

[15] 韩树海,冯春生,麻海春,等.利多卡因对局灶性脑缺血再灌注大鼠 HSP70mRNA 及其蛋白表达的影响[J].吉林大学学报

(医学版),2005,31(5):688-691.

[收稿日期]2010-02-02

呼吸通口服液中黄芩苷和牛蒡子苷在大鼠体内血药浓度测定

徐康康,廖清船,张永,仇锦春 (南京医科大学附属南京儿童医院,江苏 南京 210008)

[摘要] 目的:建立同时测定大鼠血浆中呼吸通口服液有效成分黄芩苷和牛蒡子苷的 HPLC 含量测定的方法。方法:血浆样品采用甲醇-乙腈(1/1)沉淀蛋白,HPLC 法测定血药浓度。色谱柱为 platisil ODS(4.6 mm×250 mm,5 μ m),流动相为乙腈-0.02%磷酸溶液(30:70),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长为 208 nm,柱温为室温。结果:黄芩苷和牛蒡子苷在 0.5~100 mg·L⁻¹ 范围内有良好的线性关系;二者的平均回收率均大于 85%,日内、日间精密性及稳定性的 RSD 均小于 10%。结论:本方法简便可行,重复性好,可用于呼吸通口服液中黄芩苷和牛蒡子苷的血药浓度定量分析方法。

[关键词] 血药浓度;黄芩苷;牛蒡子苷;高效液相色谱法

[中图分类号] R285.6 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2011)13-1049-03

Determination of plasma concentration of baicalin and arctiin in rats administrated with Huxitong oral solution

XU Kang-kang, LIAO Qing-chuan, ZHANG Yong, QIU Jin-chun (Nanjing Children's Hospital, Nanjing Medical University, Jiangsu Nanjing 210008)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a HPLC method for determining the plasma concentration of baicalin and arctiin in rats administrated with Huxitong oral solution. **METHODS** The protein of plasma samples were precipitated with methanol-acetonitrile (1/1) and plasma concentration was determined by using HPLC. Analysis was carried out at room temperature on a platisil ODS column(4.6 mm×250 mm,5 μ m) with acetonitrile-0.02% phosphoric acid (30/70) as the mobile phase, detecting at 208 nm, and at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. **RESULTS** The linearity range of both baicalin and arctiin was obtained from 0.5 to 100 mg·L⁻¹. The average recovery was all more than 85.0%. RSD values of inter-day, intra-day and stability were all less than 10%. **CONCLUSION** The method is simple and reproducible. It can be used to analyze quantitatively the plasma concentration of both baicalin and arctiin in rats used Huxitong oral solution.

KEY WORDS: plasma concentration; baicalin; arctiin; HPLC

呼吸通口服液系根据儿童特点研制、经江苏省药监局批准使用的儿童医院内自制中药复方制剂,由黄芩、百部、天花粉、桔梗、牛蒡子、芫花六味药材组成,具有清热解毒、止咳化痰的作用。临床用于上呼吸道感染、支气管炎、低热、咳嗽等症。医院制剂普遍缺少药动学的研究,临床使用完全建立在经验基础上。本文建立了一种测定大鼠在口服灌胃呼吸通口服液后血浆中该药 2 种主要成分的分析方法,并测定了灌胃 30 min 后大鼠血浆中黄芩苷和牛蒡子苷的含量,为今后开展药动学研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪(美国 HP-1100),紫外分光光度计(日本岛津 UV-2401 型)。

1.2 试剂与试药 黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所,供含量测定用,批号 110715-200815);牛

蒡子苷对照品(中国药品生物制品检定所,供含量测定用,批号 110819-200606);甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂为分析纯;呼吸通口服液(南京市儿童医院自制,批号 100922)。

1.3 实验动物 SD 大鼠,♂,体质量(200±20)g,中国药科大学实验动物中心提供[合格证号:SYXK(苏)2010-0025]。

2 方法与结果

2.1 测定波长的选择 取黄芩苷和牛蒡子苷对照品,用甲醇配制成适当浓度,测定吸收光谱,黄芩苷和牛蒡子苷分别在 214 nm 和 208 nm 处有最大吸收。考虑到处方中牛蒡子用量相对较少,因此选择 208 nm 为测定波长,使两者的峰面积尽量匹配。

2.2 色谱条件 色谱柱:platisil ODS 柱(4.6 mm×250 mm,5 μ m),流动相:乙腈-0.02%磷酸溶液

[基金项目] 南京市医学科技发展项目(编号:YKK08109) [作者简介] 徐康康,男,学士,主任药师,电话:025-83117533, E-mail: kang-kang4425@126.com

