

口服中药复方有效部位后血浆 中葛根素的测定[※]

□ 郭莹^{1*} 王云来² 万海同³ 张莉³ 樊守艳³
韩进³ 余勤³ 刘文洪³ 潘远江⁴

(1. 浙江中医药大学心脑血管病研究所 2004 年博士研究生 浙江 杭州 310053

2. 浙江大学医学院附属第二医院 浙江 杭州 310000

3. 浙江中医药大学心脑血管病研究所 浙江 杭州 310000

4. 浙江大学化学系 浙江 杭州 310027)

摘要 目的: 建立 HPLC 测定大鼠口服养阴通脑颗粒有效部位组合后血浆中葛根素浓度的方法。方法: 以乙腈提取处理血浆, 以对羟基苯甲酸为内标, 甲醇-0.5% 乙酸水 (28: 72, v: v) 为流动相, ODSC18 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为固定相, 流速为 1.0 mL/min, 以紫外检测器在 248 nm 波长下测定血浆中葛根素的吸收。结果: 葛根素在 0.025 ~ 3.2 μg/mL 范围内线性关系良好, RSD < 10%, 平均回收率为 97.6%, 最低检测限为 0.16 ng, 血浆中最低检测浓度为 0.016 μg/mL。结论: 此法灵敏、可靠, 可较好地用于口服中药复方养阴通脑颗粒主要有效部位组合后血浆中葛根素的测定, 可为中药复方体内成分分析提供方法。

关键词 葛根素 中药复方 养阴通脑颗粒 有效部位 血药浓度 含量测定

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 或粉葛 *P. thomsonii* Benth. 的根。葛根的主要有效部位为异黄酮类化合物, 葛根素 (puerarin) 为其中的主要有效成分之一, 对脑缺血损伤具有保护作用^[1,2]。

中药复方养阴通脑颗粒 (由葛根等六味药组成) 主要用于缺血性脑血管病治疗。本文建立了养阴通脑颗粒有效部位组合 (黄酮、生物碱、皂苷类) 给大鼠灌胃给药后, 大鼠血浆中葛根素的 HPLC 测定方法, 为中药复方体内成分分析提供方法。

1 实验材料

1.1 仪器与色谱条件 岛津 LC-10AD 液相色谱仪: 手动进样器、LC-10ADVP 泵、SPD-10AVP 检测器。流动相为甲醇-0.5% 乙酸水 (28: 72, v: v); 固定相: phenomenex GEMINI C18 柱, 150 mm × 4.6 mm, 5 μm; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 248 nm。

Millipore 超纯水仪、Mettler Toledo AG135 电子天平、Hettich Universal 32 高速离心机等。

1.2 药品与试剂 葛根素对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110752-200209); 甲醇为市售色谱纯, 乙腈、对羟基苯甲酸、冰醋酸等均为市售分析纯, 水为

※基金项目 浙江省自然科学基金项目 (No: Y405171)

超纯水。养阴通脑颗粒是一中药复方制剂,主要含葛根、川芎等中草药,有效部位由浙江大学化学系提取。

1.3 动物 老年清洁级 SD 大白鼠,雄性,体重 320~360g,由浙江省医学科学院动物中心提供。

2 方法与结果

2.1 标准溶液配制 精密称取葛根素对照品 1.0mg,用甲醇-水(9:1)溶解,定容于 10mL 容量瓶中,得到浓度为 0.1mg/mL 的葛根素标准溶液,同法配制对羟基苯甲酸标准溶液作为内标溶液,浓度为 0.022mg/mL。

2.2 脑缺血模型大鼠的制作 采用改良的 Pulsinelli 四血管法造模:以 10% 水合氯醛 0.4mL/100g (体重)腹腔麻醉,大鼠俯卧位固定于手术台上,在第一颈椎水平做一正中切口,找到两侧翼小孔,直视下电凝,永久性闭塞双侧椎动脉。颈部皮肤侧切口,分离颈总动脉,用微动脉夹夹闭双侧颈总动脉 30min,造成全脑缺血动物模型。

2.3 脑缺血大鼠血浆样品的制备 将养阴通脑颗粒有效部位组合:总黄酮(黄酮含量为 80%) 5mg/100g 体重、总生物碱(生物碱含量为 53%) 6mg/100g 体重、挥发油 1.5mg/100g 体重,用水溶解,灌胃给药,于给药后 5、10、15、30、45、60、90、120、240、360min 从颈动脉取血,肝素抗凝,离心后吸取上清获得血浆,同法以水灌胃得到空白血浆。

