

- [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

赤芍胡椒复方是中药活血温里复方中的一种基本配伍形式,主治寒凝血滞引起的多种疼痛症,方中赤芍活血化瘀,胡椒温里散寒,在该配伍中温里药可增加活血药的临床疗效。芍药苷是赤芍主要有效成分之一,具有抗血栓形成、抗血小板凝集、抗凝血等作用。选择芍药苷作为赤芍的效应成分具有一定的代表意义。为说明复方配伍的药效物质基础及作用机制,有必要对复方的主要活性成分进行动物体内的定性、定量分析。但体内药物成分分离、分析、测定难度较大,因此建立适合于该复方主要活性成分的分析方法尤为重要。本研究建立的小鼠口服赤芍胡椒复方后芍药苷血浆药物浓度分析方法,为活血温里复方药物配伍机制深入研究奠定了药动学基础。

1 材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪,二极管阵列检测器,Agilent 色谱数据处理系统。芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号:0736-200219),所用甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为重蒸去离子水。赤芍、胡椒药材购自四川省中药材公司,经成都中医药大学万德光教授鉴定为川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch 的干燥根、胡椒 *Piper nigrum* L. 的干燥果实。赤芍提取物(PE)、赤芍胡椒复方提取物(PPE)由四川省肿瘤研究所制备。

2 方法

2.1 色谱条件:色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm,7 μm);流动相:甲醇-水(38:62);体积流量:0.5 mL/min;二极管阵列检测波长:230 nm;柱温:25℃;灵敏度:0.01 AUFS;进样量:10 μL。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取芍药苷对照品适量,加甲醇溶解,制成0.50 mg/mL的对照品溶液,置于4℃冰箱备用。

2.3 血浆样品的制备:将小鼠随机分为空白对照组、对照组和实验组,每组10只。空腹14 h后,根据小鼠体重按剂量ig,给予空白对照组水、对照组赤芍提取物、实验组赤芍胡椒复方,ig后于1.0 h眼眶取静脉血0.5 mL,用肝素血液抗凝,离心取上清液获得血浆。

2.4 血样的预处理:用微量加样器取100 μL血浆,置于0.5 mL高速离心管中,加入3倍体积的乙醇,电动混匀器充分混匀后经5 000~10 000 r/min离心15~20 min,取上清液于0.5 mL试管中,37℃水浴挥干,用50 μL甲醇重溶,再次5 000~10 000 r/min离心15~20 min,取上清液置微量进样管中。

2.5 系统适用性考察:取小鼠空白血浆加入芍药苷

对照品溶液,另取对照组血浆,各5份,按血样预处理方法处理,分别进样、测定,其峰面积RSD分别为3.48%、4.03%。

2.6 方法专属性考察:在上述色谱条件下,分别测定芍药苷对照品、赤芍提取物、胡椒提取物、空白对照组、对照组、实验组血浆。可见芍药苷与血浆中蛋白杂峰、内源性物质、赤芍提取物的其他成分以及这些成分的体内代谢物和结合性成分均能很好的分离。

3 结果

3.1 色谱分离:在上述色谱条件下,赤芍提取物及血样中的芍药苷与其他物质完全分离,空白血浆、胡椒提取物均无干扰,通过二维、三维色谱图对其吸收峰定性,其保留时间均与对照品一致(图1)。

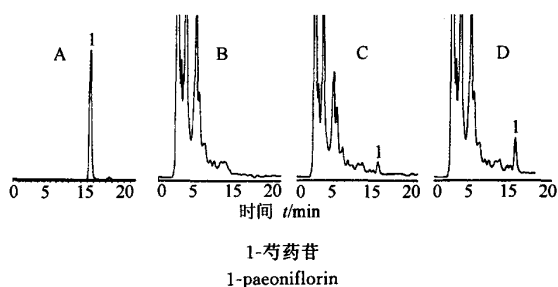


图1 芍药苷对照品(A)、空白血浆(B)、ig PE对照(C)和ig PPE实验组(D)的HPLC图

Fig. 1 HPLC chromatograms of paeoniflorin reference substance (A), blank plasma (B), plasma of mice after ig PE (C), and plasma of mice after ig PPE (D)

3.2 标准曲线及线性范围:分别取芍药苷对照品溶液1.5、10、50 μL,室温下分别加入空白血浆50 μL,再加入甲醇定容至100 μL,按色谱条件下操作测定,以芍药苷峰面积与对应进样质量浓度进行线性回归,得芍药苷的回归方程为 $C=4.037 \times 10^{-4} A - 1.098 \times 10^{-3}$, $r=0.9999$ ($n=5$)。结果表明血浆中芍药苷在5.0~250.0 ng/μL与峰面积线性关系良好。

3.3 最低检测浓度测定:以信噪比(S/N)为3时的芍药苷对照品质量浓度为分析方法的检测限。取质量浓度为0.050 mg/mL的芍药苷对照品溶液0.5、1.5、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 μL分别加入到50 μL空白血浆中,按血样预处理方法处理后进样分析。结果本方法的检测限为1.49 ng/μL。

