

# 反相高效液相色谱法测定人血浆和尿中丹皮酚浓度

吴秀君<sup>1</sup>,李国信<sup>2</sup>,肇丽梅<sup>1\*</sup> (1. 中国医科大学附属第二医院临床药理研究室,沈阳 110004;2. 辽宁中医药大学附属第二医院,沈阳 110042)

**摘要:**目的 建立测定血浆、尿样本中丹皮酚含量的反相高效液相色谱法。**方法** 血浆样品经沉淀蛋白,尿样经稀释后,以乙腈-0.1%磷酸 pH 3.5(55:45)为流动相,经 Diamonsil C<sub>18</sub> 柱分离,进行色谱分析。**结果** 本方法丹皮酚的血浆浓度在 20~1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,尿中浓度在 20~800  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  内线性关系良好,方法回收率在 81.0%~85.0% 之间,日内、日间 RSD 均小于 11.0%。**结论** 本方法简便、快速、灵敏度高,可用于丹皮酚的药动力学研究。

**关键词:**反相高效液相色谱;丹皮酚;人血浆;人尿样

中图分类号:R969.1 文献标识码:A 文章编号:1001-2494(2007)11-0863-03

## Determination of Paeonol in Plasma and Urine by RP-HPLC

WU Xiu-jun<sup>1</sup>, LI Guo-xin<sup>2</sup>, ZHAO Li-mei<sup>1\*</sup> (1. Clinical Pharmacology Laboratory, Second Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China; 2. Second Hospital of Traditional Chinese Medicines University, Shenyang 110042, China)

**ABSTRACT; OBJECTIVE** To establish a method for the determination of paeonol concentration in plasma and in urine. **METHODS** The analysis was conducted on a Diamonsil - C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) column with mobile phase consisting of acetonitrile - 0.1% phosphate acid (55:45, adjusted to pH 3.5 with triethylamine). **RESULTS** Good linearity was obtained in the concentration range of 20 ~ 1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of paeonol in plasma and 20 ~ 800  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  in urine. The average recovery was 81.0% ~ 85.0% at three different concentrations. The RSDs of intra- and inter-day were less than 11%. **CONCLUSION** This method is rapid, sensitive, precise, and can be used in the determination of paeonol in plasma and in urine for the clinical pharmacokinetic study.

**KEY WORDS:** RP-HPLC; paeonol; human plasma; human urine

脑血宁注射液是中药复方制剂,药效学试验表明,该药具有平肝熄风、凉血化痰、豁痰开窍等功效。为评价该复方制剂的体内过程,本试验选择组方中牡丹皮的主要成分丹皮酚作为药物体内过程的评价指标。关于丹皮酚的体内过程研究,已有动物试验的结果<sup>[1-5]</sup>,给出单味药中丹皮酚的血浆经时过程。本试验在文献基础上,建立了测定复方制剂中丹皮酚体内浓度的高效液相色谱法,并考察了 10 名男性健康受试者单剂量静脉滴注给药后,丹皮酚的体内血药浓度经时过程和尿药排泄率,旨在为临床用药提供参考数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品与试剂

脑血宁注射液(含丹皮酚 120 mg,批号 030408,青海圣域医药科技有限公司);丹皮酚对照品(中国药品生物制品检定所,批号为 0708-9704,纯度为 99.3%),肉桂酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号为 0786-9802,纯度为 >99%)。甲醇、乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯;空白人血浆(中国

医科大学附属第二医院输血科)。

### 1.2 仪器与色谱条件

日本岛津 10AT 高效液相色谱仪。色谱条件:色谱柱 Diamonsil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:乙腈-0.1%磷酸(三乙胺调节 pH 至 3.5) 55:45;流速:1.0 mL · min<sup>-1</sup>;检测波长:274 nm;柱温为 30 °C;进样量为 20  $\mu\text{L}$ 。

### 1.3 研究对象

经医学伦理委员会批准本试验方案后,选择健康男性志愿受试者 10 名,平均年龄(22.5 ± 1.5)岁,体重(67.2 ± 7.8) kg,体重指数为 20~24。全部受试者无既往病史,肝、肾功能及心电图检查正常。在充分了解本试验的目的、意义及可能出现的不良反应后,签署知情同意书。

### 1.4 给药及采样

10 名受试者于试验前 1 d 吃清淡晚餐后禁食,试验日空腹单剂量静脉滴注脑血宁注射液 100 mL(含丹皮酚 120 mg),于 1 h 内滴完。

#### 1.4.1 血浆样本采集

分别于给药前及给药开始

作者简介:吴秀君,女,硕士 \* 通讯作者:肇丽梅,女,教授,硕士生导师

Tel: (024) 83956565

E-mail: zhaolm@cmu2h.com

后的 0, 0.17, 0.33, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 7.0, 10.0 h, 经前臂静脉由留置针采血 5 mL 置肝素化试管中,  $3\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min, 分离血浆, 置  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中冻存待测。

