

# RP-HPLC 检测大鼠大血管中异钩藤碱的含量

杨娟, 王兴\*, 李晓倩, 陈志远

(西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031)

**[摘要]** 目的: 建立测定大鼠大血管中异钩藤碱含量的方法。方法: Wista 大鼠灌胃钩藤水煎液后取出大血管, 液氮研磨, 用乙醇沉淀组织匀浆中的蛋白质, 取上清液用氮气吹干, 加甲醇复溶后取上清液直接进样, 用高效液相色谱仪测定。RP18 Waters™ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水(70:30), 三乙胺调 pH 8.0, 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 254 nm, 异钩藤碱保留时间约为 12 min, 柱温 30 °C。结果: 大血管中异钩藤碱的质量浓度在 0.04 ~ 20.0 mg·L<sup>-1</sup>, 大鼠峰面积之比 Y 与异钩藤碱的质量浓度 X 具有较好的线性关系, 回归方程为  $Y = 4.644 1X + 0.161 2 (R^2 = 0.999 2)$ ; 平均提取回收率为 99.34%, RSD < 8.0%。结论: 方法简便、稳定、易行, 可以用于测定大鼠大血管中异钩藤碱的含量。

**[关键词]** 钩藤; 异钩藤碱; 高效液相色谱; 大鼠; 大血管

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0235-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013230235

## Detection Content of Isorhynchophylline in Rat Blood Vessels by RP-HPLC

YANG Juan, WANG Xing\*, LI Xiao-qian, CHEN Zhi-yuan

(School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for the determination of isorhynchophylline on rat great vessels. **Method:** The rat great vessels were removed after intragastric administration of Uncariae Ramulus Cum Uncis decoction and liquid nitrogen grinding. The tissue samples which were drawn and treated by adding ethanol and the supernatant were dried by N<sub>2</sub>. After redissolving in carbinol, the supernatant were detected by HPLC directly. The analysis was carried on an analytical column RP18 Waters™ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of carbinol-water (70:30), triethylamine to adjust pH 8.0 and the flow rate was 0.8 mL·min<sup>-1</sup>. The UV detection wave length was at 254 nm and the column temperature was kept at 30 °C. The retention time of isorhynchophylline was about 12 min. **Result:** A good linearity was obtained from 0.04 mg·L<sup>-1</sup> to 20.0 mg·L<sup>-1</sup> for isorhynchophylline. Regression curve was  $Y = 4.644 1X + 0.161 2$  with a correlation coefficient ( $R^2$ ) of 0.999 2, the average recovery was 99.34%, and the RSD was less than 8.0%. **Conclusion:** The method is simple, stable and easy for operation. It is shown to be suitable for determination of isorhynchophylline in rat great vessels.

**[Key words]** Uncaria Ramulus Cum Uncis; isorhynchophylline; HPLC; rat; great vessels

钩藤主要有效成分是吲哚类生物碱钩藤碱和异钩藤碱<sup>[1]</sup>。其中异钩藤碱对心血管系统、血液系统和中枢神经系统等都具有比较广泛的药理活性<sup>[2]</sup>, 临床上用于治疗高血压、头痛、癫痫, 神经衰弱<sup>[3-9]</sup>。

钩藤最常配伍的药物是天麻, 在治疗高血压的疗效上, 钩藤与天麻配伍可在一定程度上增强疗效, 著名经典代表方“天麻钩藤饮”则将这一配伍的代表。但钩藤与天麻配伍的科学性和合理性尚未阐明。本文在前期研究的基础上, 对 Wista 大鼠大血管的组织处理进行了方法学探讨, 确定大血管组织预处理的方法和 HPLC 测定条件, 建立异钩藤碱在大血管中的体内样品分析方法, 为下一步研究钩藤配伍天麻后对其效应成分在大鼠大血管中分布的影响以及探索钩藤与天麻药对配伍的机制奠定基础<sup>[10-12]</sup>。

### 1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津), MTN-

**[收稿日期]** 20130227(015)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30801547); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(SWJTU11CX115, SWJTU11ZT26)

**[第一作者]** 杨娟, 硕士, 从事中药新药研发, 028-87603202, E-mail: yangjuansan@qq.com

**[通讯作者]** \* 王兴, 博士, 副教授, 从事中药药物动力学研究, Tel: 028-87601838, E-mail: wshing@263.net

2800W 型氮吹浓缩装置(天津奥特赛恩斯), TGL-16C 型离心机(上海安亭科学仪器厂制造), WH-3 型微型漩涡混合仪(上海沪西分析仪器有限公司)。

异钩藤碱对照品(南昌贝塔生物科技有限公司,批号 10525-080117), 卡马西平(中国药品生物制品检定所,批号 100141-199503), 钩藤(四川新荷花中药饮片有限公司,经西南交通大学宋良科副教授鉴定符合 2010 年版《中国药典》相应规定), Wistar 大鼠, 雄性(150 ± 20) g(四川大学华西动物实验中心)。

