

## HPLC同时测定山茱萸总苷分散片中 莫诺昔和马钱苷的血浆浓度

孙志明<sup>1</sup>, 焦亮<sup>2</sup>, 张志斐<sup>2</sup>, 李小娜<sup>2\*</sup>

(1. 河北联合大学附属医院药剂科, 河北 唐山 063000; 2. 河北联合大学药学院, 河北 唐山 063000)

**[摘要]** 目的: 建立 HPLC 法同时测定大鼠血浆中莫诺昔和马钱苷含量的方法, 并研究山茱萸总苷分散片在大鼠血浆和各组织器官中的药动学行为。方法: Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱, 甲醇-水梯度洗脱, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 237 nm, 血浆和各组织样品采用甲醇直接沉淀蛋白的方法。结果: 血浆中莫诺昔和马钱苷的线性范围分别是 0.612 ~ 30.6, 0.921 ~ 46.0 mg·L<sup>-1</sup>; 日内与日间 RSD < 15%, 回收率在 90.2% ~ 111.6%。大鼠单次灌胃山茱萸总苷分散片后, 在血浆、胃和小肠中检测到莫诺昔和马钱苷。结论: 该方法简便、快速、重复性好, 适用于莫诺昔和马钱苷血药浓度测定及药动学研究。

**[关键词]** 山茱萸总苷; 分散片; 莫诺昔; 马钱苷; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0174-03

## Simultaneous Determination of Morroniside and Loganin in Rats Plasma from Dispersible Tablets of Total Glucosides from *Cornus officinalis* by HPLC

SUN Zhi-ming<sup>1</sup>, JIAO Liang<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-fei<sup>2</sup>, LI Xiao-na<sup>2</sup>

(1. Department of Pharmacy, Hospital Affiliated to Hebei United University, Tangshan 063000, China;

2. School of Pharmacy, Hebei United University, Tangshan 063000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To set up an HPLC method for determination of morroniside and loganin in rat plasma, and study the pharmacokinetics of dispersible tablets of total glucosides from *Cornus officinalis* in rat plasma and tissues. **Method:** The procedure of HPLC was performed on a column of Diamonsil C<sub>18</sub>, taking methanol-water as mobile phase in gradient elution. The flow rate was 1 mL·min<sup>-1</sup> and detection wavelength was 237 nm. The samples of plasma and tissues were prepared based on a simple protein precipitation with methanol. **Result:** The linear ranges of morroniside and loganin were, respectively, from 0.612 to 30.6 mg·L<sup>-1</sup>, and from 0.921 to 46.0 mg·L<sup>-1</sup>. The RSD values of intra-day and inter-day were less than 15%. The recovery was between 90.2% to 111.6%. After dispersible tablets of total glucosides from *C. officinalis* was administered orally, morroniside and loganin were found in plasma, stomach and small intestine samples. **Conclusion:** The method is simple and quick with a good repeatability, which can be used in the determination of plasma concentration of morroniside and loganin and pharmacokinetic study.

**[Key words]** total glucosides from *Cornus officinalis*; dispersible tablets; morroniside; loganin; HPLC

山茱萸总苷 (Total glucosides from *Cornus officinalis*, TGC) 为山茱萸的主要药效部位, 已经证实其能够降血糖并对糖尿病心脏和肾病病变有一定的保护作用<sup>[1]</sup>, 具有抗炎、免疫抑制作用<sup>[2]</sup>, 对阿尔

采默氏病和脑梗死有治疗作用<sup>[3]</sup>。莫诺昔和马钱苷含量占 TGC 的 85% 左右, 已经证实二者口服后均经肠内菌群代谢, 其中莫诺昔代谢产生的新代谢物具有抗糖尿病活性<sup>[4-5]</sup>。而作为口服固体速溶制剂