3.4 精密度试验:芍药苷对照品溶液在1 d内连续进样,测定5次,其峰面积日内RSD为1.02%;同法测定对照组、实验组血浆样品,芍药苷峰面积RSD分别为2.36%、3.13%;另连续测定5 d芍药苷对照品溶液、对照组、实验组血浆样品中芍药苷峰面积日间RSD分别为2.35%、4.12%、4.63%。表

明方法精密度较好,符合体内药物浓度测定的要求。

3.5 回收率试验:精密量取芍药苷对照品溶液5、10、20、40 μL ,室温下分别加入空白血浆50 μL ,再加入甲醇定容,制成一定质量浓度的芍药苷血浆对照品溶液,摇匀后按血样预处理项下处理、测定,结果见表1,不同质量浓度下均有大而稳定的回收率。

表1 血浆中芍药苷的回收率试验 ($n=3$)

Table 1 Recoveries of paeoniflorin in plasma ($n=3$)

对照品溶液质量浓度 /($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	测得质量浓度 /($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	平均回收率 /%	RSD /%
19.23	18.07	93.96	4.78
38.46	35.96	93.50	7.78
76.92	69.23	90.00	9.23
153.85	160.94	104.61	7.61

3.6 血药浓度的测定:取已制备好的血浆样品,按上述色谱条件测定,由标准曲线计算出芍药苷的血药浓度。小鼠ig赤芍提取物后血浆中芍药苷质量浓度为 $(42.28 \pm 4.43) \text{ ng}/\mu\text{L}$ ($n=10$),ig赤芍胡椒复方后血浆中芍药苷质量浓度为 $(78.56 \pm 5.61) \text{ ng}/\mu\text{L}$ ($n=10$)。

4 讨论

目前复方给药后血浆中药物效应成分可以定量的理论已经提出,但研究中药的体内代谢及中药主要有效成分体内检测方法是一个比较薄弱的方面。本研究参考有关文献^[1~3],经反复对比试验,最后选

定甲醇-水(38:62)为流动相,在此条件下,小鼠血浆中芍药苷与血浆中蛋白杂峰、内源性物质、芍药提取物的其他成分以及这些成分的体内代谢物和结合性成分均能很好的分离,峰形良好,且主峰时间适宜(芍药苷保留时间约13 min)。本方法最低检测质量浓度为 $1.49 \text{ ng}/\mu\text{L}$,平均回收率大于90%,日内、日间RSD均小于10%,精密度好,符合体内药物浓度测定的要求。

在血液样品处理中筛选了甲醇、乙醇、加热等方法,最终采用乙醇沉淀蛋白,操作程序简便,样品损失率低。本检测方法的建立为活血温里复方中活血药主要有效成分血药浓度和生物利用度的研究提供了可靠的检测方法。

致谢:四川大学周文铨教授,四川省肿瘤研究所董昱研究员、唐小海主任医师对本研究工作的支持。

References:

- [1] Guo L W. *The Method and Application of Pharmacokinetics of Chinese Traditional Drugs* (中药药物动力学方法与应用) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.
- [2] Han G Z. *Pharmacokinetics of Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药药代动力学) [M]. Beijing: China Medicopharmaceutical Science and Technology Publishing House, 1999.
- [3] Lu Q Z, Wang X H, An R, et al. Determination of ferulic acid and paeoniflorin in Huoxue Mixture by HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2002, 24(9): 668-669.

丹参水溶性成分 HPLC 指纹图谱指纹对照品对照法的研究

宋 敏,杭太俊*,张正行

(中国药科大学 药物分析室,江苏 南京 210009)

摘要:目的 建立 HPLC 法测定丹参药材水溶性成分的指纹图谱标准,确定指纹对照品对照法的作用,实现丹参药材指纹图谱标准的重现与易控。方法 采用 C_{18} 色谱柱,甲醇-1.0%冰醋酸溶液梯度程序洗脱,体积流量为 $1.0 \text{ mL}/\text{min}$ 。以丹参对照药材制备指纹对照品进行色谱系统适用性试验,考察梯度洗脱程序、流动相酸度以及色谱柱填充剂对指纹图谱重现性的影响。结果 建立的指纹图谱测定系统,对丹参水溶性成分分离良好,选择色谱图中15个特征峰作为指纹峰。将不同产地的10批药材的指纹图谱与同时测定的指纹对照品图谱进行比较,结果即使改变色谱柱填充剂也可以获得一致的相似性评价结论。结论 色谱指纹图谱可以体现药材中多个成分的信息,但色谱系统的变化对指纹图谱的重现性有很大的影响,而且在不同的色谱柱条件下所得的指纹图谱结果不尽相同。因而为了实现指纹图谱标准的重复可控,应同时规定指纹图谱测定的色谱系统适用性条件和指纹对照品。

关键词:丹参;高效液相色谱法;指纹图谱;指纹对照品

中图分类号:R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)03-0360-05

收稿日期:2004-05-18

作者简介:宋 敏(1977—),女,重庆人,博士研究生,研究方向为色谱与光谱分析。

Tel: (025) 83271090 E-mail: cqsongmin@sina.com

* 通讯作者