(30:70), 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长: 208 nm, 柱温: 室温。

2.3 血浆样品采集 大鼠禁食不禁水 24 h 后按 20 mL·kg⁻¹ 灌胃呼吸通口服溶液, 药液中分别含黄芩苷和牛蒡子苷为 3.1 g·L⁻¹ 和 2.5 g·L⁻¹。分别于给药前和给药后 30 min 于眼底静脉丛取血 0.5 mL, 置肝素化离心管, 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 分离血浆, -34 °C 保存备用。

2.4 血浆样品处理 精密吸取血浆 100 μL 置于 1.5 mL 高速离心管, 加入甲醇-乙腈(1:1) 150 μL, 旋涡混合 5 min, 离心 10 min(12 000 r·min⁻¹), 取 20 μL 进样分析。

2.5 分析方法认证

2.5.1 方法专属性 取大鼠空白血浆 100 μL, 分别按“2.4”项下操作。得空白血浆色谱图 1(a); 将一定浓度的黄芩苷和牛蒡子苷标准液加入空白血浆, 同法操作, 得色谱图 1(b), 黄芩苷和牛蒡子苷的保留时间约为 8.4 min 和 10.4 min; 取大鼠口服呼吸通口服液 30 min 后的血浆样品同法操作, 得色谱图 1(c)。从图 1 中可见, 基线噪音较小, 血浆中内源性物质均不干扰测定, 说明本法具有较高的专属性。

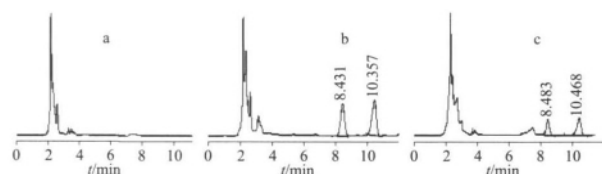


图 1 高效液相色谱图
Fig 1 HPLC chromatogram

2.5.2 标准曲线及线性范围 取大鼠空白血浆 100 μL, 加入黄芩苷和牛蒡子苷对照品适量, 使质量浓度相当于 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 75.0, 100.0 mg·L⁻¹, 按“2.4”项下操作, 进样分析。以血浆中黄芩苷的质量浓度(C)为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $A = 35.538C + 278.66$, $r = 0.9992$ ($n = 5$), 最低检测限为 100 μg·L⁻¹ ($S/N = 3$); 以血浆中牛蒡子苷的质量浓度(C)为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $A = 19.989C + 210.9$, $r = 0.9991$ ($n = 5$), 最低检测限为 50 μg·L⁻¹ ($S/N = 3$)。结果表明, 黄芩苷和牛蒡子苷在 0.5 ~ 100.0 mg·L⁻¹ 线性良好。

2.5.3 日内和日间精密度 取大鼠血浆取大鼠空白血浆 100 μL, 加入黄芩苷和牛蒡子苷对照品适量, 使质量浓度相当于 0.5, 10.0, 100.0 mg·L⁻¹, 按“2.4”项下操作, 1 日内重复进样 5 次, 连续进样 5 日, 计算精密度, 结果见表 1。

表 1 血浆中黄芩苷和牛蒡子苷测定的日内、日间精密度试验结果 ($n = 5$)

Tab 1 Inter-day and intra-day precision for determination of baicalin and arctiin ($n = 5$)

样品	加入量 /mg·L ⁻¹	日内			
		测得量 /mg·L ⁻¹	RSD /%	测得量 /mg·L ⁻¹	RSD /%
黄芩苷	0.5	0.508	3.2	0.516	4.9
	10.0	10.38	5.3	10.24	5.4
	100.0	104.4	5.4	105.8	4.2
牛蒡子苷	0.5	0.504	2.9	0.509	4.6
	10.0	10.27	4.2	10.18	5.1
	100.0	105.2	4.7	103.9	4.8

2.5.4 提取回收率 取大鼠血浆取大鼠空白血浆 100 μL, 加入黄芩苷和牛蒡子苷对照品适量, 使质量浓度相当于 0.5, 10.0, 100.0 mg·L⁻¹, 按“2.4”项下操作, 得黄芩苷和牛蒡子苷的峰面积分别为 A_1 和 B_1 , 每个浓度 5 个样品; 另取超纯水 100 μL, 加入黄芩苷和牛蒡子苷对照品适量, 使质量浓度相当于 0.5, 10.0, 100.0 mg·L⁻¹, 按“2.4”项下操作, 得黄芩苷和牛蒡子苷的峰面积分别为 A_2 和 B_2 , 每个浓度 5 个样品, 从而求得黄芩苷(A_1/A_2)和牛蒡子苷(B_1/B_2)的提取回收率, 结果见表 2。

