HPLC 测定三棱入血成分含量

李进[1]，陈佳丽[2]，马月光[2*]，徐良辉[2] (1.浙江大学医学院附属第一医院，杭州 310003；2.浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院，杭州 310006)

摘要：目的 建立同时测定三棱入血成分对羟基苯甲酸、香草酸、阿魏酸和芦丁含量的方法。**方法** 采用高效液相色谱法，Agilent Eclipse XDB-C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相 A 为 0.1%磷酸水溶液，B 为甲醇，进行梯度洗脱；流速 1.00 mL·min^{-1}；检测波长 254 nm；柱温为 30 ℃。**结果** 4 种成分分离度良好，且均在质量浓度 0.000 5~0.25 mg·mL^{-1} 内有良好的线性关系。各组含药血清样本的精密度 RSD<10%，方法回收率>90%；各组样品稳定性 RSD 均<10%。表明本实验精密度良好，回收率和稳定性均符合药动学要求。**结论** 该检测方法能够同时、快速、准确测定三棱 4 种有效成分在血清中的含量。

关键词： 三棱；入血成分；高效液相色谱法；含量测定

中图分类号： R917.101　　**文献标志码：** B　　**文章编号：** 1007-7693(2019)13-1665-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.13.013

引用本文： 李进，陈佳丽，马月光，等. HPLC 测定三棱入血成分含量[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(13): 1665-1668.

Determination of Components of Sparganii Rhizoma Absorbed into Blood by HPLC

LI Jin[1], CHEN Jiali[2], MA Yueguang[2*], XU Lianghui[2](*1.First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China; 2.Affiliated Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310006, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for simultaneous determination of phydroxybenzoic acid, vanillic acid, ferulic acid and rutin absorbed into blood of Sparganii Rhizoma. **METHODS** The analysis was carried out by HPLC, chromatographic column: Agilent Eclipse XDB-C_{18}(250 mm×4.6 mm, 5 μm); the mobile phase A was 0.1% phosphoric acid aqueous and solution B was methanol, and the gradient elution HPLC method was used; the flow rate was 1.00 mL·min^{-1}; the detection wavelength was 254 nm; the column temperature was 30 ℃. **RESULTS** The four components showed good separation and good linear relationship in the concentration range of 0.000 5–0.25 mg·mL^{-1}. The precision of serum sample in each group was good(RSD<10%), the recovery rate was >90%, and the stability of each group was good(RSD<10%), which satisfied the requirements of pharmacokinetics. **CONCLUSION** The method can determine the four active contents of Sparganii Rhizoma in serum simultaneously, accurately and rapidly.

KEYWORDS: Sparganii Rhizoma; components absorbed into blood; HPLC; content determination

三棱为黑三棱科植物黑三棱 *Sparganium stoloniferum Buch.*-Ham.的干燥块茎，主要分布于我国东北、黄河、长江中下游流域，野生资源较为丰富。三棱味辛、苦，性平，入肝、脾经，具有破血行气、消积止痛等功能，用于癥瘕痞块，瘀血经闭，食积胀痛[1]，主要含有黄酮和黄酮苷、苯丙素苷、甾体及其苷、有机酸等化合物[2]。阿魏酸具有抗血小板聚集、抗血栓等作用，这与三棱活血化瘀的传统功效相符，可能为破血活性成分；黄酮类成分具有较强的抗血小板聚集、抗血栓和镇痛作用[3-5]。本研究通过建立三棱药材入血成分对羟基苯甲酸、香草酸、阿魏酸和芦丁的含量测定方法，考察三棱药材血中移行成分。

1 材料

1.1 药材

三棱药材购自浙江中医药大学中药饮片厂，经浙江中医药大学药学院宋捷民教授鉴定为浙江产三棱，符合中国药典 2015 年版一部相关规定。

1.2 动物

SPF 级 SD 大鼠，10 只，♂，体质量 180~200 g，由浙江中医药大学实验动物中心提供，动物许可证号：SCXK(沪)2014-0001。饲养环境：温度 25~27 ℃，湿度 40%~60%，适度照明，食物充足，自由饮水。

