

大鼠含药血清中芍药苷的含量测定

闫寒¹, 付衍¹, 彭娟^{1*}, 郭娜¹, 聂颖兰¹, 范斌¹, 高冬², 宋军¹

(1. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700;

2. 福建中医药大学中西医结合学院, 福州 350108)

[摘要] 目的: 建立大鼠含药血清中芍药苷的含量测定方法。方法: 采用 HPLC 测定血府逐瘀胶囊中芍药苷含量, HPLC-MS-MS 测定血清中芍药苷含量。结果: 血府逐瘀胶囊中芍药苷含量 1.68 mg/粒, 符合 2010 年版《中国药典》规定; 血清中芍药苷质量浓度在 4.57 ~ 585 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好, $r = 0.9983$, 高、中、低质量浓度的绝对回收率 101.7% ~ 115.5%。结论: HPLC-MS-MS 测定大鼠含药血清中芍药苷含量的方法稳定、重复性好, 可作为血府逐瘀胶囊在大鼠血清中质量控制方法。

[关键词] 血府逐瘀胶囊; 含药血清; 芍药苷; HPLC-MS-MS; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0089-03

[doi] 10.11653/syfyj2013140089

Determination of Paeoniflorin in Containing Serum of Rats by HPLC-MS-MS

YAN Han¹, FU Yan¹, PENG Juan^{1*}, GUO Na¹, NIE Ying-lan¹, FAN Bin¹, GAO Dong², SONG Jun¹

(1. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. College of Integrated Traditional and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a method for determining the content of paeoniflorin in containing serum of rats. **Method:** The content of paeoniflorin from Xuefu Zhuyu capsules was determined by HPLC, but it was determined by HPLC-MS-MS in serum. **Result:** The content of paeoniflorin from Xuefu Zhuyu capsules was 1.68 mg/particle, which was in line with requirements in the 2010 edition of "Chinese Pharmacopoeia"; Linear relationship of paeoniflorin in serum was 4.57-585 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r = 0.9983$). Recovery of this method was 101.7% - 115.5%. **Conclusion:** Determination the content of paeoniflorin in containing serum of rats was stable and reproducibility by HPLC-MS-MS, it could be as a quality control method for Xuefu Zhuyu capsules in serum of rats.

[Key words] Xuefu Zhuyu capsules; containing serum; paeoniflorin; HPLC-MS-MS; determination

血府逐瘀胶囊收载于 2010 年版《中国药典》,

由赤芍、桃仁、当归、川芎等 11 味中药组成, 具有活血祛瘀、行气止痛的功效, 主要用于治疗气滞血瘀所致的胸痹、头痛日久、痛如针刺而有定处、内热烦闷、心悸失眠、急躁易怒等症。本实验拟通过对市售血府逐瘀胶囊进行含量测定, 建立大鼠含药血清中芍药苷含量的测定方法, 为该制剂在大鼠体内的代谢研究提供参考。

1 材料

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), Agilent RRLC&Agilent QQQ 6410 型液相质谱联用仪(美国 Agilent 公司), SO200 型涡旋仪(美国

[收稿日期] 20120304(120)

[基金项目] 中国中医科学院自主选题课题(2010ZZ002); 福建省自然科学基金项目(2011J01213); 陈可冀中西医结合发展基金项目(CKJ2011009)

[第一作者] 闫寒, 主管技师, 从事中药质量控制研究, Tel: 010-64014411-3324, E-mail: yanhanarrow@163.com

[通讯作者] * 彭娟, 硕士, 助理研究员, 从事中药分析及体内药物分析研究, Tel: 010-64014411-3324, E-mail: pengjuan1978@yahoo.com.cn

莱伯特公司), TGL-16G 型离心机(上海安亭科学仪器厂), X-15RAllegria 型离心机(美国 Beckman 公司), BT423S 和 BT25S 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

芍药苷对照品(批号 110736-201035, 中国药品生物制品检定所), 血府逐瘀胶囊(天津宏仁堂药业有限公司, 0.4 g × 12 粒, 批号 A03149), 甲酸、甲醇、乙腈为色谱纯, 水为自制超纯水, 其他试剂均为分析纯。

SD 大鼠, 中国食品药品检定研究院实验动物资源中心提供, 合格证号 SCXK(京)2009-0017, 体重(200 ± 20) g, 随机分为 4 组(高、中、低剂量组和空白组), 每组 6 只。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

2.1.1 HPLC 条件 Diamonsil(I) C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-冰醋酸-水(16:1:84), 检测波长 230 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温室温, 进样量 10 μL。

