

酸性染料涡旋比色法测定大鼠口服麻黄汤后血浆总生物碱

杨真真, 姜梦丽, 张丽红, 肖晓金, 赖宏强, 李孝栋*

福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122

摘要: **目的** 通过对大鼠口服麻黄汤后血浆中总生物碱的测定, 研究酸性染料比色法中涡旋法替代萃取法提取总生物碱的可行性。**方法** 大鼠口服麻黄汤后, 采用酸性染料比色法测定血浆样品中的总生物碱, 对总生物碱的提取操作分别采用传统的萃取法和改进的涡旋法, 并对2种方法所测得的大鼠口服麻黄汤后血浆中总生物碱量及其药动学参数进行比较和分析。**结果** 萃取法和涡旋法所得到的麻黄碱质量浓度分别在4~40、4~80 $\mu\text{g/mL}$ 与吸光度呈良好线性关系, 回归方程分别为 $A = 0.0171C + 0.2355$ ($r = 0.9855$)、 $A = 0.0068C + 0.0102$ ($r = 0.9964$); 平均回收率分别为95.63% (RSD=1.92%)、111.55% (RSD=0.26%); 麻黄总生物碱的大鼠体内隔室模型均为单室模型, 主要药动学参数 AUC、 C_{\max} 、 t_{\max} 、 $t_{1/2}$ 分别为 $5.30 \times 10^5 \text{ min} \cdot \mu\text{g/mL}$ 、57.13 $\mu\text{g/mL}$ 、37.20 min、6 403.78 min 和 $1.94 \times 10^6 \text{ min} \cdot \mu\text{g/mL}$ 、663.20 $\mu\text{g/mL}$ 、361.90 min、1 756.87 min, 其中涡旋法提取总生物碱完全, C_{\max} 、AUC 分别为萃取法的11.61、3.66倍。**结论** 涡旋法更为快速、准确、灵敏、简便、稳定和安全, 重复性更好, 对操作者伤害更小, 可最大限度获得麻黄汤中的总生物碱, 具有替代传统萃取法的科学性、现实性和必要性。

关键词: 麻黄汤; 酸性染料比色法; 总生物碱; 萃取法; 涡旋法; 药动学

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)02-0231-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.02.015

Determination of total alkaloids in plasma of rats after oral administration with Mahuang Decoction by acid dye colorimetry

YANG Zhen-zhen, JIANG Meng-li, ZHANG Li-hong, XIAO Xiao-jin, LAI Hong-qiong, LI Xiao-dong

College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

Abstract: Objective To propose the feasibility of the vortex method of acid dye colorimetry replacing extraction method to determine the content of total alkaloids in plasma of rats after oral administration with Mahuang Decoction. **Methods** The contents of total alkaloids in plasma of rats orally administered with Mahuang Decoction extracted by traditional extraction method and vortex method were determined by acid dye colorimetry, and the results were contrasted and analyzed. **Results** The extraction method and vortex method had good linear relationship in the range of 4—40 and 4—80 $\mu\text{g/mL}$ with the average recovery rates of 95.63% (RSD = 1.92%) and 111.55% (RSD = 0.26%), respectively. The regression equations established were $A = 0.0171C + 0.2355$, $r = 0.9855$ and $A = 0.0068C + 0.0102$, $r = 0.9964$. The metabolic processes of total alkaloids in rats were both complied with the one-compartment model. The main pharmacokinetic parameters AUC, C_{\max} , t_{\max} , and $t_{1/2}$ were $5.30 \times 10^5 \text{ min} \cdot \mu\text{g/mL}$, 57.13 $\mu\text{g/mL}$, 37.20 min, 6 403.78 min and $1.94 \times 10^6 \text{ min} \cdot \mu\text{g/mL}$, 663.20 $\mu\text{g/mL}$, 361.90 min, 1 756.87 min. The C_{\max} and AUC of vortex method were 11.61 times and 3.66 times compared with those of extraction method. **Conclusion** The vortex method is more rapid, accurate, sensitive, simple, stable, safe, and reproducible and has little harm to laboratory assistants, which can extract the total alkaloids in maximum, with the necessity, scientificity, and practicality of replacing traditional extraction method.

