

# 新型 LC/LC-UV 系统建立血浆中葛根素测定方法

邹文光<sup>1</sup>, 杨杰<sup>1</sup>, 肖轶雯<sup>2</sup>, 赵绪元<sup>2</sup>, 王峰<sup>2\*</sup>

(1. 湖南衡阳市中心医院药学部, 湖南 衡阳 421001; 2. 中南大学湘雅二医院药学部, 长沙 410011)

**[摘要]** 目的: 建立用新型 LC/LC-UV 系统测定血浆中葛根素浓度的方法, 用于葛根素人体或动物的药代动力学研究。  
**方法:** LC<sub>1</sub> 色谱柱 FRO-XB C<sub>18</sub> (4.6 mm × 30 mm, 20 μm, ANAX), 流动相 20 mmol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵水溶液-乙腈 (75:25), 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 中央处理体系温度为 40 °C, LC<sub>2</sub> 系统中分析色谱柱为 AC-XB C<sub>18</sub> (4.6 mm × 300 mm i. d, 5 μm, ANAX), 流动相为 20 mmol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵水溶液 (用甲酸调 pH 到 3.8)-乙腈 (86:14), 流速为 1.2 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 248 nm。目标物从 LC<sub>1</sub> 转移到 LC<sub>2</sub> 聚焦流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 目标物转移窗口为 1.66 ~ 2.20 min; 定量环为 200 μL, 样品用 15% 三氯醋酸预处理。  
**结果:** 葛根素在 0.020 ~ 4.50 mg·L<sup>-1</sup> 线性关系良好, 平均相关系数为 0.999 4, 最低定量浓度为 0.015 mg·L<sup>-1</sup>。日内 RSD < 3% (n = 6), 日间 RSD 均 < 5% (n = 18), 准确度在 100.3% ~ 102.6% 之间。  
**结论:** 基于新型 LC/LC-UV 系统的葛根素测定方法操作步骤少、准确性与精密度良好、自动化程度高, 适合于葛根素血药浓度测定及动力学研究。

**[关键词]** 双液相紫外检测; 治疗药物监测; 葛根素; 药动学

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0098-04

## Determination of Plasma Puerarin by LC/LC-UV

ZOU Wen-guang<sup>1</sup>, YANG Jie<sup>1</sup>, XIAO Yi-wen<sup>2</sup>, ZHAO Xu-yuan<sup>2</sup>, WANG Feng<sup>2\*</sup>

(1. The Clinical Pharmacy and Pharmacology Institute, Hengyang Central Hospital, Hengyang 421001, China; 2. The Clinical Pharmacy and Pharmacology Institute, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a routine analytical method for the determination of plasma puerarin by LC/LC-UV, and used for the investigation of pharmacokinetics of puerarin. **Method:** LC<sub>1</sub> system column was FRO-XB C<sub>18</sub> (4.6 mm × 30 mm, 20 μm, ANAX), with mobile phase consisting of 20 mmol·L<sup>-1</sup> ammonium acetate-acetonitrile (75:25) at the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was at 40 °C. LC<sub>2</sub> system column was UC-XB C<sub>18</sub> (4.6 mm × 300 mm i. d, 5 μm, ANAX), with mobile phase consisting of 20 mmol·L<sup>-1</sup> ammonium acetate (pH 3.8 adjusted by formic acid)-acetonitrile (86:314) at the flow rate of 1.2 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was at 248 nm. Flow of transferring was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, and the windows of "heart cutting" was 1.66-2.20 min. The sample loop volume was 200 μL. **Result:** The linearity range of puerarin was 0.020-4.50 mg·L<sup>-1</sup> (r = 0.999 4). The limit of puerarin was 15.0 mg·L<sup>-1</sup>. The RSD of intra-day precisions was less than 3% (n = 6), the RSD of inter-day precisions was less than 5% (n = 18). The accuracy was 100.3% -102.6%. **Conclusion:** The method for the determination of puerarin by LC/LC-UV is simple and accurate with high automatization. The method is used for investigation of pharmacokinetics of puerarin.

