

HPLC法同时测定胎盘灌流液中双黄连冻干粉中8种成分的含量^Δ

赵丽颖^{1*}, 宋殿荣^{2#}(1.天津中医药大学研究生院,天津 300193;2.天津中医药大学第二附属医院妇科,天津 300150)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)27-3823-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.27.28

摘要 目的:建立同时测定胎盘灌流液中双黄连冻干粉中8种成分含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Zorbax-C₁₈,流动相为乙腈-1%甲酸水溶液(梯度洗脱),内标为葛根素,流速为1.0 ml/min,检测波长为280 nm,柱温为25℃,进样量为10 μl。结果:8种成分在各自的质量浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系($r \geq 0.999 0$);日内精密性、日间精密性、重复性试验的RSD $\leq 1.9\%$,稳定性试验的RSD $\leq 7.3\%$,平均回收率为92.73%~112.37%,RSD为3.2%~8.2%($n=6$),平均基质效应为90.33%~105.78%,RSD为3.2%~8.0%($n=6$)。结论:该方法快速、灵敏,专属性强,可用于同时测定胎盘灌流液中双黄连冻干粉中8种成分的含量。

关键词 双黄连冻干粉;高效液相色谱法;胎盘灌流液;绿原酸;连翘酯苷B;连翘酯苷A;黄芩苷;连翘苷;木犀草素;汉黄芩苷;黄芩素

Simultaneous Determination of the Contents of 8 Ingredients of Shuanghuanglian Freeze-dried Powder in Placental Perfusate

ZHAO Li-ying¹, SONG Dian-rong² (1.Graduate School of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2.Dept. of Gynecology, Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300150, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of the contents of Shuanghuanglian freeze-dried powder in placental perfusate. METHODS: HPLC was performed on the column of Agilent Zorbax-C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-1% formic acid aqueous solution (gradient elution) at flow rate of 1.0 ml/min, the internal standard was puerarin, detection wavelength was 280 nm, column temperature was 25 °C and sample volume was 10 μl. RESULTS: There was a linear range between linear ranges and peak area of 8 ingredients ($r \geq 0.999 0$); RSDs of within-day and inter-day precision tests were no more than 1.9%, repeatability tests was no more than 7.3%; average recoveries were in the range of 92.73%-112.37% (RSD=3.2%-8.2%, $n=6$); and average matrix effects were 90.33%-105.78% (RSD=3.2%-8.0%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is rapid, sensitive and specific, and can be used to the simultaneous determination of the contents of 8 ingredients of Shuanghuanglian freeze-dried powder in placental perfusate.

KEYWORDS Shuanghuanglian freeze-dried powder; HPLC; Placental perfusate; Chlorogenic acid; Forsythiaside B; Forsythiaside A; Baicalin; Forsythin; Luteolin; Wogonoside; Baicalein

双黄连冻干粉由金银花、黄芩、连翘三味药材提取精炼而成,具有清热解毒、疏风解表之功效,是目前临床治疗呼吸道感染性疾病的首选药物之一^[1],也可被用于妊娠期多种感染性疾病的治疗^[2]。宋殿荣等^[3-4]对双黄连冻干粉透过不同孕期妊娠大鼠胎盘屏障的药物成分进行了分析,然而,由于种属差异,动物实验结果难以直接外推到人类。2013年宋殿荣等^[5]又利用胎盘组织薄片培养技术与尤斯扩散池(Ussing chamber)相结合建立了人胎盘屏障体外模型,该模型具备在体胎盘的内分泌和物质转运功能,能有效避免种属差异,模拟在体环境。而应用该技术的关键是建立胎盘灌流液中中药成分的

分析方法。为此,在本研究中笔者建立了采用高效液相色谱(HPLC)法测定胎盘灌流液中双黄连冻干粉中8种成分含量的方法,为中药透过胎盘屏障药物成分研究提供分析方法学借鉴。

1 材料

1260型HPLC仪,包括四元泵、在线真空脱气机、自动进样器、柱温箱和二极阵列检测器(美国Agilent公司)等;数控系列超声处理器FS-150N(上海生析超声仪器有限公司)。

