

6 倍量, 改良油水分离器中加 1.5% 醋酸乙酯, 蒸馏提取 12 h, 醋酸乙酯及时萃取出蒸馏液中的挥发油。川芎挥发油上硅胶柱 ($\leq 15^\circ\text{C}$ 低温), 以石油醚 (30~60 $^\circ\text{C}$) - 乙醚 (99:1) 洗脱, 500 mL 为 1 个流份, 以 TLC 荧光检查后, HPLC 测定, 纯的流份合并, 低温 ($\leq 30^\circ\text{C}$) 回收至少量, 分装于样品瓶内, 冷冻干燥, 密闭 ($\leq -10^\circ\text{C}$ 低温保存), 得纯品。另外, 也可将川芎挥发油上中压柱 ($\leq 15^\circ\text{C}$ 低温), 以石油醚 (30~60 $^\circ\text{C}$) - 乙醚 (99:1) 洗脱, 250 mL 为 1 个流份, 以 TLC 荧光检测后, HPLC 测定, 纯的流份合并, 低温 ($\leq 30^\circ\text{C}$) 回收至少量, 分装于样品瓶内, 冷冻干燥, 密闭 ($\leq -10^\circ\text{C}$ 低温保存), 得纯品。

2.2 对照品的结构鉴定: 藁本内酯为无色油状物, 略有酯香味; ESI-MS: m/z 191 [$M+1$]; IR ν_{max} cm^{-1} : 3 050, 2 959, 2 933, 2 872, 1 767 (CO)、1 668, 1 625, 1 271, 1 051, 960, 705. UV ν_{max} nm: 207, 282, 294, 323. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 0.95 (3H, t, 7 Hz), 1.47 (2H, m, 7 Hz), 2.36 (2H, dd, 7 Hz), 2.45 (2H, m), 2.62 (2H, dd, 6.3, 7 Hz), 5.26 (1H, t, 6.3, 7 Hz), 6.01 (1H, m, 4.2, 7 Hz), 6.24 (1H, dt, 7.2, 1 Hz). $^{13}\text{C-NMR}$: δ 13.41, 18.12, 22.06, 22.06, 27.80, 112.52, 116.53, 123.51, 129.73, 146.88, 148.23, 167.13. 鉴定为 (Z)-藁本内酯。

2.3 对照品的纯度检测

2.3.1 对照品的杂质检查

按薄层色谱鉴别法分析: 取适量藁本内酯, 加甲醇制成 2 mg/mL 的溶液, 吸 5 μL 点样在硅胶 G 板上,

以石油醚-醋酸乙酯 (20:3) 为展开剂, 展开, 晾干, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视。结果供试品为一个斑点。

高效液相色谱法分析: Kromasil C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 甲醇-0.1% 三氟乙酸水溶液 (80:20)、甲醇-0.1% 三氟乙酸水溶液 (70:30)、甲醇-0.1% 三氟乙酸水溶液 (58:42) 为流动相分别测定; 检测波长为 273 nm。结果表明, 对照品为一个主峰, 保留时间分别为: 7.93, 12.56, 17.32 min。改变流动相分析时未出现异常峰。

2.3.2 面积归一化法纯度检查: Kromasil C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇-0.1% 三氟乙酸水溶液 (70:30) 为流动相测定, 检测波长为 273 nm, 对照品溶液质量浓度为 0.418 4 mg/mL, 采集时间比保留时间延长 1 倍以上, 归一化法计算, 质量分数为 98.43%。

2.3.3 不加校正因子的主成分自身对照法: 按照上述高效液相色谱法测定, 对照品溶液质量浓度为 0.418 4, 0.013 1 mg/mL, 分别测定, 计算, 杂质质量分数 1.35%, 对照品质量分数 98.45%。

3 讨论

川芎用水蒸气蒸馏提取挥发油时, 蒸馏液为油水混合物, 不易分层, 经优选后, 在提取器中加入适量醋酸乙酯, 可及时将蒸馏出的挥发油萃出, 使油水混合物得到较好的分离。

醋酸乙酯为溶剂时, 可能会有残留, 因此提取过程中, 采用气相色谱法跟踪了每次提取油的醋酸乙酯残留量, 结果发现提取的挥发油经精制后, 醋酸乙酯的残留量均低于 $5 \times 10^4 \mu\text{g/g}$, 符合要求。

HPLC 法测定人血浆中的大黄酸

朱伟¹, 张莉², 王学美^{1*}

(1. 北京大学第一医院中西医结合研究所, 北京 100034; 2. 第四军医大学 化学教研室, 陕西 西安 710032)

