

# HPLC 测定口服养阴通脑颗粒方后大鼠 血清中阿魏酸含量

葛立军<sup>1</sup>, 韩进<sup>2</sup>, 李金辉<sup>2</sup>, 张宇燕<sup>1</sup>, 项丽<sup>1</sup>, 万海同<sup>2\*</sup>

(1. 浙江中医药大学生物工程学院, 杭州 310053;

2. 浙江中医药大学心脑血管研究所, 杭州 310053)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 法测定口服养阴通脑颗粒方后大鼠血清中阿魏酸浓度的方法。方法: 健康 SD 大鼠 ig 养阴通脑颗粒水溶液后, 制备含药大鼠血清。HPLC 法测定大鼠含药血清中阿魏酸的含量。采用 phenomenex GEMINI C<sub>18</sub> 柱色谱柱, 甲醇-3% 乙酸(32:68, v/v) 为流动相; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长 323 nm。结果: 阿魏酸 0.33~10.56 μg·mL<sup>-1</sup> 与峰面积线性关系良好( $r=0.9992$ ), 平均回收率为 96.41%, RSD 2.36% ( $n=6$ ); 平均日内精密度 RSD 2.04%, 平均日间精密度 RSD 5.04%, 以信噪比 S/N=3 时测得的最低检测限为 2.6 ng, 血浆中的最低检测浓度为 0.075 μg·mL<sup>-1</sup>。结论: 该方法简便, 灵敏度高, 稳定性及精密度较好, 可用于大鼠血清中阿魏酸的含量测定。

[关键词] 养阴通脑颗粒; 血清; 阿魏酸; 高效液相色谱法

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)03-0071-03

## Determination of Ferulic Acid in Serum after Oral Administration of Yangyin Tongnao Granules by HPLC in SD Rats

GE Li-jun<sup>1</sup>, HAN Jin<sup>2</sup>, LI Jin-hui<sup>2</sup>, ZHANG Yu-yan<sup>1</sup>, XIANG Li<sup>1</sup>, Wan Hai-tong<sup>2\*</sup>

(1. College of Biological Engineering,

2. Institute of Cardio-cerebral Vessel Disease, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for determination of ferulic acid concentrated in the serum of SD rats treated by Yangyin Tongnao Granules(YTG) decoction. **Methods:** SD rats serum containing Chinese herbal formula by intragastric administrating YTG was prepared. The determination was carried out with HPLC, using phenomenex GEMINI-C<sub>18</sub> column, methanol, and 3% acetic acid (32:68) was used as mobile phase with a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, and at the detection wave length of 323 nm. **Results:** The calibration curve showed a good linearity over the range of 0.33~10.56 μg·mL<sup>-1</sup> ( $r=0.9992$ ). and the average recovery for 96.41%, RSD=2.36% ( $n=6$ ), RSD=2.04% was less within day and RSD=5.04% was less than 10% day-to-day. and the minimum detection amount was 2.6ng and the minimum detection concentrations in serum was 0.075 μg·mL<sup>-1</sup>, when the signal-to-noise ratio S/N=3. **Conclusion:** This method was rapid, sensitive, stable and exact, It was appropriate for the quantitative determination of ferulic acid in the rat serum.

[Key words] Yangyin tongnao granule; serum; ferulic acid; HPLC

[收稿日期] 2009-10-09

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30672652, 30973933)

[通讯作者] \* 万海同, Tel: (010) 86613711; E-mail: wanhaitong@zjtcn.net

养阴通脑颗粒是按养阴益气活血方药组方原理的经验方,由黄芪、川芎、葛根等中药组成,具有养阴生津、益气活血等功效,主要用于脑缺血疾病的治疗,现已获得国家食品药品监督管理局临床研究批件,批号:2003L00206。组方中川芎为血中气药,具有活血行气等功效。阿魏酸(FA)是川芎中主要活性成分之一,是一种油溶性的抗氧化物质,具有抗血小板聚集、抗炎、抗氧化、扩张冠状动脉,增进冠脉流量等药理作用,临床主要用于血瘀证的治疗。阿魏酸的测定方法一般有 HPLC 法、TLC 法及高效毛细管电泳法<sup>[1~3]</sup>。

探讨以特征成分为代表的中药复方内在物质基础的药动学和药效学之间的相关性,是探明中药复方作用机制的重要方法。本实验建立了正常大鼠灌胃养阴通脑颗粒制剂后血清中阿魏酸浓度的 HPLC 测定方法,对进一步了解该方的作用机制,探讨本复方药动学和药效学相关性提供研究方法,现报道如下:

## 1 材料

**1.1 仪器与设备** 岛津 LC-10ATVP 液相色谱仪:CTO-10AVP 柱温箱,7725i 手动进样阀,LC-10ATVP 高压泵,SPD-10AVP 紫外-可见检测器,岛津 CLASS-VP 色谱工作站;Universal32 高速离心机,德国 Hettich 公司;TC-30 恒温水浴箱,浙江海宁医药器材厂;超纯水仪,美国密理博 Millipore 有限公司;Mettler Toledo AG135 型电子天平,瑞士梅特勒公司。

