

# HPLC 直接测定血清阿魏酸——方剂血样 预处理新方法(I)<sup>△</sup>

第四军医大学西京医院(西安 710032) 黄 熙\* 任 平 张 莉 吴少华 陈建宗

**摘 要** 建立了沸水浴去血清蛋白质后用 HPLC 直接测定阿魏酸(FA)方法:方剂的血样预处理新方法分别用二维、三维 HPLC 和分光光度计定性测定 FA 后,用内标(香豆精)法定量。甲醇-乙酸-水(38:0.3:61.7)为流动相,C<sub>18</sub>(ODS<sub>2</sub>)柱(150 mm×4.6 mm,5 μm)为固定相时,FA 的最低检测限 6 ng;沸水浴 10 min 的最低检测血清浓度是 20.2 ng/mL,线性范围 33.7~2 156.8 ng/mL, $r=0.9993$ ;方法平均回收率(93.59±1.93)% ,日间及日内精密度 RSD 值均为 8.44%。上法已用于人服川芎汤后经时变化的血清 FA 浓度测定。

**关键词** 阿魏酸 血药浓度 样品预处理 水浴法 HPLC

虽然“复方效应成分药动学(PK)”<sup>[1~4]</sup>认为复方进入体内成分能定性定量;国内外文献<sup>[5~9]</sup>也提供了佐证,但没有现存的特别适应方剂效应成分 PK 研究的新方法。其关键之一是样品预处理。笔者用乙腈<sup>[10]</sup>等萃取服用川芎后血清中的阿魏酸(FA)失败后,改用水浴法,经 HPLC 测定初获成功。

## 1 仪器、试药与受试对象

1.1 仪器:Waters 990 高效液相色谱,配 Waters 991 光电二极管阵列检测器(3 D-HPLC),用于复方体内成分峰纯度鉴定。贝克曼 640 分光光度计,用于化学成分的紫外扫描。贝克曼 HPLC 仪,165 可变波长双通道紫外-可见检测器,用于 FA 定量。

1.2 试药、试剂和药材:FA 对照品(批号:773-9203):中国药品生物制品检定所提供。香豆精对照品(批号 8806615):含量 99%,mp68.9℃~70.0℃,购于中国医药公司北京采购供应站。醋酸、甲醇、乙腈均为 AR 级。川

芎购自四川都江堰市医药公司,由西北大学植物解剖学研究室胡正海教授鉴定为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎。健康人空白混合血清:本院血库提供。

1.3 标准溶液制备:精称 FA 3.37 mg 于 50 mL 棕色容量瓶中,用流动相稀释至刻度为母液 1(67.4 μg/mL)。母液 1 稀释 20 倍后为母液 2(3.37 μg/mL)。精称香豆精 5.03 mg 于 100 mL 棕色容量瓶中,加 0.3 mL 无水甲醇助溶后用双蒸水稀释至刻度(50.3 μg/mL)为母液 3。上述配制好的标准溶液密封后置 4℃ 冰箱待用。

1.4 受试对象:健康自愿者 4 男 2 女,年龄 17 至 38 岁,平均年龄(28.7±7.1)岁,体重 50 至 72.5 kg,平均体重(58.3±10.5) kg。血压、心率、脉搏均正常,无心、肝、肾和胃肠道等疾患。服药前空腹 14 h 并未饮含酒精类饮料,未吸烟,受试期间正常饮水。

## 2 实验方法

\* Address: Huang Xi, Xijing Hospital of Fourth Military Medical Sciences, Xi'an

黄 熙 男,39 岁,中医学学士;中药临床药理硕士;心血管生理博士;中西医结合博士后;专业:中药临床药理,中西医结合基础与临床。现任第四军医大学附属一院中药临床药理研究室主任;副教授;硕士导师;中国中西医结合学会实验医学专业委员会副主任委员(筹),中国药学会药物分析委员会委员,陕西中药药理学会理事。研究方向:中药复方药效物质及其药动学。1991 年提出“证治药动学”,博士后基金资助。在国内外发表相关论文 30 余篇,1998 年被评为解放军后勤科技新星。西苑医院博士后流动站 1996 年 3 月至 1997 年 12 月期间在站博士后。