2.4 血浆样本预处理及色谱分离 用微量加样器吸取血浆 0.5mL,置于 5mL 离心试管中,以微量加样针准确加入内标液 25 μ L,电动涡旋器充分混匀 15s,准确加入 1.5mL 乙腈,涡旋混匀 2min,6000r/min 离心 10min,取上清 1.0mL,氮气吹干,加 0.5mL 流动相溶解,10000r/min 离心,取上清液待测。

分别吸取空白血浆、空白血浆加对照品和供试品预处理后的上清液 20 μ L,注入色谱系统,248nm 波长检测,绘制色谱图(见图 1),在此色谱条件下,脑缺血大鼠血浆中葛根素和内标物分离完全,空白血浆无干扰,样品中无其它物质的干扰。

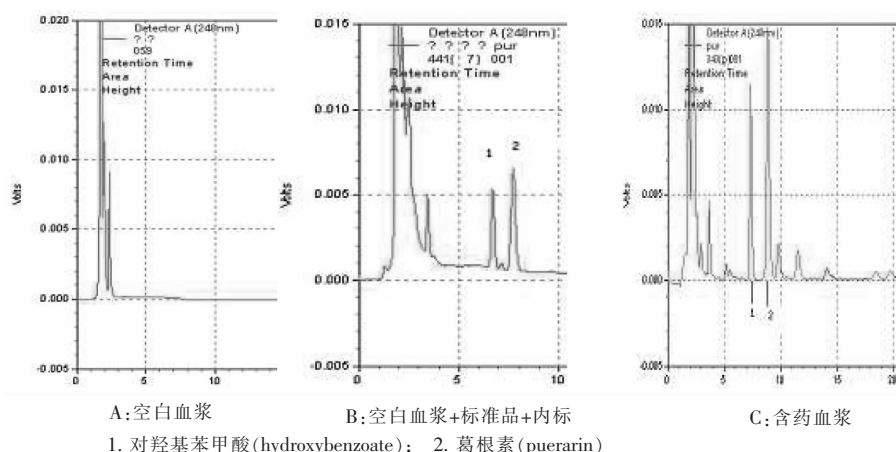


图 1

2.5 标准曲线的制作及最低检测限 取空白血浆 0.5mL 于 5mL 离心管中,分别定量加入葛根素标准溶液使其含葛根素分别为: 0.025 μ g/mL, 0.05 μ g/mL, 0.1 μ g/mL, 0.2 μ g/mL, 0.4 μ g/mL, 0.8 μ g/mL, 1.6 μ g/mL, 3.2 μ g/mL, 在每管中分别加入内标液 25 μ L, 余按 2.4 项下方法进行。

将色谱图上葛根素和内标物的峰面积比值与其相对应的浓度值作线性回归,得到该色谱条件下的葛根素的线性回归方程为: $y = 0.9981x - 0.0428$, $r =$

0.9987; 结果表明:在 0.025~3.2 μ g/mL 范围内,葛根素呈良好的线性关系。以信噪比为 3 时测得的最低检测限为 0.16ng,血浆中的最低检测浓度为 0.016 μ g/mL。

2.6 方法回收率和精密度考察 取空白血浆作底物,分别加入高、中、低 3 个浓度的葛根素标准溶液,使血浆中的葛根素含量分别为 0.025 μ g/mL、0.4 μ g/mL、3.2 μ g/mL (每个浓度平行做 5 份),在每管中分别加入内标液 25 μ L,按照 2.4 项下方法处理样品,

测定。计算 5 次测定结果的相对标准偏差 (RSD), 并计算回收率, 结果见表 1, 葛根素的平均回收率为 97.6%, 各浓度回收率基本符合要求, RSD < 10%。

选择 1 天内不同时间和不同天数检测同一已知样品, 每个浓度平行测定 5 次, 并计算日内和日间精密度的, 数据见表 2。

表 1 大鼠血浆中葛根素的回收率 (n=5)

理论值 ($\mu\text{g/mL}$)	测定值 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (%)	RSD (%)
0.025	0.0236 + 0.000818	94.5	7.67
0.400	0.430 + 0.0199	107.4	9.49
3.200	2.909 + 0.1097	90.9	8.44

表 2 血浆中葛根素测定的精密度考察 (n=5)

