

HPLC法测定血瘀证患者口服川芎丹参煎剂后阿魏酸血药浓度

孙世仁¹, 黄 熙^{1,2*}, 任 平¹, 张 莉^{1*}

(1. 第四军医大学西京医院 中药临床药理研究室, 陕西 西安 710032; 2. 北京大学 中医药现代研究中心, 北京 100083)

摘要: 目的 对以往建立的人血清中阿魏酸浓度测定的 HPLC法加以改进, 并测定了血瘀证患者口服川芎丹参煎剂后阿魏酸的药血浓度。方法 以香豆素为内标, 甲醇-水-醋酸 (40: 59. 7: 0. 3) 为流动相, Diamonsil (TM) 色谱柱 (150 mm× 4. 6 mm, 5 μ m), 流速 1. 0 mL/min, 以二极管阵列检测器测定 322 nm 波长下的数据, 以沸水浴法加甲醇处理血清样品。结果 阿魏酸和内标分离完全, 阿魏酸在 32. 18~ 965. 38 ng/mL 范围内线性关系良好 ($r=0. 9981$), 日内和日间 $RSD < 10\%$, 平均回收率为 (99. 3 $\pm$ 5. 4)%, 最低检测限为 1. 6 ng/mL, 最低检测浓度为 15. 7 ng/mL。结论 此法简单、快速、灵敏而准确, 适用于人血清中阿魏酸血药浓度的测定。

关键词: 川芎丹参煎剂; 阿魏酸; 高效液相色谱法; 血药浓度

中图分类号: R286. 02 文献标识码: A 文章编号: 0253- 2670(2002)03- 0223- 03

Quantitative analysis of ferulic acid in serum after oral administration of decoction of both *Ligusticum chuanxiong* and *Salviae miltiorrhizae* root in patients with blood stasis by HPLC

SUN Shi-ren¹, HUANG Xi^{1,2}, REN Ping¹, ZHANG Li¹

(1. Department of TCM Clinical Pharmacology, Xijing Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an, Shanxi 710032, China; 2. Modern Research Centre for TCM, Beijing University, Beijing 100083, China)

Abstract **Object** To improve the HPLC method for determination of ferulic acid (FA) and to quantify serum FA concentration in patients with blood stasis after oral administration of decoction of *Ligusticum chuanxiong* Hort. and *Salviae miltiorrhizae* Bunge root. **Methods** The serum sample was treated with a boiling water bath. The coumarin was used as internal standard compound. The mixed solvent consisted of methanol, water and acetic acid (40: 59. 7: 0. 3) was used as elutiant. The flow rate was 1. 0 mL/min. The Diamonsil TM column (150 mm× 4. 6 mm, 5 μ m) was used. FA was detected at UV-322 nm and the peak of FA in serum was recognized by photodiode-array detector. **Results** FA and internal standard compound were separated completely under the condition described as above. FA showed a good linearity in the range of 32. 18~ 965. 38 ng/mL ($r=0. 9981$). The RSD was less than 10%, and the minimum detection amount was 1. 6 ng/mL and the minimum detection concentrations in serum was 15. 7 ng/mL. **Conclusion** Improved HPLC method is simple, sensitive, rapid and accurate. It can be applied to detect FA concentration in human serum.

Key words decoction of *Ligusticum chuanxiong* Hort. and *Salviae miltiorrhizae* Bunge root; ferulic acid; HPLC; blood drug concentration

“证治药动学”假说^[1]认为, 复方进入体内其成分可以定性定量, 国内外实验^[2~ 7]对此提供了佐证, 但测定中药复方在人体内的化学成分以尿液测定为多^[2~ 5], 血药浓度测定较少。为进一步从临床论证这一假说的普遍性, 我们在对本室建立的血样预处理方法——水浴法^[8]的基础上, 以 HPLC 法测定血瘀证患者一次口服川芎丹参煎剂后体内阿魏酸的药血浓度。

1 材料与试药

1. 1 仪器: 美国 Waters 高效液相色谱系统, 7725 手动进样器, 600 泵, 996 二级管阵列检测器, M32 数据处理系统

1. 2 药品与试剂: 阿魏酸对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 773-9405), 香豆精对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 880615); 试剂均为分析纯, 水为自制双蒸水; 川芎购自四川都江堰市医药公

* 收稿日期: 2001-08-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30070912); 高等学校骨干教师计划资助; 北京大学 985 课题资助

作者简介: 孙世仁 (1971-) 男, 甘肃静宁人, 第四军医大学中西医结合临床硕士生, 研究方向为中药复方药动学

* 联系人 第四军医大学西京医院中医科 E-mail: tcmmwsl@ fmmu. edu. cn

司,经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. 的根茎;丹参购自西安市医药公司;健康人空白混合血清由本院血库提供

1.3 受试对象:血瘀证患者(来自陕西省合阳县)10名,均符合1986年广州第二届全国活血化瘀研究学术会议修订的血瘀证诊断标准,其中8男2女,年龄42~69岁,体重50~78 kg,患者试验前2周停用任何其他药物,服药前14 h未饮含酒精饮料,未吸烟,受试期间少量饮水。试验方案经西京医院医学伦理委员会批准通过,试验前均签署知情同意书。