**[Key words]** LC/LC-UV; therapeutic drug monitoring; puerarin; pharmacokinetics

**[收稿日期]** 20110323(007)

**[第一作者]** 邹文光, 主管药师, 从事临床药学工作

**[通讯作者]** \*王峰, 主管药师, 从事色谱新技术研究与复杂基质中化合物色谱分析, Tel: 0731-5292099, 13974805326, E-mail: Roitech@126.com

葛根素( puerarin, 简称 Pur) 是中药葛根的主要成分之一, 具有扩张冠状动脉及脑血管、降低心肌耗氧量、改善微循环的作用, 临床上常用于高血压、心绞痛、急性心肌梗塞和视网膜脉阻塞等疾病<sup>[1]</sup>。为进行药材及中药制剂的质量控制或含量测定, 报道了许多 HPLC 测定方法<sup>[1-7]</sup>; 随着中药现代化在我国的发展, 有关葛根素在动物或人体内动力学研究也时有报道<sup>[8-11]</sup>, 在血样基质复杂及 Pur 浓度较低时, 往往需要对样品进行浓缩与净化处理, Pur 水溶性大, 故有机溶剂难提取, 难以获得稳定的测定结果, 而 LC/LC-UV 系统具有样品在线净化、富集、自动化偏差控制及目标物转运能力, 特别适合复杂基质中的药物分析, 本文通过新型 LC/LC-UV 系统建立了 Pur 血浆中测定方法, 与普通 HPLC 法比较, 该方法在样品处理、结果准确性与灵敏度、抗干扰能力、分析过程自动化方面均有较大提高, 适合于现代复杂基质中药物浓度的测定。

## 1 材料与方 法

**1.1 药物与试剂** 葛根素对照品(含量大于 99.5%, 0142-1232)由中国药品生物制品检定所提供, 流动相由乙腈(Georgetown. Ont, Canada, 色谱级)、甲酸(长沙福滋堂生物技术开发有限公司, AR)、醋酸胺(长沙安泰精细化工实业有限公司, AR, 20070924), 三氯醋酸(天津市鑫源化工厂, 20090126), 空白血浆和患者血浆由本院临床科室提供, 二次蒸馏水为本院自制。

**1.2 设备与仪器** LC/LC-UV 系统由两个公司产品组成, 一级液相系统(LC<sub>1</sub>)为 TDM-2022 前级液相系统(安莱科分析仪器有限公司, 长沙, 中国), 包括 TDM-2022P 输液体系、TDM-2022C 中央处理单元, 7725i 手动进样阀(Rheodyne CO., USA, 定量环为 200 μL), Frosys-tdm 2.2 系统控制工作站; LC-UV 二级液相系统(LC<sub>2</sub>)系统为岛津 LC-10A 高效色谱仪(Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), 主要组件包括 LC-10ATvp 色谱泵, DGU-14A 脱气机, FCV-10ALvp 比例阀, SPD-10Avp 检测器、FCV-10ALvp 系统控制器以及 CLASS-VP5.2 工作站。XW-80A 漩涡混合器(琪特分析仪器有限公司, 上海, 中国), TG16-WS 台式高速离心机(赛特湘仪离心机仪器有限公司, 湖南, 中国), AG285 电子天平(METTLER TOLEDO, Switzerland)。

**1.3 LC/LC-UV 系统运行参数** LC<sub>1</sub> 系统中纯化富

集色谱柱为 FRO-XB C<sub>18</sub>(4.6 mm × 30 mm i. d, 20 μm, ANAX), 流动相为 20 mmol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵水溶液-乙腈(75:25), 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 中央处理体系温度为 40 ℃; LC<sub>2</sub> 系统中分析色谱柱为 AC-XB C<sub>18</sub>(4.6 mm × 300 mm i. d, 5 μm, ANAX), 流动相为 20 mmol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵水溶液(用甲酸调 pH 到 3.8)-乙腈(86:14), 流速为 1.2 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 248 nm。LC<sub>1</sub> 与 LC<sub>2</sub> 运行程序见表 1。