理论值 ($\mu\text{g/mL}$)	日内精密度 (%)	理论值 ($\mu\text{g/mL}$)	日间精密度 (%)
0.025	5.41	0.025	4.19
0.400	2.90	0.400	3.59
3.200	2.73	3.200	7.12

2.7 样品的测定 将 2.3 中得到的血浆样品按照 2.4 中的方法处理, 测定, 结果见表 3。

表 3 不同时间点葛根素的血药浓度 ($\bar{x} \pm \text{SD}$)

取血时间 (min)	血药浓度 ($\mu\text{g/mL}$)
5	0.0705 + 0.0351
10	0.0522 + 0.0304
15	0.1250 + 0.0588
30	0.4347 + 0.1962
45	0.0256 + 0.0185
60	0.1696 + 0.1097
90	0.0544 + 0.0372
120	0.0894 + 0.0514
240	0.3473 + 0.1073
360	0.2757 + 0.9945

注: 从表 3 可以看出, 葛根素于 30min 达到血药浓度的峰值, 并且有多峰现象存在。

3 讨论

3.1 血样预处理方法的选择 实验中曾采用甲醇法、水浴法^[3]沉淀血样中的蛋白, 沉淀效果均较好, 但对空白血浆和空白血浆加标准品图谱, 发现空白血浆图谱上葛根素出峰时间处有一杂质峰干扰, 未能通过流动相的调整将干扰避开。采用乙腈处理蛋白的同时可将干扰峰除去, 也是本实验选用乙腈处理血样的原因。

3.2 内标物及流动相的选择 在选择流动相过程中, 发现对羟基苯甲酸对酸很敏感, 对酸的敏感程度远大于

甲醇, 流动相中微量的酸性可使保留时间大大提前。

3.3 进样溶液溶剂的选择 2.4 中曾用乙腈处理血浆样品后离心得到的上清液直接注入色谱系统进行检测, 发现此时的对羟基苯甲酸峰分裂出 1~2 个肩峰, 改用氮气吹干后用流动相溶解, 可消除这一现象, 峰形较好。

3.4 葛根素的血药浓度 本研究中发现, 葛根素的血药浓度经时曲线出现了多峰现象, 可能是由于配伍其他中药成分影响了单一成分的吸收、分布、代谢和排泄。另外, 多峰现象的出现还可能与体内的肠-肝循环(EHC), 肠-肠循环(EEC), 胃-肠循环(GFC)等密切相关^[4,5]。

3.5 养阴通脑颗粒有效部位 “有效部位” 作为一类化学组分与有效成分 (化学成分复杂) 相比, 其“相对有限”^[6], 且更能反映中医药防病治病整体特征; 其与中药材相比, 较之富集了有效物质, 并可避免因药材产地、品种不同所带来的质量难控制。

有研究提示, 葛根素的药动学参数可以基本反映葛根黄酮的药动学参数^[7]。本文以葛根素为检测指标, 研究治疗缺血性中风的现代中药复方制剂养阴通脑颗粒 (临床批件号: CZL01043) 主要有效部位组合的体内过程, 建立血浆中葛根素浓度的 HPLC 测定方法, 为进一步开展其主要有效部位组合在动物体内的动力学研究及其配伍关系奠定基础。

参考文献

[1] 赵 雍, 杜贵友, 崔海峰, 等. 复方葛根素对脑缺血损伤保护的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30 (7): 548-551.
[2] 王磊一, 赵爱平, 王福文, 等. 葛根素对大鼠急性脑缺血的保护作用 [J]. 中国中药杂志, 1997, 22 (12): 752-754.
[3] 张 莉, 黄 熙, 任 平, 等. 三维 HPLC 法同步测定犬血浆中的葛根素及阿魏酸 [J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18 (1): 45-49.
[4] 任 平, 黄 熙, 张 莉, 等. 方剂配伍的临床药动学研究 I: 川芎与川芎芍药汤的比较 [J]. 中草药, 2000, 31 (2): 915-917.
[5] 马越鸣. 药物 C-T 曲线的双峰现象 [J]. 国外医学? 药学分册, 1987, (3): 168.
[6] 王小如. 中药复杂体系中重大科学问题探讨 [M]. 厦门: 厦门大学出版社, 1998. 35.
[7] 卢 弘, 邢东明, 孙 虹, 等. 金森脑泰注射剂中葛根素在正常和缺血再灌注模型大鼠体内的药动学研究 [J]. 中国药理学杂志, 2002, 37 (1): 41-44.