

# 正交试验优选黄芩苷血药浓度测定中大鼠血浆的处理条件<sup>Δ</sup>

李海龙\*, 孙妍, 姚琳, 冯文成, 胡昊, 王伟明<sup>#</sup>(黑龙江省中医药科学院, 哈尔滨 150036)

中图分类号 R285;R914 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)04-0461-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.04.10

**摘要** 目的: 优选黄芩苷血药浓度测定中大鼠血浆的处理条件。方法: 采集大鼠空白血浆, 加入黄芩苷, 采用高效液相色谱法测定黄芩苷血药浓度。以黄芩苷萃取回收率为指标, 以磷酸量、甲醇量、超声萃取时间、两次离心转速、两次离心时间为因素, 通过 $L_{18}(3^7)$ 正交试验对含黄芩苷大鼠血浆处理条件进行优选并验证。结果: 最优提取条件为加入磷酸50  $\mu$ l、甲醇2 ml, 涡旋混合2 min, 超声萃取10 min, 以离心半径为4 cm、3 000 r/min离心10 min, 取上清液氮气流下吹干, 取200  $\mu$ l流动相复溶, 涡旋混合1 min, 以离心半径为3 cm、14 000 r/min离心5 min。验证试验得出平均萃取回收率为91.8%, RSD为2.6%。结论: 本试验优化了含黄芩苷血浆的处理条件, 阐明了各因素水平对黄芩苷萃取回收率的影响, 优选的处理条件稳定可行。

**关键词** 黄芩苷; 血浆; 处理条件; 血药浓度; 药动学; 正交试验

## Optimization of Processing Conditions of Rat Plasma in Blood Concentration Determination of Baicalin by Orthogonal Test

LI Hai-long, SUN Yan, YAO Lin, FENG Wen-cheng, HU Hao, WANG Wei-ming (Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine Sciences, Harbin 150036, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the processing conditions of rat plasma in blood concentration determination of baicalin. METHODS: Blank rat plasma were collected and treated with baicalin. The blood concentration of baicalin was determined by HPLC. The processing conditions of baicalin in rat plasma was optimized by  $L_{18}(3^7)$  orthogonal test using extraction recovery rate of baicalin as index, the amount of phosphate and methanol, ultrasonic extraction time, centrifugal rotational speed (twice) and centrifugal time (twice) as factors. RESULTS: The optimal extraction conditions were as follows: adding phosphoric acid 50  $\mu$ l and methanol 2 ml, vortex mixing 2 min, ultrasonic extracting for 10 min, centrifugal semidiameter of 4 cm, centrifuging for 10 min at speed of 3 000 r/min, drying up supernatant under a stream of nitrogen, dissolving with the mobile phase 200  $\mu$ l, vortex mixing 1 min, centrifugal semidiameter of 3 cm, centrifuging for 5 min at speed of 14 000 r/min. Validation test showed that average extraction recovery rate was 91.8% (RSD=2.6%). CONCLUSIONS: The trial optimizes the processing conditions of plasma containing baicalin, and introduces the effects of various factors and levels on the extraction recovery rate of baicalin. The optimized processing conditions are stable and feasible.

**KEYWORDS** Baicalin; Plasma; Processing condition; Plasma concentration; Pharmacokinetics; Orthogonal test

黄芩苷是黄芩的活性成分之一, 有清热解毒、抑菌抗炎等功效<sup>[1]</sup>。因黄芩苷具有广泛的药理作用, 所以一直有着良好的临床应用价值; 但其脂溶性差, 体内吸收率比较低, 生物利用度差。因此, 为了提高黄芩苷的生物利用度, 黄芩苷的药动学研究一直是受到关注较多的课题<sup>[2]</sup>。作为中药复方药动学的前期研究, 本课题组通过对大鼠血浆中黄芩苷的处理方法进行研究, 选出最优处理方法, 为黄芩苷的药动学研究提供了处理方法依据。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

E2695型高效液相色谱(HPLC)仪、2489型紫外检测器(美国Waters公司); BSA224S-CW型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; SK250H型超声仪(上海科导超声仪器有限公司); LG16-W型高速台式离心机(北京京立离心机有限公

司); WH-3微型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器有限公司); Milli-Q Reference System型超纯水器(美国Millipore公司)。

#### 1.2 试剂

黄芩苷对照品(批号: 110715-201016, 纯度:  $\geq 98\%$ )、芦丁对照品(批号: 100080-200306, 纯度: 91%)均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇(色谱纯, 美国Dikma公司); 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