Key words: Mahuang Decoction; acid dye colorimetry; total alkaloids; extraction method; vortex method; pharmacokinetics

麻黄汤为张仲景《伤寒论》的名方, 由麻黄、桂枝、杏仁、甘草4味中药组成, 具有发汗解表、

宣肺平喘之功效, 主要用于呼吸道感染、支气管哮喘等症^[1]。药理学研究证明麻黄中生物碱类成分是

收稿日期: 2014-06-26

基金项目: 福建省科技平台建设项目(2010Y2004)

作者简介: 杨真真(1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂与质量控制。Tel: 13645015442 E-mail: 88131506@qq.com

*通信作者 李孝栋, 男, 药理学博士, 副教授。Tel: (0591)22861135 E-mail: lxdtcm@163.com

麻黄药理作用的代表性成分^[2-3],关于生物碱的提取分离、结构分析、定量测定^[4]、药理研究等多见报道,因此,测定总生物碱的量对于控制其质量、确保疗效有重要意义。目前总生物碱的定量测定有重量法、酸碱滴定法、酸性染料比色法^[5-8],其中酸性染料比色法最为常见。

酸性染料比色法测定总生物碱传统上均以氯仿作为溶剂,萃取出水相中的生物碱再进行测定,而氯仿为易挥发的剧毒液体,对心、肝、肾有损害,甚至有致癌可能性,短时间或长期吸入其挥发性气体均可对操作者身体造成轻或重度的损害。传统萃取法多采用手动剧烈振摇法使生物碱在一定的 pH 介质中与酸性染料定量的结合形成有色络合物后采用分液漏斗对有机溶剂进行萃取、排气、静置、分层,其操作较为繁琐、难定量、易造成乳化现象,并需要操作者反复多次接触氯仿,增加操作者对氯仿的吸入量,且萃取法实验结果受分液漏斗振摇时间、静置分层时间、不同操作者手动振摇力度不一致等因素影响较大,因此造成实验重复性较差。

本实验对传统萃取法中的萃取、静置、分层等操作进行了改进,提出用涡旋法替代原用于提取总生物碱的萃取法的可行性,并通过对 2 种方法所测得的大鼠口服麻黄汤后血浆中总生物碱量及其药动学参数的比较和分析,验证涡旋法的科学性,为酸性染料比色法测定总生物碱提供改进方法,提高操作者的安全性和测试结果的准确性。

1 材料

1.1 仪器

VXH-3 微型旋涡混合器(上海跃进医疗器械厂);TDL80-2B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂);10~200、100~1 000 μL TopPette Pipettor 移液器(上海恒奇仪器仪表有限公司);FA2004N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司);TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(上海分析仪器厂);KQ2200B 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

麻黄汤各味中药购自安徽协和成药业饮片有限公司,并由福建中医药大学中药鉴定教研室杨成梓副教授鉴定,分别为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf 的草质茎、樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝、双子叶植物豆科甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch 的干燥根茎、蔷薇科植物杏 *Prunus armeniaca* L. 的种仁;盐酸麻黄碱对照品

(中国食品药品检定研究院,批号 171242-200404,质量分数 99.5%);溴甲酚绿、醋酸铵、醋酸、高氯酸、氢氧化钠、氯仿等均为分析纯。

1.3 动物

健康雄性 SD 大鼠,清洁级,体质量 180~200 g,上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,许可证号 SCXK(沪)2007-0005。

2 方法与结果

2.1 麻黄汤的制备^[9]

