技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)06-0884-04

固相萃取 - 反相高效液相色谱法测定大鼠血浆中羟基积雪草苷的浓度

谭欣玮,刘颖菊,朱丽莎,高丽佳
(重庆医科大学药学院药理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立大鼠血浆中羟基积雪草苷测定的高效液相色谱法。方法:固相萃取法对样品进行纯化处理后,选用 Welchrom-C_{18} 柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm),水 - 乙腈(24:76)为流动相测定药物含量;流速:1.0 ml/min;紫外检测波长:225 nm;柱温:30℃;内标:葫芦素 B。结果:在此色谱条件下,羟基积雪草苷和内标葫芦素 B 的保留时间分别为 5.11 min 和 8.14 min。线性范围为 5 μg/ml ~ 1.5 mg/ml (r = 0.999 8),最低检测浓度为 1 μg/ml。方法回收率在 90.21% ~ 95.65%,提取回收率在 80.65% ~ 87.04%。日内与日间精密度的 RSD 在 1.31% ~ 3.07%(n=5)。结论:该检测方法简便可靠,选择性和重现性好,符合常规生物样品检验的要求,可用于羟基积雪草苷在大鼠体内的药代动力学研究。

【关键词】羟基积雪草苷;固相萃取;高效液相色谱法
【中国图书分类法分类号】R965.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-08

Determination of madecassoside in SD rats plasma by solid-phase extraction RP-HPLC

TAN Xin-wei, et al
(*Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a method for madecassoside determination by solid-phase extraction RP-HPLC in SD rats plasma. *Methods*: The sample was cleaned with an Strata-X solid-phase extraction . HPLC conditions were as follows: Welchrom-C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), water-acetonitrile (24 : 76) as mobile phase (flow rate: 1.0 ml/min), cucurbitacin B as internal standard, detection wavelength of 225 nm, and column temperature of 30℃. *Results*: In this situation, the remaining times of the madecassoside and cucurbitacin B were 5.11 min and 8.14 min, respectively. The linear range of the method was 5 μg/ml ~ 1.5 mg/ml (r = 0.999 8). The low limit of detection was 1 μg/ml. The method recoveries and the extraction recoveries were 90.21% ~ 95.65% and 80.65% ~ 87.04% ,respectively. The within-day RSD and between-day RSD were between 1.31% ~ 3.07% (n=5). *Conclusion*: The

作者介绍:谭欣玮(1984-),男,硕士,
研究方向:药物代谢动力学。
通讯作者:刘颖菊,女,教授,E-mail: liuyingjbh@yahoo.com.cn。
基金项目:留学回国人员科研启动基金(编号:2006-331)。

异就可能直接影响干扰的效果和特异性[6]。由于靶 mRNA 的空间构像、位点等存在差异,导致并非所有的 ShRNA 产生的小干扰 RNA 均可对靶 mRNA 产生有效的的 RNA 干扰效应[7]。

本研究成功的构建并筛选到具有显著干扰效率的 STAT6 干扰质粒,这为 RNA 干扰技术应用到哺乳动物奠定了实验基础,对进一步观察 RNA 干扰技术在治疗哮喘中的作用具有重要意义,同时为哮喘的治疗和预防提供了新思路。

参 考 文 献

[1] Kaplan M H, Grusby M J. Regulation of T helper cell differentiation by STAT molecules[J]. Leukoc boil, 1998, 64(9): 2-5.

[2] 田新瑞,刘卓拉,牛 勃,等. STAT6 在哮喘小鼠肺组织的表达及激素的影响作用[J].中国药物与临床,2009,9(1):18-20.

[3] Akimoto T, Numata F, Tamura M, et al. Abrogation of bronchial Eosinophliic inflammation and airway hyperreactivity in singal transducers and activators of transcription (STAT) deficient mice[J]. J Exp Med, 1998, 187(9): 1537-1542.

[4] 叶乐平,谢丽微,李昌崇,等.布地奈德对哮喘大鼠信号转导子和转录激活子 6 的表达[J].中华微生物与免疫学杂志,2005,25(7):588-593.

[5] Caplen S T, Parrish S, Imam F, et al. Spesifec inhibition of gene expretion by small double stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(1): 9742-9747.

[6] Wang Q Z, Lv Y H, Diao Y, et al. The design of vectors for RNAi delivery system [J]. Curr Pharm Des, 2008, 14(13): 1327-1340.