## 2 方法和结果

### 2.1 试液的制备

**2.1.1 药液的制备** 钩藤煎液:取钩藤 20 g, 加 300 mL 蒸馏水煎煮, 沸腾 15 min, 过滤, 滤液浓缩成 200 mL(含生药 0.1 g·mL<sup>-1</sup>)。

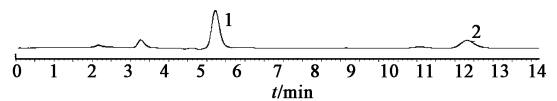
**2.1.2 内标卡马西平溶液的制备** 精密取卡马西平 2.0 mg 于 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇稀释至刻度即得 200 mg·L<sup>-1</sup> 内标溶液(储备液)。20 mg·L<sup>-1</sup>: 取 200 mg·L<sup>-1</sup> 内标溶液 1 mL 于 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇稀释至刻度即得。

**2.1.3 异钩藤碱标准液的制备** 200 mg·L<sup>-1</sup>: 精密称定异钩藤碱对照品 2.0 mg 于 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 得 200 mg·L<sup>-1</sup> 标准溶液(储备液)。20 mg·L<sup>-1</sup>: 取 200 mg·L<sup>-1</sup> 标准溶液 1 mL 于 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇稀释至刻度即得。2.0 mg·L<sup>-1</sup>: 取 200 mg·L<sup>-1</sup> 标准溶液 0.1 mL 于 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇稀释至刻度即得。

**2.1.4 供试组织匀浆的制备** 取 4 只 Wista 大鼠, 根据大鼠的体质量给予一定剂量的钩藤水煎液(钩藤水煎液的灌胃量 1~2 mL/100 g) 连续灌胃 7 d, 最后一次给药前禁食不禁水 12 h, 分别于最后一次灌胃后 60 min 和 120 min(每组 2 只) 将大鼠股动脉放血, 断头处死后取其大血管, 挤压血管内部血液, 用生理盐水进行反复冲洗, 在冷生理盐水中荡洗几遍, 每次均用 3 层滤纸挤压。将压干的组织称质量, 大血管加液氮研磨, 用确定的溶剂制成 1:2 匀浆, 超声 10 min, 涡旋 30 s, 充分混匀, 3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min。用微量移液器精密吸取 0.5 mL 的大血管组织匀浆上清液于 5 mL 的具塞玻璃锥形离心试管中, 加入 50 μL 的内标储备液卡马西平(400 mg·L<sup>-1</sup>), 涡旋混匀 30 s, 用氮吹仪氮气流吹干, 加 0.5 mL 复溶溶剂复溶, 摇匀, 涡旋充分混匀 3 min, 10 000 r·min<sup>-1</sup> 高速离心 10 min, 取上清液置于 1.5 mL 塑料离心管中备用。

**2.1.5 空白组织匀浆** 取 4 只 Wista 大鼠, 作空白对照, 同灌胃组处理方式, 根据体质量确定生理盐水的灌胃量, 灌胃 30 min 后, 自股动脉放血, 断头, 按供试组织的处理方法制成空白大血管组织匀浆液。

**2.2 色谱条件** 根据 2010 年版《中国药典》和文献[13-15], 色谱条件: RP18 Waters<sup>TM</sup> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Wondasil C<sub>18</sub> 前置预柱(4.0 mm × 10 mm, 5 μm); 考虑到该系列流动相可能产生的高压, 故将流速设定为 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 流动相为甲醇-水(70:30), 三乙胺调 pH 8.0, 检测波长 254 nm; 异钩藤碱保留时间约为 12 min, 卡马西平的保留时间约为 5.5 min。结果见图 1。