2 方法

2.1 色谱条件:流动相:甲醇-水-冰醋酸(40:59.7:0.3);北京迪马公司Diamondsil(TM)色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), C₁₈保护柱(大连依利特科学仪器有限公司);流速:1.0 mL/min,检测波长:322 nm

2.2 对照品溶液配制:精密称取阿魏酸对照品5.02 mg,置于50 mL容量瓶中,加入甲醇至刻度,配成母液浓度为100.4 μg/mL,再用甲醇稀释20倍后终浓度为5.02 μg/mL。同法配制内标香豆精溶液,浓度为23.92 μg/mL。

2.3 川芎丹参汤的制备:采用煎煮法,取川芎、丹参各1 000 g,常水洗2遍,用12 L浸泡30 min,用不锈钢刀将川芎切成0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm,放回不锈钢锅中同丹参一起煮沸30 min,5层纱布过滤,药渣用沸水覆过药面,再煮30 min,最后在文火上浓缩成2 g/mL(含川芎和丹参各为1 g/mL)。

2.4 样品制备:受试者空腹14 h后,按2 g/kg剂量服用川芎丹参汤,分别于服药前和服药后5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180 min从肘静脉取血3 mL,离心血清,冰冻至-20℃冰箱保存待测。

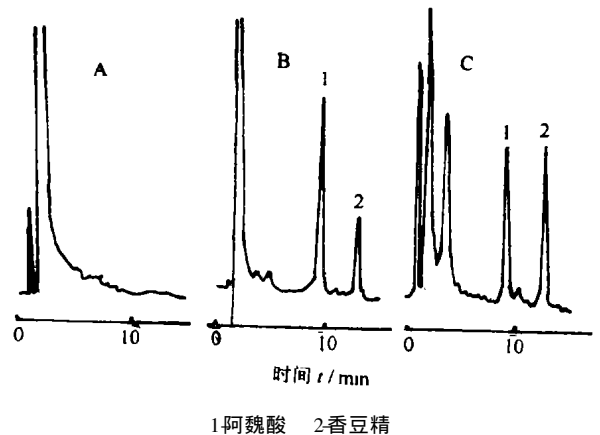
2.5 血样预处理:用微量加样器吸取1.0 mL血清,置于5 mL带刻度的玻璃尖底离心试管中,以微量进样器准确加入香豆精内标液50 μL,电动混匀器充分混匀15 s,在水沸腾时将试管放入水浴锅,至温度达95℃以上时保持10 min,取出冷却,用微型电动搅拌器充分搅拌,3 500 r/min离心15 min,取上清液100 μL,置于1 mL塑料离心管,加等量甲醇后置-4℃冰箱沉淀24 h,取出以9 000 r/min离心10 min,取上清液50 μL进样。

2.6 标准曲线制备:取空白血清1.0 mL于5 mL带刻度的玻璃离心试管中并编号,加入不同浓度的阿魏酸对照品及相同体积的香豆精内标溶液(50

μL),并用甲醇补充总体积一致为1 248 μL,使阿魏酸浓度分别为32.18, 64.36, 128.72, 257.44, 482.82, 965.38 ng/mL,充分混匀后,按2.5项下“血样预处理”方法进行,并测定。以二极管阵列检测器测定,选取322 nm时阿魏酸和内标的峰面积,以阿魏酸和内标的峰面积比与其浓度作线性回归,得到此色谱条件下阿魏酸的标准曲线。以信噪比为3时计算最低检测限和最低检测浓度。

2.7 样品血药浓度测定:取已制备的血清样品室温下融化后按“预处理”方法处理后测定,由标准曲线计算出阿魏酸的血药浓度。

3 结果



A-空白血清 B-空白血清+对照品 C-口服川芎丹参煎剂后的血清

图1 阿魏酸和香豆精 HPLC图

3.1 色谱分离:在上述色谱条件下,血样中的阿魏酸和内标分离完全,空白血清无干扰,其保留时间均与对照品一致,分别为8.8 min和12.3 min(见图1),并通过二维、三维色谱图对其吸收峰定性。

3.2 标准曲线及线性范围:阿魏酸的线性回归方程为 $Y = 0.039304 - 0.006363X$, $r = 0.9981$,表明阿魏酸在32.18~965.38 ng/mL范围内具有良好的线性关系。同时检测阿魏酸的最低检测限为1.6 ng,血清中阿魏酸的最低检测浓度为15.7 ng/mL。

3.3 精密度和回收率:以空白血清中加入高、中、低不同浓度的阿魏酸对照品作为已知样品,按上述方法处理血清样品,选择一天内不同时间以及不同天内检测,得其测定值,计算其日内、日间精密度和回收率,见表1。结果可见,精密度和回收率基本符合

表1 精密度和回收率试验

阿魏酸浓度 (ng/mL)	精密度(%)		回收率(%)	
	日内 RSD	日间 RSD	数值	RSD
32.18	5.3	9.2	107.3	8.3
257.44	4.8	5.7	96.2	8.1
965.39	6.5	5.1	95.7	9.0