**[收稿日期]** 20110526(012)

**[第一作者]** 孙志明, 学士, 主管药师, 从事中药有效成分的研究, Tel: 0315-3725759, E-mail: bambooq@126.com

**[通讯作者]** \* 李小娜, 博士, 教授, 从事中药药效物质基础与药物动力学研究, Tel: 0315-3726307, E-mail: lixiaona71@126.com

的分散片遇水迅速崩解分散,药物溶出快,生物利用度高,我们已经确定了TGC分散片的处方和制备工艺<sup>[6]</sup>。汤继辉等<sup>[7]</sup>进行了山茱萸中马钱苷大鼠体内药动学研究,本文采用高效液相色谱法(HPLC)建立同时测定山茱萸总苷分散片中莫诺苷和马钱苷血浆浓度的方法,并考察其在体内各组织器官的分布情况。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1100 Series型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司),Heidolph2型旋转蒸发器(德国海道尔夫有限公司),KDC-16H高速型离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司),BT125D型1/10万天平(塞多利斯精密科学仪器有限公司)。

山茱萸总苷分散片(自制,总环烯醚萜苷含量>50%,批号110322);莫诺苷、马钱苷对照品(参照文献<sup>[4]</sup>自提取、精制)。甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为重蒸馏水。

SD大鼠,SPF级,体重(240~260)g,雄性,天津市山川红实验动物科技有限公司提供,许可证号SCXK(津2009-0001)。实验期间饲以该中心提供的固体饲料,自由饮水。

## 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液的制备** 分别精密称取莫诺苷和马钱苷对照品,置10 mL棕色量瓶中,以甲醇配制质量浓度分别为2.04,3.07 g·L<sup>-1</sup>的对照品储备液,-20℃保存备用。分别精密量取各对照品储备液适量,加甲醇定容,然后稀释成对照品系列溶液。莫诺苷对照品溶液质量浓度分别为20.4,16.3,8.16,2.04,0.408 mg·L<sup>-1</sup>,马钱苷对照品溶液质量浓度分别为30.7,24.6,12.3,3.07,0.614 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.2 血浆和组织样品的采集** 大鼠禁食过夜,取山茱萸总苷分散片(约含莫诺苷40 mg·g<sup>-1</sup>,马钱苷20 mg·g<sup>-1</sup>),以80 mg·kg<sup>-1</sup>灌胃给药(按莫诺苷含量,加水配成质量浓度为10 g·L<sup>-1</sup>的混悬液),分别于给药后5,10,15,30,45,60,90,120,180,300 min由眼眶静脉取血0.3 mL,收集于肝素化的离心管中,9 000×g离心10 min,分离出血浆并于-20℃冻存待测;同时于给药后15,30,60,120,300 min分别放血处死,取心、肝、肺、脾、肾、脑、胃和小肠,经生理盐水冲洗,去除瘀血或组织内容物,并用滤纸吸去水分,称重后于匀浆器中制成600 g·L<sup>-1</sup>的生理盐水匀浆,9 000×g离心10 min,取上清液备用。

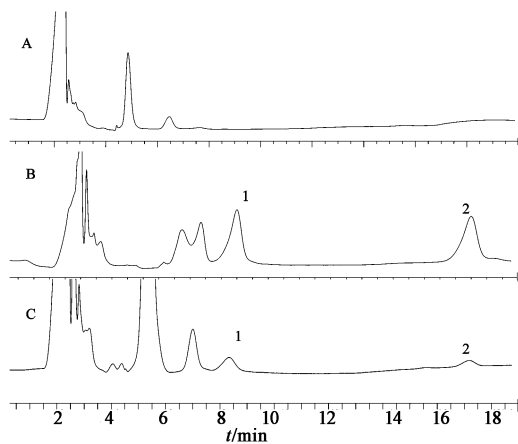
**2.3 血浆和组织样品的处理** 精密量取血浆和各组织匀浆100 μL,加甲醇300 μL,涡旋混匀,9 000