称取 12 倍麻黄汤处方量药材,即麻黄 108 g、桂枝 72 g、杏仁 72 g、甘草 21 g,加 10 倍量水,麻黄先煎 20 min,再和余药共煎 30 min,纱布粗滤去渣,浓缩至所需质量浓度(0.504 g/mL),即得。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取盐酸麻黄碱对照品 5 mg,置 25 mL 量瓶中,加蒸馏水溶解并定容至刻度,作为对照品储备液(200 $\mu\text{g/mL}$)。分别精密吸取储备液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.6、2.0、2.4、4.0 mL 于 10 mL 量瓶内,蒸馏水稀释并定容至刻度,配成质量浓度分别为 4、8、12、16、20、24、32、40、48、80 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

2.3 溴甲酚绿酸性染料的配制^[10]

精密称取溴甲酚绿 0.150 1 g,加 pH 值 6.0 的醋酸-醋酸铵缓冲溶液 300 mL,摇匀,溶解,得 0.05% 溴甲酚绿缓冲溶液。

2.4 血浆样品的采集

SD 大鼠 66 只,随机分为 11 组,1 组为对照组(ig 生理盐水),另外 10 组为给药组,给药前禁食 14 h,不禁水,给药组大鼠按 5.04 g/kg 剂量(10 mL/kg,相当于人临床等效剂量)分别 ig 给药,分别于给药后 20、40、60、90、120、180、240、360、480、600 min^[11]大鼠眼眶取血(每个时间点 6 只大鼠),放入 EDTA 采血管中,3 800 r/min 离心 10 min,取上层血浆部分,冷冻保存,备用。

2.5 酸性染料比色法中的萃取法

2.5.1 血浆样品的处理^[12] 取血浆 0.5 mL,加 6%高氯酸 1.0 mL,旋涡混合器振荡 2 min,以 3 800 r/min 离心 10 min,吸取上清液置 60 mL 分液漏斗,加 1 mol/L NaOH 溶液 0.8 mL,摇匀 1 min,再加入 CHCl_3 5 mL,密塞,摇匀 5 min,静置分层 2 min,分取下层 CHCl_3 液层,再加入 pH 6.0 溴甲酚绿缓冲溶液 3 mL,充分振摇 5 min,静置 1 h,取氯仿层溶液在 411 nm 处测定吸光度(A)值。同时取 0.5 mL 空白血浆,

同法操作, 所得氯仿液作为参比, 在 411 nm 处测定 A 值。

2.5.2 线性关系的考察 取空白血浆各 0.5 mL, 分别加入 4、8、12、16、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液各 5 mL, 按“2.5.1”项下方法, 在 411 nm 处分别测定 A 值, 以 A 值对质量浓度 (C) 进行线性回归, 得回归方程 $A=0.0171C+0.2355$, $r=0.9855$, 表明以盐酸麻黄碱计, 总生物碱在 4~40 $\mu\text{g/mL}$ 与 A 值呈现良好线性关系。

2.5.3 精密度试验 精密吸取大鼠空白血浆 0.5 mL, 加入对照品溶液配制成质量浓度为 16 $\mu\text{g/mL}$ 的血浆样品, 按“2.5.1”项下方法重复测定 5 次, 结果 RSD 为 0.77% ($n=5$), 表明仪器精密度良好。

2.5.4 重复性试验 取大鼠口服麻黄汤后 1 h 同 1 批血浆样品 6 份, 按“2.5.1”项下方法测定, 得总生物碱平均血药浓度为 68.83 $\mu\text{g/mL}$, RSD 为 2.01% ($n=6$)。

2.5.5 方法回收率试验 精密吸取大鼠空白血浆 0.5 mL, 加入对照品溶液配制成质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的血浆样品 6 份, 按“2.5.1”项下处理后进行分析, 将麻黄总生物碱 A 值代入标准曲线, 计算测得药物质量浓度, 与加入量比较, 考察样品的方法回收率, 结果回收率为 (95.63 \pm 1.84)%, RSD 为 1.92%。