基金项目： 浙江省中医药科技计划项目(2015ZA135)；杭州市卫生科技计划项目(2016A07)

作者简介： 李进，男，主治医师　Tel: (0571)87236358　E-mail: bella2000@126.com　*__通信作者：__ 马月光，女，硕士，主任中药师　Tel: (0571)56007197　E-mail: mayuegg@126.com

1.3 仪器及试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱仪器(美国 Agilent)；Agilent Eclipse XDB-C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；XS205DU 型精密天平(Mettler Toledo 公司)；2-16PK 型离心机(德国 Sigma 公司)；QL-861 型涡旋混合仪(海门市其林贝尔仪器制造)；SK5210HP 型超声波清洗仪(上海科导超声仪器有限公司)；ND100-1 型氮气吹扫仪(杭州瑞诚仪器有限公司)。

乙腈(色谱纯，批号：AS1122-801)、甲醇(色谱纯，批号：MS1922-801)购自 Tedia 公司；磷酸(成都科龙化工试剂厂，分析纯，批号：7664-38-2)；水为超纯水。对羟基苯甲酸对照品(批号：MKBK3576V；纯度≥99%)、香草酸对照品(批号：110776-20150；纯度：98%)、阿魏酸对照品(批号：110773-20161；纯度≥98%)、芦丁对照品(批号：Y23M7N11586；纯度≥98%)、内标物核黄素(批号：JS0925RA14；纯度≥99%)均购自中国食品药品检定研究院。

2 方法

2.1 三棱水煎液制备方法

传统煎煮法：三棱药材 100 g，加去离子水 800 mL 浸泡 0.5 h 后进行煎煮，煮沸 0.5 h，4 层滤布滤出药液，再次加水 500 mL 煮沸 0.5 h，滤过，2 次药液合并，浓缩至 50 mL，制成含生药 2 $g·mL^{-1}$ 的三棱水煎液原液，110 ℃高压灭菌 30 min，冰箱冷冻保存。

2.2 含药血清制备

取 180~200 g 的 SD 大鼠 10 只，饲养 1 周。按照生药浓度 2 $g·mL^{-1}$，剂量 0.2 $mL·kg^{-1}$，计算大鼠的常规给药剂量；每天灌胃 1 次，连续灌胃 7 d。末次给药前禁食 12 h，第 7 天末次给药后，于 1，2，4 h 分别从同一只大鼠眼眶静脉丛取血，收集大鼠血液至离心管中，3 000 $r·min^{-1}$ 离心 10 min，收集上层血清，56 ℃灭活 30 min，取出后无菌过滤，后放入–20 ℃冰箱保存，为含药血清。

2.3 对照品及内标的配制

精密称取对羟基苯甲酸对照品、香草酸对照品、阿魏酸对照品、芦丁对照品适量，用甲醇水溶液(1∶1)溶解，配制对照品浓度为 1 $mg·mL^{-1}$ 的混合对照品储备液，涡旋仪充分混匀，超声 30 min，0.22 μm 微孔滤膜过滤，4 ℃保存，检测前稀释成不同浓度。

精密称取内标物核黄素适量，用甲醇水溶液(1∶1)溶解，配制内标物浓度为 1 $mg·mL^{-1}$ 的储备液，涡旋仪充分混匀，超声 30 min，0.22 μm 微孔滤膜过滤，4 ℃保存。

2.4 样本处理

每管含药血清 200 μL 样本中加入 300 μL 甲醇和 100 μL 内标溶液，涡旋仪震荡 10 s，混匀后的溶液为乳白色悬浊液，4 ℃下离心(12 000 $r·min^{-1}$) 12 min，底部白色沉淀为蛋白质。用移液枪吸出全部上清，移至洁净离心管，氮吹，残渣用 100 μL 甲醇水溶液(1∶1)复溶，涡旋混匀，常温下 12 000 $r·min^{-1}$ 离心 10 min，取上清用于测定。