×g离心20 min,取上清液20 μL进样分析。

**2.4 色谱条件** 迪马C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相甲醇(A)-水(B)溶液梯度洗脱(0~8 min,31% A;8~15 min,31%~36% A;15~20 min,36% A,柱温室温,流速1 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长237 nm,进样量20 μL)。

## 2.5 方法学评价

**2.5.1 方法专属性** 按照上述色谱条件,分别对空白血浆、含药的空白血浆样品和健康大鼠给药后的血浆样品进行处理和测定,记录色谱图。在上述色谱条件下,血浆中杂质和内源性物质对莫诺苷和马钱苷的测定无干扰,色谱峰形良好。空白血浆、含药的空白血浆和健康大鼠给药后的血浆HPLC图见图1。



A. 空白血浆; B. 空白血浆加莫诺苷和马钱苷;

C. 大鼠给予山茱萸总苷分散片后的血样; 1. 莫诺苷; 2. 马钱苷

图1 大鼠血浆样品的HPLC

**2.5.2 标准曲线与线性范围** 精密量取空白血浆100 μL,加入对照品系列溶液150 μL,涡旋混匀,制成莫诺苷浓度为30.6,24.5,12.2,3.06,0.612 mg·L<sup>-1</sup>,马钱苷质量浓度为46.0,36.8,18.4,4.60,0.921 mg·L<sup>-1</sup>的对照品血浆样品,再加入甲醇150 μL,涡旋混匀,9 000×g离心20 min,取上清20 μL进样分析。以样品中对照品的质量浓度(C)为横坐标X,待测药物的峰面积(A)为纵坐标Y,按照加权最小二乘法(权重系数为1/X<sup>2</sup>)建立线性回归方程。莫诺苷和马钱苷的回归方程分别为Y=11.2X+5.19(r=0.9994),Y=7.81X+3.85(r=0.9992)。莫诺苷在0.612~30.6 mg·L<sup>-1</sup>,马钱苷在0.921~46.0 mg·L<sup>-1</sup>线性关系良好。

**2.5.3 精密度与准确度** 按2.5.2项下方法制得莫诺苷为3.06,24.5 mg·L<sup>-1</sup>的低浓度和高浓度血浆样品,马钱苷为4.60,36.8 mg·L<sup>-1</sup>的低浓度和高

浓度血浆样品,各 6 份,连续测定药物浓度 3 d,分别考察莫诺昔和马钱苷的日内精密度和日间精密度的。计算得莫诺昔在低浓度和高浓度的日内 RSD 分别为 7.6%、7.3%,日间 RSD 分别为 14.3%、5.0%;马钱苷在低浓度和高浓度的日内 RSD 分别为 8.4%、4.7%,日间 RSD 分别为 12.1%、5.2%。

**2.5.4 稳定性** 按 2.5.2 项下方法制得莫诺昔为 3.06、24.5 mg·L<sup>-1</sup>的低浓度和高浓度血浆样品,马钱苷为 4.60 和 36.8 mg·L<sup>-1</sup>的低浓度和高浓度血浆样品,各 3 份,考察其室温放置 4 h,预处理后室温放置 4、24 h 和经 3 次冷冻-解冻循环后莫诺昔和马钱苷的稳定性。莫诺昔各组的相对误差(RE)为 -3.35% ~ 11.64%,RSD 3.1% ~ 12.8%;马钱苷各组的相对误差(RE)为 -8.45% ~ 10.4%,RSD 1.7% ~ 11.0%。