双黄连冻干粉(哈药集团中药二厂,批号:Z10960058,规格:600 mg/支);绿原酸(批号:110753)、连翘酯苷B(批号:111811)、连翘酯苷A(批号:111810)、黄芩苷(批号:110715)、连翘苷(批号:110821)、木犀草素(批号:111520)、汉黄芩苷(批号:P0641)、黄芩素(批号:111595)、葛根素(批号:110752)等对照品均购自中国食品药品检定研究院(纯度均 $> 98\%$);甲醇(美国Fisher试剂公司)、乙腈(美国Fisher试剂公司)、甲

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81273938)

* 博士研究生。研究方向:妊娠期用药安全性。电话:022-60335421。E-mail: irenezhaoliying@163.com

通信作者:主任医师。研究方向:妊娠期用药安全性、妇科内分泌等。电话:022-60335423。E-mail: songdr58@126.com

酸(美国 ROE 试剂公司)均为色谱法,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液 精密称取绿原酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、黄芩苷、连翘苷、木犀草素、汉黄芩苷、黄芩素对照品各适量,加入乙腈溶解并定容至同一 10 ml 棕色量瓶中,摇匀,配成混合对照品溶液,于 4 °C 保存,备用。

2.1.2 内标溶液 精密称取内标物葛根素 10 mg,置于 10 ml 量瓶中,加入乙腈稀释至刻度,得质量浓度为 1 mg/ml 的标准液,于 4 °C 保存,备用。临用前用乙腈稀释至质量浓度为 10 μg/ml 的内标溶液。

2.1.3 胎盘灌流液 精密称取 NaCl 6.923 g、KCl 0.354 g、NaHCO₃ 2.1 g、Na₂HPO₄ 0.136 g、MgSO₄·7H₂O 0.288 g、CaCl₂·6H₂O 0.56 g、葡萄糖(GS)1.8 g、L-丙氨酸 0.178 g,混合后以 800 ml 双蒸水充分溶解,调节 pH 至 7.4,双蒸水补足体积至 1 000 ml,用 Stericup 过滤器滤过,于 4 °C 保存,备用。

2.1.4 供试品溶液 精密称取双黄连冻干粉适量至 10 ml 量瓶中,加入胎盘灌流液定容,超声(功率:80 W,频率:20 kHz)溶解,即得。

2.2 色谱条件

色谱柱:Zorbax-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(洗脱程序详见表 1);流速:1.0 ml/min;检测波长:280 nm;柱温:25 °C;进样量:10 μl。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间,min	流动相A,%	流动相B,%
0	10	90
5	18	82
15	28	72
20	35	65
25	35	65
30	42	58
35	55	45

2.3 样品处理方法及测定

取“2.1.4”项下供试品溶液 95 μl,置于 1.5 ml 聚丙烯管中,加入乙腈 5 μl,混匀后加入“2.1.2”项下内标溶液 200 μl,涡旋 30 s,以半径为 3 cm、14 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液 10 μl,按“2.2”项下色谱条件进样测定。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 分别取上述胎盘灌流液、胎盘灌流液加内标溶液、胎盘灌流液加混合对照品溶液加内标溶液、胎盘灌流液加混合对照品溶液、供试品溶液各适量,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图 1。由图 1 可知,绿原酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、黄芩苷、连翘苷、木犀草素、汉黄芩苷及黄芩素的色谱峰与其左右的干扰峰分离度均大于 1.5,各色谱峰的保留时间分别为 7.299、10.896、11.728、30.800、18.638、19.336、22.029、22.667、28.955 min,理论板数均大于 4 000。胎盘灌流液对双黄连冻干粉中 8 种成分和内标溶液的测定无干扰。

2.4.2 线性关系考察 取 1.5 ml 离心管 8 个,分别加入“2.1.3”项下胎盘灌流液 95 μl,再分别加入“2.1.1”项下的混合对照品溶液 5 μl,混匀后加入“2.1.2”项下内标溶液 200 μl,使得胎盘灌流液中绿原酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷质量浓度分别为 2、4、6、8、10、20、30、40 μg/ml;黄芩苷、木犀草素、汉黄芩苷、