2.1.2 液相质谱联用条件^[1] Atlantis® T3 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 3 μm), 流动相 0.05% 甲酸水溶液(A)-甲醇(B)梯度洗脱(0 ~ 3 min, 40% ~ 100% B, 3 ~ 5 min, 100%), 柱温 40 °C。质谱条件为负离子模式, ESI 离子源温度 325 °C, 干燥气流量 11 L·min⁻¹, 雾化气压力 45 psi, 采集条件芍药苷 479.0 → 120.9, 碎裂电压 180 V, 碰撞电压 20 V。

2.2 对照品溶液的配制

2.2.1 HPLC 精密称取芍药苷对照品适量, 加 50% 甲醇溶解稀释成 0.084 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.2.2 HPLC-MS-MS 精密称取芍药苷对照品适量, 用甲醇稀释成 1.170 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 血清样品的制备 按 0.4(低剂量, 相当于人临床用药 5 倍剂量), 0.8(中剂量), 1.6(高剂量) g·kg⁻¹ 剂量分别给各组大鼠灌服血府逐瘀胶囊水溶液, 分 2 次灌胃, 每次 2 mL, 空白组给予等容积生理盐水。给药 7 d, 每天 2 次, 于最后 1 d 给药前 12 h 禁食, 自由饮水, 于最后一次给药 1 h 后腹主动脉取血, 于 3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 收集血清, -80 °C 冰箱保存。

2.4 血清样品的预处理^[2] 精密吸取大鼠血清 500 μL 置离心管中, 加 5 倍量甲醇, 涡旋 30 s, 于 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, N₂ 吹干, 精密加入流动相 100 μL 溶解残渣, 涡旋 30 s, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 待测。

2.5 方法专属性考察 取空白血清 500 μL, 按 2.4 项下方法进行处理, 进行 LC-MS-MS 分析, 见图 1, 结果空白样品未检测到芍药苷, 说明本方法具有较好的专属性, 色谱图见图 2。

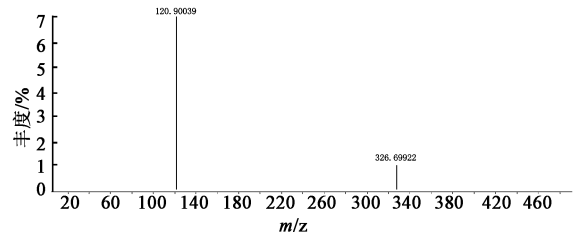
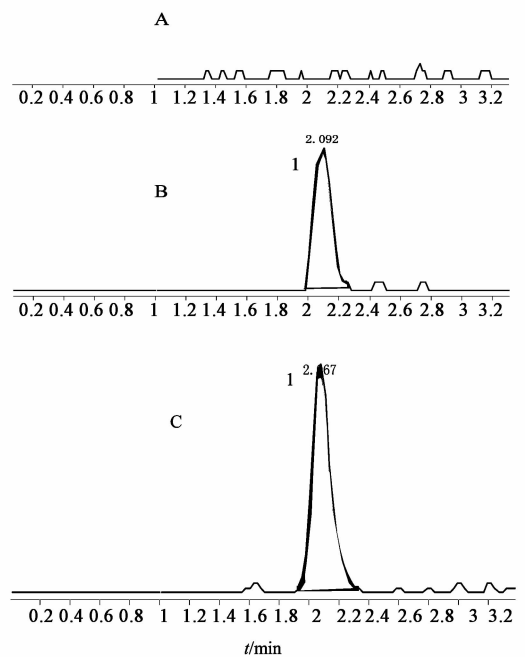


图 1 芍药苷对照品溶液 LC-MS-MS



A. 空白血清; B. 空白血清加芍药苷对照品(146.25 μg·L⁻¹); C. 含药血清; 1. 芍药苷

图 2 血清中芍药苷的 MRM

2.6 标准曲线的绘制 称取芍药苷对照品适量, 加至空白血清中, 血清中芍药苷质量浓度 4.57 ~ 585 μg·L⁻¹, 按 2.4 项下方法处理, 进行 HPLC-MS-MS 测定, 以峰面积为纵坐标, 血清芍药苷质量浓度为横坐标, 得回归方程 $Y = 1.1666X - 7.2314$ ($r = 0.9983$), 线性范围 4.57 ~ 585 μg·L⁻¹。

