

高效液相色谱直接测定沸水浴处理人血清中冠心 II 号来源的阿魏酸*

黄 熙^{1△} 陈可冀^{1△△} 任 平² 李军昌² 马红艳²

内容提要 目的:探讨建立健康人口服冠心 II 号后吸收入血清成分的临床药动学(PK)研究的新方法。方法:用高效液相色谱(HPLC)直接测定 5 名健康人服冠心 II 号后经沸水浴处理过的血清样品中的阿魏酸(FA)。分别用二维、三维 HPLC 和紫外分光光度法定性 FA 后,FA 用内标(香豆精)法定量。结果:甲醇:乙酸:水(38:0.3:61.7)为流动相, C₁₈(ODS₂)柱(150mm×4.6mm, 5μm)为固定相时, FA 的最低检测限 6ng (N/S=3);沸水浴 10min 的最低检测血清浓度是 20.2μg/L, 线性范围 33.7~2156.8μg/L, r=0.9993;方法平均回收率(93.59±2.36)%, 日间及日内精密度 RSD 值均<8.44%。结论:与乙睛法比较, 本法灵敏、快速、简便、精确、专一、价廉、无毒和重复性好。

关键词 冠心 II 号 阿魏酸 血药浓度测定 水浴法 高效液相色谱

Direct Determination of Serum Content of Ferulic Acid Treated with Boiling Water by HPLC in Volunteers after Oral Administration of Coronary Heart No. II Decoction Huang Xi, Chen Keji, Ren Ping, et al Xiyuan Hospital, China Academy of TCM, Beijing (100091)

Objective: To develop a new method for clinical pharmacokinetic detection of chemical component of Coronary Heart NO. II in serum after oral administration in healthy person. **Methods:** Content of ferulic acid (FA) in serum, which had been treated with boiling water bath, was determined directly by high performance liquid chromatography (HPLC) and spectrophotometer. After qualitative detection performed by using Bi-and tri-dimensional HPLC and ultraviolet spectrophotometer, the quantitative detection was determined with the internal standard (coumarin). **Results:** When eluted by mobile phase of a mixture of methanol, acetic acid and water (38:0.3:61.7 in ratio), and stationary phase of C₁₈(ODS₂), column (150mm×4.6mm, 5μm), the minimal detectable limit of free methanol FA was 6 ng (N/S=3), and the minimal detectable serum FA concentration, after 10 min of boiling water bath, was 20.2 μg/L, with a linearity of 33.7~2156.8 μg/L, r=0.9993. The mean recovery of serum FA was (93.59±2.36) μg/L. The RSD within day and day-to-day were all less than 8.44%. **Conclusion:** In comparing with sample Preparation of acetonitrile, this method is simple, rapid, sensitive, cheap, accurate, specific, reproducible and no toxic.

Key words Coronary Heart No II, ferulic acid, blood drug concentration detection, water bath, high performance liquid chromatography

根据文献^[1]我们用乙睛既去除人血清中蛋白,又提取血清中冠心 II 号来源的阿魏酸(Ferulic acid, FA),用香豆精作内标,高效液相色谱法测定。结果表明乙睛去除蛋白不完全,且重复性差。改用沸水浴处

理上述样品,同样用上述色谱条件,测定结果良好,现报告如下。

材料与方法

1 仪器 Waters 990 高效液相色谱,配 Waters 991 光电二极管阵列检测器(3D-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。贝克曼高效液相色谱(HPLC)仪,165 可变波长双通道紫外-可见检测器能设双波长,用于 FA 定量。超微型搅拌器为江苏海门其林医

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39570870;39670865),博士后基金(96)4

