

HPLC法测定灌胃当归胡椒复方小鼠血浆中阿魏酸的含量

裴瑾¹, 杨祖贻^{2*}, 刘荣敏², 陈佳², 万德光¹, 胡荣¹

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

摘要:目的 建立灌胃当归胡椒复方小鼠的血浆中阿魏酸的分析方法。方法 采用HPLC法,以甲醇-水-冰醋酸(36.4:63:0.6)为流动相,色谱柱Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 7 μm)为固定相,体积流量1.0 mL/min,紫外检测波长322 nm。采用外标法定量。结果 阿魏酸与血浆中其他组分能很好分离,阿魏酸在1.88~188.00 ng/μL线性关系良好($r=0.999$),最低检测浓度0.47 ng/μL,平均回收率为94.85%。结论 本方法具有准确、灵敏、专一性高等特点,适于阿魏酸的药浓度测定及药动学研究。

关键词:当归胡椒复方;阿魏酸;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)04-0523-03

Determination of ferulic acid in plasma of mice plasma administered with Danggui Hujiao Decoction by HPLC

PEI Jin¹, YANG Zu-yi², LIU Rong-min², CHEN Jia², WAN De-guang¹, HU Rong¹

(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China;

2. Sichuan Cancer Institute, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To establish an analytical method for determination of ferulic acid in Danggui Hujiao (*Radix Angelicae Sinensis* and *Fructus Piperis*) Decoction in mouse plasma. **Methods** HPLC method was used. The conditions of chromatography: Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 7 μm) was used with a mobile phase of CH₃OH-H₂O-CH₃COOH (36.4:63:0.6). Flow rate was 1.0 mL/min. The detecting wavelength was 322 nm. External standard method was quantitative analysis method. **Results** The ferulic acid could be totally separated from other ingredients in plasma. The linear range was 1.88—188.00 ng/μL ($r=0.999$), the lowest detectability was 0.47 ng/μL, and the average recovery was 94.85%. **Conclusion** This method provides an accurate and sensitive way in detecting blood concentration of ferulic acid and studying in pharmacokinetics.

Key words: Danggui Hujiao (*Radix Angelicae Sinensis* and *Fructus Piperis*) Decoction; ferulic acid; HPLC; blood concentration

当归胡椒复方是中药活血温里复方中的一种基本配伍形式,该配伍通过温里药胡椒增加活血药当归的临床疗效。为说明活血药与温里药配伍的药效物质基础及作用机制,建立适合于该复方主要活性成分的体内分析方法尤为重要。阿魏酸是当归的主要有效成分之一,具有增加冠脉血流量、保护缺血心肌、抗血小板聚集、抗血栓形成、抗脂质过氧化等生理活性。本研究建立的灌胃当归胡椒复方小鼠体内阿魏酸的药浓度分析方法为活血温里复方药物配伍机制的进一步深入研究奠定了药动学基础。

1 仪器与试剂

岛津10A高效液相色谱仪,N2000浙江智达色谱工作站。阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定

所,批号0773-9910,纯度为99.4%),所用甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为重蒸去离子水。当归、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。当归提取物、当归胡椒复方提取物由四川省肿瘤研究所制备。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱:Kromasil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 7 μm);流动相:甲醇-水-冰醋酸(36.4:63:0.6);体积流量:1.0 mL/min;检测波长:322 nm;柱温:室温;灵敏度:0.05 AUFS。

2.2 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 给药,给予空白对照组水、对照

收稿日期:2004-08-20

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)

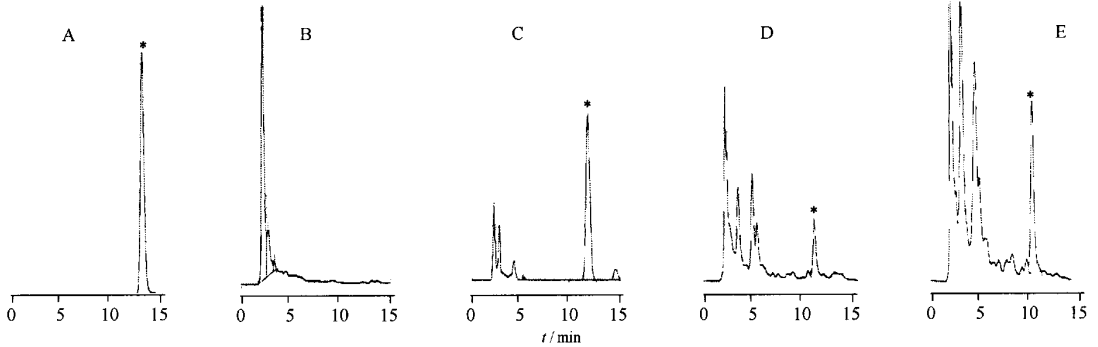
作者简介:裴瑾(1970—),女,四川成都人,中药学博士,副教授,主要从事中药质量研究工作。Tel:(028)66683824