表 1 LC/LC-UV 运行程序时间表

t/min	设备	动作	值/mL·min <sup>-1</sup>
0.01-0.40	LC <sub>1</sub> 系统	辅助输液泵启动	2.0
0.40-1.60	LC <sub>1</sub> 系统	前级输液泵维持运行	1
1.60-2.20	中央处理单元	目标物 LC <sub>1</sub> 及 LC <sub>2</sub> 间转运	
1.60-12.0	LC <sub>1</sub> 系统	前级系统清洗	0.5
2.20-12.00	LC <sub>2</sub> 系统	分析系统运行	1.2

**1.4 样品预处理** 取 EDTA 抗凝的血浆样品 300 μL, 加入 15% 三氯乙酸溶液 0.6 mL, 漩涡振荡 1 min, 14 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min(离心力为 11 988 × g), 取上层 500 μL 进样。

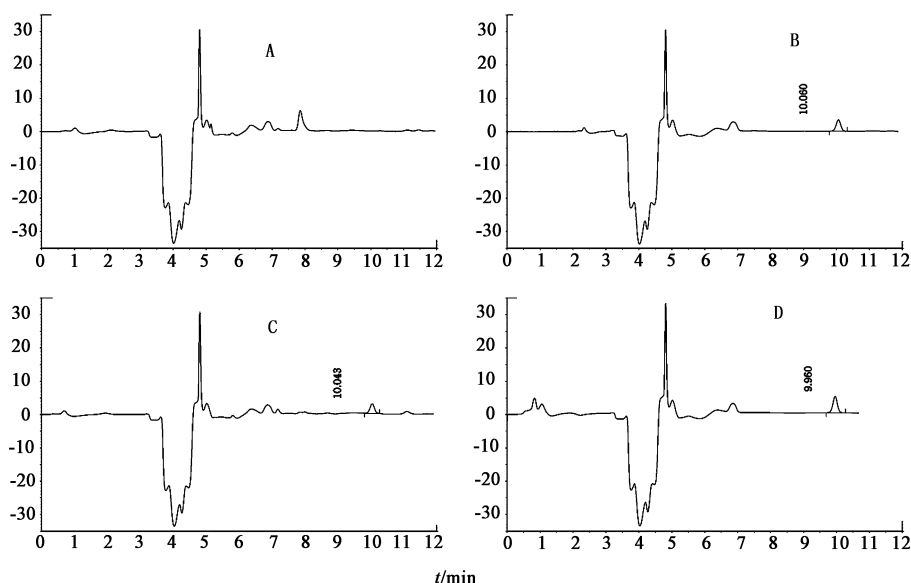
**1.5 定量** Pur 浓度通过将样品色谱图中目标物峰面积代入工作曲线中计算得到。

## 2 实验结果

**2.1 LC<sub>1</sub> 上色谱行为** 图 1 中前 6 min 基线下凹是由溶剂从 LC<sub>1</sub> 转运到 LC<sub>2</sub> 系统中造成的溶剂峰, 约 6 min 后基线平稳, 图 1 中 A 显示人空白血浆未发现内源性干扰, 另外本实验也考察了牛、兔及大鼠的空白血浆, 均未发现内源性干扰, 色谱图中 Pur 保留时间为 10.023 min, 色谱峰型对称, 工作站计算的塔板数为 17 363, 远比普通色谱柱的塔板数高, 这是因为存在 2.20 min 的在线样品处理时间, 因而在 LC<sub>2</sub> 系统上实际的分析时间为 7.8 min, 同时 TDM-2022C 中央处理单元具有防峰扩散功能, 保证了样品在 LC<sub>2</sub> 分析柱柱头上聚集, 从而获得很高柱效。

**2.2 标准曲线与线性范围** 用新生小牛血清配置浓度为 0.02, 0.06, 0.18, 0.50, 1.50, 4.50 mg·L<sup>-1</sup> 的标准样品, 按 1.3 方法处理样品, 以浓度为自变量(X), 峰面积(Y)为因变量按最小二乘法拟合工作曲线, 工作曲线方程为  $Y = 123\ 914X - 9\ 748$ ,  $r = 0.999\ 94$ , 结果显示 Pur 工作曲线在 0.020 ~ 4.50 mg·L<sup>-1</sup> 具有良好的线性。