1. 卡马西平; 2. 对照异钩藤碱

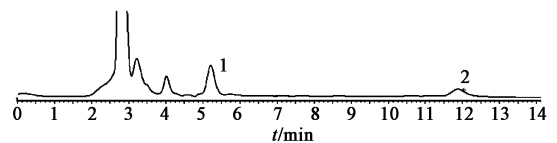
图 1 对照品异钩藤碱和内标卡马西平的 HPLC

**2.3 沉淀剂和复溶剂的选择** 大血管组织加液氮研磨, 分 3 组每组分别加入 2 mL 甲醇、无水乙醇、乙腈制成 1:2 匀浆, 超声 10 min, 涡旋 30 s, 充分混匀, 3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min。3 组用微量移液器分别精密吸取 0.5 mL 空白大鼠大血管组织匀浆于 3 支(共 9 支) 洁净的 5 mL 玻璃离心试管中, 每支试管分别加入 100 μL 的内标和 50 μL 的对照品溶液, 在涡旋混匀器上混匀 30 s, 氮气流吹干, 每组中的各支分别加 500 μL 甲醇、水、流动相复溶, 漩涡混匀 3 min, 于 10 000 r·min<sup>-1</sup> 下高速离心 10 min, 取上清液置于 1.5 mL 塑料离心管中, 精密吸取 20 μL 进样。见表 1。

表 1 沉淀剂筛选安排

No.	沉淀剂	复溶溶剂	No.	沉淀剂	复溶溶剂
1	甲醇	甲醇	6	无水乙醇	流动相
2	甲醇	水	7	乙腈	甲醇
3	甲醇	流动相	8	乙腈	水
4	无水乙醇	甲醇	9	乙腈	流动相
5	无水乙醇	水			

对色谱进行分析, 确定无水乙醇为最佳沉淀剂, 甲醇为最佳复溶剂。图谱见图 2。



1. 卡马西平; 2. 异钩藤碱

图 2 无水乙醇为沉淀剂, 甲醇为复溶剂的条件下空白大血管中对照品和内标图谱

**2.4 异钩藤碱标准曲线的绘制** 精密取大血管组织空白匀浆液 0.5 mL,各加入卡马西平内标液(200 mg·L<sup>-1</sup>)40 μL,再加入不同量的 Isorhy 标准液(200 mg·L<sup>-1</sup>)配制 0.04,0.2,0.4,2.0,4.0,20.0 mg·L<sup>-1</sup> 系列质量浓度的标准液,按上述组织样品处理方法处理,进样 20 μL,以效应成分异钩藤碱和内标的面积比为横坐标,组分质量浓度为纵坐标,求其回归方程。表明异钩藤碱对照品在大血管组织中在 0.04 ~ 20.0 mg·L<sup>-1</sup> 具有较好的线性关系。回归方程:  $Y = 4.6441X + 0.1612 (R^2 = 0.9992)$ 。

**2.5 精密度实验** 精密取空白大血管组织浆液 0.5 mL,加入不同体积的异钩藤碱标准液(200 mg·L<sup>-1</sup>)和内标卡马西平储备液(200 mg·L<sup>-1</sup>)40 μL,配制成质量浓度为 0.2,2.0,20.0 mg·L<sup>-1</sup> 溶液,平行 3 份,按照上述组织预处理方法处理,于 1 d 内完成进样,计算日内精密度。另取空白大血管组织匀浆,按照上述方法处理,连续 3 d 进样,计算日间精密度。结果表明该方法精密度良好,日间精密度 4.54%,日间精密度 7.03%。

**2.6 稳定性实验** 精密吸取 0.5 mL 空白大血管组织匀浆,加入不同体积的异钩藤碱标准液(200 mg·L<sup>-1</sup>)和内标卡马西平储备液(200 mg·L<sup>-1</sup>)40 μL,配制成 0.2,2.0,20.0 mg·L<sup>-1</sup> 溶液,平行 3 份,按照上述组织预处理方法处理,常温放置,于 24 h 内每隔 6 h 测定一次,连续测定 3 次,计算测定值 RSD,结果常温 RSD 4.54%,低温 RSD 7.03%,考察常温稳定性。另取样相同方法处理,-20℃ 贮存,分别于第 1 天,第 3 天,第 8 天进行进样,计算测定值 RSD,结果常温 RSD 5.69%,低温 RSD 5.83%,考察低温稳定性。表明该方法稳定相良好。

**2.7 重复性和准确度试验** 精密吸取 0.5 mL 空白组织匀浆,加入一定量的异钩藤碱标准液(200 mg·L<sup>-1</sup>)和内标卡马西平储备液(200 mg·L<sup>-1</sup>)40 μL,配制成质量浓度为 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 的样品溶液,连续进样 3 次,得到 3 次测定值,计算得到组织的 RSD 0.26%,表明该方法重复性良好。加入不同体积的异钩藤碱标准液(200 mg·L<sup>-1</sup>)和内标卡马西平储备液(200 mg·L<sup>-1</sup>)40 μL,配制成质量浓度为 0.2,2.0,20.0 mg·L<sup>-1</sup> 异钩藤碱标准溶液,平行 3 份,涡旋混匀,连续测定 3 次,计算其准确度平均值为 95.67%。结果表明该方法准确度良好。