1. 中国中医研究院西苑医院(北京 100091);2. 第四军医大学

△ 中国中医研究院西苑医院博士后(已出站),现在第四军医大学西京医院中药临床药理研究室(西安 710032);△△ 博士后指导老师

用仪器厂产品。

2 药物、试剂 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 880615),含量 >99%,熔点 68.9~70.0℃,购于中国医药公司北京采购供应站。醋酸、甲醇、乙睛均为 AR 级。川芎购自四川都江堰市医药公司石羊镇医药批发站。丹参和赤芍均购自四川省中江县,以上 3 药均分别经过鉴定。降香和红花饮片购于西安市药材公司。冠心 II 号由川芎、赤芍、红花、降香和丹参组成,前 4 味药取各 500g 和后 1 味药材 1000g,常水冲洗 2 次,采用分煎(每次 30min,共 2 次),最后按 1:1:1:1:2(其中丹参为 2)比例方式混合。健康人空白混合血清由本院血库提供。

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

4 受试对象 健康自愿者 5 名,男 3 名,女 2 名;年龄 17~38 岁,平均(27.6±7.6)岁;体重 50~72.5kg,平均(55.4±8.7)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 14h,并未饮含酒精类饮料,未吸烟,受试期间正常饮水。

5 实验设计 首先统一煎煮冠心 II 号汤液,并制备好足够的汤液。选择一名受试对象,按 3g/kg 剂量服用冠心 II 号汤液,30min 后取血得血清,按文献^[1]方法用乙睛进行预处理,用 HPLC 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 3g/kg 服用冠心 II 号汤液,服药前及服药后 5、10、15、30、45、60、90、120、180、240min 时间点各取血得血清 1ml,其中 30min 组取血得血清 5ml 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 3D-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。

6 紫外波长测定 分两种,一种用分光光度计进行,另一种用 3D-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。

7 色谱条件 C_{18} (HYPERASIL 填料, ODS_2) 色谱

柱(大连依利特科学仪器有限公司)150mm×4.6mm, 5μm 为固定相,流动相参考文献^[1],为甲醇:乙酸:水(38:0.3:61.7, v/v/v),该流动相用于 2D-HPLC。3D-HPLC 的流动相用甲醇-磷酸缓冲液(0.01mol/L, pH3.0),流速 1.0ml/min;贝克曼和 Waters 仪器自带脱气装置,3D-HPLC 流速 0.7ml/min。因 FA 和阿魏酸钠的对照紫外谱图有一较高的 280nm 左右的肩峰,且川芎中含有的川芎嗪的紫外吸收波长为 280nm,所以贝克曼 HPLC 设 320nm 和 280nm 两个波长。3D-HPLC 的紫外波长为 200~400nm。纸速为每屏幕 60min 和 10min 两种。

8 样品预处理方法 先用文献^[1]方法:精密量取空白血清 1ml 于 5ml 玻璃尖底离心试管中,分别加一定浓度内标,加不同浓度的 FA 后,旋涡振荡 15s 混匀,然后加 2.4ml 乙睛后再次旋涡振荡 15s 混匀,3000r/min 离心 10min,将有机层移至另一 5ml 尖底离心试管中,在 60℃ 水浴和氮气下吹干后用 100μl 甲醇重溶,20μl 进样测定。因色谱结果不佳改用水浴法。水浴法:取 10ml 玻璃尖底离心试管,分别加入 30μl 水、50μl 内标母液 3(针尖插入水中)、不同浓度的 FA 液、再加入水(使每管容积相同)、1ml 空白血清,然后旋涡混匀 15s,100℃ 水浴 10min,用超微型搅拌器搅拌 1min 制成匀浆,12000r/min 离心 15min,取上清直接进行 HPLC 测定或置于 1ml 尖底塑料试管中存 -18℃ 冰箱待测。

9 定性与定量计算及方法学比较标准 比较对照品、样品所测组分的 2D-HPLC 的保留时间、3D-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,他们的峰面积或峰高与内标的比值为因变量,求出标准曲线的回归方程计算 FA 的浓度。以色谱图的组分峰的分离情况、峰面积的稳定性与重复性作为乙睛法和水浴法的比较标准,并比较样品预处理方法。

