

亡的病历发生^[5]。在此次分析中,不同厂家雷公藤制剂中雷公藤对醌B差异很大,说明质量控制的不规范是其疗效不稳定的原因之一。另外,东北雷公藤饮片中雷公藤对醌B质量分数很低(小于百万分之一),然而广东和平药业有限公司生产的昆明山海棠片中雷公藤对醌B质量分数却达到76.75 $\mu\text{g}/\text{片}$,因此在制剂选择原药材上应固定雷公藤原药材的品种来源、产地和采收季节。

References:

- [1] Yao W C, Nian H F. Medicated wine of *Tripterygium wilfordii* in treating rheumatoid arthritis in 392 patients [J]. *Chin J New Drugs Res* (中国新药与临床杂志), 2004, 23

(1): 37-39.

- [2] Xu X Y, Zhao C G, Lu D P. *Tripterygium wilfordii* Hook. f. used to treat hard nephritic syndrome in adults [J]. *Chin J Pract Chin Med* (中华实用中西医结合杂志), 2004 (17): 71-72.
- [3] Yang J W, Dai C S, Chen Z H, et al. Effects of triptolide on T bacteria and relationship between triptolide and Camp/PKA [J]. *Chin J Nephrol Dialysis Transplant* (肾脏病与透析肾移植杂志), 1998, 7 (2): 106-113.
- [4] Yoshihisa T, Kozo S, Noriko W, et al. Triptolide A and B, novel interleukin-1 inhibitors from *Tripterygium wilfordii* var. *regelii* [J]. *Tetrahedron Lett*, 1992, 33 (47): 7177-7180.
- [5] Wang M, Chen H Y, Hu X X, et al. Analysis of the dead reason of 83 patients from *Tripterygium wilfordii* Hook. f. [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 1999, 10 (2): 128-129.

乳腺丸中阿魏酸在兔体内的药动学研究

刘艳娟, 杜智敏*, 王 珍

(哈尔滨医科大学附属二院临床药物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:目的 研究乳腺丸中阿魏酸在兔体内的药动学特性。方法 采用高效液相色谱法测定阿魏酸的血液浓度。以香豆素为内标, 甲醇-醋酸-水(38.0:0.5:61.5)为流动相, ODS Hypersil C_{18} 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)为分析柱, 检测波长为320 nm。结果 阿魏酸在12.5~1 600.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 呈线性, 血浆最低检测质量浓度为6.25 $\mu\text{g}/\text{L}$, 低、中、高3种质量浓度平均回收率分别为96.17%、99.80%、100.23%, 日内及日间RSD均 $\leq 6\%$, 5只兔单次ig乳腺丸后药-时曲线符合一室模型, 药动学参数分别为 $\text{AUC}_{0-4\text{h}}$ (855.29 $\pm$ 100.78) $\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ (1 051.99 $\pm$ 125.96) $\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, C_{max} (952.71 $\pm$ 119.04) $\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, t_{max} (0.5 $\pm$ 0.00) h, $t_{1/2}$ (1.61 $\pm$ 0.21) h, K_e (0.46 $\pm$ 0.05)/h。结论 本方法准确、重现性好, 适用于乳腺丸中阿魏酸血液浓度测定及药动学研究。

关键词: 乳腺丸; 阿魏酸; 药动学; 高效液相色谱

中图分类号: R285.61; R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)04-0527-04

Pharmacokinetic study of ferulic acid in Ruxian Pill in rabbits *in vivo*

LIU Yan-juan, DU Zhi-min, WANG Zhen

(Institute of Clinic Drug, The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