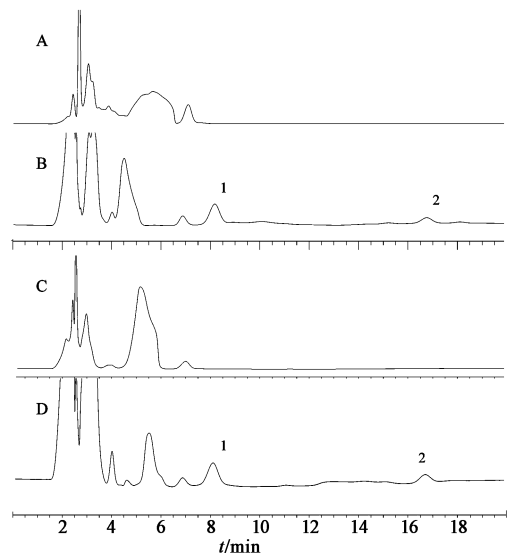
**2.5.5 回收率** 按 2.5.2 项下方法制得莫诺昔为 3.06、24.5 mg·L<sup>-1</sup>的低浓度和高浓度血浆样品,马钱苷为 4.60、36.8 mg·L<sup>-1</sup>的低浓度和高浓度血浆样品,各 6 份。测定药物浓度,以浓度测得值与加入值之比,计算得莫诺昔的相对回收率分别为 (98.5 ± 7.7)% 和 (104.1 ± 6.4)%,马钱苷的相对回收率分别为 (103.8 ± 2.1)% 和 (102.2 ± 4.3)%。

**2.6 药物在大鼠血浆和体内各组织器官的研究** 大鼠灌胃给予山茱萸总苷分散片后,在上述条件下,大鼠血浆中测得了莫诺昔和马钱苷,二者最高血药浓度均出现在 60 min;体内各组织器官中仅在胃和小肠中检测到莫诺昔和马钱苷,二者的最高浓度均出现在 15 min 或者 30 min,其余组织如心、肝、肺、脾、肾和脑中未检测到莫诺昔和马钱苷。给予山茱萸总苷分散片后大鼠胃和小肠样品的 HPLC 色谱图见图 2。

### 3 讨论

本文建立了血浆样品中同时测定莫诺昔和马钱苷的方法,可以为复方制剂中含有莫诺昔和马钱苷的中药进行药动学研究提供一定的方法参考。

进行山茱萸总苷分散片在血浆和各组织器官中的药动学研究中,由于标准曲线和线性范围所限,开始和结束的几个时间点血药浓度较低,未检测到莫诺昔和马钱苷,加大给药剂量后数据无规律性,因此没有进行药动学参数计算;同时一些组织器官未检测到莫诺昔和马钱苷,这与仪器的灵敏度较有关,以后条件允许可以选择灵敏度高的仪器或者样品处理



A. 空白胃组织;B. 大鼠给予山茱萸总苷分散片后的胃组织样品;  
C. 空白小肠组织;D. 大鼠给予山茱萸总苷分散片后的小肠组织样品;  
1. 莫诺昔;2. 马钱苷

图 2 大鼠胃和小肠样品的 HPLC

方法解决。

### [参考文献]

- [1] Recio M C, Giner R M, Manez S, et al. Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents [J]. *Planta Medica*, 1994, 60(3): 232.
- [2] 时艳, 许惠琴. 山茱萸环烯醚萜总苷对实验性糖尿病心脏病变的保护作用[J]. *南京中医药大学学报*, 2006, 22(1): 35.
- [3] 褚燕琦, 张兰, 王文, 等. 山茱萸环烯醚萜总苷对冈田酸拟阿尔茨海默病细胞模型的抗凋亡作用研究[J]. *中国药房*, 2009, 20(18): 1364.
- [4] Li X N, Huo C H, Wang Q, et al. Microbial metabolism of loganin by intestinal bacteria and identification of new metabolites in rat[J]. *Biomed Chromato*, 2008, 22(4): 367.
- [5] Li X N, Huo C H, Wang Q, et al. Identification of new metabolites of morroniside produced by rat intestinal bacteria and HPLC-PDA analysis of metabolites *in vivo* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 45(2): 268.
- [6] 孙志明, 李小娜, 陈莘莘, 等. 山茱萸总苷分散片的处方工艺研究[J]. *中国药房*, 2011, 22(3): 219.
- [7] 汤继辉, 胡容峰, 怀素丽. 山茱萸中马钱苷大鼠体内药动学研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2008, 14(1): 27.

[责任编辑 蔡仲德]