要求, $RSD < 10\%$, 表明本法可靠, 结果令人满意。

3.4 样品测定: 按样品制备方法和预处理方法分别测定各时点的血药浓度, 其药时曲线见图 2

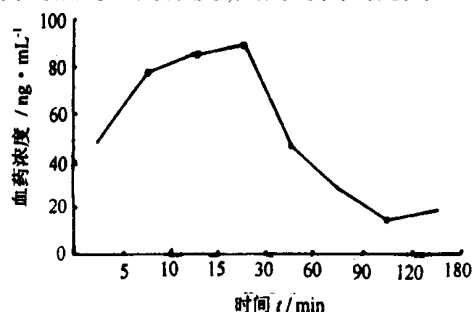


图 2 血瘀证患者口服川芎丹参煎剂后阿魏酸药-时曲线

4 讨论

4.1 血样中药物的提取方法一般使用液-液萃取、固相提取, 或加入有机溶剂去除蛋白等方法, 我室建立了沸水浴去血清蛋白质后用 HPLC 直接测定血样中药物浓度方法, 效果较好^[8], 但也存在去除蛋白不彻底从而减短分析柱使用寿命的不足^[9]。为此, 我们对原水浴法进行了改进, 将离心所得上清液再加甲醇放置沉淀, 较原法相比, 去除蛋白更充分, 在不影响检测结果的基础上有助于延长分析柱的使用寿命。

4.2 从阿魏酸的药时曲线可看出: 血瘀证患者一次口服川芎丹参煎剂后阿魏酸在胃肠道吸收迅速, 达峰时间短, 这为中药汤剂吸收快, 能迅速发挥疗效提供了直接的临床量化依据。该曲线还显示, 180 min 阿魏酸平均血药浓度高于 120 min, 提示川芎复方中的阿魏酸在体内存在重吸收现象, 且该现象在口服阿魏酸钠单体时并未出现^[10], 这可能

预示着机体存在尚不为人知的多成分方剂的特殊处置机制, 探明这一机制对阐明方剂作用原理有着重要的意义。

参考文献:

- [1] 黄 熙, 陈可冀. “证治药动学”新假说的理论与实践 [J]. 中医杂志, 1997, 38(12): 745-747.
- [2] Homma M, Oka K, Taniguchi C, *et al.* Systematic analysis of postadministrative saiboku-to urine by liquid chromatography to determine pharmacokinetics of traditional Chinese medicine [J]. Biomed Chromatogr, 1997, 11(3): 125-131.
- [3] Homma M, Oka K, Yamada T, *et al.* A strategy for discovering biologically active compounds with high probability in traditional Chinese herb remedies: an application of saiboku-to in bronchial asthma [J]. Anal Biochem, 1992, 202(1): 179-187.
- [4] Homma M, Oka K, Kobayashi H, *et al.* Liquid chromatographic determination of magnolol in urine collected from volunteers after a single dose of saiboku-to, an oriental herbal medicine for bronchial asthma [J]. J Pharm Pharmacol, 1993, 45(9): 839-841.
- [5] Zhao F Q, Zheng N X, Sato H, *et al.* Pharmacokinetics of a Chinese traditional medicine, danshensu (3, 4-dihydroxyphenylacetic acid), in rabbits using high-performance liquid chromatography [J]. Biol Pharm Bull, 1997, 20(3): 285-287.
- [6] 张 莉, 黄 熙, 王骊骊, 等. 四君子汤灌胃大鼠甘草甜素血药浓度测定及其药代动力学研究 [J]. 中药材, 2000, 23(9): 563-565.
- [7] 矢船明史, 丁宗铁. 小青龙汤投后与の血中エフェトリニ动态 [J]. 日本东洋医学杂志, 1992, 43(2): 275-283.
- [8] 黄 熙, 任 平, 张 莉, 等. HPLC 直接测定血清中阿魏酸-方剂血样预处理方法 (I) [J]. 中草药, 1999, 30(3): 175-178.
- [9] 张 莉, 黄 熙, 任 平, 等. 三维 HPLC 法同步测定犬血浆中的葛根素及阿魏酸 [J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18(1): 45-48.
- [10] Fujiwara S, Hamada T, Sugimoto I, *et al.* High-performance liquid chromatographic determination of ferulic acid in plasma [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1983, 31(3): 1079-1081.

乌龙减肥茶的质量标准研究

王 勇, 吴春敏*

(福建省药品检验所, 福建 福州 350001)

摘 要: 目的 制定乌龙减肥茶质量标准。方法 对荷叶、茶叶进行了薄层色谱鉴别, 用 HPLC 法测定制剂中咖啡因含量。结果 平均回收率为 99.3%, $RSD = 0.3\%$ ($n = 5$), 标准曲线的 $r = 0.9999$, 精密密度试验得 $RSD = 0.12\%$ ($n = 9$), 重现性试验 $RSD = 1.0\%$ ($n = 5$)。结论 方法稳定可靠, 可作为该产品的质量控制方法。

关键词: 乌龙减肥茶; 荷叶; 茶叶; TLC; 咖啡因; HPLC

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2002)03-0225-03