**1.4.2 尿样采集** 受试者于给药前排空膀胱, 留取空白尿。分别收集给药开始后 0~2, 2~4, 4~6, 6~10 h 尿样, 准确量取体积, 留取 15 mL 于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中冻存待测。

### 1.5 生物样本中丹皮酚浓度测定

**1.5.1 生物样本预处理** ① 血浆样本预处理: 精密量取 0.2 mL 血浆于具塞 5 mL 小塑料管中, 加 50  $\mu\text{L}$  甲醇, 再加入 50  $\mu\text{L}$  内标 ( $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  肉桂酸甲醇溶液), 加 0.4 mL 乙腈, 涡旋混合 1 min,  $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min, 吸取上清液 20  $\mu\text{L}$  进样。② 尿样预处理: 精密量取尿液样本 0.5 mL, 加 50  $\mu\text{L}$  甲醇, 再加 0.5 mL 甲醇, 涡旋混合 30 s,  $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 吸取上清液 20  $\mu\text{L}$  进样。

**1.5.2 数据处理** 血药浓度的达峰时间 ( $t_{\max}$ ) 和达峰浓度 ( $\rho_{\max}$ ) 采用实测值, 采用梯形法计算药-时曲线下面积 (AUC), 末端消除速率常数 ( $K_e$ ) 由消除相浓度点取半对数线性回归而得, 以尿药浓度与排尿量计算尿药排泄率。

## 2 结果

### 2.1 分析方法确证

**2.1.1 色谱行为** 在所选用的色谱条件下, 空白样品、空白样品加对照品及受试者给药后样品的色谱图见图 1, 2。从色谱图中可见, 生物样本中内源性物质及共存物质不干扰丹皮酚测定。

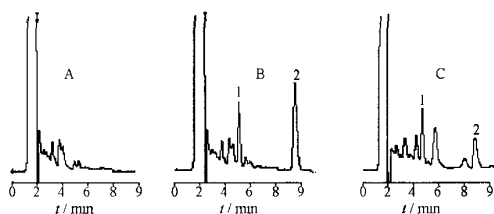


图 1 丹皮酚的血浆样品色谱图

A - 空白血浆; B - 空白血浆加对照品; C - 血浆样品; 1 - 内标; 2 - 丹皮酚

Fig 1 Chromatography of paeonol in plasma

A - blank plasma; B - plasma spiked with reference; C - plasma sample; 1 - IS; 2 - paeonol

**2.1.2 标准曲线** 准确吸取空白血浆 0.2 mL 6 份, 依次加入丹皮酚标准系列溶液 50  $\mu\text{L}$ , 配制质量浓度相当于 20, 50, 100, 250, 500, 1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的血浆样本。另取尿样 0.5 mL 6 份, 配制浓度相当于 20, 50, 100, 200, 400, 800  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的尿液样本。按“1.5.1”项下操作, 制备标准曲线。以生物样本中

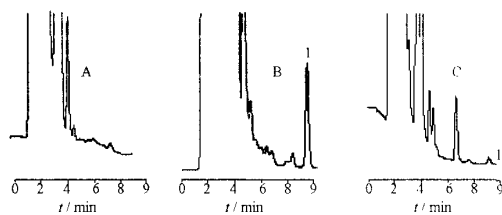


图 2 丹皮酚的尿液样品色谱图

A - 空白血浆; B - 空白血浆加对照品; C - 血浆样品; 1 - 丹皮酚

Fig 2 Chromatography of paeonol in urine

A - blank urine; B - urine spiked with reference; C - urine sample; 1 - paeonol

待测物的浓度为横坐标, 以待测物与内标的峰面积比 (血样) 或峰面积 (尿样) 为纵坐标, 用加权最小二乘法进行回归计算, 求得直线回归方程, 即为标准曲线。本法的标准曲线分别为: 血浆样本  $Y = -0.0165 + 5.0119 \times 10^{-3}\rho$  ( $r = 0.9999$ ); 尿液样本  $Y = -555.4866 + 50.6171\rho$  ( $r = 0.9995$ )。根据标准曲线, 血浆样本中丹皮酚的线性范围为 20~1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 尿样中丹皮酚的线性范围为 20~800  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。最低定量浓度均为 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**2.1.3 精密性与准确度** 取空白血浆 0.2 mL 15 份, 尿样 0.5 mL 15 份, 按“2.1.2”项下操作, 配制质量浓度分别为 50, 250, 1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  血浆样本, 质量浓度分别为 50, 200, 800  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  尿样, 每个质量浓度平行 5 样本, 计算精密性和准确度。求得血浆样本低、中、高 3 个质量浓度的日内 RSD 分别为 7.28%, 8.02% 和 1.55%, 日间 RSD 分别为 1.58%, 8.37% 和 10.7%; 尿液样本低、中、高 3 个质量浓度的日内 RSD 分别为 1.44%, 2.50% 和 4.59%, 日间 RSD 分别为 1.73%, 3.25% 和 2.53%。血浆样品平均相对回收率分别为 96.7%, 105.8% 和 105.6%; 尿样平均相对回收率分别为 110.8%, 108.0% 和 105.8%。