<sup>△</sup>国家自然科学基金资助项目 No.:39100139;39570870;39670865;39870932,博士后基金(96)4

2.1 实验设计:首先统一煎煮川芎汤液的标准并制备好足够的汤液。选择一例受试对象按 1 g/kg 剂量服用,30 min 内取血清,先用文献<sup>[10]</sup>方法用乙腈进行预处理,用 HPLC 仪进行测定并与化学对照品对照,初步定性成功但重复性差后改用水浴法进行样品预处理。选择受试对象再次以 1 g/kg 服用川芎汤,服药前及后 5 至 240 min 内多时间点各取血清 1 mL,其中 30 min 组取 5 mL 血清以作为进一步定性用。上述目的旨在确定服药后的合适取血时间、取血量和确定标准曲线范围并测定。用 3 D-HPLC 和紫外扫描仪进一步定性汤液(体外)与服用汤液后血清样品中的所测组分。根据上述预实验的明确结论确定最优色谱条件、样品预处理方法及标准曲线测定方法。

2.2 口服汤剂的制备:取干燥不规则球状川芎 2 000 g,常水冲洗 2 次,放入夹层不锈钢锅内加 12 000 mL 的 90℃~100℃水在煮沸 20 min 后滤干,用不锈钢刀将变软的川芎切成 1 cm×1 cm 左右的方块,放入原水中文火煮沸 30 min,用上法过滤;第二次用沸水没过药渣,文火煮沸 30 min,过滤后 2 次药液合并,最后浓缩成 0.5 g/mL。赤芍汤的制备方法同上,最终浓度为 0.5 g/mL,置 4℃冰箱备用。

2.3 紫外波长测定:分 2 种,一种用分光光度计进行,另一种用 3 D-HPLC 的二极管阵列检测器进行。FA、内标香豆精对照品、汤液及预处理后的血清样品中的靶成分均进行紫外扫描以定性。

2.4 色谱条件: C<sub>18</sub> (HYPERASIL 填料, ODS<sub>2</sub>) 色谱柱 150 mm×4.6 mm, 5 μm (大连依利特科学仪器有限公司) 为固定相,流动相参考文献用 甲醇-乙酸-水 (38 : 0.3 : 61.7, ) , 该流动相用于 2 D-HPLC; 3 D-HPLC 的流动相用 甲醇-磷酸缓冲液 (0.01 mol/L, pH 3.0) , 流速 1.0 mL/min, 贝克曼和 Waters 仪器自带脱气装置, 3 D-HPLC 流速 0.7 mL/min。因 FA 和阿魏酸钠的对照紫外谱图有一较高的 280 nm 左右的肩峰,且

川芎中含有川芎嗪的紫外吸收波长为 280 nm, 所以贝克曼 HPLC 设 320 和 280 nm 两个波长。3D-HPLC 和紫外波长为 200 至 400 nm, 纸速: 每屏幕 60 和 10 min 两种。

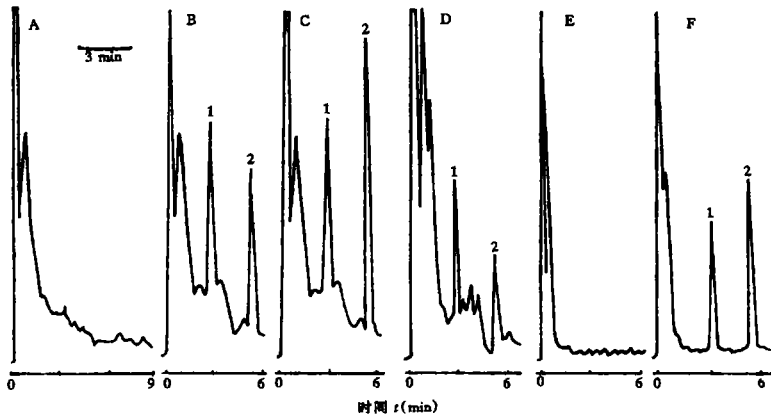
2.5 样品预处理方法: 先用文献<sup>[10]</sup>方法: 精密量取空白血清 1 mL 于 5 mL 玻璃具塞锥形离心试管中, 分别加一定浓度内标、不同浓度 FA 后, 涡旋振荡 15 s 混匀, 然后加 2.4 mL 乙腈后再次涡旋振荡 15 s 混匀, 3 000 r/min 离心 10 min, 将有机层移至另一 5 mL 具塞锥形离心试管中, 在 60℃水浴和氮气下吹干后用 100 μL 甲醇重溶, 20 μL 进样测定。因色谱结果不佳(图 1)改用水浴法: 10 mL 具塞锥形离心试管内分别加入 30 μL 水、50 μL 内标母液 3 (针尖插入水中)、不同浓度的 FA 液和水(使每管容积相同)、1 mL 空白血清, 然后涡旋混匀 15 s, 100℃水浴 10 min, 用超微型搅拌器搅拌 1 min 制成匀浆, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液直接进行 HPLC 测定或置于 1 mL 锥形塑料试管中存 -18℃冰箱待测。

