

制:(1)由于自身蛋白质结构决定的,如能提供活泼氢质子,使其易于受到活性氧自由基的攻击,从而与发光剂竞争活性氧自由基导致发光强度的降低;(2)蛋白质的抗氧化活性多与巯基量或类似于酶的活性有关,如保护蛋白(*protector protein*)是巯基特异性抗氧化剂,能清除双氧水及羟自由基^[16];而肌球蛋白,血红蛋白及血红蛋白-蛋白质复合物(如肝球蛋白)等具有类似于过氧化物酶的活性,可清除 H₂O₂ 或有机氢过氧化物^[17]。白果蛋白的氨基酸组成分析表明其含有 2.5% 左右的半胱氨酸,因此具有较多的巯基,从而表现出类似于保护蛋白的抗氧化机制。而其是否具有类似于酶的抗氧化活性则有待于进一步的证实。

因此,本试验结果表明化学发光法能用于测定白果蛋白对活性氧的清除作用及对 DNA 损伤的保护作用,但也具有一定的选择性。

References:

[1] Huang W, Xie B J. Studies on antibiooxidation of ginkgo protein [J]. *Acta Nutrimenta Sin*, 2002, 24(2): 192-194.
 [2] Huang W, Xie B J, Wang Y, et al. Study on separation and purification of protein from ginkgo seed and its antioxidant activity [J]. *Sci Agric Sin*, 2004, 37(10): 1537-1543.
 [3] Ling Z Q, Xie B J. Effects of procyanidins extract from the Lotus seedpod on reactive oxygen species and lipid peroxidation [J]. *Acta Nutrimenta Sin*, 2002, 24(2): 121-125.
 [4] Archer S L, Nelson D P, Weir E. Detection of activated O₂ species *in vitro* and in rat lungs by chemiluminescence [J]. *J Appl Physiol*, 1989, 67: 1912-1921.
 [5] Demiryurek A T, Wainwright C L, Wadsworth R M, et al. Characterization of a method for the detection of drugs with

free radical scavenging activity using porcine leukocytes [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1994, 32: 35-40.
 [6] Guo A G, Wang Z Y. Antioxidation of Pyrogallol-chemiluminescence assay for superoxide dismutase activity [J]. *Plant Physiol Commun*, 1989, 3: 54-57.
 [7] Hu T X. *Progress of Free Radical of Life Science* (生命科学的自由基研究进展) [M]. Vol 5. Beijing: Atomic Energy Publishing House, 1997.
 [8] Zhang E X. *Progress of Free Radical of Life Science* (生命科学的自由基研究进展) [M]. Vol 2. Beijing: Atomic Energy Publishing House, 1994.
 [9] Yldz G, Demiryurek A T. Ferrous Iron-induced Luminol chemiluminescence: a method for hydroxyl radical study [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1998, 39(3): 179-184.
 [10] Hu T X, Chen J W, Xu J Y, et al. Effects of polysacchride-peptide of *Coriolus* and polysaccharide of *Ganoderma* on scavenging active oxygen species [J]. *Acta Biochem Biophys Sin*, 1992, 24(5): 465-470.
 [11] Ma W J, Cao E H, Zhang J, et al. Phenanthroline-Cu complex-mediated chemiluminescence of DNA and its potential use in antioxidant evaluation [J]. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 1998, 44: 63-68.
 [12] Hu T X. Free radical, lipid peroxide and antioxidant determined by chemiluminescence methods [J]. *Preclinic Med Clin*, 1993, 13(2): 81-85.
 [13] Xu S H. A new chemiluminescence system for measure OH radical [J]. *J Instrum Anal*, 2000, 19(2): 11-13.
 [14] Zhang J, Cao E H, Qin J F. Study on mechanism of antioxidant protection against DNA damage [J]. *Acta Biophys Sin*, 1997, 13(1): 123-127.
 [15] Ma W J, Cao E H, Zhang J. Structure analysis and theory calculation of protecting effect of over ten antioxidants on damaged DNA [J]. *Acta Biophys Sin*, 1998, 14(1): 155-160.
 [16] Xie L T. Protector protein—a new antioxidative protein and its biologic activity [J]. *Acad J Guangzhou Med Coll* (广州医学院学报), 1999, 27(3): 80-83.
 [17] Ren G P, Yu B, Li S L. Antioxidative ability of protein and its ramification [J]. *Chin Lipids*, 1997, 22(4): 47-50.

