

RP-HPLC 法测定兔血浆中盐酸川芎嗪和阿魏酸

韩 锋¹, 程艳静², 邓晋丽³, 马 莉^{1*}, 肖苏萍⁴, 赵润怀⁴

1. 天津药物研究院, 天津 300193
2. 天津大学 化工学院, 天津 300072
3. 天津大学 理学院, 天津 300072
4. 中国药材公司, 北京 102600

摘 要: 目的 建立 RP-HPLC 法测定兔血浆中盐酸川芎嗪和阿魏酸的方法。方法 采用 RP-HPLC 法, 使用 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.5%冰乙酸 (35:65), 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长 280 nm, 柱温 30 °C, 香豆素作内标, 采用甲醇沉淀蛋白法处理血浆样品。结果 盐酸川芎嗪线性范围为 0.072~13.888 μg/mL ($r=0.999\ 8$), 最低检测浓度 12 ng/mL, 日内、日间精密度试验的 RSD 值均小于 2%; 阿魏酸线性范围为 0.06~15.36 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 最低检测浓度 10 ng/mL, 日内、日间精密度试验的 RSD 值均小于 3%。结论 该分析方法简便、灵敏, 可用于同时测定兔血浆中盐酸川芎嗪和阿魏酸。

关键词: 川芎嗪; 阿魏酸; 血浆; 兔; 香豆素; 高效液相色谱

中图分类号: R285.6 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2014)04-0359-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2014.04.007

Determination of tetramethylpyrazine hydrochloride and ferulic acid in rabbit plasma by RP-HPLC

HAN Feng¹, CHENG Yan-jing², DENG Jin-li³, MA Li¹, XIAO Su-ping⁴, ZHAO Run-huai⁴

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China
2. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China
3. School of Science, Tianjin University, Tianjin 300072, China
4. China National Corp. of Traditional Herbal Medicine, Beijing 102600, China

Abstract: Objective To establish a RP-HPLC method for simultaneous determination of tetramethylpyrazine hydrochloride (TMPH) and ferulic acid in plasma of rabbits. **Methods** Separation was carried out on a Diamonsil C₁₈ reverse phase column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) at a flow rate of 1.0 mL/min. Chromatography was performed at 30 °C. TMPH and ferulic acid were monitored at a wavelength of 280 nm with coumarin as internal standard, and injection volume was 20 μL. Methanol - 0.5% acetic acid solution (35:65) was used as mobile phase. **Results** The calibration curves for TMPH in plasma were linear in the range of 0.072 — 13.888 μg/mL ($r=0.999\ 8$), and the detection limit of TMPH in plasma was 12 ng/mL. RSD values of the intra-day and inter-day precision tests were within 2%. The calibration curves for ferulic acid in plasma were linear in the range of 0.06 — 15.36 μg/mL ($r=0.999\ 9$), and the detection limit of ferulic acid in plasma was 10 ng/mL. RSD values of the intra-day and inter-day precision tests were within 3%. **Conclusion** The method is rapid and sensitive and could be used for simultaneous determination of TMPH and ferulic acid in plasma of rabbits.

Key words: tetramethylpyrazine hydrochloride; ferulic acid; plasma; rabbit; coumarin; HPLC

川芎嗪、阿魏酸是川芎中的主要活性成分^[1]。性生物碱, 具有抗脂质过氧化、扩血管、抑制血小板聚集、改善微循环、促进造血功能等作用^[2], 临

收稿日期: 2013-09-03

基金项目: 国家重大新药创制科技重大专项 (2011ZX09102-003-05)

*通信作者 马 莉, 女, 从事中药新药研究。Tel: (022)23006851 E-mail: zhihua504@163.com

床上广泛用于治疗缺血性脑血管病^[3]。阿魏酸具有抑制血小板聚集、抗血栓形成、抗动脉粥样硬化、抗炎、抗肿瘤等作用, 目前已成为临床使用的活血祛瘀主要药物之一^[4]。本实验建立了一种同时测定兔血浆中盐酸川芎嗪和阿魏酸的测定方法, 为盐酸川芎嗪、阿魏酸的药动力学研究提供参考。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪, XW—80A 型漩涡混合器 (上海琪特分析仪器有限公司), 1.5 mL 刻度离心管、电动离心机沉淀器 (北京京立离心机有限公司), 200 μ L 移液 (DragonLab 公司), AB204—N 分析天平 (Mettler Toledo 科技有限公司), Model C3860A 超声仪 (CBL Photoelectron Technology 公司)。

甲醇 (天津市科康德科技有限公司, 色谱纯), 乙酸 (天津市凯信化学工业有限公司, 分析纯), 盐酸川芎嗪 (批号 0817-9803)、阿魏酸 (批号 0773-9910) 对照品均由中国食品药品检定研究院提供, 香豆素 (天津市化学试剂三厂, 质量分数为 98%)。