**2.1.4 提取回收率** 取空白血浆 0.2 mL 15 份, 尿样 0.5 mL 15 份, 同“2.1.3”项下操作, 以提取后的色谱峰面积与相同浓度样本未经提取获得的色谱峰面积之比, 考察样本绝对提取回收率。结果表明, 血浆样本中低、中、高 3 种质量浓度的提取回收率分别为 85.2%, 87.7% 和 89.8%; 尿样低、中、高 3 种质量浓度的提取回收率分别为 81.3%, 85.6% 和 83.2%。

**2.1.5 样品稳定性** 按“2.1.2”项下操作, 分别配制高、中、低 3 种浓度的血浆样本及尿液样本, 考察其反复冻融 3 次,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻放置 30 d 及生物样本处理后室温放置 24 h 的稳定性, 结果表明, 丹皮酚血液及尿液样本反复冻融 3 次,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻放置 30

d 均较稳定,生物样本处理后室温放置 8 h 基本稳定。

## 2.2 人体试验结果

**2.2.1 丹皮酚体内经时过程** 按“1.5”项下操作,测定受试者血浆样品,并以当日的标准曲线计算各时刻样品中丹皮酚的浓度,平均药物浓度-时间曲线见图 3。10 名受试者静脉滴注脑血宁注射液后,丹皮酚的主要药动学参数  $t_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $t_{1/2}$ ,  $K_e$ ,  $AUC_{0-10}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  分别为  $(0.87 \pm 0.31) h$ ,  $(765.0 \pm 194.5) \mu g \cdot L^{-1}$ ,  $(3.72 \pm 0.98) h$ ,  $(0.200 \pm 0.060) h^{-1}$ ,  $(1453.9 \pm 413.2) \mu g \cdot h \cdot L^{-1}$ ,  $(1658.5 \pm 460.0) \mu g \cdot h \cdot L^{-1}$ 。

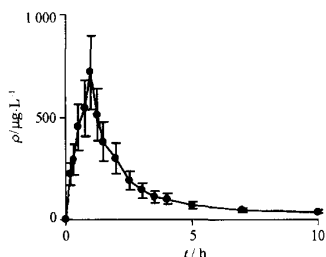


图 3 10 名受试者静脉滴注脑血宁注射液开始后血浆药物浓度-时间曲线.  $n=10, \bar{x} \pm s$

**Fig 3** Plasma concentration profiles of paeonol in naoxuening injection after iv administration to 10 healthy volunteers.  $n=10, \bar{x} \pm s$

**2.2.2 尿液排泄率测定** 根据尿中浓度数据和记录的尿液体积求算 10 名受试者静脉滴注脑血宁注射液后丹皮酚原形药物的排泄量及各时间段尿排泄率,结果见表 1。脑血宁注射液给药后 10 h 内,约占总剂量  $(0.044 \pm 0.021) \%$  的丹皮酚以原形从尿中排出,不同个体尿中丹皮酚排泄率差别较大。

表 1 丹皮酚各时间段平均尿排量及排泄速率.  $n=10, \bar{x} \pm s$

**Tab 1** Total amount and excretion rate of paeonol in urine in different time phase.  $n=10, \bar{x} \pm s$

t/h	Total amount/ng	Excr. rate/ng · h <sup>-1</sup>
0~2	23 515 ± 13 874	11 758 ± 6 937
2~4	15 586 ± 66 76	7 793 ± 3 338
4~6	11 326 ± 4 387	5 663 ± 2 193
6~10	6 245 ± 2 961	1 561 ± 740

## 3 讨论

丹皮酚的挥发性较强,本试验曾分别考察用氯仿,乙醚及混合溶剂提取血浆样本中的丹皮酚,但均未获得稳定的提取回收率,因此,本实验采用乙睛沉淀蛋白进行血浆样品处理,内源性物质及共存物质不干扰测定,丹皮酚在  $20 \sim 1000 \mu g \cdot L^{-1}$  内呈良好线性关系。

脑血宁注射液为中药复方制剂,成分复杂,加之尿液样本中内源性物质的干扰,在尿液样本测定时,未选到合适内标,故采用外标法定量分析,结果表明,尿样中丹皮酚在  $20 \sim 800 \mu g \cdot L^{-1}$  内线性关系良好 ( $r=0.9995$ ),最低定量浓度为  $20 \mu g \cdot L^{-1}$ ,内源性物质及共存物或代谢物不干扰测定。