[7] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami P. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalion cells [J]. Science, 2002, 296(5567): 550-553.

(责任编辑:关蕴良)

method is simple, convenient, accurate, reproducible, and suitable for studying the pharmacokinetics of madecassoside in SD rats.
【Key words】Madecassoside; Solid-phase extraction(SPE); HPLC

积雪草(Centalla asiatica)作为传统药物治病已有数千年的历史,广泛分布于长江流域以南各地;在亚洲的马来西亚、印度、非洲的毛里求斯和马达加斯加等地也有广泛分布。主要用于治疗抑郁症、烧伤性瘢痕、抗癌、防治冠心病、心肌梗死、脑血栓,脑梗塞,增强记忆,皮肤增白等。羟基积雪草苷(Madecassoside,MD)(图 1)为积雪草提取物三萜皂苷的主要成分之一,近年发现其对中枢神经系统疾病有明显的治疗作用[1]。为研究羟基积雪草苷在血浆中随时间变化的规律和药代动力学参数,本文建立固相萃取 - 反相高效液相色谱法测定大鼠血浆中羟基积雪草苷的浓度。

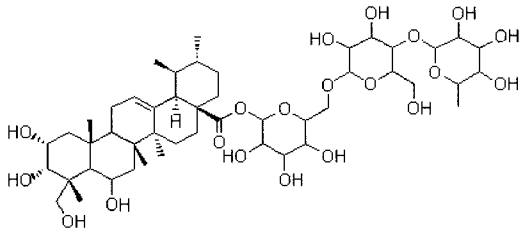


图 1 羟基积雪草苷结构式

1 仪器与试药

1.1 仪器

高效液相色谱仪 LC-2010A 型(日本岛津),紫外检测仪 UV-3150 型(日本岛津),电子分析天平 AB204-E 型(梅特勒—托利多仪器公司),台式离心机 TGL-16C(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试药

羟基积雪草苷标准品(美国 Sigma 公司),内标葫芦素 B(纯度 99%,购自天津医药工业研究所),甲醇(分析纯,重庆川东化工(集团)有限公司化学制剂厂),乙腈(色谱纯,天津市四友生物医学技术有限公司),0.9%氯化钠注射液(四川科伦药业股份有限公司),纯化水由美国 Millipore 公司 Milli-Q Biocel 型超纯水系统制备。

2 方法与结果

2.1 测定波长的选择

将羟基积雪草苷与葫芦素 B 用甲醇分别配成 0.1 mg/ml 的溶液,在 200 ~ 400 nm 间扫描。测定结果显示在 225 nm 处两者吸收较好,且杂质干扰较小,故选择 225 nm 作为检测波长。

2.2 色谱条件与系统适用性

Welchrom-C_{18} 柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm,美国 Welch Materials 公司)色谱柱,Strata-X 固相萃取柱(30 mg,1 ml)(美国 Phenomenex 公司);流动相:水:乙腈 =24:76[2~4];流速:1.0 ml/min;紫外检测波长为:225 nm;进样量:20 μl;柱温:30℃。

2.3 标准溶液及内标溶液的配制

2.3.1 标准品溶液的配制 精密称取羟基积雪草苷标准品 20 mg,置于 10 ml 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,配制成浓度为 2 mg/ml 的储备液,置于 4℃冰箱备用。

2.3.2 内标溶液的配制 精密称取葫芦素 B 标准品 10 mg,置于 10 ml 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,制成储备液。再稀释至浓度为 0.4 mg/ml 的内标液,置于 4℃冰箱备用。

2.4 血样处理

取血浆 0.2 ml,加入甲醇 0.4 ml(含内标葫芦素 B 10 μg),混旋 1 min,再 12 000 r/min 离心 15 min。取上清液上 Strata-X 固相萃取柱(预先用甲醇 3 ml 和水 3 ml 过柱),然后用乙腈 - 水 = 10:90 的洗脱液 2 ml 洗脱杂质;再用乙腈 - 水 =95:5 的洗脱液 1 ml 洗脱目标物质[5,6]并收集,室温下以氮气吹干,残渣用 100 μl 甲醇充分溶解,混匀后取 20 μl 进行 HPLC 检测,记录羟基积雪草苷和内标的峰面积。采用内标标准曲线法以峰面积比值定量[7]。

