

降香挥发油大鼠体内 HPLC 测定方法的建立

王秀丽*, 赵保胜

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的:建立降香挥发油中指标成分橙花叔醇在大鼠体内的 HPLC 检测方法。方法:血浆经甲醇沉淀蛋白,以 shim-pack vp C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱,以水(A相)-甲醇(B相)为流动相,采用梯度洗脱:0~16 min B相由75%线性递增至92%,16~17 min B相由92%线性递减至75%,流速1.0 mL·min⁻¹,柱温30℃;检测波长213 nm。结果:橙花叔醇血药浓度为0.05~2 μL·mL⁻¹时与峰面积之间线性关系良好($r^2 = 0.9812$),低、中、高3个浓度的日内、日间精密性、样品的稳定性、提取回收率 RSD 均低于10%。结论:此方法简便、快速、准确可靠,适用于大鼠血浆中降香挥发油指标成分橙花叔醇的浓度测定。

[关键词] 降香挥发油;高效液相色谱法;橙花叔醇

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)01-0051-02

降香挥发油具有活血化痰、抗血栓^[1]作用,临床多以中药复方的形式用于治疗心脑血管系统疾病。而关于降香挥发油的体内检测目前还未见报道,本文以降香挥发油中主要成分橙花叔醇为指标成分,建立了检测大鼠体内降香挥发油中橙花叔醇的 HPLC 检测方法。

1 仪器与材料

降香挥发油乳剂自制,粒径为(150 ± 5) nm;肝素钠(天津生物化学制药厂);其它试剂和试药均为分析纯。

Varian series ProStar 高效液相色谱仪,美国; EmulsiFlex-C5 高压乳匀机,AVESTIN,加拿大;FA25 分散乳化机,上海;ZS90 激光粒径测定仪, Malvern, 英国;Sartorius 电子天平(BP211D 型,德国);Büchi Rotavapor R-114 旋转蒸发仪(瑞士);81-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器厂);BS 3200 超声波清洗器(上海新芝生物技术研究);YKH-2 型液体快速混合器(江西医疗器械厂);HGC-24A 型氮吹仪(天津恒奥科技有限公司);Beckman X-22R 高速冷冻离心机(美国贝克曼公司)。

2 实验与方法

2.1 降香挥发油乳剂的制备 将4 g 大豆磷脂、0.8 mL 降香挥发油加入10 mL 中链脂肪酸中;0.8 g PEG 6000,2.25 g 甘油溶于注射用水90 mL 中,于

80℃ 混合后立即用分散乳化器分散乳化(8 000 r·min⁻¹) 60 s,再经高压乳匀机匀化5次,即得。

2.2 HPLC 色谱条件 色谱柱为 shim-pack vp C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为水(A相)-甲醇(B相),采用梯度洗脱:0~16 min B相由75%线性递增至92%,16~17 min B相由92%线性递减至75%,流速1.0 mL·min⁻¹,柱温30℃;检测波长213 nm;进样量10 μL。

2.3 血浆样品的处理 健康雄性 Wistar 大鼠 200~220 g,在实验室动物房中饲养3 d,自由进食、进水,每天8:00至20:00开灯,20:00至次日8:00关灯,室温22~24℃,室内相对湿度60%。尾 iv 降香挥发油乳剂前12 h 禁食,以肝素浸润过的具塞离心管接收给药前和给药后的血液,立即于4℃以4 500 r·min⁻¹离心1 min。量取100 μL 血浆,加入200 μL 甲醇,涡旋混合1 min,于4℃以15 000 r·min⁻¹离心15 min,转移上清液(有机相),吸取20 μL 作为 HPLC 进样样品。

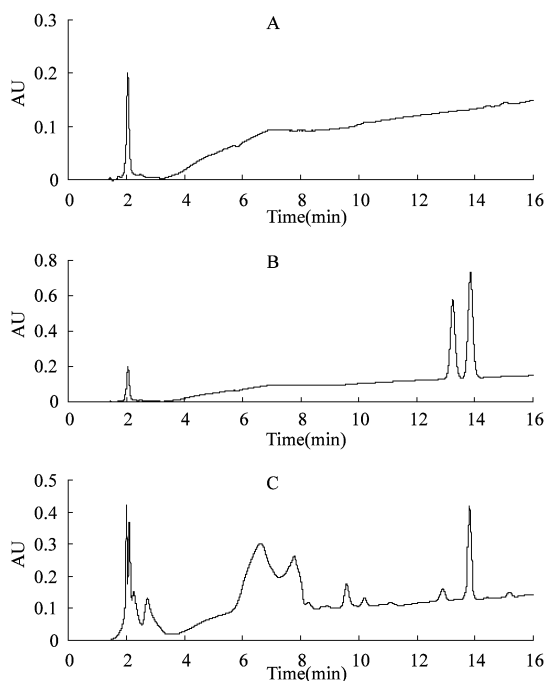
2.4 血浆样品分析方法的验证

2.4.1 方法的专属性 分别取空白血浆、空白血浆加入橙花叔醇对照品、大鼠尾 iv 降香挥发油乳剂的含药血浆,按建立的血浆预处理方法和 HPLC 方法操作并进样,空白血浆的内源性物质及降香挥发油乳剂的其他成分对有效成分的含量测定没有干扰。结果如图1所示。