2.5 色谱条件

Agilent Eclipse XDB-C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相 A 为 0.1%磷酸水溶液，B 为甲醇，梯度洗脱：0~5 min，20%B，5~20 min，20%→48%B，20~40 min，48%→90%B，40~50 min，90%B，50~51 min，90%→20%B，51~60 min，20%B。流速：1.00 $mL·min^{-1}$；检测波长 254 nm；柱温为 30 ℃；进样量：10 μL。

2.6 方法学考察

2.6.1 线性回归方程和线性范围 取混合对照品溶液(各对照品浓度均为 0.25 $mg·mL^{-1}$)，用空白血清进行稀释，使药物质量浓度分别为 0.25，0.05，0.01，0.005，0.001，0.000 5 $mg·mL^{-1}$，取上述系列混合对照品血浆溶液，按“2.4”项下方法处理，按“2.5”项下色谱条件测定，记录色谱图和峰面积。分别以血浆中药物的质量浓度为横坐标(X)，以药物与内标的峰面积比值为纵坐标(Y)作图，得到 4 种成分的回归方程和相关系数。

2.6.2 日间精密度和日内精密度 取 100 μL 大鼠空白血清 18 份，精密加入不同质量浓度的对照品溶液，在线性范围内配成高(0.25 $mg·mL^{-1}$)、中(0.005 $mg·mL^{-1}$)、低(0.000 5 $mg·mL^{-1}$)3 种不同质量浓度的待测液各 6 份，按“2.4”项下方法处理，按“2.5”项下色谱条件测定。1 d 内 3 个剂量各测定 6 次，记录峰面积，计算日内精密度；1 周内连续 6 d 检测，记录峰面积，计算日间精密度。

2.6.3 方法回收率 按“2.6.2”项下方法配制高、中、低不同质量浓度的血清样本各 6 份，按“2.4”项下方法处理，按“2.5”项下色谱条件测定，计算对照品峰面积与内标物峰面积比值，根据标准

曲线求得测定质量浓度。将各成分的测定质量浓度和理论的加入浓度进行比较，计算方法回收率。

2.6.4 基质效应 按“2.6.2”项下方法配制高、中、低不同质量浓度的血清样本各 6 份，按“2.4”项下方法处理，按“2.5”项下色谱条件测定；同时配制相同浓度的以流动相为基质的对照品溶液直接进样分析，空白血清加对照品的测定值与对照品溶液测定值之比即为基质效应，考察血清基质干扰情况。

2.6.5 稳定性 按“2.6.2”项下方法配制高、中、低不同质量浓度的血清样本各 18 份。取 3 种质量浓度样品各 6 份，按“2.4”项下方法处理得到待测血清样本，每个质量浓度的血清样本处理完成后立即按“2.5”项下色谱条件测定；取 3 种质量浓度的样本各 6 份，将含药血清样本置于−20 ℃冷冻 24 h，再室温下溶解，反复冻融 3 次后按“2.4”项下方法处理，按“2.5”项下色谱条件测定；另将 3 种质量浓度的样本各 5 份于−80 ℃条件放置 1 周，待室温溶解后按“2.4”项下方法处理，按“2.5”项下色谱条件测定。计算 3 种条件下的标准偏差(RSD)，考察稳定性。

2.7 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析，所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，不同组间两两比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)中的 LSD 法(最小显著性法)，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 专属性试验

按“2.4”项下方法处理大鼠空白血清，按“2.5”项下色谱条件进行测定，结果见图 1，空白血清的内源性物质与对羟基苯甲酸、香草酸、阿魏酸和芦丁对照品及内标物的分离度良好，且没有干扰物质，内源性物质与各药品及代谢物之间不存在相互作用，说明方法的专属性良好。

