

血浆中黄芩甙的 HPLC 测定方法

阴 健 (中国中医研究院中药研究所 北京 100700)

任天池 曹春林 (北京中医药大学 北京 100029)

摘 要 采用 HPLC 法建立了家兔血浆中黄芩甙(baicalin)测定方法。用甲醇沉淀家兔血浆蛋白,氮气流将上清液吹干,以少量流动相溶解残渣,用 HPLC 方法测定。该方法可用于家兔静脉注射黄芩甙后血药浓度的测定。

关键词 黄芩甙 HPLC 法 药代动力学

Determination of Baicalin in Rabbit Plasma by Reversed Phase HPLC

Yin Jian(Institute of Chinese Materia Medica,China Academy of TCM,Beijing,100700)

Ren Tianchi, Cao Chunlin(Beijing University of TCM,Beijing,100029)

Abstract: The determination of baicalin in rabbit plasma was carried out by RP HPLC. The rabbit plasma was obtained by precipitating with methanol, evaporating the supernatant to dry with the nitrogen steam and dissolving the residual with small amount of the mobile

phase. The average recovery was 98.80%.

Key words: baicalin, HPLC, pharmacokinetics

黄芩甙是黄芩的主要有效成分,与黄芩的清热解毒、燥湿等功效有十分密切的关系。现代药理研究发现^[1],黄芩甙有抗菌、抗病毒、抗变态反应、抗炎及降压作用。近年研究发现,黄芩甙^[2]有抑制磷酸二酯酶,调节cAMP水平的作用。因此,建立黄芩甙的血药浓度测定方法,搞清黄芩甙的体内命运,将有重要的意义。有关黄芩甙的HPLC测定方法,以前曾有过很多的报道^[3~5],这些方法大多是针对生药或成药建立的方法,黄芩甙血药浓度测定方法尚未见报道,因此本文作者借鉴以上条件建立了血浆中黄芩甙的HPLC测定方法。

1 仪器与药品

1.1 仪器 Waters244型高效液相色谱仪;Model 510泵;Model 440固定紫外波长检测器;Model 730数据处理机。

1.2 药品与试剂 对照品:黄芩甙(购自卫生部药检所,并反复重结晶)。内标物:芦丁(北京市药检所提供)。试剂:甲醇、四氢呋喃、磷酸均为分析纯。家兔全血以1%肝素抗凝并离心得血浆。

2 实验条件

色谱柱:YWG-RP18,250mm 不锈钢柱,内径4.6mm;流动相:甲醇-水-四氢呋喃-磷酸(25:60:10:33×10⁻³);流速:1.0ml/min;检测波长280nm;灵敏度0.01AUFs。

3 实验方法与结果

3.1 标准溶液配制 精密称取黄芩甙对照品适量配成浓度为44.8μg/ml和1.792μg/ml的两种溶液供做高浓度和低浓度标准曲线用。并称内标物芦丁适量配制成2.834μg/ml内标溶液。

3.2 直线回归方程的测定 取44.8μg/ml的黄芩甙对照品溶液40、80、120、180、300、700μl至各试管中,在45℃以下用氮气

流将溶剂挥干,加100μl空白血浆,并加1.00ml芦丁甲醇液沉淀血浆蛋白,加入50μl 1M KH₂PO₄溶液在快速液体混合器上混合30秒,放置30min用4000rpm离心,吸取上清液800μl,在45℃以下用高纯氮吹干,50μl流动相溶解残渣,离心,取上清液进样,以黄芩甙峰高与芦丁峰高比(Y)对黄芩甙浓度(x)作线性回归。在17.6μg/ml~316.6μg/ml范围内,黄芩甙高浓度标准曲线回归方程为: $Y = 0.06473x - 0.7634, r = 0.9993$ 。在0.892~17.92μg/ml范围内,低浓度标准曲线回归方程为 $Y = 0.03960x + 0.006629, r = 0.9907$ 。以三倍信噪比的峰高值与已知浓度的黄芩甙的峰高值比较,计算得黄芩甙最低检测量为18ng。

3.3 精密度和回收率实验 0.1ml空白血浆中加入黄芩甙4.48μg和2.688μg,进行日内、日间精密度实验,结果见表1。

表1 变异系数

No.	加入量 (μg/ml)	测得量(日内)		测得量(日间)	
		$\bar{x} \pm s$	RSD	$\bar{x} \pm s$	RSD
1	44.80	46.03±2.21	4.81	47.37±2.05	4.32
2	26.88	27.62±0.67	2.43	28.87±1.60	5.55

0.1ml血浆中加入4.48、13.44、17.92μg黄芩甙按上法操作,测得回收率为103.5%、94.41%、98.48%,平均回收率为98.80%。

3.4 样品测定 家兔血浆中黄芩甙的测定与标准曲线中的操作相同,即以给药后的血浆代替空白血浆。当家兔静注黄芩甙100mg/kg(用注射用水溶解,并调节pH=7.20),用该方法测定黄芩甙血药浓度,实验数据采用中国药理学会编写的《实用药代动力学程

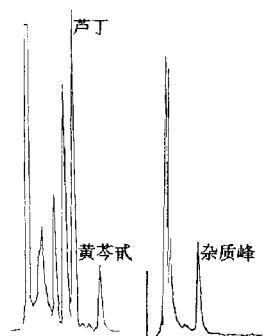


图1 HPLC 色谱图

序》进行房室模型拟合,结果表明黄芩甙在家兔体内符合三室开放模型, $t_{1/2\beta} = 4.22 \pm 2.03\text{min}$, $t_{1/2\alpha} = 12.25 \pm 2.28\text{min}$, $t_{1/2\beta} = 447.87 \pm 180.09\text{min}$, $MRT_{0\sim\infty} = 107.36 \pm 51.46\text{min}$ 。

4 讨论

由于黄芩甙结构为 5,6-二羟基黄酮-7-0-葡萄糖醛酸甙,易氧化,须在低温下(45℃以下)用氮气流吹干。黄芩甙极性较大,且有一定酸性,因此流动相中加入四氢呋喃增加其溶解度,加入磷酸抑制其解离,防止色谱峰拖尾,起到改善峰形的作用。本方法中选择芦丁为内标物,因为芦丁与黄芩甙均为黄酮甙,溶解度性质与色谱性质近似,实验证明以芦丁为内标物的方法可增加方法的准确性,简化操作。

本文为黄芩甙血药浓度测定方法的探讨,应用此方法进行黄芩甙的药代动力学研究,证明此方法简便可行,有关研究工作请见以后报道。

参考文献

- 1 周金黄,王筠默,李仪奎,等. 中药药理学. 上海:上海科学技术出版社,1986. 97
- 2 李忠. 中药的酶效应. 生物化学与生物物理进展,1983,3(6):17~19
- 3 Takino Y, Miyahara T, Arichi E, et al. Chem Pharm Bull, 1987, 35(8):3494
- 4 Sagara K, Ito Y, Oshima T, et al. J Chromatogr, 1985, 328:289
- 5 Tomimori T, Jin H, Miraichi, et al. Yakugaku Zasshi, 1985, 105(2):148

(收稿:1997-03-21)