Abstract: **Objective** To study the pharmacokinetics of ferulic acid in rabbits *in vivo* after ig administering Ruxian Pill. **Methods** The concentrations of ferulic acid in plasma were determined by HPLC. Taking coumarin as internal standard, a mixture of methanol-acetic acid-water (38.0:0.5:61.5) was used as the mobile phase, and UV detection was performed at 320 nm. The analytical column was ODS Hypersil C_{18} (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm). **Results** The calibration curve was linear over the range of 12.5—1 600.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ and the measurable limit of plasma detection was 6.25 $\mu\text{g}/\text{L}$. The recovery was 96.17%, 99.80%, 100.23%. The RSD of the intra-day and the inter-days was less than 6%. The plasma concentration-time curve was consistent with one-compartment model. The pharmacokinetic parameters were as follows: $\text{AUC}_{0-4\text{h}}$ (855.29 $\pm$ 100.78) $\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ (1 051.99 $\pm$ 125.96) $\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, C_{max} (952.71 $\pm$ 119.04) $\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, t_{max} (0.5 $\pm$ 0.00) h, $t_{1/2}$ (1.61 $\pm$ 0.21) h, K_e (0.46 $\pm$ 0.05)/h. **Conclusion** The method is accurate and precise with better reproducibility, which can be used for the determination of plasma level of ferulic acid and the study of its pharmacokinetics for Ruxian Pill.

Key words: Ruxian Pill; ferulic acid; pharmacokinetics; HPLC

收稿日期: 2005-06-26

基金项目: 黑龙江省“十五”科技攻关课题(G99C20-4)

作者简介: 刘艳娟, 女, 在职研究生。Tel: (0451) 86863083 E-mail: liuyanjuan345@126.com

* 通讯作者 杜智敏 Tel: (0451) 86605353 Fax: (0451) 86665559 E-mail: dzm@pharm-hrbmush.com

乳腺丸是我院制剂,系由当归、莪术、赤芍、柴胡、郁金、三棱等制成的丸剂,经临床多年应用,取得良好的疗效。其具有舒肝理气、软坚散结、活血化瘀等功效,临床用于症瘕积聚、乳腺肿块。其中当归为方中之佐药,阿魏酸为当归的主要有效成分。药理及临床研究表明阿魏酸具有抗氧化、抑制血栓形成、增加冠脉流量、改善心肌缺血、抑制胶原和 ADP 诱导的血小板聚集作用^[1]。本实验建立了 HPLC 法测定兔 ig 给药后阿魏酸的血药浓度,并对其在新西兰兔体内的药动学参数进行了研究。

1 材料与仪器

1.1 试药:乳腺丸(哈尔滨医科大学附属二院药学部生产,批号 030520,规格:9 g/丸),阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 0773-9708),香豆素(中国医药公司北京采购供应站,批号 910901),甲醇、乙腈(色谱纯),冰醋酸(分析纯),双重蒸馏水。

1.2 动物:纯种新西兰大白兔 5 只,雄性,体重(2.4±0.1) kg,由哈尔滨中药二厂动物室提供,许可证号:黑动字第 20020030 号。

1.3 仪器:美国 Waters 600 型高效液相色谱系统,包括 Waters 2487 紫外检测器、Waters 600 四元泵、Waters in-line 脱气机、7725 型手动进样阀;MVS—1 涡旋混合器(北京长安仪器厂);TGL—16G 台式高速离心机(上海医用分析仪器厂)。

2 实验方法

2.1 色谱条件:ODS Hypersil C₁₈ 色谱分析柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-醋酸-水(38.0:0.5:61.5);检测波长:320 nm;体积流量:1.0 mL/min。

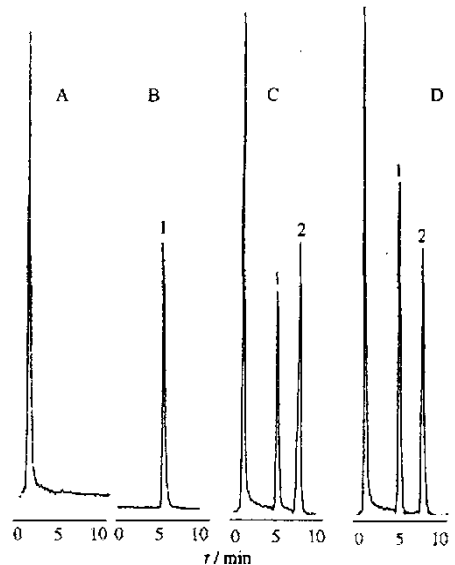
2.2 药动学研究

2.2.1 给药及采血:新西兰大白兔 5 只,禁食 24 h (不禁水),按 3.6 mL/kg (0.2 g/mL) ig 后禁食不禁水(剂量选择以正常人的用量换算成兔的给药剂量),分别于给药后 10、20、30、45 min,1.0、2.0、3.0、4.0 h 自耳缘静脉采血 0.5 mL 置肝素化离心管中。

