁计数器测量放射性活度 (cpm), 随行空白对照、阳性对照, 分别加入 20 μL。

按下式计算, 即为对 PDC 钙通道钙离子内流的拮抗作用。每个样品测定时用 6 个动脉环, 加入 100 L, 平行测定, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 *t* 检验检查显著性。

$$\text{Ca}^{2+} \text{ 内流量 (cpm/mg)} = \frac{\text{放射性活度} - \text{本底 (22)}}{\text{动脉环湿质量}}$$

3 实验结果

3.1 复方丹参缓释片及其组分钙拮抗作用实验结果: 见表 1。复方丹参缓释片、自制复方丹参片、丹参脂溶性部位、丹参水溶性部位、三七总皂苷、丹参酮Ⅱ_A、丹参素、原儿茶醛、人参皂苷 Rb1、三七皂苷 R1 均有极显著的钙拮抗作用, 市售复方丹参片、冰片有显著的钙拮抗作用; 隐丹参酮、丹参酮Ⅰ、原儿茶酸、人参皂苷 Rg1 在此质量浓度下无钙拮抗作用。

表 1 复方丹参缓释片及其组分对大鼠主动脉 PDC 钙通道 Ca²⁺ 跨膜内流的影响 (n=6)

Table 1 Influence of CDST and its fractions on Ca²⁺ transmembrane influx of PDC in rat aorta (n=6)

名 称	质量浓度 /(mg · mL ⁻¹)	Ca ²⁺ PDC 内流量 /(cpm · mg ⁻¹)
空白对照	0	290.70 ± 54.16
阳性对照	0.25	219.00 ± 51.74**
复方丹参缓释片	1 片/200 mL	132.32 ± 14.03**
自制复方丹参片	1 片/200 mL	148.60 ± 21.49**
市售复方丹参片	4.5 片/200 mL	239.35 ± 31.96*
丹参脂溶性部位	0.72	207.05 ± 21.49**
丹参水溶性部位	0.73	193.02 ± 16.00**
三七总皂苷	0.24	122.20 ± 13.51**
冰片	0.36	146.60 ± 40.84*
丹参酮Ⅱ _A	0.03	182.80 ± 24.04**
丹参素	0.07	154.40 ± 14.68**
隐丹参酮	0.01	258.70 ± 42.47
丹参酮Ⅰ	0.01	260.70 ± 32.29
原儿茶醛	0.01	203.90 ± 24.04**
原儿茶酸	0.01	284.10 ± 14.40
人参皂苷 Rg1	0.01	251.20 ± 33.98
人参皂苷 Rb1	0.01	145.70 ± 14.18**
三七皂苷 R1	0.01	151.10 ± 24.09**

与空白对照组比较: *P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs blank control

3.2 体外释放样品测定结果: 见表 2。复方丹参缓释片在 1~12 h 内钙拮抗作用呈增强趋势, 从 4 h 起开始有显著钙拮抗作用, 6 h 后有极显著钙拮抗作用, 18、24 h 有显著性钙拮抗作用, 但比 4~15 h 作用弱; 自制复方丹参片 1 h 起开始有显著钙拮抗作用, 2 h 后有极显著钙拮抗作用, 18、24 h 有显著性钙拮抗作用, 但比 4~15 h 作用弱。与自制复方丹参片比, 复方丹参缓释片起效缓慢, 证明有延缓起效的作用。

4 讨论

据报道, 血管平滑肌上至少存在 3 种钙通道:

表 2 复方丹参缓释片体外释放样品对大鼠主动脉 PDC 钙通道 Ca^{2+} 跨膜内流的影响 ($n=6$)

Table 2 Influence of *in vitro* release solution of CDST on Ca^{2+} transmembrane influx of PDC in rat aorta ($n=6$)

药组名称	质量浓度 /($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Ca^{2+} PDC 内流量 /($\text{cpm} \cdot \text{mg}^{-1}$)
空白对照	0	290.7 ± 54.16
阳性对照	0.25	$219.0 \pm 51.74^{**}$
复方丹参缓释片(1 h)		263.2 ± 10.91
(2 h)		243.8 ± 22.76
(4 h)		$230.4 \pm 18.24^{*}$
(6 h)		$214.5 \pm 14.02^{**}$
(8 h)		$210.6 \pm 14.93^{**}$
(10 h)		$202.4 \pm 29.93^{**}$
(12 h)		$201.5 \pm 19.73^{**}$
(15 h)		$218.2 \pm 28.24^{**}$
(18 h)		$225.3 \pm 25.45^{*}$
(24 h)		$231.8 \pm 23.63^{*}$
100% 样品释放供试液		$200.8 \pm 14.97^{**}$
自制复方丹参片(1 h)		$227.5 \pm 13.80^{*}$
(2 h)		$207.2 \pm 16.67^{**}$
(4 h)		$208.1 \pm 13.91^{**}$
(6 h)		$210.6 \pm 25.31^{**}$
(8 h)		$211.8 \pm 28.72^{**}$
(10 h)		$213.6 \pm 29.68^{**}$
(12 h)		$215.4 \pm 27.83^{**}$
(15 h)		$219.7 \pm 17.25^{**}$
(18 h)		$225.8 \pm 24.34^{*}$
(24 h)		$229.6 \pm 31.55^{*}$
100% 样品释放供试液		$206.7 \pm 31.90^{**}$