灌胃养阴通脑颗粒大鼠血浆中川芎嗪的 HPLC 法测定

张国平¹, 郭莹², 张莉², 樊守艳², 韩进², 余勤², 潘远江¹, 万海同^{2*}

(1. 浙江大学医学院附属第二医院, 浙江 杭州 310009; 2. 浙江中医药大学心脑血管病研究所, 浙江 杭州 310053)

摘要:目的 建立 HPLC 测定大鼠灌胃养阴通脑颗粒有效部位组合后血浆中川芎嗪质量浓度的方法。方法 以乙腈提取处理血浆,以安眠酮为内标,甲醇-水(55:45)为流动相,ODS C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm,5 μm)为固定相,体积流量为 1.0 mL/min,以紫外检测器在 279 nm 波长下测定血浆中川芎嗪。结果 川芎嗪在 0.11~22 μg/mL 线性关系良好,平均回收率为 102.98%,RSD<10%,最低检测限为 0.21 ng,血浆中最低检测质量浓度为 0.042 μg/mL。结论 此法灵敏、可靠,可较好地用于口服养阴通脑颗粒有效部位组合后血浆中的川芎嗪的测定,为测定中药复方体内有效成分提供方法。

关键词:养阴通脑颗粒;川芎嗪;血药浓度;高效液相色谱

中图分类号:R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2007)05-0690-03

收稿日期:2006-07-03

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371789;30672652);浙江省自然科学基金项目(Z 204424)

作者简介:张国平(1967—),男,浙江嵊州人,主治医师,硕士,主要从事心脑血管病的中西医结合临床与实验研究。

Tel: (0571)87783511 E-mail: zhanguoping@zj.com

* 通讯作者 万海同 E-mail: wanhaitong@zjctm.net

Determination of tetramethylpyrazine in plasma of rats ig administered with Yangyin Tongnao Granula by HPLC

ZHANG Guo-ping¹, GUO Ying², ZHANG Li², FAN Shou-yan², HAN Jin²,
YU Qin², PAN Yuan-jiang¹, WAN Hai-tong²

(1. Second Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China; 2. Institute of Cardio-cerebral Vessel Disease, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for determining the tetramethylpyrazine in plasma of rats after ig administered by the main active fractions of Yangyin Tongnao Granula. **Methods** The plasma was extracted and treated by acetonitrile. Using methaqualone as internal standard, tetramethylpyrazine was detected by ODS C₁₈ chromatography column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) as stationary phase, mobile phase was methanol-water (55 : 45), with the flow rate at 1.0 mL/min, and the detective wavelength at 279 nm. **Results** There was a good linear relationship for tetramethylpyrazine in the range of 0.11—22 μg/mL, and the average recovery rate was 102.98%, RSD < 10%. Minimum detection limit was 0.21 ng and the minimum concentraton in plasma was 0.042 μg/mL. **Conclusion** The method is sensitive and reliable. It can be well applied to the quality control of Yangyin Tongnao Granula and provide a way for the determination of active components in Chinese materia medica preparation *in vitro*.

Key words: Yangyin Tongnao Granula; tetramethylpyrazine; blood concentration; HPLC

复方养阴通脑颗粒主要由川芎、葛根、生地等药味组成,主要用于缺血性脑血管病的治疗。其中川芎为其主要药物,川芎嗪为川芎的主要有效成分,可扩张小动脉,改善微循环和脑血流^[1]。本实验建立脑缺血大鼠灌胃养阴通脑颗粒有效部位组合(生物碱、黄酮等)后血浆中川芎嗪的 HPLC 测定方法,为进一步开展养阴通脑颗粒有效部位组合在脑缺血大鼠体内的药动学研究提供参考。