#### 1.3 动物

清洁级Wistar大鼠10只, 8周龄,  $\delta$ , 体质量(300  $\pm$  50) g, 由吉林大学基础医学院动物实验中心提供[实验动物使用合格证号: SCXK(吉)2011-0004]。动物饲养1周, 给药前禁食16 h, 自由饮水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件<sup>[3-4]</sup>

色谱柱: WATERS  $C_{18}$  (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相: 甲醇-0.04%磷酸水溶液(38:62, V/V), 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 280 nm; 柱温: 30  $^{\circ}$ C; 进样量: 20  $\mu$ l。理论板数按黄芩苷计不少于3 000, 黄芩苷与内标及其他杂质峰分离良好。

### 2.2 溶液的制备

精密称取黄芩苷对照品2.8 mg、芦丁对照品7.9 mg, 分别置于25、50 ml量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 得质量浓度分别为

<sup>Δ</sup> 基金项目: 国家重大新药创制专项(No.2010ZX09101-104); 黑龙江省中医药科研项目(No.ZHY12-Z128); 黑龙江省杰出青年基金项目(No.JC200813)

\* 硕士研究生。研究方向: 中药药动学。E-mail: 799950751@qq.com

<sup>#</sup> 通信作者: 研究员, 硕士生导师, 博士后。研究方向: 中药剂型。E-mail: 672566098@qq.com

112、158 μg/ml的黄芩苷、芦丁贮备溶液,4℃贮藏,备用。

### 2.3 血浆样品的采集

取Wistar大鼠10只,每只腹主动脉采血10 ml,置于肝素钠负压采血管中,以离心半径为4 cm、4 000 r/min离心15 min,分离血浆,置于-20℃贮藏,备用。

### 2.4 血浆样品的处理

于同一离心管中加入一定量的芦丁液(内标,158 μg/ml)、1 ml黄芩苷对照品溶液(112 μg/ml),氮气流下吹干,精密加入血浆样品200 μl混匀。按正交试验表进行血浆样品处理:加入磷酸、甲醇,涡旋,混合2 min,超声一定时间萃取,以离心半径为4 cm第1次离心一定时间(除蛋白沉淀),取上清液氮气流下吹干,加200 μl流动相复溶,涡旋混合1 min,以离心半径为3 cm第2次离心一定时间(除血浆中杂质)。每组3个平行样品。处理完成后取上清液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,以测定量与加入量之比计算黄芩苷萃取回收率。

### 2.5 正交试验设计<sup>[5-9]</sup>

以黄芩苷萃取回收率为评价指标,以磷酸量(A)、甲醇量(B)、超声萃取时间(C)、离心转速1(D)、离心时间1(E)、离心转速2(F)、离心时间2(G)为考察因素,采用L<sub>18</sub>(3<sup>7</sup>)正交表进行试验。因素与水平见表1;正交试验结果见表2;方差分析结果见表3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素						
	A, μl	B, μl	C, min	D, r/min	E, min	F, r/min	G, min
1	10	400	5	3 000	5	10 000	5
2	50	1 000	10	6 000	10	12 000	10
3	100	2 000	15	8 000	15	14 000	15

表2 正交试验结果

Tab 2 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	E	F	G	黄芩苷萃取回收率, %
1	1	1	1	1	1	1	1	67
2	1	2	2	2	2	2	2	69
3	1	3	3	3	3	3	3	70
4	2	1	2	2	2	3	3	76
5	2	2	2	3	3	1	1	79
6	2	3	3	1	1	2	2	82
7	3	1	2	1	3	2	3	75
8	3	2	3	2	1	3	1	77
9	3	3	1	3	2	1	2	83
10	1	1	3	3	2	2	1	71
11	1	2	1	1	3	3	2	73
12	1	3	2	2	1	1	3	77
13	2	1	2	3	1	3	2	79
14	2	2	3	1	2	1	3	80
15	2	3	1	2	3	2	1	86
16	3	1	3	2	3	1	2	73
17	3	2	1	3	1	2	3	75
18	3	3	2	1	2	3	1	85
K <sub>1</sub>	71.167	73.500	76.667	77.000	76.167	76.500	77.500	
K <sub>2</sub>	80.333	75.500	77.333	76.333	77.333	76.333	76.500	
K <sub>3</sub>	78.000	80.500	75.500	76.167	76.000	76.667	75.500	
R	9.166	7.000	1.833	0.833	1.333	0.334	2.000	

由表2、表3可知,各因素对试验结果的影响程度依次为A>B>G>C>E>D>F,血浆处理方法最优条件为A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>E<sub>2</sub>F<sub>3</sub>G<sub>1</sub>,即加入磷酸50 μl、甲醇2 000 μl,涡旋混合2 min,超声萃取10 min,以离心半径为4 cm、3 000 r/min离心10