结 果

1 样品预处理方法的比较 见图 1。图中的峰 1 和峰 2 为 FA 和内标,乙睛不能使 FA 峰与血清内源性物质完全分开(图 1 中 B 和 C)。由于除蛋白差致使保留时间到 5min 才使谱图接近基线(图 1 中的 A~D),而且因内标忽高忽低使定量结果的重复性太差(图 1 中 B~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 1 中 E~F)。内标峰稳定而重复性好(图略)。

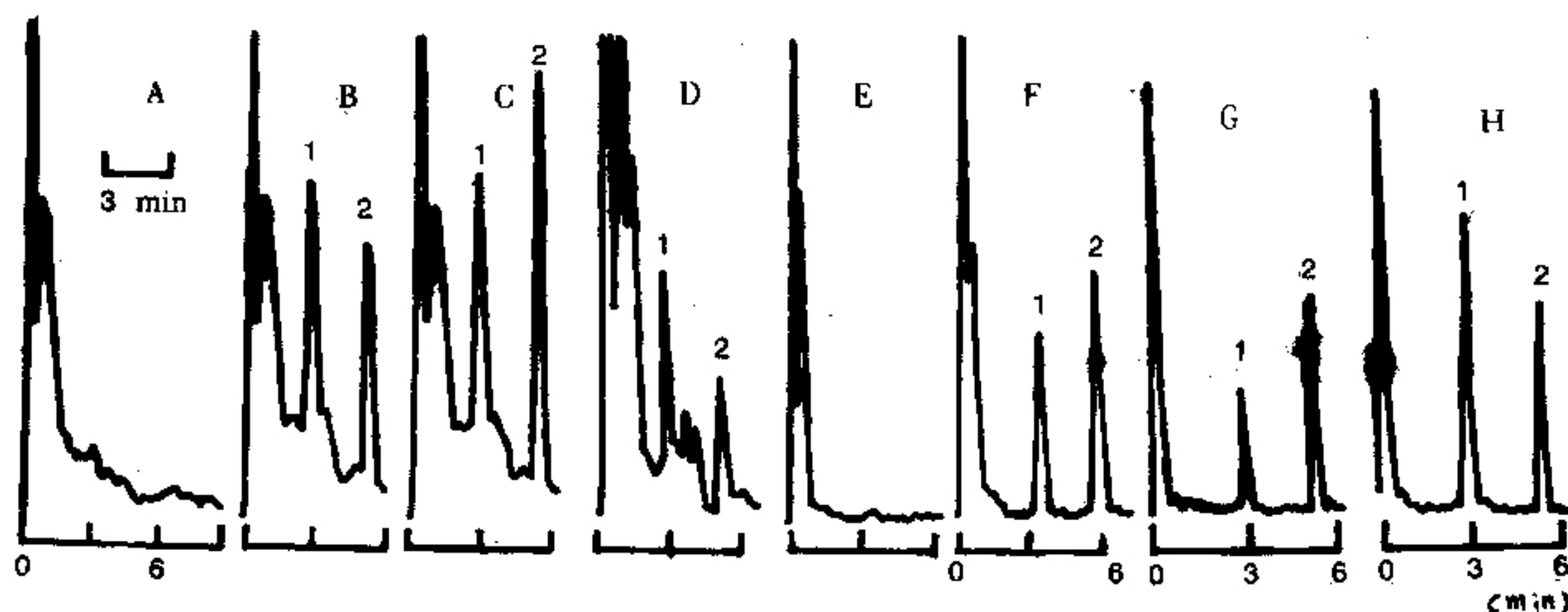


图1 人血清样品经乙醚(A~D)和沸水浴(E~F)处理后的色谱图的比较;峰1为FA,峰2为内标;A和E为空白血清;B、C和F为空白血清加FA和内标;D为口服冠心Ⅱ号后的血清样品;G和H为健康人口服冠心Ⅱ号后血清样品沸水浴处理的色谱图;G不加FA;H为加FA