1 仪器与材料

日本岛津 LC—10AD 液相色谱仪;手动进样器、LC—10ADVP 泵、SPD—10AVP 检测器。Millipore 超纯水仪, Mettler Toledo AG135 电子天平, Hettich Universal 32 高速离心机。

盐酸川芎嗪对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110817-200305);甲醇为市售色谱纯,乙腈等均为市售分析纯,安眠酮由上海集成制药厂提供,水为超纯水。养阴通脑颗粒有效部位组合含生物碱 53%,其是川芎嗪占 76%,由浙江大学化学系提取。

老年清洁级 SD 大鼠,雄性,体重 320~360 g,由浙江省医学科学院动物中心提供。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的配制:精密称取川芎嗪对照品 57.2 mg,用甲醇-水(1 : 1)溶解,定容于 10 mL 量瓶中,得到质量浓度为 5.72 mg/mL 川芎嗪对照品溶液,精密移取 1 mL,定容至 10 mL 量瓶,得到质量浓度为 0.572 mg/mL 川芎嗪对照品溶液。

2.2 内标溶液的配制:精密称取安眠酮 120 mg,用甲醇-5%醋酸(1 : 1)溶解,定容于 100 mL 量瓶中,

即得质量浓度为 0.12 mg/mL 内标溶液。

2.3 脑缺血模型大鼠的制备:用改良的 Pulsinelli 四血管法造模。以 10%水合氯醛 0.4 mL/100 g ip 麻醉,大鼠仰卧位固定于手术台上,在第一颈椎水平做一正中切口,找到两侧翼小孔,直视下电凝,永久性闭塞双侧椎动脉。颈部皮肤侧切口,分离颈总动脉,用微动脉夹夹闭双侧颈总动脉 30 min,造成全脑缺血,即为模型组。假手术组为进行以上手术,暴露椎动脉而不进行电凝,暴露双侧颈总动脉而不夹闭。

2.4 脑缺血大鼠血浆样品的制备:将养阴通脑颗粒有效部位组合用水溶解,6 mg/100 g ip 给药,从颈动脉取血,以肝素抗凝,离心后吸取上清液获得血浆,同法以水灌胃得到空白血浆。

2.5 血浆样本预处理:用微量加样器吸取血浆 0.5 mL,置于 5 mL 离心试管中,以微量加样针准确加入内标液 20 μL,电动涡旋器充分混匀 15 s,准确加入 1.5 mL 乙腈,涡旋混匀 2 min,10 000 r/min 离心,取上清液待测。

2.6 色谱条件:流动相为甲醇-水(55 : 45),固定相为 Phenomenex Gemini ODS C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),体积流量为 1.0 mL/min,检测波长为 279 nm。

2.7 标准曲线的制作及最低检测限:取空白血浆 0.5 mL 于 5 mL 离心管中,分别定量加入川芎嗪对照品溶液使其含川芎嗪质量浓度分别为 0.11、0.22、0.55、1.10、2.75、5.50、11.00、22.00 μg/mL,在每管中分别加入内标液 20 μL,进行处理。将川芎

嗪和内标物的峰面积比值与其相对应的质量浓度值作线性回归,得到该色谱条件下的川芎嗪的线性回归方程为 $Y=3.8374 X-0.0454$, $r=0.99995$ 。结果表明川芎嗪在 $0.11\sim 22\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 呈良好的线性关系。以信噪比为 3 时测得的最低检测限为 $0.21\ \text{ng}$, 血浆中的最低检测质量浓度为 $0.042\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.8 专属性试验:在此色谱条件下,分别吸取空白血浆、空白血浆加对照品和供试品预处理后的上清液 $20\ \mu\text{L}$,注入色谱系统,测定。结果脑缺血大鼠血浆中川芎嗪和内标物分离完全,空白血浆无干扰,样品中无其他物质的干扰。见图 1。