**2.3 最低检测限与最低定量限** 最低检测限(LOD)以  $S/N \geq 3$  计算, 最低定量限计算(LLOQ), 以 Pur 色谱峰完全达到基线分离, 峰面积 RSD ≤



A. 空白血浆色谱图; B. 对照品色谱图(Pur 浓度为  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ); C. 空白血浆加入对照品色谱图(Pur 浓度为  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ); D. 大鼠血浆中药物浓度( $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 灌胃给药, 给药后 16 h 采血)

图 1 LC/LC-UV 中 Pur 色谱图

20%, 准确度在 80% ~ 120% 之间来计算, 结果为 Pur 最低检测限及最低定量限分别为  $0.006 0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  与  $0.015 0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 图 2 为  $0.006 0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 pur 加入到空白血浆中的色谱图。

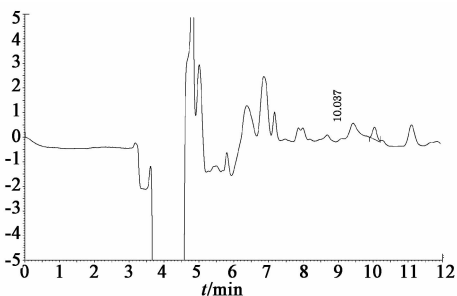


图 2 空白血浆加入对照品色谱图(Pur 浓度为  $0.006 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )

**2.4 精密度与准确性** 用新生小牛血清配置浓度为  $0.06, 0.50, 4.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Pur 低、中、高质控血清, 日内精密度数据通过日内测定 Pur 低、中、高 3 个质量浓度得到 ( $n = 6$ ), 日间精密度数据通过连续测定 3 个工作日高、中、低 3 个浓度, 每日每个浓度 6 份得到, 日内与日间精密度测得数据的准确度用测得值/加入值  $\times 100\%$  表示, 结果见表 2。

**2.5 萃取回收率** 配置浓度为  $0.060, 0.50, 4.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的低、中、高浓度的 Pur 质控品, 按 1.4 项下进行样品处理, 与不经过处理的 Pur 对照品溶液峰面积比较, 计算样品萃取回收率, 低、中、高浓度的萃取回收率分别为  $(95.7 \pm 2.61)\%$ ,  $(96.2 \pm$

表 2 日内与日间准确度与精密度

浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	日内精密度 ( $n = 6$ )		日间精密度 ( $n = 18$ )	
	准确度/ $\%$	RSD/ $\%$	准确度/ $\%$	RSD/ $\%$
0.060	101.7	2.27	102.6	3.28
0.50	102.1	1.84	101.3	2.93
4.50	100.4	3.10	101.5	2.52

2.24)% ,  $(96.7 \pm 2.93)\%$ 。结果显示 15% 三氯醋酸处理样品的萃取回收率非常完全及稳定。

### 3 讨论

色谱分析中复杂基质的样品处理往往涉及到目标物在不同相之间的转移, 比如液液萃取中目标物从水相转移到有机相, 固相萃取中目标物从液相转移到固定相等, 这些相转移过程存在乳化、提取不完全、穿透曲线过宽等现象, 从而导致操作步骤繁杂、回收率过低或不稳定等问题, 因此复杂的样品处理过程是色谱分析中不确定度的主要来源。LC/LC-UV 方法中样品处理中不涉及相转移, 定量环体积较大 ( $200 \mu\text{L}$ ), 无大的操作误差来源, 且  $\text{LC}_1$  对目标物进行自动富集、净化与防扩散处理, 然后完全转移至  $\text{LC}_2$  中, 损失率极低, 因此具有很高且稳定的萃取回收率; 另外 LC/LC-UV 系统存在正交两级去除杂质过程,  $\text{LC}_2$  中分析色谱柱上干扰物质很少, 空白血浆内源性干扰很少, 与文献报道的 HPLC-UV 方法比较<sup>[8-11]</sup>, 本方法简单的样品预处理即可达到很高的灵敏度。另通过增加定量环体积或与不同类型检测