**1.2 试药** 阿魏酸对照品(110773-200611)中国药品生物制品检定所提供;7-羟基香豆素(111739-200501)中国药品生物制品检定所提供;甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。养阴通脑颗粒方(浙江中医药大学心脑血管研究所提供,配制成含生药  $2.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  养阴通脑颗粒溶液)。

**1.3 动物** 雄性健康 SD 大鼠 SPF 级,体重( $150 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$ )。购自浙江省医学科学院浙江省实验动物中心。合格证号:SYXK(浙)2003-0001。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** phenomenex GEMINI  $\text{C}_{18}$  柱,  $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ; 流动相: 甲醇-3% 乙酸(32:68, v/v); 柱温:  $30^\circ\text{C}$ ; 流速:  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 检测波长:  $323 \text{ nm}$ , 进样量:  $20 \mu\text{L}$ 。

**2.2 对照品储备液的制备** 精密称取阿魏酸对照品  $6.6 \text{ mg}$ , 置  $25 \text{ mL}$  容量瓶中, 用甲醇-3% 乙酸(32

68) 流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀。制成阿魏酸浓度为  $0.66 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品溶液。精密称取内标 7-羟基香豆素对照品  $5.0 \text{ mg}$ , 置  $25 \text{ mL}$  容量瓶中, 用甲醇-3% 乙酸(32:68) 流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀。制成 7-羟基香豆素浓度为  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品溶液。密封后于  $4^\circ\text{C}$  冰箱保存。

**2.3 对照品溶液的制备** 准确移取对照品储备液适量, 用流动相逐步稀释制成不同浓度( $0.33, 0.66, 1.32, 2.64, 5.28, 10.56 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 阿魏酸对照品溶液。

**2.4 含药血浆样品的制备** 大鼠以  $10\%$  水合氯醛  $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  ip 麻醉, ig 养阴通脑颗粒水溶液  $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  后仰卧固定于手术台上, 从颈动脉取血, 以肝素抗凝, 离心后吸取上清液获得含药血浆。同法以水 ig 得到空白血浆。

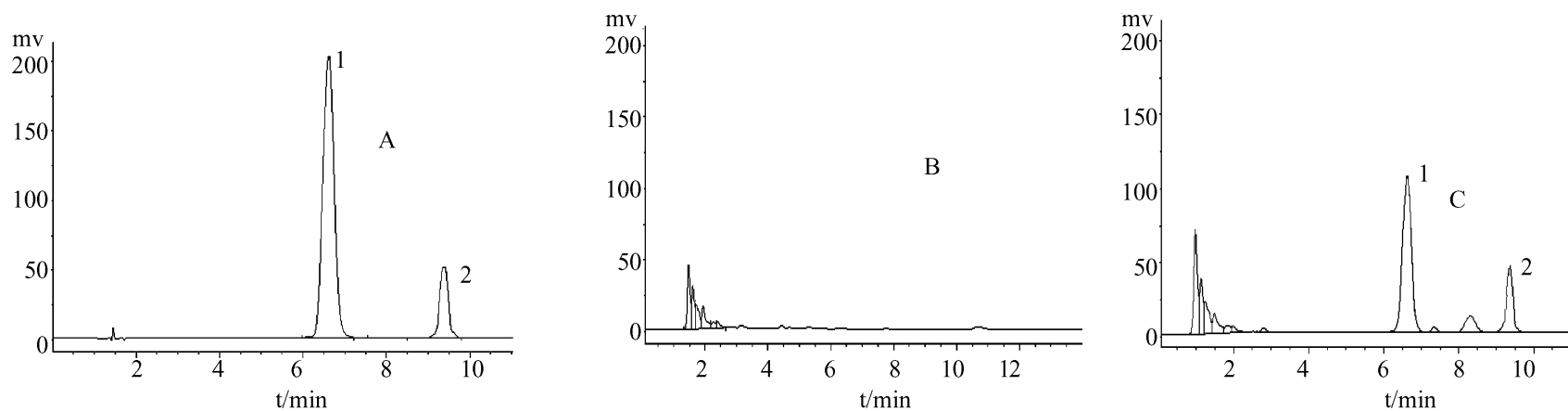
**2.5 血样预处理方法** 吸取  $0.2 \text{ mL}$  血浆, 置于  $1.5 \text{ mL}$  具塞尖底离心管中, 加入 7-羟基香豆素内标溶液( $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )  $50 \mu\text{L}$ , 震荡混匀后, 加入甲醇  $2 \text{ mL}$ , 在电动混匀器上充分混匀  $1 \text{ min}$ ,  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $15 \text{ min}$ , 取上清液于  $5 \text{ mL}$  离心管中,  $40^\circ\text{C}$  氮气吹干, 加入流动相至  $1.0 \text{ mL}$ , 在电动混匀器上充分混匀后,  $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $10 \text{ min}$ , 取上清液待测。