3.2 线性回归方程和线性范围

血清中对羟基苯甲酸、香草酸、阿魏酸和芦丁的回归方程分别为 Y=56 971.00X+282.99(r^2=0.999 8)，Y=36 756.00X+247.66(r^2=0.999 7)，Y=50 686.00X+89.41(r^2=0.999 8)，Y=36 349.00X+20.99 (r^2=0.999 7)，各成分均在质量浓度 0.000 5~0.25 mg·mL^{-1} 内线性关系良好。按信噪比(S/N)为 3 来计算，对羟基苯甲酸、香草酸、阿魏酸、芦丁的最低检测限均为 0.000 1 mg·mL^{-1}。

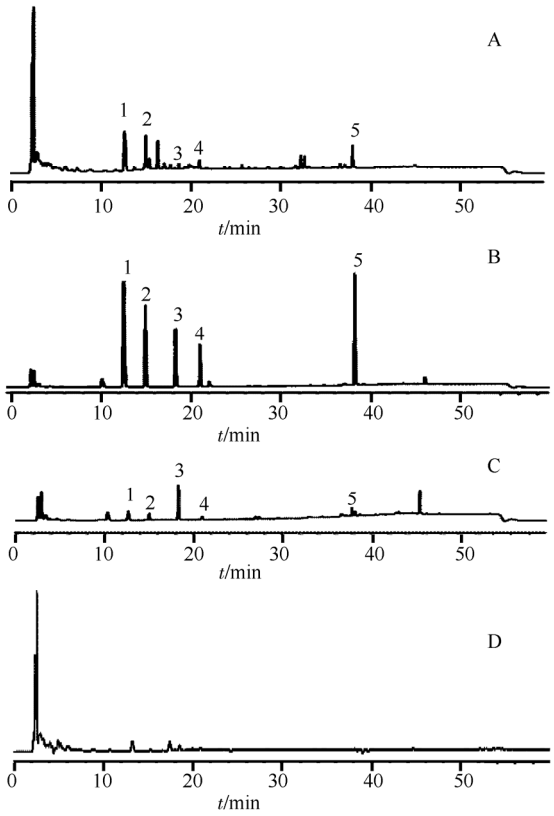

图 1 高效液相色谱图

A−提取液；B−空白血清+对照品+内标；C−血清样品；D−空白血清；1−芦丁；2−对羟基苯甲酸；3−阿魏酸；4−香草酸；5−内标物。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A−extraction solution; B−reference solution+blank serum+internal standard; C−serum sample; D−blank serum; 1−rutin; 2−phydroxybenzoic acid; 3−ferulic acid; 4−vanillic acid; 5−internal standard.

3.3 精密度、回收率、基质效应和稳定性

计算得到各组含药血清样本的精密度 RSD<10%，方法回收率>90%，基质效应考察结果为 89.45%~95.12%；各组样品稳定性均 RSD<10%，表明本实验精密度良好，回收率和稳定性均符合药动学要求。结果见表 1~2。

表 1 回收率、基质效应和精密度试验结果($\bar{x} \pm s$，n=6)

Tab. 1 Tests results of recovery, matrix effect and precision ($\bar{x} \pm s$, n=6)

分析物	质量浓度/mg·mL^{-1}	回收率/%	基质效应/%	精密度 RSD/%	
				日内	日间
对羟基苯甲酸	0.25	98.37±0.44	90.39	2.20	4.31
	0.005	101.40±3.34	94.53	3.82	6.21
	0.000 5	99.53±5.21	92.12	3.86	7.26
香草酸	0.25	96.65±3.42	89.56	1.98	5.23
	0.005	101.23±5.76	90.34	2.62	8.92
	0.000 5	99.81±2.53	93.42	3.41	7.26
阿魏酸	0.25	101.84±2.46	91.53	3.65	4.31
	0.005	103.66±4.54	95.12	2.85	2.89
	0.000 5	102.36±5.77	93.43	3.21	5.84
芦丁	0.25	99.98±2.84	90.67	1.00	2.70
	0.005	98.06±3.20	89.45	1.90	2.89
	0.000 5	101.39±9.91	89.53	1.89	4.15