2.6 定性与定量计算及方法比较标准: 比较对照品、样品所测组分的 2 D-HPLC 的保留时间、3 D-HPLC 的峰纯度和紫外扫描波长是否一致给予定性。以 FA 浓度为自变量, 峰面积或峰高与内标的比值为因变量进行回归, 求出标准曲线的回归方程, 计算 FA 的浓度。以色谱图的组分峰分离情况、峰面积的稳定性与重复性作为乙腈法和水溶法的比较标准, 并比较样品预处理方法。

### 3 实验结果

3.1 样品预处理方法的比较: 图 1 中峰 1 和 2 为 FA 和内标(下同), 乙腈不能使 FA 峰与血清内源性物质完全分开(图 1B 和 C), 由于除蛋白差致使保留时间到 5 min 才使谱图接近基线(图 1A~D), 而且因内标忽高忽低使定量结果的重复性太差(图 1B~D)。而水浴法的沉淀蛋白效果、FA 峰与其他峰的分离均良好(图 1E~F), 内标峰稳定而重复性好。

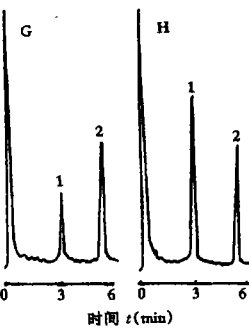
3.2 定性分析: 用 2 D-HPLC 定性, 结果见



1-FA 2-内标 A和E-空白血清 B、C和F-空白血清加FA和内标 D-人服川芎汤后的血清样品

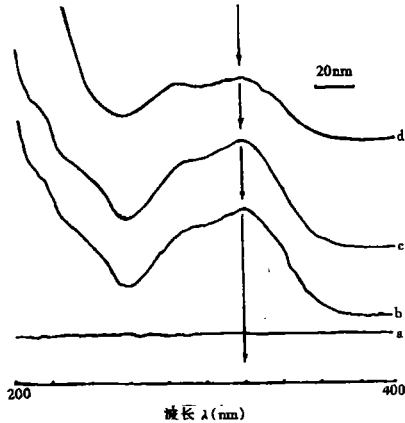
图1 人血清样品乙腈(A~D)和沸水浴(E~F)处理后的色谱图的比较。

图2,人服川芎复方汤后血清样品经水浴后直接测定的1号峰与FA对照品保留时间一致,加FA对照品后1号峰明显增高,可初步定性(图2G和H)。图3中的b和c说明沸水浴对FA的最大UV吸收无影响。实验表明FA加入血清的UV的最大吸收亦为320 nm,约280 nm



1-FA 2-内标 加(H)和不加(G)FA对照品

图2 人服川芎汤后血清样品经沸水浴后的色谱图



a-流动相 b-流动相中的FA c-b 样经水浴 d-血清中FA

图3 FA的紫外扫描图

处的肩峰略高是由于血清所致(未列图,我们实验证实)。图4为3 D-HPLC 色谱结果:图中A为空白血清,B中箭头所指处的峰(320 nm)及其水平轴随后峰(220 nm)与FA对照品的一致。箭头所指峰与3 D-HPLC 所测出的UV(未列出)与FA对照品的UV也一致。所以可将1号峰鉴定为FA。

3.3 标准曲线:按样品预处理项下的水浴法操作,FA 浓度线性范围是 33.7~2156.8 ng/mL。每个浓度组 n=6,进样量 33.7 ng/mL 组为 200 μL,余为 50 μL。得标准曲线:

$$Y=0.0022X+0.0713, r=0.9993$$

3.4 回收率及精密性试验:3种浓度按样品预处理项和标准曲线项下处理和测定,血清FA的方法回收率见表1。日内精密性为1 d 内测定结果的统计分析;日间精密性为30 d

内日间测定结果的统计分析,见表2。

3.5 检测限:FA的最低检出限为6 ng。按样品预处理项下操作测定,水浴10 min 时的最低检测浓度为20.2 ng/mL。

表1 FA在血清测定的方法回收率(n=5)