新西兰家兔, 体质量 (2.5 ± 0.5) kg, 普通级, 天津市津南区春乐实验动物养殖厂提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇—0.5%冰乙酸 (35:65), 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长 280 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C。以信噪比小于等于 3 计算, 血浆中盐酸川芎嗪的最低检测浓度为 12 ng/mL, 阿魏酸最低检测浓度为 10 ng/mL。

2.2 对照品溶液的制备

取盐酸川芎嗪对照品 14.90 mg, 阿魏酸对照品

13.20 mg, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 制成 0.596 mg/mL 盐酸川芎嗪、0.528 mg/mL 阿魏酸对照品储备液。同法配制 0.36 mg/mL 香豆素母液。再将储备液用甲醇稀释成 8 个不同的质量浓度, 香豆素母液稀释至 14.4 μ g/mL。

2.3 标准曲线的建立

精密吸取家兔空白血浆 8 份, 各 200 μ L, 分别加入 100 μ L 不同质量浓度的盐酸川芎嗪、阿魏酸对照品溶液、14.4 μ g/mL 内标溶液 50 μ L 和 100 μ L 甲醇溶液, 制成含盐酸川芎嗪 0.072、0.217、0.434、0.868、1.736、3.472、6.944、13.888 μ g/mL, 阿魏酸 0.06、0.24、0.48、0.96、1.92、3.84、7.68、15.36 μ g/mL 的系列质量浓度溶液。涡旋 2 min, 10 000 r/min 离心 15 min, 取清液过 0.45 μ m 微孔滤膜, 进样 20 μ L, 分别以目标成分和内标峰面积之比与质量浓度进行回归, 绘制标准曲线, 得回归方程。盐酸川芎嗪: $Y=0.1679X+0.0065$, $r=0.9998$, 表明盐酸川芎嗪在 0.072~13.888 μ g/mL 线性关系良好。阿魏酸: $Y=0.0694X+0.0161$, $r=0.9999$, 表明阿魏酸在 0.06~15.36 μ g/mL 线性关系良好。

2.4 专属性考察

取空白血浆, 空白血浆加盐酸川芎嗪及内标, 空白血浆加盐酸川芎嗪、内标及阿魏酸和给药后 5 min 血浆样品在以上色谱条件下测定, 色谱图见图 1。盐酸川芎嗪、阿魏酸和内标的保留时间分别为 15.8、19.5、22.7 min, 分离良好, 无明显干扰峰。

2.5 方法回收率试验

精密吸取家兔空白血浆 15 份, 各 200 μ L, 加入含有不同质量浓度的盐酸川芎嗪和阿魏酸对照品溶液 100 μ L, 内标 50 μ L, 甲醇 100 μ L, 配制成分

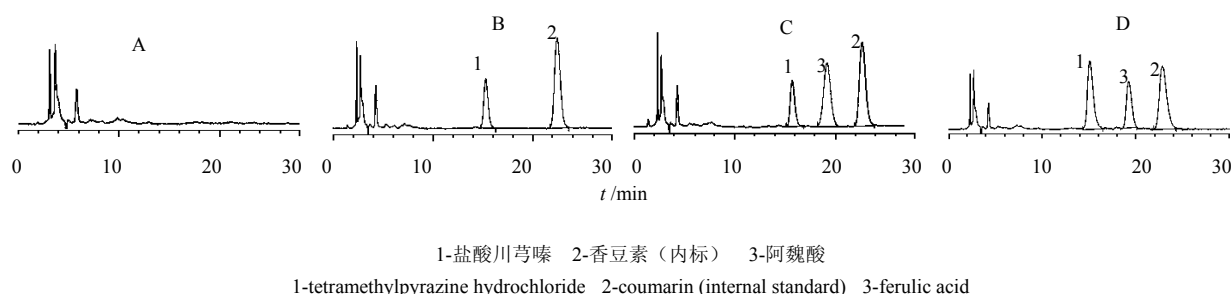


图 1 空白血浆 (A), 空白血浆加盐酸川芎嗪及内标 (B), 空白血浆加盐酸川芎嗪、内标及阿魏酸 (C) 和给药后 5 min 血浆样品 (D) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of blank plasma (A), plasma spiked with tetramethylpyrazine hydrochlorid and internal standards (B), plasma spiked with tetramethylpyrazine hydrochlorid, internal standards, and ferulic acid (C), and rabbit plasma sample at 5 min after administration (D)

盐酸川芎嗪 1.736、3.472、6.944 $\mu\text{g/mL}$ ，含阿魏酸 1.920、3.840、7.680 $\mu\text{g/mL}$ 的血浆样品各 5 份，按 2.3 项下方法进行处理，进样测定，记录峰面积比，带入回归方程计算质量浓度。以含低、中、高质量浓度的盐酸川芎嗪和阿魏酸血浆样品的测定质量浓度与配制质量浓度之比计算方法回收率，结果见表