2.6 酸性染料比色法中的涡旋法

2.6.1 血浆样品的处理 取血浆 0.5 mL, 加 6% 高氯酸 1.0 mL, 旋涡混合器振荡 2 min, 以 3 800 r/min 离心 10 min, 吸取上清液置 15 mL 离心管, 加 1 mol/L NaOH 溶液 0.8 mL, 涡旋 1 min, 再加入 CHCl_3 5 mL, 密塞, 涡旋 5 min, 以 3 800 r/min 离心 2 min, 精密吸取下层 CHCl_3 液层, 再加入 pH 6.0 溴甲酚绿缓冲溶液 3 mL, 涡旋 5 min, 静置 10 min, 取氯仿层溶液在 411 nm 处测定 A 值。同时取 0.5 mL 空白血浆, 同法操作, 所得氯仿液作为参比, 在 411 nm 处测定 A 值。

2.6.2 线性关系的考察 取空白血浆各 0.5 mL, 分别加入 4、16、24、32、40、48、80 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液各 5 mL, 按“2.6.1”项下方法, 在 411 nm 处分别测定 A 值, 通过归一化, 以 A 值对质量浓度 (C) 进行线性回归, 得回归方程 $A=0.0068C+0.0102$, $r=0.9964$, 表明以盐酸麻黄碱计, 总生物碱在 4~80 $\mu\text{g/mL}$ 与吸光度呈现良好线性关系。

2.6.3 精密度试验 精密吸取大鼠空白血浆 0.5 mL, 加入对照品溶液配制成质量浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 的血浆样品, 按“2.6.1”项下方法重复 5 次测定 A 值, 结果 RSD 为 0.32% ($n=5$), 表明仪器精密度良好。

2.6.4 重复性试验 取大鼠口服麻黄汤后 1.5 h 的同一批血浆样品 6 份, 按“2.6.1”项下方法测定 A 值, 得总生物碱平均血药浓度为 229.12 $\mu\text{g/mL}$, RSD 为 1.37% ($n=6$)。

2.6.5 方法回收率试验 精密吸取大鼠空白血浆 0.5 mL, 加入对照品溶液配制成质量浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 的血浆样品 6 份, 按“2.6.1”项下处理后进行分析, 将麻黄总生物碱 A 值代入标准曲线, 计算测得药物质量浓度, 与加入量比较, 考察样品的方法回收率, 结果回收率为 (111.55 \pm 0.29)%, RSD 为 0.26%。

2.7 总生物碱血药浓度的测定

取采集时间为 20、40、60、90、120、180、240、360、480、600 min 的血浆样品, 每个时间点、每种方法取 3 份样品, 分别按萃取法和涡旋法对其中的总生物碱进行测定, 结果见表 1。

2.8 总生物碱在大鼠体内血药浓度-时间曲线

将采集的所有血浆样品, 分别按萃取法“2.5.1”项和涡旋法“2.6.1”项下方法进行测定, 绘得平均血药浓度-时间曲线, 见图 1。将所得的血药浓度-时间数据用 3P97 软件进行拟合, 麻黄总生物碱的药动力学参数见表 2。

表 1 萃取法和涡旋法测得麻黄汤总生物碱大鼠体内血药浓度 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 *In vivo* blood concentration of total alkaloids from Mahuang Decoction in rats by vortex or extraction methods ($\bar{x} \pm s, n=3$)

方法	平均血药浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$				
	20 min	40 min	60 min	90 min	120 min
萃取法	39.28 \pm 6.37	58.77 \pm 2.68	65.98 \pm 7.78	48.25 \pm 4.57	50.17 \pm 1.43
涡旋法	189.41 \pm 57.31	316.37 \pm 20.61	620.78 \pm 146.40	309.51 \pm 74.73	492.35 \pm 72.42
方法	平均血药浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$				
	180 min	240 min	360 min	480 min	600 min
萃取法	70.55 \pm 1.62	61.37 \pm 2.70	56.21 \pm 2.78	55.79 \pm 4.23	51.02 \pm 3.70
涡旋法	762.45 \pm 74.27	741.86 \pm 56.62	716.86 \pm 60.57	669.31 \pm 21.22	614.90 \pm 10.43