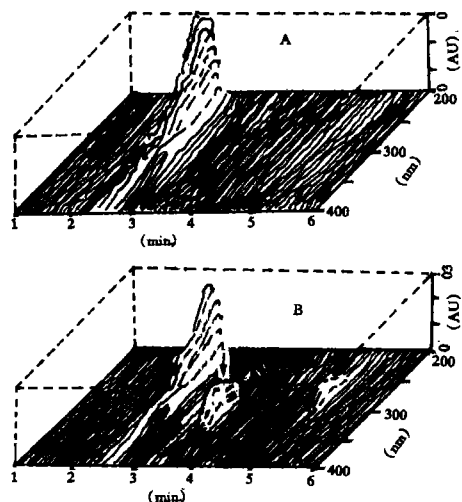
加入量 (ng/mL)	测得值 (ng/mL)	回收率 (%)	RSD (%)
33.7	31.4±1.46	93.17	4.63
269.6	258.8±10.13	96.14	3.92
2156.8	1972.8±71.21	91.47	3.61

表2 FA在血清测定的精密性

加入量 (ng/mL)	n	日内误差 RSD (%)	n	日间误差 RSD (%)
33.7	8	4.59	5	6.18
269.6	9	3.89	5	7.89
2156.9	8	3.62	5	8.44

3.6 专一性:水浴法处理后色谱图基线平稳,最先洗脱的蛋白杂峰峰面积小,不存在血清中内源性成分、川芎中其他成分(图1E和

F)对FA的干扰,而乙腈法则存在上述干扰(图1A~D)。



A-空白血清 B-服川芎汤后血清样品 ↓-FA峰

图4 人血清的三维色谱图

3.7 本方法应用:健康自愿者( $n=6$ )空腹服川芎汤(1 g/kg)后于服药前及后5、10、15、30、45、60、90、120、180和240 min取血清1 mL,置 $-180^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,这些样品除不加FA标准液外均同样品预处理方法。上述时间点的血药浓度( $\text{ng/mL}$ )均值分别为81.78、115.54、127.81、94.14、72.74、55.18、61.95、67.33、58.42和55.98。其PK正在进一步研究之中。

#### 4 讨论

4.1 学术界主流否定论认为:方剂在体内成分不能、难以或没有必要进行定性定量<sup>[1~3]</sup>。1991年假说<sup>[1~3]</sup>的创新性意义如前言所述在于提出与其相反的“肯定论”理论。我国中药的方剂的相关研究有待进行,因此开创与新理论相称的新方法,具有重要意义。

4.2 迄今所有复方PK文献<sup>[1~3]</sup>中的血样预处理没有采用水浴法。水浴法可能“较适合(应)”复方药物分析法的血样预处理;因为复方水煎液中的化学成分能耐受长时间的沸水高温和水解作用,当它们在血清中被水浴提取时同样能够耐受,这些成分在体内与体外所面临处理的条件和环境一致;另一“较适合”的依据是:血清中源自复方的成分以水溶

性成分为主,兼有双溶性成分,或部分脂溶性成分,但能溶于热水。而目前西药化学药品主体为脂溶性成分。这可能是目前西药体内药物分析很少采用水溶法的原因。

4.3 方法学色谱图和数据(图1~4,表1~2)表明:本文建立了服用川芎复方后血清FA测定的新方法,该方法特点体现如下:仅一步性萃取,不需要有机溶剂一步性萃取时的氮气吹干并重溶,因此可单独大规模制备样品;水浴法不使用有机溶剂,因而无毒;水浴法条件易于控制、引入外来因素少、大批量一次性完成,所以该方法非常的精确、灵敏和重复性好。这是我们以往乙腈法<sup>[10]</sup>、三氯甲烷提取补骨脂素<sup>[11]</sup>、川芎嗪<sup>[4]</sup>等预处理法所无法比拟的。

4.4 许多西药体内药物分析的定性,仅用保留时间与对照品是否一致为确定。而(图3~4)采用了二极管阵列检测器和光谱学数据来鉴定川芎进入人体内的FA,可以判断同一保留时间的不同波长上是否有其他成分,可以保证定性的准确,为定量奠定基础。

4.5 本实验仅为初步实践。水浴法预处理复方血清成分,广泛应用性如何?不同动物血清中复方来源的FA,用水浴法萃取的规律性如何?水浴时间如在本文中延长至15 min如何?对色谱柱的污染如何?如预柱或样品上清液过滤后对柱子的影响如何?水浴加强酸等改变条件时的萃取效果、除蛋白效果如何,均不清楚,我们正在研究中。