*通讯作者 Tel:(028)85420350 E-mail:chianghm@163.com

组当归提取物(以阿魏酸计 100 mg/kg)、实验组当归胡椒复方提取物(以阿魏酸计 100 mg/kg)。ig 后 0.5 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。用微量加样器取 100 μ L 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,取上清液置于 0.5 mL 试管中,置于 37 $^{\circ}$ C 水浴挥干,用 50 μ L 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,备用。

2.3 方法专属性考察:取小鼠空白血浆、空白血浆加入对照品、对照组、实验组血浆各 5 份,按血样处理方法处理,分别进样、测定。在上述色谱条件下,阿魏酸与血浆中蛋白质杂峰、内源性物质均能很好的分离,当归、当归胡椒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,见图 1。



A-阿魏酸对照品 B-空白血浆 C-空白血浆+阿魏酸 D-对照组 E-实验组 * -阿魏酸

A-ferulic acid reference substance B-blank plasma C-blank plasma + ferulic acid D-control group E-experiment group * -ferulic acid

图 1 小鼠血浆样品的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mouse plasma sample

2.4 标准曲线的绘制:精密称取阿魏酸对照品,加甲醇溶解,制成 0.47 mg/mL 的对照品溶液。分别取对照品溶液 0.2、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0 μ L,室温下挥干,分别加入空白血浆 100 μ L,按血浆样品的制备方法处理、测定。以阿魏酸峰面积与对应进样量进行线性回归,得此条件下阿魏酸的回归方程为 $C=8.10368 \times 10^5 A-9.98482$, $r=0.999$ 。结果表明血浆中阿魏酸在 1.88~188.00 ng/ μ L 线性关系良好。

2.5 最低检测浓度的测定:取 0.047 mg/mL 阿魏酸对照品溶液 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、5.0 μ L 分别加入到 100 μ L 空白血浆中,按血样预处理方法处理后,进样、分析。以信噪比(S/N)为 3 时的阿魏酸质量浓度作为本法的检测限,结果最低检测限为 0.47 ng/ μ L。

2.6 精密度试验:阿魏酸对照品溶液,对照组、实验组血浆样品在 1 d 内连续进样测定 5 次,以峰面积计其日内 RSD 分别为 2.31%、3.53%、4.08%;另连续测定 5 d,日间 RSD 分别为 3.05%、4.66%、3.83%。

2.7 方法回收率试验:精密量取阿魏酸对照品溶液 5、10、20 μ L,室温下分别加入空白血浆 100 μ L,摇

表 1 方法回收率试验结果 (n=5)

Table 1 Results of recovery test (n=5)

阿魏酸加入量 /(ng \cdot μ L $^{-1}$)	测得量 /(ng \cdot μ L $^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)	平均回收率 /%	RSD /%
47.00	45.22 \pm 7.34		
94.00	88.86 \pm 10.27	94.85	2.52
188.00	176.38 \pm 15.98		

匀后按血样预处理项下处理、测定。结果见表 1。可见,不同质量浓度下均有大而稳定的回收率。

2.8 血药浓度的测定:取制备的血浆样品,按上述色谱条件测定,由标准曲线计算出阿魏酸的血药浓度。对照组小鼠血浆中阿魏酸质量浓度为(62.10 \pm 5.35) ng/ μ L (n=10),实验组小鼠血浆中阿魏酸质量浓度为(115.87 \pm 9.40) ng/ μ L (n=10)。

3 讨论

目前我国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环节。人、大鼠血清中阿魏酸的 HPLC 法测定已有相关文献报道^[1~3],但多采用以香豆素为内标的内标法进行,可消除一部分由于预处理过程中造成的误差。经反复对比试验,本实验建立了外标法直接测定小鼠血浆中阿魏酸的质量浓度,操作相对简便,平均回收率为 94.85%,符合体内药物浓度测定的要求。