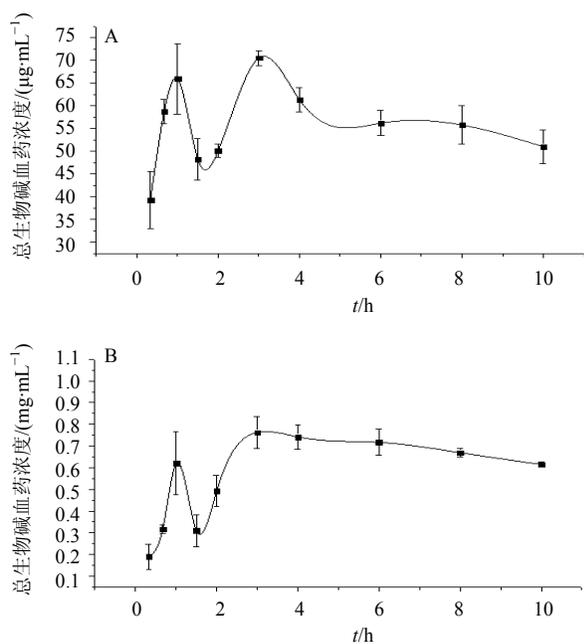


图 1 萃取法 (A) 和涡旋法 (B) 得到的麻黄总生物碱平均血药浓度-时间曲线

Fig. 1 Mean blood concentration-time curves of total alkaloids from Mahuang Decoction by extraction method (A) and vortex method (B)

表 2 麻黄总生物碱在大鼠体内的药动学参数

Table 2 *In vivo* pharmacokinetic parameters of total alkaloids from Mahuang Decoction in rats

参数	单位	萃取法	涡旋法
$t_{1/2}$	min	6 403.78	1 756.87
t_{max}	min	37.20	361.90
C_{max}	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	57.13	663.20
AUC	$\text{min}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	5.30×10^5	1.94×10^6
V/F	$\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{mL}$	0.026 0	1.95×10^{-3}
CL/F	$\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{mL}$	3.00×10^{-6}	1.00×10^{-6}

3 讨论

本实验主要通过考察涡旋法与传统萃取法对大鼠口服麻黄汤后血浆中总生物碱定量测定的影响, 提出用涡旋法替代酸性染料比色法中原用于提取总生物碱的萃取法的可行性, 并对 2 种方法优缺点进行比较, 方法学考察均按照体外普通样品处理进行辅助验证, 由表 1 可知, 从测得麻黄总生物碱的平均血药浓度上比较, 2 种方法差别较大, 涡旋法为萃取法的 5~12 倍, 表明涡旋法可最大限度提取总生物碱; 萃取法和涡旋法的方法学确证结果显示 RSD 都是符合要求的, 说明这 2 种方法皆可行, 但

萃取法中精密度、重复性、加样回收率的 RSD 均大于涡旋法, 分别为涡旋法的 2.41、1.47、7.38 倍, 因此涡旋法相比于萃取法具有明显优势。

酸性染料比色法中的传统萃取法影响因素较多, 实验重复性较差, 已有文献报道, 同一样品相同时间萃取法的测定结果相差几倍甚至几十倍^[13]。改进的涡旋法, 在萃取方面, 将实验转移至具塞离心管中进行, 采用旋涡振荡器对络合物进行混合(力度一致), 此改进避免由于人工手动振摇力度不一样而引起的实验误差; 在静置分层方面, 采用离心机 3 800 r/min 离心 2 min 方法, 而萃取法静置分层 1 h, 此改进大大减少氯仿静置分层的时间, 同时解决氯仿充分振摇萃取时的乳化现象; 在定量方面, 采用移液枪对氯仿进行准确定量移取, 此改进相对于萃取法排气放液进行定量更快捷、准确。在整个实验过程上, 虽然氯仿用量没有减少, 测定人员仍然直接面对比色皿中的氯仿溶液, 但由于涡旋法大大缩短操作者与氯仿的接触时间及次数, 且可以避免萃取法经常出现的漏液问题, 从而减小氯仿对操作者的伤害, 因此改进方法在安全性上有大大提高。