2 定性分析 用2D-HPLC定性结果,见图1。健康人服用冠心Ⅱ号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,并可初步定性(图1中G和H)。分光光度计测定值说明沸水浴对FA的最大紫外吸收无影响。FA加入血清的紫外吸收波长的最大吸收亦为320nm,约280nm处的肩峰略高是由于血清所致(图略)。3D-HPLC色谱结果表明健康人服用冠心Ⅱ号后血清中一成分与FA对照品的一致。故可将1号峰鉴定为FA。

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、67.4、134.8、269.6、539.2、1078.4和2156.8 $\mu\text{g/L}$ 。每个浓度组6个样品,进样量33.7 $\mu\text{g/L}$ 组为200 μl ,余为50 μl 。测得标准曲线: $Y = 0.0022X + 0.0713$, $r = 0.9993$ 。

4 回收率及精密度试验 3种浓度按样品预处理项下和标准曲线项下处理和测定。血清FA的方法回收率见表1,其平均回收率为 $(93.59 \pm 2.36)\%$ 。精密密度为日内(24h内)测定结果的统计分析,日间精密密度为30天内日间测定结果的统计分析,见表2。

5 检测限 FA的最低检出限为6ng。按样品预处理项下操作测定,水浴10min时的最低检测浓度为20.2 $\mu\text{g/L}$ (以上的信/噪比为3)。

表1 FA在血清测定的方法回收率

加入量 ($\mu\text{g/L}$)	样本数	测定值 ($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$)	回收率 (%)	变异系数 (%)
33.7	5	31.40 ± 1.46	93.17	4.63
269.6	5	258.80 ± 10.13	96.14	3.92
2156.8	5	1972.80 ± 71.21	91.47	3.61

表2 FA在血清测定的精密密度 ($\pm\%$)

加入量 ($\mu\text{g/L}$)	样本数	日内(24h)误差 变异系数	样本数	日间误差 变异系数
33.7	8	4.59	5	6.16
269.6	9	3.89	5	7.89
2156.8	8	3.62	5	8.44

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(见图1中的E~H)对FA的干扰,而乙醚法则存在上述困扰(见图1中的A~D)。

7 本方法采用健康自愿者空腹服冠心Ⅱ号汤(3g/kg)前及后5、10、15、30、45、60、90、120、180和240min取血得血清1ml,置 -18°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。结果健康人服冠心Ⅱ号后血清FA的药动学(PK)参数为: $K_e = 0.0012\text{min}^{-1}$; $K_a = 0.6083\text{min}^{-1}$; $t_{1/2K_a} = 1.1394\text{min}$; $t_{1/2K_e} = 563.0283\text{min}$; $T_p = 14.1881\text{min}$; $C_{\max} = 40.6316\text{mg/L}$; $AUC = 33421.8710\text{mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$; $Cl/F_{(s)} = 0.0008\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; $V/F_{(c)} = 0.6738\text{L/kg}$ 。

讨 论

1 方法学色谱图和数据(图1,表1~2)表明:本研究建立了服用冠心Ⅱ号后血清FA测定的新方法,该方法特点是简便、高效、无毒、灵敏、精确、价廉、快速而专一。体现如下:仅一步性提取,不需要有机溶剂一步性提取时的氮气吹干并重溶,因此远为简便、省时和价廉,并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。这是经典法及我们以往用乙晴法⁽¹⁾、三氯甲烷提取补骨脂素⁽²⁾、川芎嗪⁽³⁾等预处理法所无法比拟的。

2 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来确定,而本研究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,很有必要,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,为进一步定量奠定基础。

3 迄今所有复方 PK 文献⁽⁴⁻¹¹⁾中的血样预处理没有采用水浴法。水浴法可能“较适合”复方生物药物分析法;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,当它们在血清中被沸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基本一致;另一“较适合”的依据是:血清中源自复方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浴法的原因。