与空白对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs blank control

(1) 溢流钙通道(leak channel, LC), 为细胞处于静息状态下的 Ca^{2+} 内流; (2) 电压依赖性钙通道(potential-dependent Ca^{2+} channel, PDC), 为细胞去极化兴奋时的 Ca^{2+} 内流; (3) 受体操纵性钙通道(receptor-operated channel, ROC), 去甲肾上腺素等与膜受体结合后使其活化, 除引起细胞外 Ca^{2+} 内流, 还促进细胞内储存的 Ca^{2+} 释放到胞浆内^[1]。实验证明, 当高钾引起平滑肌细胞去极化, 导致 PDC 开放时, Ca^{2+} 内流量较 LC 和 ROC 通道转移都强, 也较为稳定^[9,10]。因此, 本实验中采用 PDC Ca^{2+} 内流测定方法测定药物的钙拮抗作用。实验结果表明, 经过改进工艺、剂型优化的复方丹参缓释片与自制复方丹参片、市售复方丹参片都能有效地阻滞 PDC, 减少 Ca^{2+} 内流, 均为中药钙拮抗剂; 丹参脂溶性部位、丹参水溶性部位、三七总皂苷为钙拮抗有效部位, 丹参酮 I_A、丹参素、原儿茶醛、人参皂苷 Rb1、三七皂苷 R1 和冰片为钙拮抗有效成分。本实验首次将 ^{45}Ca 跨膜内流测量技术应用于中药复方缓释制

剂的研究, 并确认复方丹参缓释片为钙拮抗剂, 为此技术用于其缓释作用的综合评价提供了依据。

本实验以复方丹参片为样本, 针对中药复方物质基础较为复杂、具有多成分、多靶点、多层次作用的特点, 以及中药复方缓释剂型研究发展的难点问题——如何对中药复方缓释剂型进行评价, 运用多学科交叉的手段, 将现代中药缓释制剂技术与核技术、生物技术与药理相结合, 在复方丹参缓释片研制的基础上, 引入 ^{45}Ca 跨膜内流测量技术, 针对钙离子内流过多的冠心病发病机制, 采用对大鼠主动脉 PDC 的拮抗作用, 探讨并综合评价复方丹参缓释片体外缓释作用, 结果表明与自制复方丹参片比具良好的缓释作用。在体内缓释作用情况如何、体内含药血清钙拮抗作用持续时间有多长, 将另文阐述。

本实验采用了 ^{45}Ca 跨膜内流测量新技术进行了中药复方缓释制剂及体外缓释作用的综合评价, 以期治疗冠心病类中药复方缓释新剂型的评价探索出一种新方法, 改变测定单一成分或某一有效部位不能综合评价、用药效实验评价费时费钱且操作烦琐的局面, 并可广泛拓展应用到使用钙拮抗剂治疗的心律失常、脑血管痉挛、支气管哮喘、食道痉挛、肾绞痛、脑梗死、癫痫等相关疾病中, 具有临床价值。

^{45}Ca 跨膜内流测量技术是核技术、生物技术多学科结合的新技术, 基本原理为同位素示踪法, 这种示踪技术的目标是生物细胞膜上的 PDC。通过阳性对照和空白对照组组间 t 检验来验证测试方法及操作的可行性; 通过药物组和空白对照组组间 t 检验检查钙拮抗作用的有无和强弱, 具显著性和极显著性的样品为有钙拮抗作用, 具极显著性的样品钙拮抗作用强于具显著性的样品。复方丹参缓释片与自制复方丹参片在 15 h 后钙拮抗作用降低, 也低于相应制剂 100% 释放样品的钙拮抗作用, 可能原因是有效成分在人工胃液中发生变化、冰片挥发减少, 或者多次取样使有效成分浓度有所降低所致。市售复方丹参片比复方丹参缓释片、自制复方丹参片活性低, 可能与所用制剂原料、制备工艺条件有关。后两者为相同的中药材原料制成, 并对丹参、三七有效部位进行了分离精制, 所以活性基本相近; 而市售复方丹参片是按《中华人民共和国药典》2000 年版制备工艺要求制备的, 与后两者所用中药材原料不同, 其中丹参未分离有效部位, 三七采用的是药粉。

References:

- [1] Dong H, Yang Z C. ^{45}Ca transmembrane influx technique and its application in calcium antagonist research [J]. *Adv Physiol Sci* (生理科学进展), 1990, 21(2): 171-174.