2.2.2 样品的处理:取含待测药物的全血 500 μL 于离心管中,加入内标香豆素溶液 50 μL,涡旋混合 10 s,置 95 ℃ 水浴 5 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 50 μL,加入等量的甲醇溶液,充分振摇 15 s,混匀后 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 20 μL 进样。

2.3 色谱行为及方法专属性:取阿魏酸对照品适量,加甲醇溶液溶解制成 2.5 μg/mL 的对照品溶

液,进样 20 μL,记录色谱图。取空白兔血(肝素抗凝) 500 μL,按样品的处理项下操作,进样 20 μL,记录色谱图,结果见图 1,可知,乳腺丸中阿魏酸、兔血浆内源性物质、内标及其他干扰组分分离良好,无杂质峰干扰。阿魏酸和内标物的保留时间分别为 5.62 min 和 7.97 min。



A-空白血浆 B-阿魏酸对照品 C-空白血浆加入阿魏酸对照品和内标物 D-给药后兔血浆样品 1-阿魏酸 2-内标物
A-blank plasma B-ferulic acid C-blank plasma spiked with ferulic acid and internal standard D-plasma samples of rabbits after ig Ruxian Pill 1-ferulic acid 2-internal standard

图 1 兔血浆中阿魏酸的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of ferulic acid in rabbit plasma

2.4 标准曲线的制备:取 500 μL 空白全血(肝素抗凝)于离心管中,加入不同体积的阿魏酸对照品溶液,使之成为 12.5、25.0、50.0、100.0、200.0、400.0、800.0、1 600.0 μg/L 系列质量浓度的溶液,按样品的处理项下操作。以阿魏酸与内标物峰面积比对血药浓度进行线性回归,得回归方程为 $C = 681.49 X + 35.93$, $r = 0.9984$,最低检测质量浓度为 6.25 μg/L ($S/N \geq 3$),表明阿魏酸在 12.5~1 600.0 μg/L 线性良好。

2.5 精密度试验:配制 50.0、400.0、1 600.0 μg/L 阿魏酸血浆样品,于当日取 500 μL 全血样品,处理并测定血药浓度,测定后置室温保存,每个质量浓度平行做 5 份,计算日内精密度。于第 1、2、3、4、5 日重复测定,计算日间精密度,结果见表 1。表明,在上述 3 种质量浓度下,日内与日间 RSD 均小于 6%,说明该方法的精密度符合生物样品分析的要求。

表 1 精密度试验结果 ($n=5$)
Table 1 Results of precision test ($n=5$)

加入浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	日内精密度		日间精密度	
	测定浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	RSD/ %	测定浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	RSD/ %
50.0	47.40 $\pm$ 2.42	5.22	47.33 $\pm$ 2.74	5.79
400.0	386.11 $\pm$ 13.98	3.62	389.36 $\pm$ 15.76	4.05
1 600.0	1 592.05 $\pm$ 23.70	1.48	1 589.34 $\pm$ 25.65	1.61

2.6 稳定性试验:取 50.0、400.0、1 600.0 $\mu\text{g/L}$ 阿魏酸血浆样品室温放置 1、2、3、4、5 h,连续测定 5 次,得质量浓度平均值分别为 47.32、383.25、1 587.34 $\mu\text{g/L}$, RSD 分别为 5.43%、3.89%和 1.18% ($n=5$);取 50.0、400.0、1 600.0 $\mu\text{g/L}$ 阿魏酸血浆样品置 -20°C 冰箱中保存,分别于 0、3、5、10 d 取出测定其质量浓度,得血浆样品冷冻贮存稳定性结果,质量浓度平均值为 47.79、389.13、1 587.56 $\mu\text{g/L}$, RSD 分别为 5.35%、3.79%和 1.20% ($n=5$);取上述血样反复冻融后测定其质量浓度,得血浆样品冻融稳定性结果,质量浓度平均值为 46.32、375.43、1 582.58 $\mu\text{g/L}$, RSD 分别为 6.76%、4.53%、2.14% ($n=5$)。

2.7 回收率试验:用空白血浆配制含阿魏酸质量浓度分别为 50.0、400.0、1 600.0 $\mu\text{g/L}$ 的血浆对照品溶液各 5 份,处理,计算回收率,结果见表 2。

