

# 固相萃取-高效液相色谱法测定大鼠血浆中柴胡皂苷 d 的浓度

何昱\*, 张茹萍

(浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

[摘要] 目的: 建立用固相萃取-高效液相色谱法定量大鼠灌服柴胡水提液后血浆中柴胡皂苷 d 的方法。方法: 大鼠灌服柴胡水提液后在不同时间点眼眶静脉取血, 血浆经 Waters Oasis HLB 固相萃取小柱纯化, 洗脱液用氮气吹扫至干, 流动相溶解后进样; 用 YMC-Pack ODS C<sub>18</sub> 色谱柱以及乙腈-水为流动相的色谱体系检测其中柴胡皂苷 d 的含量。结果: 柴胡皂苷 d 在 1.28 ~81.60  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的浓度范围内线性关系良好 (相关系数  $r = 0.9978$ ), 定量下限为 1.28  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。相对回收率为 94.6% ~102.8%, 日间、日内 RSD 均小于 8%。结论: 该方法灵敏、准确, 可用于大鼠血浆中柴胡皂苷 d 的浓度测定。

[关键词] 固相萃取; 高效液相; 柴胡皂苷 d

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0046-03

## Solid Phase Extraction-high Performance Liquid Chromatography Determination of Saikosaponin d in Rat Plasma

HE Yu\*, ZHANG Ru-ping

(College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

**[Abstract] Objective:** To develop a SPE-HPLC method for the determination of saikosaponin D in rat plasma after being administered Radix Bupleuri water extract intragastrically. **Method:** The blood was taken from rat orbital venous at different time points, and the plasma was purified by using the Waters Oasis solid-phase extraction column. The eluate was dried with nitrogen, and then dissolved with mobile phase. The saikosaponin D was analyzed by chromatographic system consisting of YMC-Pack ODS C<sub>18</sub> column and acetonitrile-water as mobile phase. **Result:** Saikosaponin D was linear in range of 1.28-81.60  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $r = 0.9978$ ). And the quantitative limit was 1.28  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Relative recovery was 94.6% -102.8%; And the within-day precision and between-day precision were less than 8% (RSD). **Conclusion:** This method is sensitive, accurate, and can be used for determination of saikosaponin D in rat plasma.

**[Key words]** Solid phase extraction; HPLC; saikosaponin d

柴胡是中医临床常用的药物之一, 以其为主导的中药汤剂或中成药在诸多疾病的治疗中发挥了相当重要的作用。目前, 国内外学者对柴胡的药理药效、入药资源、提取工艺以及化学成分进行了较广泛的探讨<sup>[1-4]</sup>, 但其体内过程的报道为数甚少<sup>[5]</sup>。由于皂苷类成分被普遍认为是柴胡镇静、镇痛、保肝、降

脂的有效部位, 柴胡皂苷 d 作为其中的主要成分之一, 也具有着抗炎、抗病毒、抗肝纤维化、抗肿瘤、免疫调节等活性<sup>[6-7]</sup>, 因此本文尝试以其作为柴胡的指标性成分, 构建用高效液相色谱测定大鼠灌服柴胡水提液后血浆中柴胡皂苷 d 浓度的方法。由于血浆中柴胡皂苷 d 的含量很低, 故用固相萃取技术对大鼠血样进行前处理, 以消除杂质干扰, 并避免化学方法处理所造成的结果偏差, 为柴胡体内过程和作用机理的研究奠定基础。

### 1 仪器与试剂

美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪 (配备在线

[收稿日期] 20100316(003)

[基金项目] 浙江省教育厅课题(20050815)

[通讯作者] \* 何昱, 博士, 副教授, 研究方向中药质量研究,

Tel: 13185099526, E-mail: heyu0923@hotmail.com

脱气机、四元泵、柱温箱、自动进样器和二极管阵列检测器)。德国 Sartorius 1/10 万电子天平, Waters Oasis HLB 固相萃取小柱, SUPELCO 固相萃取仪, 美国 Millipore 公司 Milli-Q 超纯水制备仪。

柴胡药材购自北京同仁堂杭州药店有限公司, 经浙江中医药大学药学院陈孔荣教授鉴定为北柴胡 *Bupleurum Chinese DC.*, 柴胡皂苷 d 对照品由复旦大学药学院潘胜利教授提供, 纯度 >98%。乙腈为色谱纯, 水自行制备, 其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱 YMC-Pack ODS C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水 (38:62); 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 紫外检测波长为 210 nm; 柱温室温。