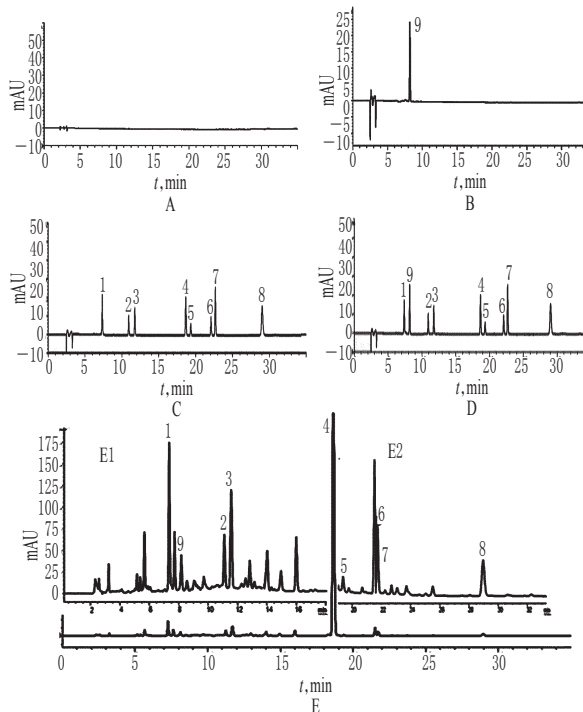


图 1 高效液相色谱图

A. 胎盘灌流液; B. 胎盘灌流液加内标溶液; C. 胎盘灌流液加混合对照品溶液; D. 胎盘灌流液加混合对照品溶液加内标溶液; E. 供试品溶液; E1. 图 E 在 0~18 min 放大图; E2. 图 E 在 19~33 min 放大图; 1. 绿原酸; 2. 连翘酯苷 B; 3. 连翘酯苷 A; 4. 黄芩苷; 5. 连翘苷; 6. 木犀草素; 7. 汉黄芩苷; 8. 黄芩素; 9. 葛根素

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank placental perfusate; B. blank placental perfusate and internal standard; C. blank placental perfusate and mixed reference substances; D. blank placental perfusate, mixed reference substances and internal standard; E. test sample; E1. the amplified chromatogram in 0-18 min; E2. the amplified chromatogram in 19-33 min; 1. chlorogenic acid; 2. forsythiaside B; 3. forsythiaside A; 4. baicalin; 5. forsythia glycosides; 6. luteolin; 7. wogonoside; 8. baicalein; 9. puerarin

黄芩素质量浓度分别为 1、2、3、4、5、10、15、20 μg/ml,涡旋 30 s,以半径为 3 cm、14 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液 10 μl,按“2.2”项下色谱条件进样测定。以质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、各对照品和内标溶液的峰面积比值(y)为纵坐标进行线性回归,以信噪比为 10 计算 8 种成分的定量检测限(LOQ),结果见表 2。

表 2 线性关系试验结果

Tab 2 Results of linear range

待测成分	回归方程	线性范围, μg/ml	r	LOQ, μg/ml
绿原酸	y=0.011 6x+0.012 0	2~40	0.999 3	0.100 0
连翘酯苷 B	y=0.057 6x-0.009 8	2~40	0.999 1	0.200 0
连翘酯苷 A	y=0.080 3x-0.028 2	2~40	0.999 3	0.150 0
黄芩苷	y=0.126 0x-0.034 6	1~20	0.999 4	0.075 0
连翘苷	y=0.039 7x-0.012 1	2~40	0.999 3	0.300 0
木犀草素	y=0.063 9x-0.032 9	1~20	0.999 4	0.075 0
汉黄芩苷	y=0.148 6x-0.056 8	1~20	0.999 0	0.037 5
黄芩素	y=0.173 1x-0.092 9	1~20	0.999 0	0.100 0

2.4.3 精密度试验 取“2.1.4”项下供试品溶液适量,按“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次,测定日内精密度;另连续测定 6

d, 每天进样1次, 测定日间精密度, 结果见表3。由表3可见, 各成分的RSD均 ≤ 1.9 , 表明精密度良好。

表3 精密度试验结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 3 Results of precision tests($\bar{x} \pm s, n=6$)