2.5 方法专属性试验

分别取空白血浆,定量稀释后的对照品溶液(羟基积雪草苷为 0.1 mg/ml 和葫芦素 B 为 0.4 mg/ml)以及含对照品血浆溶液,按"2.4"项下方法进行操作,记录色谱图(图 2)。在此条件下,羟基积雪草苷和内标葫芦素 B 的保留时间分别为 5.11 min 和 8.14 min,羟基积雪草苷和葫芦素 B 峰形良好,无杂质峰干扰,且保留时间较短,本方法具有较高的专属性。

2.6 线性关系及最低检测限试验

分别取大鼠空白血浆 0.2 ml 加入稀释的羟基积雪草苷标准溶液,使其最终质量浓度分别为 5、10、20、50 μg/ml 和 0.1、0.2、0.4、0.8、1.5 mg/ml 血浆,按血样预处理方法处理,然后采用 HPLC 法进行检测分析。血浆药物浓度在 5 μg/ml ~ 1.5 mg/ml 范围内线性关系良好,药物与内标的峰面积比值(Y)与药物质量浓度(X)呈线性关系,标准曲线方程:Y= 0.007 3+0.001 4X (r=0.999 8)。

当 S/N>3 时,羟基积雪草苷在血浆中的检测限为 1 μg/ml。

2.7 稳定性试验

取空白血浆 0.2 ml,分别加入羟基积雪草苷对照品溶液配制成终浓度分别为 10、100 μg/ml 和 1 500 μg/ml 的对照品血浆,各浓度制备 3 份,置于 -20℃冰箱保存,分别于第 5、10、20 d,取出对照品血浆按"2.4"项下方法操作,然后进行 HPLC 测定,结果表明,各浓度的 RSD 分别为 2.52%、3.24%、2.40%。实验结果表明血浆样品在 -20℃条件下,至少在 20 d 内保持稳定。

2.8 回收率试验

分别取空白血浆 0.2 ml,加入羟基积雪草苷使其质量浓

度分别为 10、100 μg/ml 和 1 500 μg/ml，每个浓度各 5 份，按血样预处理方法操作。HPLC 测定药品与内标的峰面积比值，代入标准曲线，计算羟基积雪草苷质量浓度，以测定值与实际加入量之比计算方法回收率(n=5)。

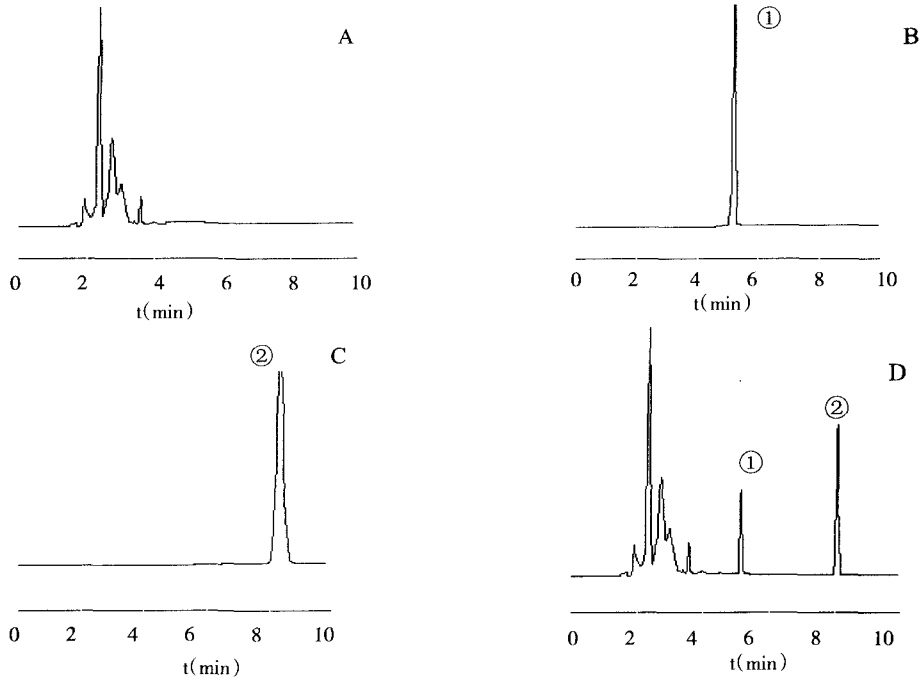
将 0.2 ml 的空白血浆换成甲醇，照上述方法同样配置浓度分别为 10、100 μg/ml 和 1 500 μg/ml 的羟基积雪草苷溶液，每个浓度各 5 份，取 20 μl 直接进样，将相同浓度的对照品血浆所测得的峰面积与甲醇制备的样品峰面积的比值，计算提取回收率(n=5)，结果见表 1。同理，将对照品血浆中所测到的内标的峰面积与其甲醇制备的样品(0.6 ml 甲醇中含 10 μg 葫芦素 B)峰面积的比值，计算内标物的平均提取回收率为 78.05%，RSD 为 2.25%(n=5)。