**2.8 提取回收率实验** 精密吸取 0.5 mL 空白大血管组织匀浆,加入不同体积的异钩藤碱标准液(200 mg·L<sup>-1</sup>)和内标卡马西平储备液(200 mg·L<sup>-1</sup>)

40 μL,配制成质量浓度为 0.2,2.0,20.0 mg·L<sup>-1</sup> 溶液,平行 3 份,按照上述组织预处理方法处理,连续测定 3 次,计算平均回收率为 99.34%。结果表明该方法回收率良好。

### 3 讨论

由于大血管组织蛋白与卡马西平的吸收峰相近,蛋白质对内标卡马西平的分离效果影响较大,将收集到的组织经过乙醇沉淀,再加甲醇复溶在此沉淀,能够消除组织蛋白质对分离效果的影响。通过查阅文献资料<sup>[8-15]</sup>、综合分析,经预实验检测到异钩藤碱后,本实验选择在灌胃后 60,120 min 进行检测。且色谱图显示,供试组织样品和加异钩藤碱的组织样品对照溶液的图谱中有与异钩藤碱对照品溶液相同的异钩藤碱峰(保留时间为 12 min),异钩藤碱峰与其他组分峰基线分离。空白组织样品在与异钩藤碱峰相应位置上无吸收。经大鼠灌胃异钩藤碱 60,120 min 后,在大鼠组织样品中可以检测到异钩藤碱。该研究建立大鼠大血管中异钩藤碱的检测方法,为进一步了解异钩藤碱在体内的数量和质量的变化的变化,获得药物代谢动力学的各种参数、天麻素在体内的生物转化、代谢的方式和途径等信息奠定了基础。

本研究的新颖性在于进行了大血管预处理的研究,探讨出了最佳预处理方法,为以后进行此类大鼠体内组织的各种研究提供了参考,为下一步研究钩藤配伍前后其有效成分异钩藤碱在组织中的分布奠定了基础。

### [参考文献]

- [1] 黄瑞松,张鹏,朱意麟,等. 钩藤属植物部分品种药材钩藤碱成分的分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(8):125.
- [2] 谭超元,王海波,王东. 钩藤饮片 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):63.
- [3] 杜晨光,董玉山,刘俊敏. 天麻钩藤饮加减治疗肝阳上亢型高血压病临床分析[J]. 辽宁中医药大学学报,2010,12(2):154.
- [4] 张德都,王亚菲,胡宝荣. 天麻钩藤颗粒治疗高血压病(附 318 例临床分析)[J]. 黑龙江医学杂志,2002,26(9):704.
- [5] 段淑珍. 天麻钩藤饮加味治疗肝阳上亢型血管神经性头痛疗效观察[J]. 医学信息,2009,22(8):1612.
- [6] 邵怀琳. 天麻钩藤饮与归脾汤加减治疗慢性头痛 80 例[J]. 甘肃中医,2010,23(11):45.
- [7] 唐庆,马晓芳,赵桂香,等. 天麻钩藤降压胶囊降压及镇静作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(17):241.

# 脉络宁复合液神经阻滞治疗大鼠激素性早期股骨头坏死

吴青<sup>1\*</sup>, 刘晟<sup>2</sup>

(1. 贵阳市公安消防支队卫生队, 贵阳 550008;

2. 贵州省中科院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550008)

