

毛细管,使插入端刚好接触气管底部表面,2 h后观察各鼠的痰液分泌量(以占毛细管长度计),并比较组间差异性(表5)。结果显示,高、中剂量的XDBM与阴性组比较能显著增加大鼠排痰量。表明XDBM具有显著祛痰作用。

表5 熊胆贝母止咳胶囊对大鼠排痰量的影响(\bar{x} , $\bar{x} \pm s$)

Groups	Dose/ $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$	n	Length of sputum
Negative	NS	12	1.48 \pm 0.66
Amchlor	1.0	11	4.90 \pm 0.69*
High dose of XDBM	4.44	10	4.81 \pm 0.71*
Middle dose of XDBM	2.22	10	5.13 \pm 0.68*
Low dose of XDBM	1.11	10	5.84 \pm 0.90*

Compared with control group: * $P < 0.01$

1.2.6 统计处理 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS10.0统计软件对组间差异进行组间比较。

2 讨论

急性支气管炎和慢性支气管炎急性发作期证属外感咳嗽,主要临床表现是咳嗽、咯痰等,起病急,常伴恶寒、发热等表证^[1]。熊胆贝母止咳胶囊中的主药熊胆粉具有镇静、抗惊、解热、解痉、利胆、抑菌等作用,对小鼠氨水气雾化致咳具有明显的镇咳作用^[2]。浙贝母中含多种生物碱,其中贝母甲素和贝

母乙素对支气管平滑肌有明显的松弛作用,对小鼠均有明显的镇咳作用^[3]。儿茶主要成分是儿茶素、表儿茶素和鞣质等,具清热、化痰、止血、消食等功能^[4],在不同的镇咳和祛痰试验中,均显示出明显的减少咳嗽次数、增加气管排痰的作用。黄芩具有清热、泻火、解毒之功^[5]。实验研究表明,熊胆贝母胶囊能显著减少浓氨水刺激所致小鼠、豚鼠的咳嗽次数;能显著促进小鼠气管排痰酚红及显著增加大鼠排痰量的作用;酵母粉所致大鼠发热试验也表明其具有一定的解热作用。

参考文献:

- [1] 徐丽华,王俊,孙子凯. 慢性支气管炎中医辨证现代研究述评与展望[J]. 中华现代中西医杂志, 2003, 1(7): 591 - 593.
- [2] 徐愚聪,王野. 熊胆粉的研究进展[J]. 华西药学期刊, 2000, 15(3): 200 - 202.
- [3] 高文远,李志亮,肖培根. 常用中药浙贝母的研究进展[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(6): 323 - 325, 328.
- [4] 井玥,赵余庆,倪春雷. 儿茶的化学药理与临床研究[J]. 中草药, 2005, 36(5): 790 - 792.
- [5] 陈秀清,齐香君,何恩铭. 中药黄芩研究新进展[J]. 食品与药品, 2006, 8(5): 23 - 27.

收稿日期: 2008 - 03

人血浆中水杨酸的测定及阿司匹林的人体药物动力学研究

周燕文,陈丽,兰聪贤

(广西医科大学第一附属医院国家药品临床研究基地,广西南宁 530021)

摘要: 目的 采用 HPLC - FLU 测定人血浆中阿司匹林活性代谢物水杨酸的浓度,并研究人体内的药动学。方法 采用 Zorbax SB - C₁₈ 色谱柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m),流动相为 0.02 mol \cdot L⁻¹ 乙酸胺(冰醋酸调 pH2.2) - 乙腈 - 四氢呋喃(65:30:5),流速 1.0 ml \cdot min⁻¹。激发波长为 300 nm,发射波长为 405 nm。结果 水杨酸 0.0288 ~ 2.3000 μ g \cdot ml⁻¹ 线性良好($r = 0.999$),最低检测浓度为 28.8 ng \cdot ml⁻¹,方法回收率 92.48% ~ 109.98%,日内、日间 RSD 分别为 3.09% ~ 6.35%、3.08% ~ 7.16%。结论 所建方法操作简便、快速、灵敏、准确、干扰少,适用于测定水杨酸血药浓度及阿司匹林药动学研究。

关键词: 阿司匹林;水杨酸;HPLC - FLU法;血药浓度;药动学

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1006 - 0103(2008)05 - 0572 - 03

Determination of salicylic acid in plasma by HPLC - FLU and pharmacokinetics of aspirin in healthy volunteers