表 2 回收率试验测定结果 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Results of recovery test ($\bar{x}\pm s, n=5$)

加入质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率/%	RSD/%
50.0	96.17 $\pm$ 5.20	5.41
400.0	99.80 $\pm$ 3.81	3.82
1 600.0	100.23 $\pm$ 1.54	1.54

3 实验结果

3.1 给药后的血药浓度:兔 ig 给予乳腺丸后,测得的血药浓度-时间曲线见图 2。

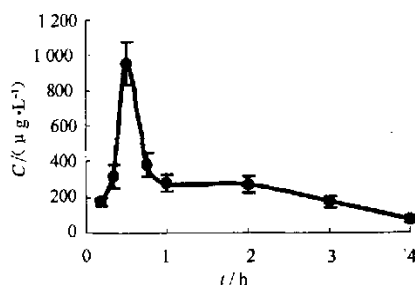


图 2 灌胃给药后体内血浆阿魏酸浓度-时间曲线

Fig. 2 Plasma concentration-time curve of ferulic acid after a single ig in rabbits

3.2 药动学参数:将测得的血药浓度数据用 DAS Ver1.0 药动学智能分析计算程序拟合,乳腺丸在兔

体内的药动学过程符合一室模型,主要药动学参数见表 3。

表 3 兔灌胃给乳腺丸后体内阿魏酸药动学参数
($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 3 Pharmacokinetic parameters of ferulic acid in rabbits *in vivo* after ig Ruxian Pills

($\bar{x}\pm s, n=5$)

参 数	数 值
$t_{1/2}/\text{h}$	1.61 $\pm$ 0.21
$\text{AUC}_{0-4\text{h}}/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	855.29 $\pm$ 100.78
$\text{AUC}_{0-\infty}/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	1 051.99 $\pm$ 125.96
t_{max}/h	0.50 $\pm$ 0.00
$C_{\text{max}}/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	952.71 $\pm$ 119.04
K_e	0.43 $\pm$ 0.05

4 讨论

4.1 阿魏酸血药浓度测定多采用 HPLC-UV 法^[2~4],检测波长为 280、312、320 nm。本实验经紫外扫描确定阿魏酸的最大紫外吸收为 320 nm,因此选择 320 nm 作为检测波长。文献报道^[2,3,5]的甲醇-1%醋酸(28:72)、60%甲醇(乙二胺、甲酸调 pH 3~4)、乙腈-0.1%磷酸盐(3:7)作为流动相,结果阿魏酸与杂质峰达不到基线分离。实验选用甲醇-醋酸-水(38.0:0.5:61.5)作为流动相,阿魏酸与内标及血浆中内源性杂质峰分离良好,达到了方法学要求,保证了阿魏酸在检测过程中的稳定性和检测方法的准确性,同时具有经济适用的优点。

4.2 文献报道^[3,5,6]的血样中阿魏酸提取方法是醋酸乙酯、乙腈、三氯乙酸等有机溶剂萃取,笔者也尝试了这些方法,结果均有柱压升高较快,干扰成分较多,回收率低,达不到基线分离等缺点,说明蛋白和杂质成分去除不够彻底。采用水浴处理、高速离心和甲醇提取,去除蛋白彻底,提取回收率高,杂质干扰少,在提高检测灵敏度的同时,减少了有机溶剂的用量,提高了柱效,延长了色谱柱的使用寿命。

4.3 阿魏酸及其他中药复方中的阿魏酸在不同动物体内的药动学已有报道^[7],多为一室模型,iv、ig 或 po 给药后血药浓度下降迅速, $t_{1/2}$ 较短,均小于 1 h。本实验结果表明,乳腺丸中的阿魏酸在兔体内的药动学仍符合一室模型,但 $t_{1/2}$ 为 1.61 h,表明吸收较慢,说明乳腺丸中的其他成分对阿魏酸的体内过程有较大影响,研究中药药动学应充分考虑其在复方中的作用及配伍关系,才能得到科学、准确的结果。

References:

- [1] Jiangsu New Medical College. Dictionary of Chinese Materia Medica (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific

- and Technical Publishers, 1997.
- [2] Song J C, Yang H, Hu C Q, *et al.* Simultaneous determination of both ferulic acid and tetra methylpyrazine in serum by reverse phase HPLC [J]. *Herald Med* (医药导报), 2004, 23 (1): 45-46.
- [3] Yan F S, Liu X D, Song X Y, *et al.* Detection of ferulic acid in blood samples by using HPLC [J]. *J Capital Inst Med* (首都医学院学报), 1991, 12 (1): 27-30.
- [4] Shang G W, Jiang Y P, Huang X, *et al.* Determination of free ferulic acid in serum of healthy volunteers after administering compound Chuanxiong Decoctions by RP-HPLC [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1997, 32 (12): 761-764.
- [5] Wen A D, Huang X, Jiang Y P, *et al.* High-performance liquid chromatographic determination of free ferulic acid in serum of rabbits with blood stasis [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1995, 30 (10): 762-767.
- [6] Zhang Z, Yan Y F, Chen K J, *et al.* Study on the pharmacokinetics of ferulic acid in Canine serum after giving an intragastrical single dose of Xiongshao Capsules to a dog [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 2001, 24 (1): 25-28.
- [7] Chang M X, Xu L Y, Tao J S, *et al.* Studies on pharmacokinetics of ferulic acid in Chuanxiong in rabbits [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1996, 31 (1): 43-45.

肉桂醛和柠檬醛对烟曲霉细胞膜中麦角甾醇生物合成的影响

谢小梅, 龙 凯, 方建茹

(江西医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004)

摘要:目的 研究肉桂醛、柠檬醛对烟曲霉中麦角甾醇生物合成的影响。方法 将烟曲霉接种在含有不同质量浓度药物的蔡氏固体培养基中, 同时设不加药物为空白对照, 置 26.5 °C 恒温培养 5 d, 刮取平皿上菌苔, 称质量、皂化、提取烟曲霉菌中的难皂化脂, 高效液相色谱法测定其中的麦角甾醇。结果 柠檬醛质量浓度为 0.11 μg/mL、肉桂醛质量浓度为 0.16 μg/mL 作用于烟曲霉后, 麦角甾醇的质量分数显著降低。结论 肉桂醛和柠檬醛影响了烟曲霉中麦角甾醇的生物合成。

关键词:肉桂醛; 柠檬醛; 烟曲霉; 麦角甾醇; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)04-0530-03

Effects of cinnamaldehyde and citral on ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* cell membrane

XIE Xiao-mei, LONG Kai, FANG Jian-ru

(Key Laboratory of Modern Preparation Chinese Materia Medica of Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of the active ingredients, cinnamaldehyde and citral, on ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* cell membrane. **Methods** Saponification and extraction of the nonsaponifiable lipids (NSLs) of *A. fumigatus* were carried out after 26.5 °C for 5 d of incubation in Cai's solid medium with varied concentrations of cinnamaldehyde and citral compared with the control group without drugs. The contents of ergosterol in NSLs were determined by HPLC. **Results** After the treatment by cinnamaldehyde (0.16 μg/mL) and citral (0.11 μg/mL), the contents of ergosterol in *A. fumigatus* cell membrane was obviously decreased. **Conclusion** Cinnamaldehyde and citral influence the ergosterol biosynthesis in *A. fumigatus* cell membrane.

Key words: cinnamaldehyde; citral; *Aspergillus fumigatus* Fres.; ergosterol; HPLC

烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* Fres. 是深部真菌感染的常见病原菌。目前, 临床上常用的抗真菌感染药物如唑类化合物、烯丙胺类等, 无一例外是通过抑制真菌的麦角甾醇生物合成来达到抑菌目的的, 但由于这些药物的不良反应、耐药性及价格昂贵等原因, 在临床上应用受到限制。中药不良反应小, 来

源广, 价格低廉, 较少出现耐药等, 因此, 抗真菌中药的研究将成为 21 世纪的中医药研究热点内容之一。本研究室实验表明中药活性成分肉桂醛和柠檬醛有良好的抗烟曲霉作用, 并对其抗真菌作用机制做了初步探讨^[1~3]。本实验采用高效液相色谱法测定了肉桂醛和柠檬醛作用烟曲霉后真菌细胞膜中麦角甾