**[摘要]** **目的:**探讨脉络宁复合液神经阻滞对早期激素性股骨头坏死(GANFH)大鼠的疗效,并深入地研究脉络宁复合液神经阻滞治疗大鼠激素性早期股骨头坏死的作用机制,以期临床防治 GANFH 提供新药。**方法:**选取健康 4 月龄 Wistar 雄性成年白化大鼠 42 只,雌雄各半,体质量 300~350 g,随机分为正常对照组、模型组、治疗组,14 只/组。模型组和治疗组大鼠复制激素性股骨头坏死的动物模型:经尾静脉注射脂多糖 10  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  1 次。注射脂多糖 24 h 后重复注射 1 次;24 h 后臀肌注射注射醋酸强的松龙 40  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,连续 3 天,每次间隔 24 h。对照组于相同时间点经臀肌注射等量的生理盐水。治疗组从第 4 d 开始在闭孔神经注射脉络宁复合液 2  $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,3 次/周,共 8 周;模型组和对对照组常规饲养。采用 HE 染色、免疫组织化学、血生化及放射免疫分析等方法,观察脉络宁复合液神经阻滞对早期股骨头坏死大鼠的疗效,并深入地研究脉络宁复合液神经阻滞治疗大鼠激素性早期股骨头坏死的作用机制,以期临床防治 GANFH 提供新药。**结果:**模型组的空骨陷窝率较对照组和治疗组明显升高( $P < 0.05$ ),治疗组空骨陷窝率明显降低,但与对照组比较有明显差异仍然显著( $P < 0.05$ );模型组骨陷窝面积与对照组比较明显升高( $P < 0.05$ ),而治疗组的骨陷窝面积则较模型组明显下降( $P < 0.05$ ),与对照组比较无明显差异;模型组的骨小梁面积较对照组和治疗组明显下降( $P < 0.05$ ),治疗组的骨小梁面积高于模型组,但是无明显差异。治疗组的血管内皮细胞生长因子(VEGF)、骨发生蛋白(BMPs)、转化生长因子  $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )的阳性面积比及 VIII 因子相关抗原(VIII-R Ag)的微血管密度(MVD)均明显高于模型组,低于对照组,与两组比较均有明显差异( $P < 0.05$ );这表明治疗组的 VEGF、BMPs、TGF- $\beta_1$  及 VIII 因子相关抗原等表达水平均较模型组明显恢复,即激素性早期股骨头坏死大鼠经过脉络宁复合液神经阻滞治疗后,其 VEGF、BMPs、TGF- $\beta_1$  及 VIII 因子相关抗原等蛋白的表达水平均明显上调。对 3 组之间的血脂水平进行比较发现治疗组高于对照组,低于模型组,甘油三酯 3 组组间比较差异显著( $P < 0.05$ );总胆固醇模型组与对照组比较差异显著( $P < 0.05$ )。对 3 组之间的血清内皮素(ET)和肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平进行比较发现治疗组高于对照组,低于模型组, TNF- $\alpha$  3 组组间比较差异显著( $P < 0.05$ );ET 模型组与对照组比较差异显著( $P < 0.05$ )。**结论:**采用脉络宁复合液进行闭孔神经阻滞对于早期激素性股骨头缺血性坏死具有很好的治疗作用,具体可以增加骨小梁数量,增加成骨细胞及造血细胞数量,减少坏死骨细胞、空骨陷窝及多核破骨细胞数量,明显减轻骨坏死的程度。其作用机制可能为:脉络宁复合液进行闭孔神经阻滞可以使与微血管及骨细胞生成密切相关的生长因子表达上调;纠正脂肪代谢紊乱,降低高水平的胆固醇和甘油三酯,减少脂肪栓子的形成;促进坏死股骨头内微血管及软骨细胞的生成,进而促进了新骨的生成;降低 TNF- $\alpha$  含量,同样减少血管内皮损害,保护骨质不被破坏,促进成骨细胞的生成。

**[关键词]** 脉络宁复合液; 神经阻滞; 大鼠; 激素性早期股骨头坏死

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0238-05

**[doi]** 10.11653/syfy2013230238

**[收稿日期]** 20130924(004)

**[基金项目]** 国家自然科学基金(21102026)

**[通讯作者]** \* 吴青,主管药师,从事 trigonolimine A-C 的仿生合成及构效关系研究, Tel:13985529300, E-mail:2265427794@qq.com

- [8] 吴积海. 天麻钩藤饮加减治疗各证型眩晕 80 例[J]. 中医研究, 2008, 21(4): 47.
- [9] 胡少洋. 天麻钩藤饮治疗神经衰弱[J]. 浙江中医杂志, 2006, 41(9): 550.
- [10] 张卫国, 李晓倩, 王兴, 等. 钩藤与天麻配伍前后异钩藤碱在 SHR 大鼠肝脏和肾脏的分布[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 220.
- [11] 李晓倩, 王兴, 李莹, 等. 天麻与钩藤配伍前后对 SHR 大鼠肾脏相关基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 131.
- [12] 陈志远, 王兴, 李晓倩, 等. 异钩藤碱与天麻素合用对异钩藤碱在大鼠肝脏分布的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20): 193.
- [13] 杨立, 王兴, 辛秀, 等. 天麻素在大鼠肝肾组织中检测方法的研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(2): 295.
- [14] 王萍, 王敏智, 王兴. 反相 HPLC 法测定大鼠组织中异钩藤碱含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(3): 43.
- [15] 黄彬, 吴芹, 文国容, 等. 异钩藤碱在大鼠组织中的分布及其血浆半衰期的测定[J]. 遵义医学院学报, 2001, 24(2): 119.

[责任编辑 邹晓翠]