待测成分	日内精密度		日间精密度	
	$\bar{x} \pm s, \%$	RSD, %	$\bar{x} \pm s, \%$	RSD, %
绿原酸	761.25 \pm 7.75	1.0	774.47 \pm 13.55	1.8
连翘酯苷B	182.93 \pm 3.00	1.6	189.73 \pm 3.32	1.8
连翘酯苷A	361.53 \pm 4.15	1.1	363.15 \pm 4.28	1.2
黄芩苷	21 389.72 \pm 317.98	1.5	21 475.40 \pm 254.27	1.2
连翘苷	112.93 \pm 1.82	1.6	117.88 \pm 1.73	1.5
木犀草素	352.92 \pm 6.04	1.7	358.18 \pm 3.79	1.1
汉黄芩苷	54.90 \pm 1.08	1.9	52.67 \pm 0.56	1.1
黄芩素	34.68 \pm 0.45	1.3	33.42 \pm 0.62	1.9

2.4.4 稳定性试验 以胎盘灌流液为基质, 按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液(批号: Z10960058), 分别考察样品于室温下放置24 h、 -20°C 冷冻保存7 d的长期稳定性和反复冻融3次的稳定性, 结果见表4。由表4可见, 各成分的RSD $\leq 7.3\%$, 表明供试品溶液稳定性较好。

表4 稳定性试验结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 4 Results of stability tests($\bar{x} \pm s, n=6$)

待测成分	室温24 h		冷冻7 d(-20°C)		冻融3次(-20°C)	
	$\bar{x} \pm s, \%$	RSD, %	$\bar{x} \pm s, \%$	RSD, %	$\bar{x} \pm s, \%$	RSD, %
绿原酸	729.30 \pm 8.70	1.2	728.10 \pm 9.02	1.2	725.98 \pm 21.82	3.0
连翘酯苷B	181.22 \pm 3.27	1.8	179.13 \pm 8.15	4.5	168.43 \pm 8.43	5.0
连翘酯苷A	358.55 \pm 6.84	1.9	351.53 \pm 9.19	2.6	354.20 \pm 20.66	5.8
黄芩苷	21 243.42 \pm 317.86	1.5	20 861.25 \pm 802.21	3.8	20 776.58 \pm 1 238.69	6.0
连翘苷	116.68 \pm 3.73	3.2	111.27 \pm 4.68	4.2	108.60 \pm 7.92	7.3
木犀草素	351.32 \pm 4.47	1.3	353.18 \pm 11.57	3.3	339.95 \pm 15.07	4.4
汉黄芩苷	50.88 \pm 1.67	3.3	50.17 \pm 2.28	4.5	49.15 \pm 3.08	6.3
黄芩素	31.25 \pm 1.66	5.3	30.50 \pm 1.74	5.7	31.05 \pm 1.88	6.1

2.4.5 重复性试验 取双黄连冻干粉(批号: Z10960058)6份, 按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液, 精密吸取10 μl , 按“2.2”项下色谱条件进样。结果, RSD在1.2%~1.9%之间, 表明该方法重复性较好。

2.4.6 基质效应和回收率试验 以胎盘灌流液为基质, 按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液共6份, 按“2.2”项下色谱条件进样测定, 得双黄连冻干粉中各成分峰面积为A1; 另取胎盘灌流液适量, 加入适量“2.1.1”项下混合对照品溶液, 配制与双黄连供试品溶液浓度相同的溶液, 每个浓度6份, 按“2.2”项下色谱条件进样测定, 得到双黄连冻干粉中各成分峰面积为A2; 另取去离子水代替胎盘灌流液, 加入适量“2.1.1”项下混合对照品溶液, 配制与双黄连供试品溶液浓度相同的溶液, 每个浓度6份, 按“2.2”项下色谱条件进样测定, 得到双黄连冻干粉中各成分峰面积为A3; 以A1/A2计算回收率, A2/A3计算基质效应, 结果见表5。

3 讨论

胎盘灌流液中中药成分的测定是完成中药离体胎盘透性研究的基础。郭洁等^[9]曾建立了双黄连冻干粉HPLC指纹图谱, 但未对胎盘灌流液中药物成分进行分析。本研究首次建立了测定胎盘灌流液中双黄连冻干粉中各成分的方法, 可为中药透过胎盘屏障药物成分研究提供分析方法学借鉴。