ZHOU Yan - wen, CHEN Li, LAN Cong - xian

(Base of Drug Clinical Test of the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: OBJECTIVE To establish an HPLC - FLU method for the determination of salicylic acid (SA, the metabolite of aspirin) in human plasma and to apply this method to the pharmacokinetics study of salicylic acid. METHODS The samples were separated on a Zorbax SB - C₁₈ column (150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) using a mobile phase containing a mixture of 0.02% CH₃COONH₃ (adjusted to pH2.2 with HAc) - acetonitrile - THF (65:30:5) and a flow rate of 1.0 ml \cdot min⁻¹. Eluents were monitored by fluorescence spectroscopy with excitation wavelength of 300 nm and emission wavelengths of 405 nm. RESULTS The linear range of salicylic acid concentration was

作者简介:周燕文,女,硕士,主任药师,从事新药临床研究。E - mail: zyw7789@sina.com

0.0288 ~ 2.3000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.999$). The limit of detection was 28.8 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, recoveries were 92.48% - 109.98%. The variation coefficients of intra-day ($n=5$) and inter-day ($n=5$) were 3.09% - 6.35% and 3.08% - 7.16%, respectively. **CONCLUSION** The method is simple, rapid, sensitive, accurate, and suitable for the study of pharmacokinetics and bioavailability of aspirin.

Key words: Aspirin; Salicylic acid; HPLC-FLU; Plasma concentration of drug; Pharmacokinetics

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006-0103(2008)05-0572-03

阿司匹林在临床上常用于治疗头痛、风湿痛、风湿性关节炎、痛风症等。小剂量的阿司匹林具有抗血小板聚集的作用,广泛用于防治动脉粥样硬化、心肌梗死、冠心病、脑血管及其他栓塞性疾病^[1]。阿司匹林被吸收后,迅速转化为活性代谢物水杨酸而起作用,因此,常采用测定血中水杨酸浓度的方法来研究阿司匹林的药动学。我们首次采用 HPLC-FLU 法测定水杨酸的血液浓度,并研究了健康受试者口服 25 mg 阿司匹林肠溶片后的体内过程。所建方法可用于小剂量阿司匹林的药物动力学和生物利用度研究,为合理用药提供依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪包括 1525 双元泵、717plus 手动进样器、2475 荧光检测器、Breeze 色谱软件(美国 Waters); TGL-16G 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。阿司匹林肠溶片(南京白敬宇制药厂,批

号:20030309,每片 25 mg);水杨酸对照品(江苏恒瑞医药股份有限公司,99.6%);乙腈、甲醇、四氢呋喃为色谱纯;乙酸胺为分析纯;水为重蒸馏水。

1.2 方法与结果

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈ (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相为 0.02 mol·L⁻¹ 乙酸胺(冰醋酸调 pH2.2)-乙腈-四氢呋喃(65:30:5),流速 1.0 mL·min⁻¹;柱温为室温;检测波长 $E_x=300\text{ nm}$, $E_m=405\text{ nm}$ 。色谱图见图 1,水杨酸的保留时间约为 5.2 min。

1.2.2 血样的采集 试验方案经广西医科大学第一附属医院医学伦理委员会审批,18 名男性健康受试者(体重 62.0 \pm 5.2 kg)自愿签署知情同意书。受试者禁食 10 h 后,于清晨空腹口服 25 mg 阿司匹林肠溶片,分别于服药前和服药后 3、4、5、6、8、10、12、14、16、24、36 h 抽取 3 mL 静脉血。血样置含有肝素的离心管中,立即离心,分离出血浆,置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存待测。

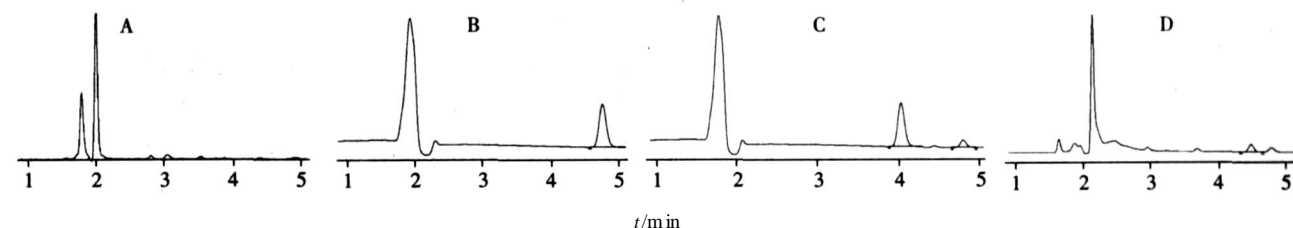


图 1 空白血浆(A)、药物对照品(B)、空白血浆加药物对照品(C)和受试者服药后血浆(D)中水杨酸的色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of salicylic acid in blank plasma solution (A), standard solution (B), blank plasma with standard solution (C) and plasma obtained from a volunteer after administration (D)