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

变异来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	272.333	2	136.166 5	817.817	<0.01
B	156.000	2	78.000 0	468.468	<0.01
C	10.333	2	5.166 5	31.030	<0.05
D	2.333	2	1.166 5	7.006	
E	6.333	2	3.166 5	19.018	<0.05
F(误差)	0.333	2	0.166 5	1.000	
G	12.000	2	6.000 0	36.036	<0.05

注: F<sub>0.05</sub>(2, 2)=19.00; F<sub>0.01</sub>(2, 2)=99.00

Note: F<sub>0.05</sub>(2, 2)=19.00; F<sub>0.01</sub>(2, 2)=99.00

min,取上清液于氮气流下吹干,取200 μl流动相复溶,涡旋混合1 min,以离心半径为3 cm、14 000 r/min离心5 min。以极值最小的F因素为误差项进行方差分析,结果表明A、B、C、E、G,即加入磷酸量、甲醇量、超声萃取时间、离心时间对血浆中黄芩苷的萃取有显著影响,且A>B>G>C>E。

### 2.6 验证试验

为了确保提取工艺的重现性及可行性,于同一离心管中加入一定量的芦丁液(内标)、1 ml黄芩苷对照品溶液,氮气流下吹干,精密加入血浆样品200 μl混匀,平行5份,按血浆样品方法处理下最优条件操作,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,计算黄芩苷萃取回收率。结果,5份平行样品的黄芩苷平均萃取回收率均高于正交试验组,表明处理条件为最优条件;且5份平行样品的萃取回收率较为接近,表明按最优处理方法处理大鼠血浆样品比较稳定。验证试验结果见表4。

表4 验证试验结果

Tab 4 Results of validation test

编号	黄芩苷萃取回收率, %	均值, %	RSD, %
1	92		
2	90		
3	89	91.8	2.6
4	93		
5	95		

## 3 讨论

通过测定正交试验黄芩苷的萃取回收率,在加入磷酸50 μl、甲醇2 ml,涡旋混合2 min,超声萃取10 min,以离心半径为4 cm、3 000 r/min离心10 min,取上清液氮气流下吹干,取200 μl流动相复溶,涡旋混合1 min,以离心半径为3 cm、14 000 r/min离心5 min的条件下,应用HPLC法测定黄芩苷的峰形最好,血浆中的黄芩苷萃取回收效果最高。通过正交试验方差分析得出,加入磷酸量、甲醇量、超声萃取时间、离心时间对血浆中黄芩苷萃取回收影响显著。利用最优萃取工艺,可最大限度萃取血浆中黄芩苷。

为了减少试验过程中的误差,在样品处理时,采用内标法,以芦丁为内标物;通过参考文献,在血浆样品的处理时,通常采用甲醇、乙腈、乙酸乙酯等有机溶剂对血浆蛋白沉淀处理,芦丁和黄芩苷在甲醇中有较好的溶解率,且本研究中HPLC色谱条件水相为甲醇-磷酸水溶液,所以采用甲醇对样品中血浆蛋白进行沉淀。通过最佳样品处理方法,样品中黄芩苷和芦丁的萃取回收率均能达到80%以上,且方法稳定可行,符合要求<sup>[10]</sup>。

### 参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年

# 老龙七水提液对兔离体肠平滑肌收缩的影响<sup>Δ</sup>

李志东<sup>1\*</sup>, 王慧<sup>2</sup>, 张海娟<sup>2</sup>, 陈现伟<sup>2</sup>, 胡开良<sup>2</sup>, 刘旭海<sup>3</sup>, 冯尚彩<sup>2#</sup>(1.广州中医药大学研究生院, 广州 510006; 2.临沂大学山东省鲁南中药材资源开发工程技术研究中心, 山东临沂 276000; 3.临沂市人民医院, 山东临沂 276003)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)04-0463-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.04.11

**摘要** 目的:研究老龙七水提液对兔离体肠平滑肌收缩的影响。方法:以0.25、0.50、0.75、1.00、1.25 g(生药)/L老龙七水提液、0.003 125 g/L乙酰胆碱(先加入)+1.25 g(生药)/L老龙七水提液(后加入)、0.003 125 g/L阿托品(先加入)+1.25 g(生药)/L老龙七水提液(后加入)作用于兔离体肠平滑肌,记录兔离体肠平滑肌收缩频率、振幅和张力的结果:0.75~1.25 g(生药)/L老龙七水提液可明显增强兔离体肠平滑肌自发性收缩的振幅和张力( $P<0.01$ ),且呈浓度依赖性,但对频率无影响;1.25 g(生药)/L老龙七水提液可明显增强乙酰胆碱诱导的兔离体肠平滑肌收缩的振幅和张力( $P<0.05$ ),并且可明显增强阿托品诱导的兔离体肠平滑肌舒张后的振幅和张力( $P<0.05$ )。结论:老龙七水提液可增强乙酰胆碱诱导的兔离体肠平滑肌的收缩,可对抗阿托品诱导的兔离体肠平滑肌舒张。