# 芦丁分解速度与加热温度的相关性

赵宇新

(国家药典委员会, 北京 100061)

**[摘要]** 目的:分析芦丁分解速度与加热温度的相关性。方法:在 120~250℃ 每间隔 10℃ 对芦丁单体分别加热 30 min, 得到 14 份受热样品,采用高效液相色谱法测定这些受热样品中的芦丁、槲皮素的含量。结果:在 120~150℃ 加热,芦丁含量无显著性变化;160℃~200℃ 加热,芦丁开始分解,槲皮素含量升高,且随着温度升高,分解速度增快,槲皮素含量也越高。210~250℃ 加热,芦丁、槲皮素含量均降低。结论:芦丁在 160℃ 以前几无分解,而在 160~200℃ 部分分解产生槲皮素,而在 210℃ 后加热,芦丁被破坏。

**[关键词]** 芦丁; 槲皮素; 受热温度

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0101-03

## The Relationship Between Decomposition of Rutin and Heated Temperature

ZHAO Yu-xin

(Chinese Pharmacopoeia Commission, Beijing 100061, China)

**[收稿日期]** 20110801(005)

**[第一作者]** 赵宇新, 硕士, 主管药师, Tel:010-67079523, E-mail: zyxmy@mail@163.com

器联用, LC/LC-UV 可以持续提高分析方法的灵敏度, 使之满足更宽广领域的需求。

本方法另外一个特点是不需要采用内标也可以获得很高的精密度与准确度<sup>[8-11]</sup>, 首先是因为 LC/LC-UV 系统采用大体积进样, 使得进样误差小, 其次 TDM-2022C 中央处理单元具备防色谱峰扩散功能, 最大程度减少峰扩散误差, 还有样品处理过程不涉及相转移, 且提取率很高。故使得整个分析过程中不存在不可控的不确定度源, 即使不采用内标, 也可以获得良好准确度与精密度。

### [参考文献]

- [1] 郭建平, 李国栋, 赵彤英, 等. HPLC 对人血浆中葛根素及葛根黄酮的线性考察[J]. 药学实践杂志, 2003, 21(4):219.
- [2] 张萍, 王晓玲, 陈燕, 等. HPLC 测定小儿清肺止咳片中葛根素的含量[J]. 咸阳师范学院学报, 2008, 23(2):46.
- [3] 杨久云, 张思波. HPLC 测定降脂活血片中葛根素的含量[J]. 中国药师, 2007, 10(12):1258.
- [4] 方继辉, 朱炳辉, 邹玉婷, 等. SPE-HPLC 法测定中成

药中葛根素的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2004, 15(3):187.

- [5] 李哲, 李辉, 陈发奎, 等. 葛根芩连制剂的三维高效液相色谱鉴定[J]. 中成药, 2003, 25(1):27.
- [6] 李洪玉, 戴诗文, 寿旦, 等. 葛根中葛根素的高效液相色谱分析[J]. 中国实用医药, 2008, 3(7):7.
- [7] 李桥, 宋恬, 王光忠, 等. 高效液相色谱法测定葛根、红花和山楂混合提取物中葛根素、羟基黄酮红色素 A 的含量[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(8):1860.
- [8] 李煦颖, 赵妍, 王琳, 等. 葛根素及葛根提取物在大鼠体内药代动力学研究[J]. 中国生化药物杂志, 2009, 30(6):383.
- [9] 郭炎荣, 蒙太平, 韦戈, 等. 高效液相色谱法测定全血中葛根素含量[J]. 中国医院药学杂志, 2000, 20(6):343.
- [10] 黄熙, 任平, 张莉, 等. HPLC 法测定犬口服养阴通脑颗粒后血浆中的葛根素[J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(2):127.
- [11] 张志荣, 游学均, 何勤, 等. HPLC 测定血浆中葛根素[J]. 中国药学杂志, 1997, 32(2):104.

[责任编辑 蔡仲德]