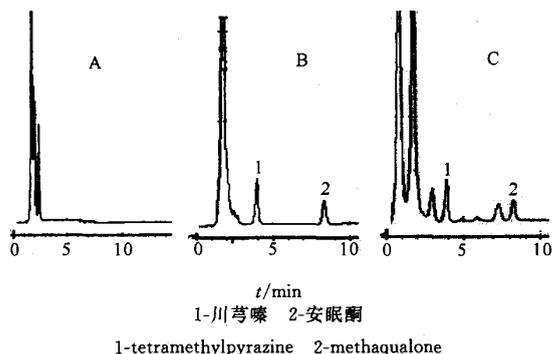


图 1 空白血浆(A)、空白血浆+对照品+内标(B)和含药血浆(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of blank plasma (A), blank plasma+reference substance+internal standard (B), and drug-containing plasma (C)

2.9 方法回收率和精密度的试验:取空白血浆作底物,选择 1 d 内不同时间和不同天检测同一已知样品,将其理论值与测定值相比得其回收率,并计算日内和日间精密度的,见表 1 和 2。结果川芎嗪的平均回收率为 102.98% , RSD 小于 10% ,各质量浓度回收率基本符合要求。

表 1 大鼠血浆中川芎嗪测定的回收率考察 ($n=5$)

Table 1 Recovery rate of tetramethylpyrazine in plasma of rats ($n=5$)

理论值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	测定值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率/%	RSD/%
0.11	0.1200 ± 0.0052	108.73	9.74
1.10	1.1800 ± 0.0644	108.60	9.88
22.0	20.1500 ± 0.4600	91.60	5.12

2.10 测定结果:取不同时间点给药大鼠血浆,处理,进样测定,结果见表 3。

3 讨论

中药复方口服给药后,其体内过程极其复杂,除

表 2 血浆中川芎嗪测定的精密度考察 ($n=5$)

Table 2 Precision of tetramethylpyrazine in plasma of rats ($n=5$)

理论值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	日内精密度/ %	理论值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	日间精密度/ %
0.11	8.28	0.11	8.38
1.10	7.73	1.10	7.39
22.0	4.51	22.0	4.03

表 3 川芎嗪血药浓度的测定结果 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 3 Determination of tetramethylpyrazine blood concentration ($\bar{x}\pm s, n=5$)

取血时间 /min	血药浓度 /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	取血时间 /min	血药浓度 /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
5	0.153 ± 0.0593	60	0.121 ± 0.0781
10	0.219 ± 0.142	90	0.139 ± 0.0504
15	0.258 ± 0.154	120	0.149 ± 0.0775
30	0.391 ± 0.183	240	0.147 ± 0.0691
45	0.155 ± 0.0897	360	0.128 ± 0.0586

肝肠效应外,药物间的相互作用也不可忽视,血药浓度经常出现双峰或多峰现象。

采用内标法测定脑缺血大鼠血浆中的川芎嗪,可以相对减少误差,提高实验的准确度。在内标物的选择上,根据文献分别对尼群地平^[2]和安眠酮^[3]进行了试验。结果表明,在本实验条件下,尼群地平的保留时间较大,且对酸不敏感,流动相的选择不太理想;安眠酮在甲醇中微溶,但可溶解于甲醇-5%醋酸(1:1)中,对酸敏感,在色谱条件的选择上可以加以考虑。

游离川芎嗪易升华,在样品的处理过程中,应尽量减少加热、蒸发等高温操作,或在萃取液中加入盐酸,使川芎嗪成盐,避免川芎嗪蒸发损失^[3]。

本实验主要以治疗缺血性中风的养阴通脑颗粒为对象,对其主要有效部位优化组合,建立大鼠灌胃后血浆中川芎嗪浓度的 HPLC 测定方法,为进一步开展其主要有效部位组合在动物体内的药动学研究提供参考。

References:

[1] Liang C C, Hong C Y, Chen C F, et al. Measurement and pharmacokinetic study of tetramethylpyrazine in rat blood and its brain tissue by high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 1999, 724: 303.
 [2] Zhang J C, Dong W L. Determination of ligustrazine phosphate by HPLC in serum [J]. *J Tianjin Med Univ* (天津医科大学学报), 2000, 6(1): 34-36.
 [3] Cai W, Dong S N, Lou Y Q. Study on pharmacokinetics of ligustrazine in normal people orally administered [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1989, 24(12): 881-886.