大黄为我国最常用的中药之一, 始载于《神农本草经》, 列为下品, 历代本草均有记载。目前世界上已有 19 个国家的药典收载了大黄, 作为法定药物使用, 因此大黄已经成为一种世界性的药物, 大黄酸是大黄中最重要的活性成分之一。为适应临床治疗药物监测的需要, 本实验建立了一种简单快速的高效

液相色谱对大黄酸定性、定量的方法, 为临床上合理使用大黄提供依据。

1 材料

美国 Agilent 公司 1100 系列高效液相色谱仪, 包括真空脱气机、四元梯度泵、柱温箱、紫外检测器和 Agilent Chem station for LC 色谱工作站; Rheo-

* 收稿日期: 2005-03-17

作者简介: 朱伟 (1975—), 男, 在读博士研究生, 主治医师, 主要从事中药临床药理研究工作。

Tel: (010) 66551122-3053 E-mail: zwwbx@163.com

dyne 7725i 手动进样器; 瑞士梅特勒- 托利多公司 AE—200 型万分之一电子分析天平; 梅特勒- 托利多(上海)公司 320—S 型 pH 计; SHB—3 循环水多用真空泵(郑州杜甫仪器厂)。

大黄购于西安市药材公司, 经浙江医药高等专科学校杨雄志副教授鉴定为蓼科植物药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根茎及根, 样品凭证标本存于我所中药标本室。

大黄酸、1, 8-二羟基蒽醌对照品购自中国药品生物制品检定所, 面积归一化法测定质量分数均> 99%。甲醇为进口色谱纯(Fisher 公司), 冰醋酸为国产分析纯; Millipore 超纯水; 空白血浆来源于北京大学第一医院血库。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为美国 Agilent 公司 Zorbax C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 1% 醋酸水溶液-甲醇(15 : 85, pH = 5.25), 体积流量为 0.5 mL/min, 柱温为 30℃, 检测波长 256 nm。

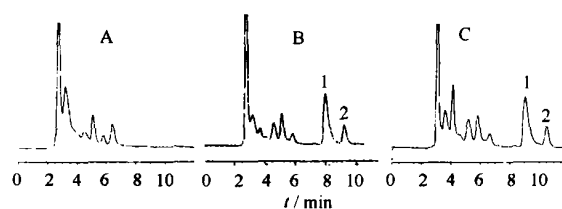
2.2 样本处理: 取待测血样 3 mL 置于含抗凝剂的试管中, 4℃ 条件下冷冻离心 20 min, 取血浆置- 20℃

冰箱保存, 分析前在暗处自然熔融。取血浆 0.5 mL, 加入 100 μg/mL 内标溶液 8 μL, 混匀, 加入 2 mol/L 盐酸溶液 100 μL, 混匀。然后加入提取溶液乙醚-环己烷(4 : 1) 3 mL, 涡旋 1 min, 1 500 × g 离心 10 min。取有机层置于一干净塑料试管中, 该过程重复 1 次。合并 2 次提取液, 于 40℃ 水浴中用氮气吹干, 残渣用 100 μL 甲醇溶解后, 取 20 μL 进样。

2.3 标准曲线的制作: 采用色谱峰保留时间和叠加法进行定性分析。分别准确吸取空白血浆 0.5 mL 置于若干支 10 mL 塑料离心管中, 分别加入大黄酸和内标对照液, 使各管中大黄酸的质量浓度分别为 0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 μg/mL, 内标的质量浓度为 0.8 μg/mL, 按“样本处理”项下操作。以大黄酸与内标峰面积比值(Y)和血浆中药物质量浓度(X)做线性回归计算, 大黄酸标准曲线的回归方程为: $Y = 0.917\ 782\ 112 X + 0.023\ 640\ 82$, $r = 0.999\ 3$, 表明大黄酸在 0.4~ 6.4 μg/mL 具有良好的线性关系。此色谱条件下, 大黄酸的检测限为 6.0 μg/L。

2.4 色谱适应性: 在本色谱条件下, 空白血浆对大黄酸无干扰。空白血浆加对照品及健康志愿者口服大黄后血浆的色谱图显示大黄酸与内标分离良好(图 1)。

2.5 专一性试验: 取空白血浆, 按“样本处理”项下操作, HPLC 法测定。结果在大黄酸、内标物相应的保留时间没有色谱峰, 表明专一性良好。



1-大黄酸 2-内标 1, 8-二羟基蒽醌

1-rhein 2-internal standard substance 1, 8-dioxanthraquinone

图 1 空白血浆(A)、空白血浆+ 大黄酸对照品+ 内标(B)和含药血浆(C)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank plasma (A), blank plasma + rhein reference substance + internal standard substance (B), and plasma with sample (C)