2.7 日内及日间精密度试验 向大鼠空白血清中加入已知量的芍药苷对照品, 分别制成质量浓度 9.14, 36.56, 146.25 μg·L⁻¹ 的样品, 按 2.4 项下方法处理, 进行 LC-MS-MS 分析, 结果日内精密度 RSD 依次为 2.8%, 2.4%, 1.7% ($n = 6$); 日间精密度分别为 6.5%, 12.4%, 8.7% ($n = 3$)。

2.8 加样回收率试验 向空白血清中加入已知量的芍药苷对照品,制成高、中、低质量浓度的样品,按2.4项下方法处理,进行LC-MS-MS分析,结果平均回收率分别为101.7%(2.9%),115.6%(4.0%),102.6%(8.4%),表明该方法符合要求。

2.9 冻融稳定性考察 向大鼠空白血清中加入已知量的芍药苷对照品,制成146.25,73.125 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的样品,考察样品在72 h内冻融3次的稳定性,按2.4项下方法处理,测定,结果芍药苷含量的RSD分别为7%,4.2%,说明冻融3次后样品中芍药苷稳定性良好。

2.10 样品溶液的稳定性考察 取制备好的血清样品适量,分别于制备后0,2,4,6,24 h进行分析测定,结果峰面积的RSD 8.9%,说明样品在24 h内稳定。

2.11 血府逐瘀胶囊供试品的制备与测定^[3] 取血府逐瘀胶囊内容物约0.5 g,混匀,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇25 mL,密塞,称定质量,超声处理(200 W,40 kHz)30 min,取出,放冷,称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,过滤,取续滤液过0.45 μm 微孔滤膜,进样量10 μL ,测得每粒血府逐瘀胶囊含芍药苷1.68 mg,符合2010年版《中国药典》规定。对大鼠给予高(55.97 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、中(23.77 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、低(8.38 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)剂量的血府逐瘀胶囊水溶液,对血样进行含量测定分析,结果芍药苷含量的RSD分别为24.6%,23.5%,21.9%。

3 讨论

血府逐瘀汤方出自王清任《医林改错》,用于治疗“血府”的“血瘀”,为探讨该方作用机制,大量基于该方基础研究的报道不断呈现,类似试验出现截然不同的结论^[4-5]。含药血清中化学成分质控势在必行,故选取了2010年版《中国药典》中该制剂的质控成分——芍药苷作为指标成分。

中药复方中芍药苷的血清样品HPLC测定方法报道不多^[6-11],通过预试验发现,含药血清在与芍药

苷对照品的相应保留时间内有色谱峰,但空白血清在相同保留时间内有干扰,尝试不同血清预处理方法,空白血清中的干扰仍存在,因此改用HPLC-MS-MS检测,该方法能排除基质干扰,且快速、灵敏、可靠,可用于血清中芍药苷含量的测定。

[参考文献]

- [1] 孙明谦,卢健秋,张宏桂.液质联用技术分析血府逐瘀汤中的化学成分[J].中成药,2009,31(5):793.
- [2] 刘斌,杨昭毅,魏伟.LC-MS/MS测定大鼠血浆中芍药苷及其药物动力学特征[J].安徽医科大学学报,2009,44(6):707.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:693.
- [4] 丁志山,高承贤,程东庆,等.血府逐瘀汤对牛内皮细胞增殖和迁移的影响[J].中成药,2003,25(5):423.
- [5] 高冬,陈文元,吴立娅,等.血府逐瘀汤诱导内皮细胞促血管新生的基因调控研究[J].中国中西医结合杂志,2010,30(2):153.
- [6] 罗焕敏,李晓光,肖飞,等.当归芍药散中阿魏酸和芍药苷的药代动力学研究[J].中药材,2003,26(3):189.
- [7] 刘东锋,张莉,陈婷.四逆散有效成分芍药苷药代动力学研究[J].中国实验方剂学杂志,2005,11(2):36.
- [8] 陈梅,姚男,周秋香,等.血清HPLC指纹图谱法研究芍药苷草汤伍用的合理性[J].中国药房,2010,21(15):1347.
- [9] 姜清华,邓晶晶,吴琼,等.芍药苷的药代动力学研究进展[J].实用药物与临床,2010,13(6):451.
- [10] 高冬,吴立娅,焦雨欢,等.血管内皮生长因子通路在血府逐瘀汤影响内皮祖细胞功能中的作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(11):104.
- [11] 陈小新,原素,龙超峰,等.妇炎康灌肠剂中芍药苷在家兔体内药代动力学[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(12):106.

[责任编辑 仝燕]