为了获得较好的分离度和峰形, 在色谱条件的探索中, 笔者尝试在流动相中添加0.1%甲酸, 提高了双黄连冻干粉中各成分和内标物的离子化效率和灵敏度; 与等度洗脱相比,

表5 基质效应和回收率试验结果($n=6$)

Tab 5 Results of matrix effects and recovery tests($n=6$)

待测成分	基质效应		回收率	
	$\bar{x} \pm s, \%$	RSD, %	$\bar{x} \pm s, \%$	RSD, %
绿原酸	104.83 \pm 5.97	5.7	97.72 \pm 6.02	6.1
连翘酯苷B	96.93 \pm 6.79	7.0	98.48 \pm 8.19	8.2
连翘酯苷A	90.33 \pm 7.19	8.0	112.37 \pm 7.66	6.8
黄芩苷	105.78 \pm 5.99	5.7	104.50 \pm 6.95	6.7
连翘苷	101.20 \pm 7.46	7.4	98.07 \pm 4.83	4.9
木犀草素	92.73 \pm 2.93	3.2	92.73 \pm 2.92	3.2
汉黄芩苷	92.90 \pm 4.97	5.3	92.80 \pm 5.04	5.4
黄芩素	90.63 \pm 4.96	5.5	98.80 \pm 5.40	5.5

选择了能够使基质效应最小化, 且能够使峰形最优化的梯度洗脱, 最终实现了双黄连冻干粉中8种成分和内标物的快速分析检测。

在样品前处理方法的优化中, 本研究采用了更快捷的蛋白沉淀法。由于胎盘灌流液为特殊生物基质, 其功能是在体外模拟妊娠期母体和胎儿的血液, 使胎盘保持活性^[7], 因此其成分复杂多样, 尤其是盐及蛋白含量较高, 若在样品预处理过程中对多余成分去除不完全, 易损伤或堵塞色谱柱。国外文献报道多将胎盘灌流液样品经不同试剂多次蛋白沉淀后, 高速离心取上清液进样^[9], 这种方法处理过程较为复杂, 且多次沉淀降低了样品浓度, 增加了检测难度。本研究选用乙腈为蛋白沉淀剂对胎盘灌流液样品进行前处理, 操作简便、快速、回收率高, 可避免使用超滤膜或固相萃取柱带来的高成本以及液-液萃取的低效率和低提取率。

综上所述, 该方法快速、灵敏、专属性强, 可用于同时测定胎盘灌流液中双黄连冻干粉中8种成分的含量。

参考文献

- [1] 顾媛媛, 李殿明, 石朗, 等. 注射用双黄连安全性问题研究近况[J]. 中国药房, 2015, 26(15): 2 156.
- [2] 王丽伟, 杨静. 双黄连粉针剂在妊娠期合并症的临床应用[J]. 承德医学院学报, 2007, 24(2): 157.
- [3] 郭洁, 宋殿荣, 宋红运, 等. 双黄连冻干粉大鼠血清药物成分的初步研究[J]. 天津中医药, 2010, 27(2): 160.
- [4] 宋殿荣, 郭洁, 王跃飞, 等. 双黄连透过妊娠大鼠胎盘组织的药物成分研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(12): 1 626.
- [5] Song D, Guo J, Han F, *et al.* Establishment of an in vitro model of the human placental barrier by placenta slice culture and ussing chamber[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2013, 77(5): 1 030.
- [6] 郭洁, 宋殿荣, 王跃飞, 等. 双黄连冻干粉HPLC指纹图谱特征色谱峰的归属研究[J]. 天津中医药, 2009, 26(6): 497.
- [7] Hutson JR, Garcia-Bournissen F, Davis A, *et al.* The human placental perfusion model: a systematic review and development of a model to predict in vivo transfer of therapeutic drugs[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2011, 90(1): 67.
- [8] Mathiesen L, Rytting E, Mose T, *et al.* Transport of benzo [α]pyrene in the dually perfused human placenta perfusion model: effect of albumin in the perfusion medium [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2009, 105(3): 181.

(收稿日期: 2015-01-28 修回日期: 2015-06-24)

(编辑: 余庆华)