2.6 回收率和精密度试验: 在 0.5 mL 空白血浆中加入高、中、低 3 种质量浓度的大黄酸对照品溶液, 按“样本处理”项下操作, 测得大黄酸的峰面积 A_0 。同时取相应质量浓度的大黄酸对照品溶液置于若干支 10 mL 离心管中, 于 40℃ 水浴中通氮气挥干, 同法用甲醇溶解后进样分析, 记录大黄酸峰面积 A_1 , 按相对回收率 = $A_0/A_1 \times 100\%$ 计算。采用相应质量浓度的大黄酸对照品溶液直接进样分析, 测得大黄酸的峰面积 A_2 , 按绝对回收率 = $A_0/A_2 \times 100\%$ 计算。取空白血浆 0.5 mL 置于若干支 10 mL 离心管中, 分别加入大黄酸对照品溶液, 使大黄酸的质量浓度分别为 0.4、1.6、4.8 μg/mL, 按“样本处理”方法操作, 分别于 1 d 内 5 个时间点及连续测定 5 d, 则获得大黄酸高、中、低质量浓度的日内和日间 RSD 及回收率试验结果(表 1)。

表 1 大黄酸的回收率和精密度试验 (n = 5)

Table 1 Recovery and precision test of rhein in plasma (n = 5)

加入质量浓度/检测质量浓度/ (μg · mL ⁻¹)	绝对回 率/%	相对回 率/%	日内 RSD/%	日间 RSD/%
0.4	104.69	67.42	7.04	5.22
1.6	104.90	73.96	3.09	9.35
4.8	100.23	74.92	3.87	4.75

2.7 临床应用: 采用本法测定 2 名健康志愿者服用大黄水提物后的血浆样本。健康志愿者 A 为 30 岁的男性, 体重 70 kg; 健康志愿者 B 为 23 岁男性, 体重 72.5 g。试验前经询问病史、体格检查和实验室检查, 血尿常规、肝肾功能、心率及血压均正常, 无心、肝、肾和胃肠道等疾患。受试前 2 周及受试期间未服用其他药物, 禁止烟酒及饮料。受试期间统一清淡饮食, 正常饮水。试验前均签署知情同意书。受试者空腹 14 h 后于第 2 天清晨按 50 mg/kg (相当于生药

大黄 1.0 g/kg) 服用大黄水提物和 150 mL 水, 分别于服药前及后 0、0.083、0.5、1、1.5、2、3、4、5、7、10 h 从肘静脉取血 3 mL, 血样置于含有肝素的离心管中, 1 500 × g 离心 10 min, 取血浆置 -20℃ 冰箱保存待测。整个试验在医生监护下进行, 2 名健康志愿者在试验期间未出现药物不良反应。

2.8 血药浓度-时间曲线: 以大黄酸血药浓度对时间作图, 得到大黄酸的药时曲线, 见图 2。显示健康志愿者服用大黄水提物后大黄酸的药时曲线。可见, 人口服大黄水提物后, 大黄酸被快速吸收入血, 大黄酸的最大血浆浓度 (C_{max}) 分别为 3.877 和 3.249 $\mu\text{g/mL}$, 达峰时间 (t_{max}) 分别为 1.5 和 1 h。由于受试者数量太少, 目前还不能得到大黄酸在健康人体内的药动学参数。

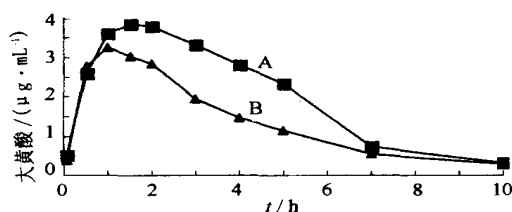


图 2 志愿者 A(A) 和 B(B) 口服大黄水提物后大黄酸的药时曲线

Fig. 2 Rhein concentration-time curve in healthy male volunteer A (A) and B (B) orally administered by *R. officinale* water extract