2.5.5 方法回收率 取大鼠血浆取大鼠空白血浆 100 μL, 加入黄芩苷和牛蒡子苷对照品适量, 使质量浓度相当于 0.5, 10.0, 100.0 mg·L⁻¹, 按“2.4”项下操作, 得黄芩苷和牛蒡子苷的峰面积, 每个浓度 5 个样品, 代入标准曲线中, 计算样品的浓度, 以测定量与加入量比较, 得到样品的方法回收率, 结果见表 2。

表 2 血浆中黄芩苷和牛蒡子苷测定的回收率试验结果 ($n = 5$)

Tab 2 Extraction and method recovery for determination of baicalin and arctiin ($n = 5$)

样品	加入量 /mg·L ⁻¹	日内					
		测得量 /mg·L ⁻¹	回收率 /%	RSD /%	测得量 /mg·L ⁻¹	回收率 /%	RSD /%
黄芩苷	0.5	0.473	94.6	5.4	0.49	98.0	4.8
	10.0	9.54	95.4	2.4	9.7	97.0	3.2
	100.0	95.8	95.8	3.3	97.4	97.4	3.1
牛蒡子苷	0.5	0.48	96.0	5.1	0.47	94.0	4.1
	10.0	9.63	96.3	2.8	9.68	96.8	3.4
	100.0	97.2	97.2	3.0	92.4	92.4	3.6

2.5.6 稳定性考察 用空白血浆配置黄芩苷和牛蒡子苷分别为 0.5, 10, 100 mg·L⁻¹ 3 个质量浓度样品, 分别于下列条件下测定稳定性: (1) 室温放置: 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 取样测定黄芩苷和牛蒡子苷的浓度, 测得 RSD 小于 10%; (2) -34 °C 下冷冻放置: 分别在 0, 3, 6, 9 d 取样测定黄芩苷和牛蒡子苷的浓度, 测得 RSD 小于 10%; (3) 冻融稳定性, 血浆样品 -34 °C 冰箱放置 3 d 后, 室温融化, 测定黄芩苷和牛蒡子苷的浓度, 重复操作 3 次, 测得 RSD 小

于 10%。见表 3。

表 3 血浆中黄芩苷和牛蒡子苷稳定性试验结果

Tab 3 Stability of baicalin and arctiin in plasma

存储条件	RSD/%					
	低浓度		中浓度		高浓度	
	黄芩苷	牛蒡子苷	黄芩苷	牛蒡子苷	黄芩苷	牛蒡子苷
室温放置	3.19	2.99	3.25	3.01	1.54	1.42
冷冻放置	3.49	3.28	3.17	2.87	1.64	1.48
冻融循环	4.69	3.87	4.67	4.01	1.78	1.54

2.6 黄芩苷和牛蒡子苷血浆样品含量测定 结果见表 4。

表 4 给药 30 min 后黄芩苷和牛蒡子苷血药浓度 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 4 plasma concentration of baicalin and arctiin 30min after administration ($\bar{x} \pm s, n=3$)

成分	血药质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD/%
黄芩苷	30.24	5.53
牛蒡子苷	28.52	4.98

3 讨论

本文优化了对黄芩苷和牛蒡子苷的血浆处理方法,采用甲醇-乙腈(1/1)混合溶剂沉淀法。在实验过程中,我们比较了乙醇、甲醇、丙酮、三氯醋酸、乙腈等溶剂沉淀蛋白的效果。发现甲醇-乙腈(1:1)效果最好。在设定的色谱条件下,黄芩苷与牛蒡子苷分离良好,血浆内源性物质及其他杂质不干扰样品的分离测定。

测定黄芩苷血药浓度的文献报道相对比较多^[1-2];测牛蒡子苷血药浓度的报道则较少,作者检索维普期刊数据库(1989—2010年)只发现胥秀英等^[3]报道过相关研究。同时测定这 2 种组分血药浓