在前期多次反复的体内药动学研究中得出, 大鼠受到的惊吓对体内代谢影响很大, 因此本实验血浆样品的采集设 10 个给药组 (即每个采血点 1 组, 每组 6 只大鼠, 一只大鼠只采一个时间点), 分别于给药后大鼠眼眶取血, 每个采血点取 1.5~2 mL, 此实验安排是为了避免在同一只大鼠由于需要完成 10 个血浆样品的采集而造成对大鼠的惊吓, 同时避免由于大鼠失血过多而影响药物的体内代谢。

从所绘制的药-时曲线上看, 在 10 h 药物并没有消除完全, 因此拟合出的药动学参数并不是最佳结果, 还需要增加采血时间点, 相关后期研究正在进行中。血浆样品浓度在处理后的血浆样品中需要重新计算, 理论上加入 0.5 mL 血浆被 5 mL 氯仿萃取完全, 浓度稀释 10 倍。

综上所述, 涡旋法具有快速、准确、稳定、重复性好、对操作者伤害小的特点, 可最大限度获得酸性染料比色法中的总生物碱提取量, 具有替代传统萃取法的科学性、现实性和必要性。

参考文献

[1] 刘鑫, 邹中兰, 梅全慧, 等. 干麻黄汤对慢性哮喘大鼠缺氧诱导因子-1 α 、血管内皮生长因子表达及气道重塑的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 190-194.
 [2] 屈艳格, 陈军, 王冬月, 等. 马钱子生物碱类成分经

- 口给药后在大鼠体内的药动学研究 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 1008-1012.
- [3] 陈 勇, 沈少林, 陈怀侠, 等. HPLC-ESI-ITMSn 法鉴定麻黄碱及其大鼠体内主要代谢产物 [J]. 药学学报, 2005, 40(9): 838-841.
- [4] 谢升谷, 祝 明. HPLC 测定小儿清热止咳颗粒中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的含量 [J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(3): 255-257.
- [5] 周毅玲. 酸性染料比色法测定延胡索总生物碱的量 [J]. 中草药, 2008, 39(8): 1257-1258.
- [6] 李文静, 徐 进, 景 霞, 等. 酸性染料比色法测定哮喘口服溶液中盐酸麻黄碱的含量方法改进 [J]. 中国药房, 2013, 37(24): 3534-3636.
- [7] 张祖兵, 刘世伟, 杨 强, 等. 复方盐酸伪麻黄碱镶嵌缓释片的制备及其体外释放度的测定 [J]. 华西药学杂志, 2005, 20(1): 18-20.
- [8] 索银科, 霍彬科. HPLC 法测定咳喘清片中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱 [J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 123-124.
- [9] 刘国清, 王 涛, 余林中, 等. 麻黄汤的发汗作用与 M 受体的关系研究 [J]. 中国药房, 2006, 17(16): 1210-1211.
- [10] 刘 悦, 邓沁涛, 张 帆. 不同产地哈萨克药材白喉乌头中总生物碱含量的分析 [J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(2): 126-128.
- [11] 贺 丰, 罗佳波, 陈飞龙, 等. 麻黄汤中麻黄碱、伪麻黄碱在人体药代动力学研究 [J]. 中药药理与临床, 2005, 21(1): 1-3.
- [12] 贺 丰. GC-MS 法研究麻黄汤中麻黄碱、伪麻黄碱的人体内过程 [J]. 中药新药与临床药理, 2004, 15(5): 336-338.
- [13] 刘军凯, 雷泞菲, 吴虹霁, 等. 常见蔬菜中 Vc 含量的研究 [J]. 广东微量元素科学, 2006, 13(4): 56-60.