2.9 精密度试验

分别取空白血浆 0.2 ml，加入羟基积雪草苷使其质量浓度分别为 10、100 μg/ml 和 1 500 μg/ml，各浓度样品制备 5 份，并按“2.4”项下方法处理。对同一浓度血浆样品分别于 1 d 内连续测定 6 次，5 d 内每天测定 1 次，通过羟基积雪草苷和内标的峰面积比值进行定量，并计算日内和日间精密度(表2)。

2.10 药代动力学研究

根据药效学推荐剂量，SD 大鼠静脉注射 42 mg/kg 羟基积雪草苷后 1、3、5、10、20、30、60、120 min 分别从眼底静脉丛取血，分离血浆，按“2.4”项下方法进行操作，得到羟基积雪草苷在大鼠体内的血药浓度—时间曲线(图 3)。



A. 空白血浆；B. 羟基积雪草苷标准品；C. 葫芦素；B. 标准品；D. 血浆样品。

①羟基积雪草苷(保留时间 5.11 min)；②葫芦素 B(保留时间 8.14 min)

图 2 羟基积雪草苷和葫芦素 B 色谱图

表 1 血浆中羟基积雪草苷回收率试验结果(n=5)

羟基积雪草苷浓度(μg/ml)	方法回收率(%)		提取回收率(%)	
	$\bar{x}$	RSD	$\bar{x}$	RSD
10	90.21	1.64	80.65	2.77
100	95.65	1.97	87.04	3.23
15	94.22	2.52	81.47	2.73

表 2 血浆中羟基积雪草苷精密度试验结果(n=5)

羟基积雪草苷浓度(μg/ml)	RSD	
	日内精密度(%)	日间精密度(%)
10	2.98	2.31
100	1.59	1.96
1 500	1.31	3.07

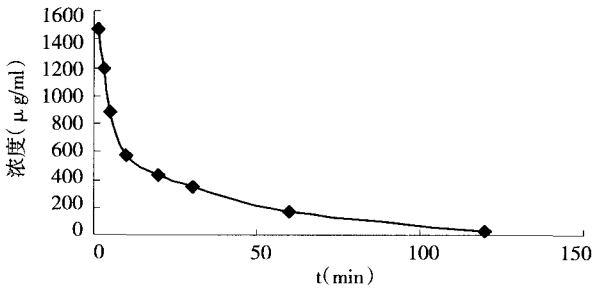


图 3 羟基积雪草苷在 SD 大鼠体内的血药浓度 - 时间曲线

3 讨 论

3.1 本实验选择了在结构上与羟基积雪草苷同属三萜类化合物的葫芦素 B 为内标物,在优化的色谱条件下,内标物能与羟基积雪草苷以及杂质均实现较好的分离[8]。

3.2 羟基积雪草苷是三萜类化合物,其结构中没有较强的发色基团,通过 HPLC-UV 的方法测定其生物样品存在一定的难度,对该药的紫外扫描可知羟基积雪草苷在 205 nm 处有最大吸收,在 220 nm 波长左右时也有较强吸收,为避免末端吸收的干扰,故选择 225 nm 为测定波长。但在该波长情况下 HPLC 检测时,干扰物较多,所以目前常用 LC-MS[9],柱转换液相色谱法[10]和蒸发光散射检测法[11]来测定羟基积雪草苷的含量。但上述方法的成本较高,操作复杂,不便于普遍应用。为了解决 HPLC 测定中干扰物较多的问题,在样品前处理中我们采用了固相萃取法对样品进行纯化,使干扰物质减少,羟基积雪草苷及内标物与杂质峰均实现了较好的分离,基线平稳,能够满足生物样品的测定要求。