**2.2 柴胡水提液的制备** 柴胡药材适当粉碎, 按一定比例加入适量水, 煎煮 2 次, 合并 2 次提取液, 置旋转薄膜蒸发器中浓缩至 1 g·mL<sup>-1</sup>。

**2.3 对照品溶液的制备** 精密称取适量的柴胡皂苷 d 对照品, 用甲醇溶解并定容, 得到 255 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品储备液。

**2.4 动物分组、给药与血样的采集** Wistar 大鼠由浙江中医药大学动物实验研究中心提供, 合格证号

SCXK(浙)2003-0011, 清洁级, 雄性, 体重约 200 ~ 250 g; 24 只大鼠随机分为 3 组, 空白组 4 只, 实验高、低剂量组各 10 只; 给药前 12 h 禁食不禁水。

实验组大鼠按高剂量组 6.75 g·kg<sup>-1</sup>、低剂量组 1.35 g·kg<sup>-1</sup> 的剂量 (相当于人体临床给药剂量 15 g·d<sup>-1</sup> 的 5 倍和 1 倍) 灌服柴胡水提液, 空白组给与相应剂量的生理盐水。

分别于大鼠灌胃后的 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 18.0, 24.0 h 眼眶后静脉丛取血, 每次 0.3 mL。血液用肝素抗凝, 室温放置 30 min, 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 分离血浆, 分别合并各时间点高、低剂量组 10 只大鼠的血浆。

**2.5 样品的前处理和进样分析** 固相萃取小柱用 1.0 mL 甲醇活化和 1.0 mL 水平衡后, 加入大鼠血浆 2.0 mL, 过柱后用 1.0 mL 纯水淋洗 2 次, 洗涤液弃去, 再用 1.0 mL 甲醇洗脱, 洗脱液用氮气吹扫至干, 用 0.5 mL 流动相溶解, 0.2 μm 的微孔滤膜过滤后进样, 进样量为 20 μL。

在所选择的色谱条件下, 柴胡皂苷 d 得到了较好的分离和检测, 空白血浆在此无干扰, 如图 1 所示。

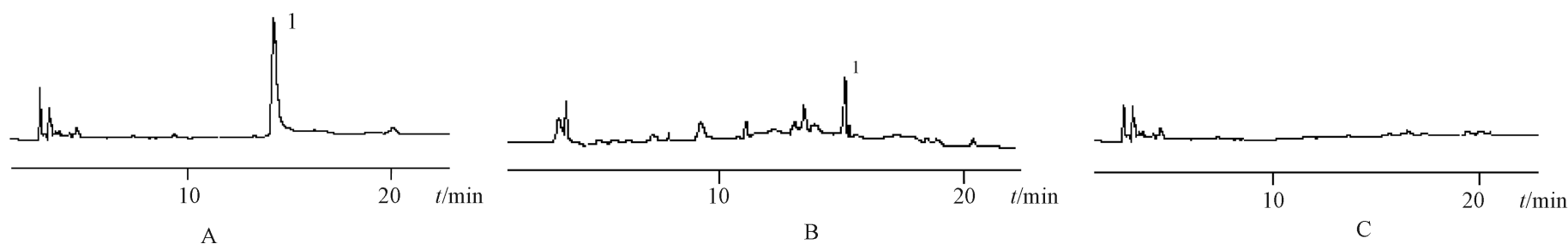


图 1 柴胡皂苷 d 对照品 (A)、含药血浆样品 (B) 及空白血浆 (C) 的高效液相色谱图

### 1. 柴胡皂苷 d

**2.6 标准曲线的制备** 用大鼠空白血浆梯度稀释柴胡皂苷 d 的对照品储备液, 得到浓度为 1.28, 2.55, 5.10, 10.20, 40.80, 81.60 mg·L<sup>-1</sup> 的含药血浆样品。各浓度的血浆样品用 2.5 项下的方法处理后进样, 以得到的柴胡皂苷 d 色谱峰峰面积 (X 轴) 和相应的浓度 (Y 轴) 进行回归, 得到的回归方程为  $Y = 94.03X + 2.64$ ,  $r = 0.9978$ , 说明血浆中的柴胡皂苷 d 在 1.28 ~ 81.60 mg·L<sup>-1</sup> 的线性关系良好, 定量下限为 1.28 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.7 精密度和相对回收率** 移取 2.55, 10.20, 81.60 mg·L<sup>-1</sup> 低、中、高浓度的柴胡皂苷 d 对照血浆样品, 按 2.5 项下的方法处理后进样测定。各浓度的样品在 1 d 内每隔 3 h 测定一次, 共测 5 次; 日间每日测定 1 次, 共测 5 d, 依据测定结果计算方法的