1。可知盐酸川芎嗪 3 种质量浓度的平均回收率在 99.49%~102.14%，RSD 值分别为 2.19%、1.75%、1.86%。阿魏酸 3 种质量浓度的平均回收率在 98.54%~101.12%，RSD 值分别为 2.47%、2.03%、1.98%。RSD 值较小，均符合生物样品分析方法要求。

表 1 方法回收率试验结果 ($n=5$)
Table 1 Results of accuracy test ($n=5$)

成分	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	测定质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	回收率/%	RSD/%
盐酸川芎嗪	1.736	1.773 ± 0.059	102.14 ± 3.42	2.19
	3.472	3.477 ± 0.021	100.16 ± 0.61	1.75
	6.944	6.908 ± 0.014	99.49 ± 0.20	1.86
阿魏酸	1.920	1.941 ± 0.058	101.12 ± 3.02	2.47
	3.840	3.810 ± 0.032	99.22 ± 0.83	2.03
	7.680	7.568 ± 0.021	98.54 ± 0.27	1.98

2.6 精密度试验

精密吸取家兔空白血浆 15 份，各 200 μL ，加入含有不同质量浓度的盐酸川芎嗪和阿魏酸对照品溶液 100 μL ，内标 50 μL ，甲醇 100 μL ，配制成含盐酸川芎嗪 1.736、3.472、6.944 $\mu\text{g/mL}$ ，含阿魏酸 1.920、3.840、7.680 $\mu\text{g/mL}$ 的血浆样品各 5 份，按

2.3 项下方法进行处理，于 1 d 内连续测定 5 次，5 d 内分别测定 5 次，结果见表 2。可见低、中、高质量浓度的盐酸川芎嗪血浆样品日内 RSD 值、日间 RSD 值小于 2%，阿魏酸血浆样品的日内 RSD 值小于 3%、日间 RSD 值小于 2%，均符合生物样品分析方法要求。

表 2 精密度试验结果 ($n=5$)
Table 2 Results of precision test ($n=5$)

成分	质量浓度 $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	日内精密度		日间精密度	
		测定质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	RSD/%	测定质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	RSD/%
盐酸川芎嗪	1.736	1.765 ± 0.059	1.89	1.748 ± 0.059	1.27
	3.472	3.469 ± 0.021	0.72	3.483 ± 0.021	1.58
	6.944	6.802 ± 0.014	1.45	6.986 ± 0.014	0.96
阿魏酸	1.920	1.939 ± 0.058	2.01	1.975 ± 0.058	1.94
	3.840	3.862 ± 0.032	1.53	3.843 ± 0.032	1.33
	7.680	7.678 ± 0.021	0.98	7.641 ± 0.021	1.05

2.7 提取回收率试验

精密吸取家兔空白血浆 15 份，各 200 μL ，加入含有不同质量浓度的盐酸川芎嗪和阿魏酸对照品溶液 100 μL ，内标 50 μL ，甲醇 100 μL ，配制成含盐酸川芎嗪 1.736、3.472、6.944 $\mu\text{g/mL}$ ，含阿魏酸 1.92、3.84、7.68 $\mu\text{g/mL}$ 的血浆样品各 5 份，按 2.3 项下方法进行处理，进样测定，记录峰面积比。以所测得的峰面积与甲醇直接溶解后进样的所得盐酸

川芎嗪和阿魏酸峰面积比较，计算提取回收率，见表 3。

可见含 3 种质量浓度盐酸川芎嗪血浆样品的提取回收率分别为 $(89.85\pm 1.49)\%$ 、 $(91.69\pm 0.98)\%$ 、 $(92.91\pm 0.65)\%$ ，RSD 值均小于 2%。含阿魏酸血浆样品提取回收率分别为 $(90.67\pm 3.73)\%$ ， $(94.57\pm 1.60)\%$ ， $(92.87\pm 1.09)\%$ ，RSD 值均小于 2%，均符合生物样品分析方法要求。

表 3 提取回收率试验结果 ($n=5$)Table 3 Results of extraction recovery test ($n=5$)

成分	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	回收率/%	RSD/%
盐酸川芎嗪	1.736	89.85 ± 1.49	1.37
	3.472	91.69 ± 0.98	0.96
	6.944	92.91 ± 0.65	0.61
阿魏酸	1.92	90.67 ± 3.73	1.83
	3.84	94.57 ± 1.60	0.94
	7.68	92.87 ± 1.09	1.10