度的报道同样很少,耿立冬等^[4]在双波长条件下,采用梯度洗脱可以分析中药验方梔蒡热毒平中梔子苷、黄芩苷和牛蒡子苷 3 种组分的血药浓度。该色谱条件对于仪器设备的配置比较高。有研究报道^[5-6]提供了同时测定黄芩苷和牛蒡子苷的色谱方法,但是前者的色谱条件不能有效分离血浆中内源性物质,后者的保留时间较长,且需要配置柱温箱。实验过程中我们优化了有机相的比例,取得理想的分离度和合适的保留时间。

本文建立了 HPLC 法同时测定呼吸通口服液中黄芩苷和牛蒡子苷的血药浓度的方法,结果表明,该方法准确、简单、灵敏,能满足生物样品分析的要求,可用于呼吸通口服液的药动学考察。

参考文献:

- [1] 方焱,陈礼明,陈象青. HPLC 法测定注射用双黄连中黄芩苷血药浓度及其在家兔体内药动学[J]. 中国药师, 2006, 9(11): 1022-1023.
- [2] 路通,宋珏,谢林,等. HPLC 法同时测定灌胃黄芩水煎剂后大鼠血浆中黄芩苷和汉黄芩苷的质量浓度及药动学研究[J]. 中草药, 2005, 36(6): 870-873.
- [3] 胥秀英,郑一敏,傅善权,等. 牛蒡子苷在小鼠体内的分布状态及药代动力学研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(5): 698-699.
- [4] 耿立冬,石任兵,萨楚拉,等. 梔蒡热毒平有效组分中梔子苷、牛蒡子苷和黄芩苷在大鼠体内血药浓度测定[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(5): 350-353.
- [5] 张永,廖清船,仇锦春,等. HPLC 同时测定呼吸通口服液中黄芩苷和牛蒡子苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 25-27.
- [6] 周晓英. HPLC 测定小儿咳嗽宁糖浆中牛蒡子苷和黄芩苷的含量[J]. 华西药理学杂志, 2000, 16(4): 303-304.

[收稿日期] 2011-01-17

心包腔注射米力农对心衰大鼠血流动力学的影响

张春曦,罗兆榴,黄达德,谢建将 (广州市第一人民医院心胸外科,广东 广州 510180)

[摘要] 目的:观察心包腔注射米力农对慢性心力衰竭大鼠模型血流动力学参数的影响,并探讨米力农心包腔给药与静脉给药的差异。方法:腹主动脉缩窄法制备大鼠慢性心力衰竭模型,38 只成模大鼠随机分为心包组($n=19$)和静脉组($n=19$)。2 组均给予 0.5 mL 米力农($50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$),分别经心包腔和股静脉给药,监测给药前后大鼠平均动脉压(MAP)、心率(HR)、左心室收缩压峰值(LVSP)、左心室内压最大上升速率($\text{LV} + \text{dp}/\text{dt}$)、左心室内压最大下降速率($\text{LV} - \text{dp}/\text{dt}$)、左心室舒张期末压(LVEDP)的变化。结果:心包腔给药后 5, 15, 30, 60 min, LVSP、 $\text{LV} + \text{dp}/\text{dt}$ 、 $\text{LV} - \text{dp}/\text{dt}$ 较给药前显著增加($P < 0.05$), LVEDP 显著降低($P < 0.05$), HR 和 MAP 未见显著改变;静脉给药后 1, 5, 15 min, LVSP、 $\text{LV} + \text{dp}/\text{dt}$ 较给药前极显著增加($P < 0.01$), $\text{LV} - \text{dp}/\text{dt}$ 、HR 显著增加($P < 0.05$), MAP、LVEDP 显著降低($P < 0.05$)。给药后 1, 5, 15 min, 心包组 MAP 高于静脉组($P < 0.05$), 而 LVSP、 $\text{LV} + \text{dp}/\text{dt}$ 、HR 低于静脉组($P < 0.05$); 30, 60 min, LVSP、 $\text{LV} + \text{dp}/\text{dt}$ 、 $\text{LV} - \text{dp}/\text{dt}$ 高于静脉组($P < 0.05$)。结论:心包腔注射米力农可以提高心衰大鼠左心室的收缩功能和舒张功能,与静脉注射比较作用缓和、平稳、持久,并且对体循环血压和心率无影响。

[关键词] 心力衰竭;大鼠;米力农;心包腔;静脉;心脏血流动力学

[基金项目] 广州市医药卫生科技项目(编号:2008-YB-018) [作者简介] 张春曦,男,硕士,副主任医师,电话:020-81048278, E-mail: zcx3503@163.com