**关键词** 老龙七;水提液;兔;肠平滑肌;收缩作用

## Effects of Water Extract of *Lobaria retigera* on Isolated Rabbit Intestine Smooth Muscle Contraction

LI Zhi-dong<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>2</sup>, ZHANG Hai-juan<sup>2</sup>, CHEN Xian-wei<sup>2</sup>, HU Kai-liang<sup>2</sup>, LIU Xu-hai<sup>3</sup>, FENG Shang-cai<sup>2</sup>(1. Graduate School, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China; 2. Shandong Provincial Engineering Technology Research Center for Lunan Chinese Herbal Medicine, Linyi University, Shandong Linyi 276000, China; 3. Linyi People's Hospital, Shandong Linyi 276003, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effects of water extract of *Lobaria retigera* on isolated rabbit intestine smooth muscle contraction. METHODS: The isolated intestinal smooth muscle of rabbits were treated with 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 and 1.25 g (medicinal materials)/L water extract of *L. retigera*, 0.003 125 g/L acetylcholine (adding first)+1.25 g (medicinal material)/L water extract of *L. retigera* (adding secondly), 0.003 125 g/L atropine (adding first)+1.25 g (medicinal material)/L water extract of *L. retigera* (adding secondly). The frequency, amplitude and contractive tension of isolated intestine smooth muscle contractions were recorded. RESULTS: 0.75-1.25 g (medicinal materials)/L water extract of *L. retigera* could enhance the amplitude and contractive tension of isolated intestine smooth muscle spontaneous contractions significantly ( $P<0.01$ ) in concentration-dependent manner, but had no effect on its frequency. 1.25 g (medicinal materials)/L water extract of *L. retigera* could enhance the amplitude and contractive tension of acetylcholine-induced intestine smooth muscle contractions significantly and also increased contraction rate ( $P<0.05$ ); 1.25 g (medicinal materials)/L water extract of *L. retigera* could enhance the amplitude and contractive tension of atropine-induced intestine smooth muscle relaxation significantly and also increased contraction rate ( $P<0.05$ ). CONCLUSIONS: The water extract of *L. retigera* can coordinate acetylcholine-induced isolated intestine smooth muscle contractions of rabbits, and resist atropine-induced intestinal smooth muscle relaxation.

**KEYWORDS** *Lobaria retigera*; Water extract; Rabbit; Intestinal smooth muscle; Contraction

版.北京:中国医药科技出版社,2010:282.

- [2] 祝婧云,梁新丽,王光发,等.白芷提取物对黄芩活性成分黄芩苷的吸收促进作用[J].药学学报,2011,46(2):232.
- [3] 邱枫,徐静华,肇丽梅,等. HPLC法测定大鼠血浆中黄芩苷的浓度[J].实用药物与临床,2009,12(5):334.
- [4] 王丽,周慧芳,张艳军,等.高效液相色谱法测定小鼠血浆中黄芩苷含量及其药代动力学研究[J].长春中医药大学学报,2011,27(2):160.

Δ 基金项目:山东省科技发展计划资助项目(No. 2012GNC11027);临沂大学博士科研启动经费资助项目

\* 硕士研究生。研究方向:中药及天然药物活性成分。电话:0539-8766717。E-mail:leezhi\_dong@163.com

# 通信作者:教授。研究方向:天然活性物质。电话:0539-2060115。E-mail: fshc2003@126.com

- [5] 项慧慧,杨洁红,傅旭春,等.正交试验法优选赶黄草的提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(4):50.
- [6] 丁延虹,丁小全,贾忠,等.正交试验优选黄芩苷的新型提取方法[J].中国药房,2009,20(9):658.
- [7] 贺葵邦,王英姿,张春泥,等.正交试验法优选地龙水提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(6):33.
- [8] 赵珉,郭靖,张红岩,等.正交试验法优选舒欣胶囊中丹参酮II A工艺[J].长春中医药大学学报,2011,27(3):355.
- [9] 孔燕芳,周艳梅,闫艳仓,等.正交试验优选野菊花中总黄酮的提取工艺[J].中国药房,2013,24(43):4 068.
- [10] 梁文权.生物药剂学与药物动力学[M].北京:人民卫生出版社,2007:320-325.

(收稿日期:2014-03-06 修回日期:2014-06-12)

(编辑:张 静)