2.8 药时曲线的绘制

取家兔 6 只, 雌雄各半, 禁食不进水 12 h。按 20 mg/kg 盐酸川芎嗪+10 mg/kg 阿魏酸鼻腔给药, 分别于给药后 1、5、10、15、30、45、60、90、120 min 耳缘静脉取血 0.5 mL, 置于含有肝素钠的离心管中, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上层血浆, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 待用。精密吸取兔血浆 200 μL , 加入 50 μL 内标, 200 μL 甲醇, 涡旋混匀 2 min, 10 000 r/min 离心 15 min, 取清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 取 20 μL 进样。以盐酸川芎嗪、阿魏酸峰面积与内标峰面积比, 分别代入回归方程计算血药浓度。以血药浓度为纵坐标, 时间为横坐标, 利用软件 Origin 8.5 绘制药时曲线, 见图 2。

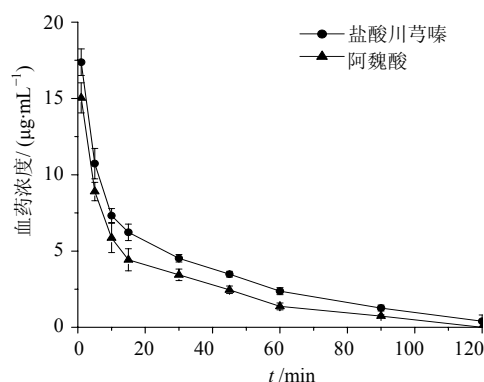


图 2 盐酸川芎嗪和阿魏酸的血浆药-时曲线图

Fig. 2 Plasma concentration - time curves of tetramethylpyrazine hydrochloride and ferulic acid

3 讨论

曾采用二氯甲烷、醋酸乙酯、乙腈提取盐酸川芎嗪和阿魏酸, 结果发现提取液中杂质较多, 干扰主药的测定。提取液在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴下氮气挥干, 发现盐酸川芎嗪提取率低, 小于 50%, 可能由于盐酸

川芎嗪在加热的条件下性质不稳定引起, 且内标在加热条件下易分解, 所以不考虑用水浴条件下氮气吹干方法。实验采用甲醇沉淀蛋白法处理血浆样品, 操作简单、易行, 提取效率高。

文献显示, 盐酸川芎嗪在人和动物体内易氧化, 氧化代谢产物的极性大于母体药物, 所以在 HPLC 色谱图上, 代谢产物峰的保留时间小于母体峰^[5-6], 而兔给药实验中也发现, 该色谱条件下, 盐酸川芎嗪代谢产物峰在母体峰之前, 与母体药物可达到基线分离。阿魏酸属于弱酸, 易解离, 加入冰乙酸可抑制阿魏酸的解离, 避免了拖尾峰的出现^[7]。兔给药实验中阿魏酸未出现拖尾现象。

本文所建立的高效液相色谱法同时测定兔血浆内的盐酸川芎嗪和阿魏酸浓度, 方法简便, 且灵敏度高, 血浆中盐酸川芎嗪的最低检测浓度为 12 ng/mL, 阿魏酸最低检测浓度为 10 ng/mL, 采用内标法, 定量准确, 无内源物质干扰主药盐酸川芎嗪、阿魏酸的测定, 且提取率高。该方法既可以用于兔血浆中盐酸川芎嗪的单独检测, 又能用于盐酸川芎嗪和阿魏酸的同时测定, 为临床盐酸川芎嗪和阿魏酸血药浓度的测定提供了好的分析方法。

盐酸川芎嗪、阿魏酸的最高血药浓度分别为 17.370、15.037 $\mu\text{g/mL}$, 达峰时间均为 1 min, 说明鼻腔给药能够实现药物的快速吸收。由此可见, 鼻腔给药是一种速效途径, 适用于心脏病、脑血栓等急性疾病的应急处理。

参考文献

- [1] 吕洁, 孟祥军, 郭妍. 高效液相色谱法测定阿魏酸川芎嗪口崩片的含量 [J]. 中国药业, 2008, 17(20): 24-25.
- [2] 杨家荣, 张密霞, 常亮堂, 等. 川芎嗪、阿魏酸及其配伍对心肌缺血再灌注模型大鼠的保护作用及对黏附分子的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(7): 1054-1056.
- [3] 王丽, 吕圭源, 陈素红, 等. 川芎嗪药理作用的研究进展 [J]. 医学信息: 下旬刊, 2011, 24(3): 1116-1118.
- [4] 胡益勇, 徐晓玉. 阿魏酸的化学和药理研究进展 [J]. 中成药, 2006, 28(2): 253-255.
- [5] 叶云鹏, 王世真, 江骥. 人体尿中川芎嗪代谢产物的研究 [J]. 中国医学科学院学报, 1996, 18(4): 288-291.
- [6] 陈欣, 董善年. 川芎嗪在兔体内代谢产物的研究 [J]. 药学报, 1996, 31(8): 617-621.
- [7] 高学敏. 中药学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 1052-1053.