表 2 对羟基苯甲酸稳、香草酸、阿魏酸、芦丁稳定性试验结果($\bar{x} \pm s$, n=6)

Tab. 2 Results of stability test of phydroxybenzoic acid, vanillic acid, ferulic acid and rutin($\bar{x} \pm s$, n=6)

稳定性	浓度/μg·mL^{-1}	对羟基苯甲酸		香草酸		阿魏酸		芦丁	
		测定值/μg·mL^{-1}	RSD/%	测定值/μg·mL^{-1}	RSD/%	测定值/μg·mL^{-1}	RSD/%	测定值/μg·mL^{-1}	RSD/%
室温稳定性	0.5	0.48±0.05	7.21	0.52±0.06	5.72	0.47±0.04	6.24	0.49±0.09	4.31
	5	4.96±2.52	5.06	5.32±3.60	3.71	4.86±2.32	4.06	4.73±1.82	6.06
	250	251.33±5.85	1.96	253.12±6.50	1.09	249.33±5.25	1.64	248.43±6.85	1.46
冻融稳定性	0.5	0.51±0.01	3.39	0.49±0.06	5.70	0.52±0.04	2.39	0.51±0.03	3.33
	5	5.13±2.08	4.05	37.00±3.05	2.84	5.23±2.34	7.03	5.24±2.12	7.05
	250	249.23±8.62	2.84	251.33±9.01	1.47	248.46±7.89	2.74	246.23±7.69	3.34
长期稳定性	0.5	0.51±0.04	7.06	0.52±0.06	5.41	0.49±0.08	6.36	0.48±0.08	8.36
	5	4.87±1.52	3.14	4.83±4.73	4.61	4.94±1.78	5.17	4.97±1.42	4.34
	250	252.66±3.21	1.08	248.67±7.09	1.15	251.46±3.91	2.68	250.96±3.41	2.51

3.4 大鼠血清中三棱有效成分的含量测定

利用所建立的方法，对灌胃给予中药三棱后所采取的 10 只大鼠血清样品进行含量测定，结果见表 3，说明该方法能够简单、准确测定大鼠血浆中三棱的 4 种有效成分的血药浓度。

表 3 大鼠血清中 4 种成分的含量($\bar{x} \pm s$，n=10)

Tab. 3 Contents of four components in rats serum($\bar{x} \pm s$, n=10) μg·mL^{-1}

有效成分	含量		
	1 h	2 h	4 h
对羟基苯甲酸	30.54±5.04	26.78±2.25	3.89±5.23
香草酸	5.78±8.23	4.01±6.42	3.78±8.23
阿魏酸	756.78±8.49	376.79±8.55	90.33±3.73
芦丁	16.72±3.49	8.78±5.43	8.34±7.83

4 讨论

本研究采用 HPLC 梯度洗脱同时准确、快速测定三棱药材入血成分对羟基苯甲酸、香草酸、阿魏酸和芦丁的含量，分离效果好。色谱条件优化发现，水相加入适量的磷酸可以改善峰形并能提高分离度，当酸度为 0.1%时待测成分均可分离，效果较好。本研究为进一步研究三棱药材活性成分与药效物质基础提供一定的实验参考。

REFERENCES

[1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 13.

[2] YUAN T, HUA H M, FEI Y H. Chemical constituents of *Sparganium stoloniferum* (Ⅰ) [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2005, 36(11): 1607-1610.

[3] 王新胜, 吴启南, 陈广云, 等. 三棱化学成分与质量评价的研究进展[J]. 中国药房, 2013, 24(15): 1417-1420.

[4] FENG Y R, ZHANG W T, LI E W, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Sparganium stoloniferum* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48(22): 4804-4818.

[5] MA Y G, LI Q L. Study on the process for fabrication of Spargaii Rhizoma of the gas replacement [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(9): 1066-1070.

收稿日期：2018-09-12

(本文责编：曹粤锋)