- [2] Fleckenstein A. Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers and vascular smooth muscle [J]. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 1977, 17: 49-66.
- [3] Guan Y Y, Chen K M, Sun J J. α 1-Adrenoceptors mediate the response to BHT-920 and rauwolfscine in dog mesenteric artery after partial depolarization by KCl [J]. *Eur J Pharmacol*, 1991, 200: 283-289.
- [4] Wang X, Han G Q, Li R Z, et al. Screening on common Chinese herbal and traditional drugs by modern biological analyzing methods [J]. *J Beijing Med Univ* (北京医科大学学报), 1986, 18(1): 31-36.
- [5] Dai W S, Rao G X, Dai Y H, et al. Chinese herbs and their active components of Ca^{2+} antagonistic effect [J]. *J Yunnan Coll Tradit Chin Med* (云南中医学院学报), 1994, 17(2): 25-29.
- [6] Mo S W, Liu N, Jin J N, et al. Influence of Huatan Yuxin Decoction and its functional herbal group on Ca^{2+} transmembrane influx in rat aorta [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24(1): 232-233.
- [7] Yang Y Y, Liu N, Qin M F, et al. Studies on functional fractions of fructus trichosanthes cortex by ^{45}Ca isotopic technique [J]. *Nuclear Tech* (核技术), 2002, 25(5): 345-348.
- [8] Yang Y Y, Liu N, Mo S W, et al. Study on Ca^{2+} antagonistic effect and mechanism of Chinese herbal drugs using ^{45}Ca [J]. *J Isotopes* (同位素), 2002, 15(2): 69-73.
- [9] Mo S W, Chen H L, Liu N, et al. Influence of *Flos Carthami* on Ca^{2+} transmembrane influx in rat aorta by using ^{45}Ca [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 26(10): 532-534.
- [10] Chen H L, Mo S W, Chen F, et al. Studying on Chinese herbal drugs by using ^{45}Ca transmembrane influx technique [J]. *J Sichuan Univ—Nat Sci* (四川大学学报·自然科学版), 1994, 31(4): 501-507.

RP-HPLC 法测定灌胃赤芍胡椒复方小鼠血浆中芍药苷的含量

裴瑾^{1,2}, 杨祖贻^{1*}, 刘荣敏¹, 程佳¹, 万德光², 胡荣²

(1. 四川省肿瘤研究所, 四川 成都 610041; 2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610075)

摘要:目的 建立小鼠口服赤芍胡椒复方后血浆中芍药苷浓度的 RP-HPLC 定量分析方法。方法 以甲醇-水 (38:62) 为流动相。色谱柱为 Kromasil C_{18} (250 mm×4.6 mm, 7 μm), 体积流量为 0.5 mL/min, 以二极管阵列检测器获取 230 nm 波长下数据, 采用外标定量法。结果 芍药苷与血浆中其他成分能很好分离, 芍药苷在 5.0~250.0 ng/ μL 线性关系良好 ($r=0.9999$), 最低检测质量浓度为 1.49 ng/ μL , 平均回收率大于 90%。结论 本方法准确性、灵敏度、专一性高, 可为芍药苷的体内血浆药物浓度分析提供有意义的方法学参考。

关键词: 赤芍胡椒复方; 芍药苷; 高效液相色谱; 血药浓度

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2005)03-0358-03

Determination of paeoniflorin in mouse plasma after ig compound decoction of *Radix Paeoniae Rubra* with *Fructus Piperis* by RP-HPLC

PEI Jin^{1,2}, YANG Zu-yi¹, LIU Rong-min¹, CHENG Jia¹, WAN De-guang², HU Rong²

(1. Sichuan Cancer Institute, Chengdu 610041, China; 2. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

Abstract: **Objective** An HPLC method was established for determination of paeoniflorin in plasma after ig compound decoction of *Radix Paeoniae Rubra* with *Fructus Piperis* to mice. **Methods** The conditions of chromatography: Kromasil C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 7 μm) was used with a mobile phase of $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (38:62); flow rate was 0.5 mL/min; the detecting wavelength was 230 nm; external standard method was quantitative analysis method. **Results** Paeoniflorin was fully separated from the other components in plasma. The linear range was 5.0—250.0 ng/ μL ($r=0.9999$), the lowest detectability was 1.49 ng/ μL , the average recovery was higher than 90%. **Conclusion** This method specially provides an accurate and sensitive way in detecting the *in vivo* blood concentration of paeoniflorin in plasma.

Key words: compound decoction of *Radix Paeoniae Rubra* with *Fructus Piperis*; paeoniflorin; HPLC; blood concentration

收稿日期: 2004-06-06

基金项目: 国家中医药管理局科研基金资助项目 (02-03ZP50); 四川省中医药管理局科研基金资助项目 (200217)

作者简介: 裴瑾 (1970—), 女, 四川成都人, 博士, 讲师, 主要从事中药质量研究工作。Tel: (028) 81607731

* 通讯作者 Tel: (028) 85420916 E-mail: chianghm@163.com