日内差、日间差及相对回收率。结果低、中、高浓度的对照血浆样品的日内 RSD 分别为 5.3%, 4.3%, 2.0%; 日间 RSD 分别为 7.2%, 3.2%, 4.1%; 相对回收率的均值分别为 97.4%、94.6%、102.8%。

**2.8 提取回收率** 移取 2.55, 10.20, 81.60 mg·L<sup>-1</sup> 低、中、高浓度的柴胡皂苷 d 对照血浆样品, 按 2.5 项下的方法处理后进样测定; 另制备与它们相同浓度的对照品流动相溶液不经处理直接进样。前后进样相对应的峰面积之比即为提取回收率, 结果低、中、高 3 种浓度的提取回收率分别为 94.5% ± 3.5%, 93.6% ± 4.1%, 95.6% ± 2.0% (n=3)。

**2.9 稳定性试验** 将浓度为 10.20 mg·L<sup>-1</sup> 的柴胡皂苷 d 对照血浆样品在 -20 °C 冷冻保存, 分别在冷冻的第 7, 14, 21 d 取样固相萃取后测定, 结果在冷

冻保存的 21 d 内  $RSD < 8\%$ , 说明柴胡皂苷 d 对照血浆样品在 21 d 内稳定性良好, 无明显改变。

以上方法学考察的结果证明, 该方法符合生物样品定量分析的相关要求。

### 2.10 血样的含量测定和药代动力学参数的计算

将高、低剂量组大鼠灌胃后各时间点所取的血浆样品按 2.5 项下处理并用 2.1 项下的色谱条件分析测定, 所得柴胡皂苷 d 峰面积用回归方程计算, 得到各时间点血浆中柴胡皂苷 d 的质量分数值 ( $n = 3$ )。采用 3P97 药动学软件处理数据, 求取药代动力学参数。由于低剂量组所能量化的数据点太少而无法绘制药时曲线, 只得到了高剂量组的主要药代动力学参数:  $C_{\max} 8.65 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $T_{\max} 1.63 \text{ h}$ ,  $T_{1/2} 5.31 \text{ h}$ ,  $\text{MRT} 8.97 \text{ h}$ ,  $\text{AUC}_{0-t} 95.32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ,  $\text{AUC}_0 102.44 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$ , 柴胡药材中柴胡皂苷 d 在大鼠体内呈一室模型。

### 3 讨论

血样的前处理曾采用加甲醇沉淀蛋白质的方法, 但由于大鼠灌服柴胡后血浆中柴胡皂苷 d 的浓度很低, 较难检测, 故而采用固相萃取小柱纯化并浓缩后进样, 较好地检测了血浆中柴胡皂苷 d 的含量。

柴胡中的皂苷类成分除柴胡皂苷 d 之外, 还含有柴胡皂苷 a 和 c 等, 有文献报道两者可以在体内或肝肠循环代谢后转变成柴胡皂苷 d<sup>[5]</sup>, 而且人体

肠道菌也可对柴胡皂苷类成分进行水解和代谢<sup>[8]</sup>。因此, 柴胡皂苷的体内过程研究值得进一步深入和探讨。

### [参考文献]

- [1] 崔国静, 徐亚, 贺蕾. 浅谈柴胡[J]. 首都医药, 2009, 16(3): 45.
- [2] 牛向荣. 柴胡药理作用研究概述[J]. 中国药师, 2009, 12(9): 1310.
- [3] 肖功胜, 杨云, 刘富岗, 等. 柴胡皂苷提取和含量测定方法研究[J]. 中成药, 2009, 31(4): 595.
- [4] 谢东浩, 蔡宝昌, 安益强, 等. 柴胡皂苷类化学成分及药理作用研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2007, 23(1): 63.
- [5] 王胜春, 赵伟平, 皇孟君. 五灵胶囊中柴胡皂苷 d 在小鼠体内药代动力学研究[J]. 中成药, 2005, 27(7): 809.
- [6] 何燕, 胡志峰, 李平, 等. 柴胡皂苷 d 抗肝纤维化大鼠脂质过氧化作用的研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(8): 915.
- [7] 李勇, 王鹏, 任建琳, 等. 柴胡皂苷 d 在小鼠体内的类雌激素样作用[J]. 中西医结合学报, 2009, 7(7): 657.
- [8] 严梅桢(编译). 人肠道菌对柴胡皂苷的代谢[J]. 国外医学·中医中药分册, 2001, 23(3): 156.

[责任编辑 顾雪竹]