筛选了适宜的流动相甲醇-水-冰醋酸(36.4 : 63 : 0.6),在此条件下,阿魏酸与血浆中蛋白质杂峰、内源性物质、当归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,且阿魏酸保留时间适宜(约10 min),最低检测质量浓度1.49 ng/ μ L,精密度好。

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阿魏酸血药浓度和生物利用度的研究提供了可靠的检测方法。

References:

- [1] Liu W J, Yang L, Qin W J. Determination of ferulic acid in rat serum by HPLC after oral administration of Shuguan Liquid extract [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2001, 36 (5): 339-340.
- [2] Huang J Q, Huang X, Zhang L, et al. Improved RP-HPLC method for determination of ferulic acid concentration in human serum [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (9): 792-794.
- [3] Xia D Y, Guo T, Pan W H, et al. Determination of plasma level of ferulic acid in Xinshu Oral Liquid by HPLC and its *in vivo* pharmacokinetics in rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35 (1): 36-38.

从枳壳中分离纯化新橙皮苷对照品

许永兴,瞿海斌,程翼宇*

(浙江大学 中药科学与工程学系,浙江 杭州 310027)

摘要:目的 从枳壳提取物中分离纯化高纯度新橙皮苷。方法 枳壳提取物经大孔树脂处理后,用正丁醇萃取分离、浓缩,将浓缩物重结晶3次。正丁醇萃取物的浓缩是关键。结果 优化的枳壳提取物中分离新橙皮苷的工艺使新橙皮苷的纯化得率达48.6%,纯度达98.7%。结论 该方法简单易行,为制备高纯度的新橙皮苷提供了一种经济的、可行的方法。

关键词:枳壳;新橙皮苷;分离;纯化

中图分类号:R284.2; R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2005)04-0525-03

Isolation and purification of neohesperidin reference substance from *Fructus Aurantii*

XU Yong-xing, QU Hai-bin, CHENG Yi-yu

(Department of Chinese Medicine Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310072, China)

Abstract: Objective To isolate and purify high-purity neohesperidin from *Fructus Aurantii* extract. **Methods** *Fructus Aurantii* extract was treated by macroporous resin and extracted by *n*-butanol, then concentrated and some solid was precipitated. After crystallizing the precipitate three times, neohesperidin was obtained. The concentration of *n*-butanol extract was optimized, which was of great importance in the whole preparation. **Results** The yield of neohesperidin was 48.6% and purity of neohesperidin was up to 98.7% in *Fructus Aurantii* extract. **Conclusion** High-purity neohesperidin could be prepared feasibly and economically by proposed method.

Key words: *Fructus Aurantii*; neohesperidin; isolation; purification

新橙皮苷属于黄酮体化合物中的二氢黄酮类,通常在酸橙、枳实、枳壳、陈皮中含量较高。新橙皮苷经氢化处理后形成新橙皮苷二氢查耳酮,是一种特殊的甜味剂,其甜度是蔗糖的1 000倍。而且新橙皮苷具有较好的耐热性和耐酸性,在食品的杀菌和加工过程中很稳定,可广泛应用于热处理的食品。目前,新橙皮苷在欧美一些国家已开始应用,但由于生产成本较高,使用受到限制。另外,也有报道新橙皮

苷二氢查耳酮是一种前景广阔的新型药用赋型剂。

新橙皮苷多从柑橘类植物中提取,但柑橘类植物中除了新橙皮苷之外,往往还含有柚皮苷、橙皮苷等理化性质非常接近的黄酮苷类物质,这使得从柑橘类植物中分离新橙皮苷非常困难。Del Rio等研究了西班牙产的不同品种、不同季节的柑橘中的新橙皮苷、柚皮和橙皮苷的含量,选择了一个新橙皮苷含量很高,而柚皮和橙皮苷含量很少的柑橘品种来提

收稿日期:2004-06-04

基金项目:国家自然科学基金重大研究计划资助项目(90209005)

作者简介:许永兴(1976—),男,浙江东阳人,硕士研究生,研究方向为制药工程。

* 通讯作者 E-mail: chengyy@zju.edu.cn