丹皮酚有挥发性,且较易氧化,生物样本处理后室温放置 24 h,中、高浓度稳定性较好,而低浓度稳定性较差,约减少 15%,但室温放置 8 h 的结果基本稳定,提示丹皮酚生物样本处理后应尽快分析。

健康志愿者静脉滴注脑血宁注射液后,体内丹皮酚的血浆浓度较低,仅有约给药量 0.044% 的原形药物从尿中排出,该结果提示,丹皮酚在体内进行广泛代谢,与文献报道相符<sup>[6]</sup>。

## REFERENCES

- [1] WANG B Q, PANG Z G, ZHANG Q. Comparative study on ADME of paeonol in cortex moutan and in cynanchum paniculatum [J]. *J Xi'an Med Univ* (西安医科大学学报), 1995, 16 (1): 47-48.
- [2] WANG G R, WANG D Z, LU Y, et al. Pharmacokinetic study of zhi tong si hao [J]. *J Changchun Coll Tradit Chin Med* (长春中医药大学学报), 2001, 17 (4): 45.
- [3] SUN Y C, SHEN Y X, SUN G P, et al. Determination of paeonol in mice serum by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2004, 24 (1): 7-9.
- [4] WU X, CHEN H, CHEN X, et al. Determination of paeonol in rat plasma by high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetic studies following oral administration of Moutan cortex decoction [J]. *Biomed Chromatogr*, 2003, 17 (8): 504-508.
- [5] TSAI T H, CHOU C J, CHEN C F. Pharmacokinetics of paeonol after intravenous administration in rats [J]. *J Pharm Sci*, 1994, 83 (9): 1307-1309.
- [6] TAKAOKI Y, RINKO K, TAKAHIRO N, et al. Metabolism of paeonol in rats [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62: 1142-1144.

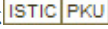
(收稿日期:2006-09-20)

## 关于《中国药理学杂志》、《中国医院药学杂志》启用在线投稿系统的通知

《中国药理学杂志》、《中国医院药学杂志》“稿件远程处理系统”已启用,请广大作者尽量通过“稿件远程处理系统”在线投稿(网址为 <http://www.cpa.org.cn/onlinetg.htm>)或点击中国药学会网站首页([www.cpa.org.cn](http://www.cpa.org.cn))右边的“杂志在线投稿”图片进入系统。

由于本系统正处于测试阶段,前期投稿作者务必将打印稿(如已在线投稿请务必注明稿号)、单位介绍信及审稿费 50 元(进入外审阶段时寄)直接邮寄至本刊编辑部。如有疑问,请 E-mail 联系我们: E-mail: zgyzxx@yahoo.com.cn。 [本刊讯]

# 反相高效液相色谱法测定人血浆和尿中丹皮酚浓度

作者: [吴秀君](#), [李国信](#), [肇丽梅](#), [WU Xiu-jun](#), [LI Guo-xin](#), [ZHAO Li-mei](#)  
作者单位: [吴秀君,肇丽梅,WU Xiu-jun,ZHAO Li-mei\(中国医科大学附属第二医院临床药理研究室,沈阳,110004\)](#), [李国信,LI Guo-xin\(辽宁中医药大学附属第二医院,沈阳,110042\)](#)  
刊名: [中国药学杂志](#)   
英文刊名: [CHINESE PHARMACEUTICAL JOURNAL](#)  
年,卷(期): 2007,42(11)

## 参考文献(6条)

1. [WU X;CHEN H;CHEN X](#) [Determination of paeonol in rat plasma by high-performance liquid chromatography and its application to pharmaeokinetic studies following oral administration of Moutan cortex decoction](#) 2003(08)
2. [SUN Y C;SHEN Y X;SUN G P](#) [Determination of paeonol in mice serum by reversed-phase high performance liquid chromatography](#)[期刊论文]-[中国医院药学杂志](#) 2004(01)
3. [WANG G R;WANG D Z;LU Y](#) [Phamlacokinetic study of zhi tong si hao](#)[期刊论文]-[长春中医学院学报](#) 2001(04)
4. [TAKA AKI Y;RINKO K;TAKAHIRO N](#) [Metabolish of paeonol in rats](#)[外文期刊] 1999(8)
5. [TSAI T H;CHOU C J;CHEN C F](#) [Pharmacokinetics of paeonol after intravenous administration in rats](#)[外文期刊] 1994(09)
6. [WANG B Q;PANG Z G;ZHANG Q](#) [Comparative study on ADME of paeonol in cortex moutan and in cynanchum paniculatum](#) 1995(01)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zgyxzz200711018.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgyxzz200711018.aspx)