3 讨论

有研究者认为当前中医学面临两个难题: 1) 中药中的何种成分被吸收入血, 它们的药动学特征如何; 2) 吸收入体内的中药成分有什么样的生物效应以及这些生物学效应和临床疗效之间有何种联系; 要回答这些问题大多数学者认为首先必须在人的体液中检测出微量的来源于中药的化学成分^[1-4]。本实验在人口服大黄水提物后的血浆中只检测出大黄酸, 这和以往的文献报道^[6]一致。说明以大黄酸为大黄的指标成分进行临床治疗药物监测有合理性, 这也说明建立一种简单快速高效液相色谱测定人血浆中大黄酸方法十分必要。

本实验采用内标法定量测定, 可减少由仪器系统或操作过程带来的误差, 从而提高分析的准确度。筛选了大量的内标物, 结果发现以 1, 8-二羟基蒽醌为内标物与大黄酸同属蒽醌类衍生物, 两者分子骨架相同, 亦微溶于水, 溶于乙醇。在所选的色谱条件下, 两者均为单一峰, 分离度好 ($R > 1.5$), 测定时不受干扰, 保留时间适宜, 因此完全符合内标要求。

萃取条件的选择: 参考文献先后考察了甲醇、乙醚、环己烷-己酸酯-正丁醇 (3:2:0.5)、三氯甲烷 6 mL 的提取效果。结果表明甲醇沉淀蛋白, 浓缩后残渣杂质较多, 干扰大, 且甲醇的毒性较大。采用环己烷-己酸酯-正丁醇 (3:2:0.5)、三氯甲烷作为提取剂则大黄酸提不出来。单纯乙醚提取血浆样品, 不易乳化, 但提取率太低, 加入适量的环己烷后大黄酸提取率高, 无杂质峰干扰, 而且乙醚易挥发, 易挥发富集。此外大黄酸为弱酸性, 在酸性环境下其溶解度较高。比较了 0.5、1.0、2.0 mol/L 盐酸溶液酸化血浆样本后对大黄酸提取效率的影响, 结果发现当用 0.5、1.0 mol/L 盐酸溶液酸化血浆样本时, 不但大黄酸的提取率低, 而且残渣杂质多损耗色谱柱, 采用 2.0 mol/L 盐酸溶液酸化血浆样本则情况大为改善。本实验的样本预处理方法操作简单, 不需要特殊的仪器设备。

色谱柱的选择: 选择了 Waters 公司的 Spherisorb、Nova Pak 柱, Agilent 公司的 Zorbax 柱以及大连物理化学研究所的 Kromasil 柱进行试验, 但结果均不满意。试验证明在本实验条件下, Agilent 公司的 Zorbax 色谱柱为最佳选择。

目前文献报道了多种 HPLC 测定动物样本中大黄酸的方法, 但这些方法经笔者预实验证明均不适用于对人血浆的检测, 而 HPLC 测定人血浆中大黄酸的方法只有 3 种^[5-7], 但也存在或需要放射性核素标记, 操作复杂; 或缺乏内标定量不准; 或检测浓度范围较高等缺点。本实验所建立的人血清中大黄酸的 HPLC 测定法经临床应用证明具有灵敏度高、专属性强、准确、精密等优点, 最低定量质量浓度为 20 $\mu\text{g/L}$, 充分满足人体内大黄酸的治疗药物监测的要求。

References

- [1] Xie J C, Chen L R, Li C X, et al. Selective extraction of functional components derived from herb in plasma by using a molecularly imprinted polymer based on 2, 2-bis (hydroxymethyl) butanol trimethacrylate [J]. *J Chromatogr B*, 2003, 788: 233-242.
- [2] Xu X J, Zhu L L, Chen L R. Separation and screening of compounds of biological origin using molecularly imprinted polymers [J]. *J Chromatogr B*, 2004, 804: 61-69.
- [3] Li C, Homma M, Ohkura N, et al. (S)-dihydrooroxylin A in human urine following oral administration of the traditional Chinese medicines Daisaiko-to and Shosaiko-to [J]. *Tetrahedron Asymmetry*, 1997, 8 (8): 1145-1147.
- [4] Li C, Homma M, Oka Y K. Chromatographic identification of phenolic compounds in human urine following oral administration of the herbal medicines Daisaiko-to and Shosaiko-to [J]. *J Chromatogr B*, 1997, 693: 191-198.
- [5] Lee J, Kim J M, Kim C. Pharmacokinetic analysis of rhein in

- Rheum undulatum* L. [J]. *J Ethnopharmacol*, 2002, 84: 5-9.
- [6] Krumbiegel G, Schulz H. Rhein and aloe-emodin kinetics from senna laxatives in man [J]. *Pharmacology*, 1993, 47 (Suppl): 120-124.