#### 参考文献

- 1 黄 熙,等. 中国中药杂志,1997,22(4):250
- 2 Huang X, et al. C J I M,1995,1(4):297
- 3 黄 熙,等. 中草药,1995,26(10):546
- 4 黄 熙,等. 中西医结合,1995,6(2):79
- 5 Kano Y, et al. Shoyakugaku Zassh,1989,43(3):199
- 6 矢船明史,他. 日本东洋医学杂志,1992,43(2):275
- 7 Nishioka Y, et al. Chem Pharm Bull,1992,40(5):1335
- 8 Kano Y, et al. 国外医学-中医中药分册,1995,17(6):34
- 9 Wang S, et al. 国外医学-中医中药分册,1995,17(6):34
- 10 Wen A D, et al. J Chin Pharmaceu Scien,1995,4(4):199
- 11 黄 熙,等. 中草药,1991,22(8):361

(1998-10-5 收稿)

## Determination of Ferulic Acid in Serum after Oral Administration of TCM Preparations

Huang Xi, Ren Ping, Zhang Li, *et al.* (Xijing Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

**Abstract** A new method for the determination of ferulic acid in serum samples after oral administration of TCM by HPLC has been developed. Serum samples containing ferulic acid (FA) and internal standard coumarin (IS) were first treated in boiling water-bath to deproteinate, and the FA and IS in the supernatant analysed by 2D, 3D HPLC and spectrometry, on  $C_{18}$  column (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m,) with MeOH:HOAc:H<sub>2</sub>O (38 : 0.3 : 61.7) as the mobile phase, and detected at 320 nm. Results showed that (1) the minimal detectable limits of blank methanol and serum concentrations of FA were 6 ng and 20.6 ng/mL; (2) the linearity ranged from 33.7 to 2156.8 ng/mL ( $r=0.9993$ ); (3) the mean recovery was 93.59  $\pm$  1.93%; and (4) RSD of within day and day to day were less than 8.44%. In a pilot study, serum samples collected from healthy volunteers following oral administration of a decoction of Chuanxiong (*Ligusticum chuanxiong* Hort.) gave a concentration-time curve of FA with accurate and reproducible results.

**Key words** determination of serum ferulic acid by HPLC

## 固相萃取结合 HPLC 法快速测定紫杉醇的含量

大连理工大学生化工程研究所(110612)

张志强\* 田桂莲

中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室

韦新桂 苏志国

**摘要** 采用  $\gamma$ - $Al_2O_3$  固相萃取和 HPLC 法对云南红豆杉和东北红豆杉培养细胞中的紫杉醇进行了定量分析。红豆杉浸膏粗品经  $\gamma$ - $Al_2O_3$  固相萃取柱后,可直接上高效液相色谱柱。 $C_{18}$  HPLC 的最佳条件是:甲醇-乙腈-水(25:45:30)为流动相,227 nm 紫外检测。该法简单、快速、准确、适应性,对紫杉醇的检测范围在 0.4~19.2  $\mu$ g。

**关键词** 固相萃取 HPLC 紫杉醇

紫杉醇(paclitaxel)是一种从红豆杉植物中获得的具有独特疗效的抗癌天然植物产物,现已被多个国家批准应用于临床治疗卵巢癌和乳腺癌等。关于紫杉醇的 HPLC 分析,国内外已有不少报道<sup>[1~5]</sup>。由于红豆杉属植物种类繁多,而这些植物中具有紫杉烷骨架的化合物就有 100 多种,但紫杉醇含量极低,约占固体物 0.010%~0.013%。同时,红豆杉浸膏中往往含有大量的蜡、脂类物质等。这些杂质的存在,严重影响了紫杉醇的准确

定性定量和分析分离所使用色谱柱的寿命。因此,寻找一种快速、精确、灵敏、适应性强的分析方法,无论是对红豆杉细胞培养还是对紫杉醇的大规模分离纯化,都显得尤为重要。固相萃取其突出的优点是能使 HPLC 分析复杂样品时定性定量更准确,并延长色谱柱的使用寿命。同常规的样品预处理方法液液萃取相比,固相萃取具有效率高、选择性好的特点。它不需要大量不互溶溶剂,样品处理步骤简单,样品回收快。固相萃取的主要目的是

\* Address:Zheng Zhiqiang, Institute of Biochemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian

张志强 男,在读博士,主要研究方向为生物产品的制备与纯化。参加完成国家青年基金资助项目“重组人肿瘤坏死因子的分离纯化”。现正从事国家“九·五”攻关项目“紫杉醇大规模生产”的研究。