**2.6 标准曲线的制备** 精密吸取空白血浆  $0.2 \text{ mL}$  于  $1.5 \text{ mL}$  离心管中, 在每管中分别加入内标液 7-羟基香豆素对照品溶液  $50 \mu\text{L}$ , 并分别定量加入阿魏酸对照品溶液, 以流动相定容至  $1 \text{ mL}$ , 使其含阿魏酸对照品浓度分别为  $0.33, 0.66, 1.32, 2.64, 5.28, 10.56 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 余按 2.5 项方法进行。

将色谱图上阿魏酸和内标物的峰面积比值与其相对应的浓度值作线性回归, 得到该色谱条件下的阿魏酸的线性回归方程为:  $Y=0.1492X+0.0499$ ,  $r=0.9992$ ; 结果表明: 在  $0.33 \sim 10.56 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内, 阿魏酸呈良好的线性关系。

**2.7 最低检测限** 以信噪比  $S/N=3$  时测得的最低检测限为  $2.6 \text{ ng}$ , 血浆中的最低检测浓度为  $0.075 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**2.8 回收率和精密度考察** 取空白血浆作底物, 在线性范围内配制高、中、低 3 个浓度的阿魏酸作为已知样品, 分别加入对照品阿魏酸含量分别为  $0.33, 2.64, 10.56 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $n=6$ ), 按照血样预处理方法进行测定, 选择日内不同时间和不同天检测同一



A. 阿魏酸对照品溶液; B. 空白血清; C. 样品血清 + 内标;  
1. 阿魏酸; 2. 7-羟基香豆素

图 1 大鼠血清阿魏酸色谱图

已知样品, 将其理论值与测定值相比得其回收率, 并计算日内和日间精密度。

表 1 阿魏酸测定的回收率考察 (n=6)

理论值 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	测定值 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	回收率 (%)	RSD (%)
0.33	0.323 ± 0.016	94.85	3.06
2.64	2.527 ± 0.226	95.72	2.47
10.56	10.418 ± 0.285	98.66	1.56

表 2 阿魏酸测定的精密度考察 (n=6)

理论值 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	日内精密 度 / %	理论值 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	日间精 密度 / %
0.33	2.76	0.33	6.34
2.64	1.57	2.64	4.69
10.56	1.80	10.56	4.08

结果表明, 大鼠血浆中高, 中, 低浓度的回收率基本符合要求, 平均回收率为 96.41%, RSD = 2.36% (n=6), 表明方法重现性好, 稳定, 可靠; 大鼠血浆中高, 中, 低浓度的平均日内精密度 RSD 为 2.04%, 平均日间精密度 RSD = 5.04%, < 10%, 符合要求, 表明该条件下阿魏酸的稳定性较好, 符合测定要求。

**2.9 样品血药浓度测定** 取已制备的血浆样品按照 2.5 项下方法处理后, 取 20  $\mu\text{L}$  注入高效液相色谱仪中, 测定峰面积, 由标准曲线计算出阿魏酸的血药浓度。结果见图 1(C) 和表 3。

### 3 讨论

本实验建立的高效液相色谱法测定口服养阴通脑颗粒大鼠血清中阿魏酸的浓度, 具有稳定性强、准确快速而简便的特点。本法在适用于研究阿魏酸体内药动学、为药效学的依据及其规律特点研究提供必要的分析方法。

表 3 阿魏酸血药浓度测定结果 ( $\bar{x} \pm s$ , n=5)

取血时间 (min)	血药浓度 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	取血时间 (min)	血药浓度 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
5	0.541 ± 0.091	60	1.165 ± 0.348
10	1.199 ± 0.373	120	1.056 ± 0.245
15	1.252 ± 0.217	180	0.927 ± 0.065
30	1.242 ± 0.124	240	0.873 ± 0.077

在血样的预处理过程中, 我们在参考其它文献资料的基础上, 尝试采用了二氯甲烷、乙酸乙酯的萃取方法及乙腈、甲醇血浆蛋白质沉淀方法, 从血药浓度测定结果可见, 甲醇沉淀法能较好的回收血样中的阿魏酸, 去除了蛋白质等杂质, 保留了中药复方多成分分析色谱特征, 且分离度较好, 其它成分干扰较少, 为中药复方制剂多成分血清含量色谱同时测定提供了可行性基础。

阿魏酸是弱酸, 水溶性较差, 油溶性较好, 为使阿魏酸的峰形稳定, 分离度好, 本实验采用了不同比例的甲醇-水系统, 甲醇-不同浓度的乙酸系统等进行了试验比较, 最后选取甲醇-3% 乙酸 (32 : 68, v/v) 为流动相。由于中药复方制剂成分多, 进入血样中可能会造成一定相互干扰, 因此血清多成分药动学的测定具有一定的难度, 还有待于进一步研究。

### [参考文献]

- [1] 孙世仁, 黄熙, 张莉, 等. 人血清中阿魏酸和川芎 同时测定的 HPLC 法 [J]. 南京中医药大学学报, 2001, 11 (6): 355.
- [2] 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.
- [3] 孙忠, 彭康. HPLC 法测定补阳还五汤中阿魏酸的含量研究 [J]. 中医药学刊, 2004, 22(5): 833.