2.4.2 标准曲线的建立 取具塞离心管6支,分别精密量取空白血浆0.5 mL,依次加入橙花叔醇对照

[收稿日期] 2009-04-08

[通讯作者] *王秀丽, Tel: (010) 84738658; E-mail: lwangxiuli@163.com



(A) 空白血清; (B) 血清 + 橙花叔醇; (C) 血样

图1 橙花叔醇血清浓度测定的 HPLC 色谱图

品溶液,使其浓度分别为 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$,按样品处理方法处理后进样,以橙花叔醇体积浓度(X)对顺反式橙花叔醇的峰面积之和(Y)进行线性回归,得回归方程为: $Y = 3 \times 10^{-11}X + 7 \times 10^{-6}$, ($r = 0.9812$)。线性范围: 0.05 ~ 2 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.4.3 精密度试验 日内 RSD:以 0.05, 0.5, 2 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3 个浓度各 5 个样品,日内连续测定;日间 RSD:以 0.05, 0.5, 2 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3 个浓度样品分别于 5 d 内测定。计算得 3 个浓度的日内 RSD 分别为 6.64%, 7.82% 和 8.77%, 日间 RSD 分别为 8.93%, 7.45% 和 6.91%。

2.4.4 稳定性考察 将 0.05, 0.5, 2 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 橙花叔醇对照品贮备液置冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放;加入 0.05, 0.5, 2 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 橙花叔醇的大鼠血浆样品,置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱和室温分别存放。定期取样测定,考察药物的稳定性。贮备液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存 7 d 的 RSD 分别为 7.87%, 7.54%, 6.65%;血浆样品在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存 15 d 的 RSD 分别为 9.95%, 9.51%, 9.03%;室温下放置 12 h 的 RSD 分别为 8.21%, 7.74%, 7.06%。表明对照品 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放 7 d、血浆样品在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻放置 15 d 及室温下放置 12 h 的稳定性可满足试验要求。

2.4.5 提取回收率 取具塞离心管 15 支,分别精

密度取空白血浆 0.5 mL,依次加入橙花叔醇对照品溶液,使其浓度分别为 0.05, 0.5, 2 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$,每个浓度各 5 份,按样品处理方法处理后进样测定,计算得 3 个浓度的回收率分别为 81.1%, 83.7% 和 86.9%, RSD 分别为 8.7%, 6.9% 和 5.6%。

3 讨论

蛋白沉淀法是血浆样品经过蛋白沉淀后直接进样 HPLC 进行检测,可以较大程度上保护降香挥发油不损失,所以,文中选用蛋白沉淀法。该法的关键在于选择合适的沉淀溶剂和溶剂体积,以确保既能有效去除蛋白质,又能避免样品被过于稀释而引起检测灵敏度下降。

文中实验先后考察了乙醇、甲醇、丙酮和乙腈的提取和沉淀蛋白质的效果,结果表明乙醇沉淀蛋白质的效果不理想。而甲醇提取杂质干扰少,回收率高,故选用甲醇为提取溶剂。预试验中分别尝试了 1, 2, 3, 4 倍体积的甲醇作为蛋白沉淀剂,结果 2 倍甲醇时已经能很好地将蛋白质沉淀,而常规选用的 4 倍甲醇则过度稀释样品,所以最终选择以 2 倍体积的甲醇作为蛋白沉淀剂。

关于中药挥发油成分的含量测定,常用气相色谱法。本文鉴于高效液相色谱法普及率高,相对成本降低,且有相关的采用高效液相色谱法成功测定药材或制剂中降香挥发油含量的文献报道^[2-3],故本文采用了高效液相色谱法作为检测方法。

不同产地或者同一产地不同方法获得的降香挥发油物理化学性质略有差异,但挥发油的主要成分仍相同,都含有橙花叔醇,故本文选定橙花叔醇为指标成分。

购自 Sigma 公司的橙花叔醇对照品液是顺式和反式的混合溶液,高效液相色谱图出峰时间分别是 13.18, 13.87 min,降香挥发油中只有 13.87 min 的峰,与文献^[2]报道相符,推测 13.87 min 的峰为反式橙花叔醇,13.18 min 的峰为顺式橙花叔醇。

[参考文献]

- [1] 冷红文,谭力伟,郭济贤.降香挥发油对血栓形成、血小板 cAMP 和血浆纤溶酶活性的影响[J].中成药,1992,14(4):30-31.
- [2] 韩静,唐星,巴德纯.HPLC 法测定降香挥发油中橙花叔醇的含量[J].中草药,2004,35(7):428-429.
- [3] 王靖,张铁军,廖茂梁.HPLC 法测定降香挥发油羟丙基- β -环糊精包合物中反式-橙花叔醇[J].天津中医药大学学报,2006,25(2):92-93.