4 PK 参数表明健康人服用较大剂量的冠心 II 号后,血清中 FA 吸收非常迅速(见 K_a 、 $t_{1/2K_a}$ 和 T_p 值),消除缓慢(见 K_e 、 $t_{1/2K_e}$ 和 $Cl/F_{(s)}$ 值)。为汤剂药效迅速提供了直接临床 PK 证据。其 PK 的其他意义需要进一步研究。

5 作为一个新方法,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,用水浴法提取的规律性如何?水浴时间如在本文中延长至 15min 如何?对色谱柱的污染如何?加预柱或样品上清过滤后对柱子的影响如何?水浴加强酸等改变条件时的提取效果,除蛋白效果如何均不清楚,我们正在研究中。

参 考 文 献

1. Wen AD, Jiang YP, Huang X, et al. Pharmacokinetics of ferulic acid in rabbits with blood stasis. J Chin Pharmaceu Scien 1995;4(4):199—204.
2. 黄 熙,蒋永培,杨易灿,等.补骨脂素混合结晶在健康和 S_{180} 小鼠体内的药代动力学研究.中草药 1991;22(8):361—367.
3. 任 平,黄 熙,蒋永培,等.四君子汤对脾虚大鼠胃动素及川芎嗪药物动力学特征的影响.中国中西医结合杂志 1997;17(1):45—47.
4. Kano Y, Sakurai T, Saitto K. Pharmacological properties of galenical preparation XII Chinese traditional prescription “KANZOBUSITO” in rat portal blood after oral administration. Shoyakugaku Zasshi 1989;43(3):199—203.
5. 矢船明史,丁宗铁.小青龙汤投与後の血中エフェドリン動態.日本东洋医学杂志 1992;43(2):275—283.
6. Nishioka Y, Kyotani S, Miyamura M, et al. Influence of time of administration of a Shosaikoto extract granule on blood concentration of its active constituents. Chem Pharm Bull 1992;40(5):1335—1337.
7. 黄 熙,蒋永培,臧益民,等.方剂化学成分药代动力学研究进展.中草药 1995;26(10):546—549.
8. 黄 熙,马 援,蒋永培,等.“证治药动学”假说的科学依据及前景.见陈可冀主编:迈向 21 世纪的中西医结合.北京:中国医药科技出版社,1991:207—216.
9. 黄 熙,陈可冀,任 平.“复方效应成分动力学”新假说:科学证据、要素、意义及前景.中国中药杂志 1997;22(4):250—252.
10. 汪宝琪,庞志功,朱慧勤.用 β -CD 单分子胶束荧光技术监测秦艽中龙胆苦甙血药浓度.沈阳药学院学报 1994;11(4):242—245.
11. 黄 熙,文爱东,臧益民.方剂化学成分代谢动力学研究能否进行?中国中西医结合杂志 1995;15(5):308—309.

(收稿:1998-05-06 修回:1998-09-25)

中国中西医结合学会精神疾病专业委员会全国第六届学术研讨会征文通知

经中国中西医结合学会批准,精神疾病专业委员会于 1999 年第 4 季度召开全国第六届中西医结合学术研讨会,征文范围如下:(1)近 3 年来有关中西医结合精神科临床、实验研究及理论探讨的未在全国性刊物公开发表的文章。(2)专业委员会制订的精神分裂症、躁狂抑郁症和神经症辨证分型标准的临床验证文章。(3)新方剂的临床试用经验及探索。文章内容应体现科学性、先进性和具有实用价值。每篇论文应交全文及 500~1000 字的摘要各 1 份,同时交审稿费 10 元。来稿需经本单位同意,再由各省、市、自治区中西医结合分会统一寄至:北京德胜门外,北京安定医院(邮政编码:100088)贾宏晓医师收。截稿日期:1999 年 5 月 31 日(以邮戳为准)。会议地点:暂定杭州,具体日期另行通知。