3.3 固相萃取柱的洗脱液的确定,是以尽可能多地保留目标物质并最大化地除去杂质为目的。通过考察不同配比的乙腈与水的混合溶液,进行了洗脱液的选择试验。结果表明,乙腈 - 水 = 10:90 的混合溶液作为洗脱杂质的溶液,在除去较多杂质的同时可以将更多的将羟基积雪草苷保留在固相萃取柱上,并且使血浆样品中的杂质干扰最小。乙腈 - 水 =95:5 的混合溶液 1 ml 可以达到最佳洗脱目标物质的效果。

3.4 在该色谱条件下,对羟基积雪草苷各种浓度含量测定的回收率均在 80.65%以上,RSD 均在 3.24%以下,测定所需时间短,方法灵敏可靠,具有很好的准确度和可操作性。本文所建立的方法能够满足羟基积雪草苷在大鼠体内药代动力学研究的需要。

参 考 文 献

[1] 肖 隽,车镇涛,毕开顺.柱前衍生化 HPLC 法测定积雪草及三金片中积雪草苷的含量 [J].药学学报,2000,35(8):605-608.

[2] 汪洪武,刘艳清.HPLC 测定复方金银花颗粒中绿原酸与黄芩苷含量[J].中国药学杂志,2009,44(9):706-708.

[3] 王国兰,王丽荣,王俊秋,等.梯度洗脱反相高效液相色谱法测定头孢尼西钠有关物质[J].药物分析杂志,2007,27(3):409-411.

[4] 周彦彬,李 芳,丁劲松.HPLC 梯度洗脱法同时测定人血浆中对乙酰氨基酚和维生素 C 浓度[J].中国药学杂志,2009,44(4):314-317.

[5] 闫克里,朱秀卿,赵 丽,等.固相萃取 - 反相高效液相色谱法测定人血浆长春瑞滨的浓度[J].药物分析杂志,2009,29(3):399-402.

[6] 王洪允,江 骥,胡 蓓,等.固相萃取技术进展及在生物药物分析中的应用[J].药物分析杂志,2003,23(3):236-241.

[7] 刘颖菊,尚京川,高丽佳,等.八宝素在 Beagle 犬体内药代动力学[J].药学学报,2006,41(7):680-683.

[8] 王 宁,邓意辉,王绍宁,等.高效液相色谱法测定葫芦素 B 人血清白蛋白纳米粒中药物含量[J].中国新药杂志,2007,16(23):1968-1970.

[9] 张蕾磊,王海生,姚庆强,等.积雪草化学成分研究[J].中草药,2005,36(12):1761-1763.

[10] Minsun Baek, Young-Soo Rho, Dong-Hyun Kim. Column-switching high-performance liquid chromatographic assay for determination of asiaticoside in rat plasma and bile with ultraviolet absorbance detection[J]. Journal of Chromatography B, 1999, 7(32):357-363.

[11] 高永艳,黎永洁.反相高效液相蒸发光散射检测法测定三金软胶囊中羟基积雪草苷含量[J].药物研究,2008,5(29):26-27.

(责任编辑:关蕴良)

读者·编者·作者

关于论文写作中的作者致谢

我国著作权法公布以来,已得到社会各界的广泛重视,作为医学科技期刊必须不折不扣的执行著作版权法。为此将本刊对作者致谢的有关要求重申如下。在文后致谢是表示感谢并记录在案的意思。对给予实质性帮助而又不能列为作者的单位或个人应在文后给予致谢,但必须征得被致谢人的书面同意。致谢应避免以下倾向:(1)对确实给予了帮助的单位和个人,甚至用了他人的方法、思路、资料,为了抢先发表,而不公开致谢和说明。(2)出于某种考虑,将应被致谢人放在作者的位置上,混淆了作者和被致谢者的权利和义务。(3)以知名人士、知名专家包装自己的论文,抬高论文的身份,将未曾参与工作的,也未阅读过该论文的知名专家写在被致谢者中。被致谢者包括:(1)对研究提供资助的单位和个人、合作单位。(2)协助完成研究工作和提供便利条件的组织和个人。(3)协助诊断和提出重要建议的人。(4)给予转载和引用权的资料、图片、文献、研究思想和设想的所有者。(5)作出贡献又不能成为作者的人,如提供技术帮助和给予财力、物力支持的人,在致谢中应阐明其支援的性质。(6)其他需致谢者。

本刊编辑部

2010 年 6 月