- [7] Tan L, Yuan S, Yang J W, et al. Determination of rhein in human plasma by HPLC and the study of its pharmacokinetics [J]. *Bull Jinling Hospital* (金陵医院学报), 1998, 11 (2): 112-115.

HPLC 法测定三七及其制剂中三七素

付春梅, 朱 静, 刘三康, 李章万*

(四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F.H. Chen 的干燥根, 其中所含三七素 (dencichine, β -草酰基-L- α , β -二氨基丙酸) 具有止血作用^[1,2], 因此三七在祖国传统医药中广泛用于跌打损伤的治疗。研究进一步证明三七素具有止血、增加血小板数的药理活性^[3]。目前, 三七素的测定主要采用的是氨基酸自动分析仪^[4,5], 该法具有分析结果准确的优点, 但仪器价格昂贵, 且不能应用于其他成分的分析。也有将三七素进行荧光衍生化后, 采用薄层扫描的方法测定^[6], 但衍生化产物不稳定, 扫描定量中引起误差的因素较多, 准确度不高。本实验采用离子对反相液相色谱法对三七素进行分离测定, 灵敏、快速、准确, 可用于三七药材及其复方制剂中三七素的测定。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10A 高效液相色谱仪, SPD-10AVP 紫外检测器, CTO-6A 柱温箱, SEPU 3000 色谱工作站(杭州普惠科学仪器有限公司)。三七素对照品(四川大学华西药学院药化教研室提供, 质量分数大于 99%), 三七药材(产地: 云南文山)经四川大学华西药学院生药教研室张浩教授鉴定为五加科植物三七的干燥根, 三七制剂为市售; 实验用水为超纯水, 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 迪马 Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μ m), 自填国产 CYW C₁₈ 保护柱 (10 mm × 4.5 mm, 5 μ m), 流动相为含 3.5 mmol/L 磷酸二氢钠的甲醇-0.03% 四丁基氢氧化铵 (20:80, 磷酸调 pH 为 3.8), 体积流量为 1 mL/min, 柱温 40℃, 检测波长为 220 nm, 进样量为 20 μ L。

2.2 对照品溶液的制备: 取三七素对照品约 5 mg, 精密称定, 用流动相溶解制成 0.1 mg/mL 溶液作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 取粉碎的三七根粉 1 g, 精密称定, 置 50 mL 烧瓶中, 加硼砂缓冲液 (pH 9.18) 25 mL, 水浴回流 1 h, 提取液转移至 50 mL 量瓶中, 残渣加硼砂缓冲液 15 mL 回流提取 0.5 h, 提取液转移至 50 mL 量瓶中, 残渣用硼砂缓冲液洗涤, 合并提取液与洗涤液, 用硼砂缓冲液定容至 50.00 mL, 混匀, 滤过, 即得。

2.4 线性及范围: 配制不同质量浓度对照品溶液, 注入液相色谱仪测定。以三七素峰面积对进样量进行线性回归, 回归方程为 $Y = -2.12 \times 10^4 + 6.98 \times 10^5 X$, $r = 0.9997$, 线性范围为 0.202~4.04 μ g。

2.5 精密度试验: 同一供试品溶液重复进样 5 次, 三七素峰面积积分值的 RSD 为 0.85%。

2.6 重现性试验: 同一批样品平行测定 5 份, 测得其平均质量分数为 5.61 mg/g, RSD 为 1.1%。

2.7 稳定性试验: 在 4 个不同日期测定同一批供试品, RSD 为 1.5%。

2.8 加样回收率试验: 精密称取三七粉末(含三七素 5.61 mg/g) 适量 (0.4、0.5、0.6 g), 分别加入三七素对照品 (2.2、2.8、3.4 mg), 按供试品溶液制备方法制成高、中、低 3 种质量浓度溶液各 3 份, 测定。结果平均加样回收率为 98.8%, RSD 为 1.7%。

按制剂处方配制空白样品(不含三七), 按供试品溶液的制备方法制备空白溶液并测定, 结果 3 种制剂空白均不干扰三七素测定。冠心丹参片、复方三七胶囊、复方丹参片的高、中、低 3 种质量浓度空白加样平均回收率分别为 98.2% (RSD 为 2.1%, $n=$

* 收稿日期: 2005-03-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271535)

作者简介: 付春梅 (1971—), 女, 讲师, 硕士, 主要从事药物分析教学及科研工作。Tel: (028) 85503272 Fax: (028) 85501634

E-mail: lizhangwanlab@163.com

* 通讯作者 李章万 E-mail: lizhangwanlab@163.com