1.2.3 血样的处理与测定 精密量取 250 μL 血浆置 2 mL 具塞塑料离心管中,加入 100 μL 10% 三氯乙酸,漩涡振荡 1 min 后,1.3 $\times 10^4$ r·min⁻¹ 离心 7 min,取上清液 20 μL 进样。

1.2.4 数据的处理 T_{max} 、 C_{max} 均用实测值。用消除相时间对浓度的对数进行线性回归。

1.2.5 线性关系与检测限 取 11.5 mg 水杨酸对照品,精密称定,置 10 mL 的棕色量瓶中,用甲醇溶解、定容,配成 1.15 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准贮备液,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,使用时用甲醇稀释至所需浓度。准确吸取 250 μL 空白血浆于 2 mL 塑料离心管中,加入含水杨酸标准贮备液,配成 0.0288、0.0575、0.1440、0.2880、0.0575、1.1500、2.3000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列溶液,漩涡振荡 1 min,混匀,按“1.2.3 项操作,水杨酸 0.0288 ~ 2.3000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的线性良好,回归方程为: $C=1.1 \times$

$10^5 A - 0.9249$ ($r=0.9990$),最低定量浓度为 28.8 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,检测限 ($S/N=3$) 为 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.2.6 相对回收率及精密度试验 配制相当于血浆样品浓度为 0.0575、0.2880、2.3000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准管,按“1.2.3 项操作,测定峰面积,按回归方程计算实测浓度。分别在同日内测定 5 次;连续 5 d 每天测定 1 次,分别考察方法的日内、日间 RSD 和回收率(表 1)。

表 1 血浆中水杨酸相对回收率和日内、日间 RSD ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 1 Recovery, precision of salicylic acid in human plasma ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

$C/\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	Recovery rate/%	Intra-day RSD/%	Inter-day RSD/%
0.0575	109.98 \pm 3.57	3.24	3.08
0.2880	92.48 \pm 2.86	3.09	7.16
2.3000	92.82 \pm 5.90	6.35	3.89

1.2.7 稳定性试验 按“1.2.6 项回收率的测定方法”配制 0.0575 、 0.2880 、 $2.3000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆样品,置 -20°C 冰箱保存,考察血浆样品在冷冻及反复冻融条件下的稳定性。结果显示,血浆样品在冷冻条件下至少可保存 12 d,反复冻融 2 次无明显分解

表 2 水杨酸在 -20°C 冻存及冻融稳定性测定 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Table 2 Results of stability test of salicylic acid in -20°C freezing and after frost thawing cycles ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

C	Freezing				RSD/%	After frost thawing cycles			RSD/%
	0 d	2 d	5 d	12 d		0 time	1 time	2 time	
57.5	61.96	62.33	58.91	59.79	2.69	60.75	61.72	60.44	1.10
288	247.47	259.36	247.04	238.38	3.47	256.50	252.24	253.56	0.86
2.3×10^3	2.17×10^3	2.21×10^3	2.03×10^3	2.21×10^3	4.01	2.16×10^3	2.22×10^3	2.29×10^3	2.86

表 3 质控样品的测定结果 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $n=6$)

Table 3 Results of determination of quality control sample ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $n=6$)

C	Determination	Recovery rate/%	\bar{X}	RSD/%
57.50	64.75	112.6	112.6	3.78
288.00	300.09	104.20	104.20	4.98
2.30×10^3	2.31×10^3	100.43	100.43	5.62

1.2.9 药物动力学研究 18 名健康受试者口服阿司匹林肠溶片 25 mg 后活性代谢物水杨酸的平均血药浓度-时间曲线见图 2。主要药动学参数计算结果 K_e 为 $0.34\pm 0.11 \text{ h}^{-1}$, $C_{\text{max}} = 1495.88\pm 334.32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $T_{\text{max}} = 5.89\pm 1.40 \text{ h}$, $T_{1/2} = 2.20\pm 0.54 \text{ h}$, $AUC_{0-\infty} = 5651.06\pm 845.51 \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$, $AUC_0 = 5851.74\pm 887.28 \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$, $CL/F = 4.32\pm 0.68 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, $Vd/F = 13.58\pm 3.13 \text{ L}$ 。

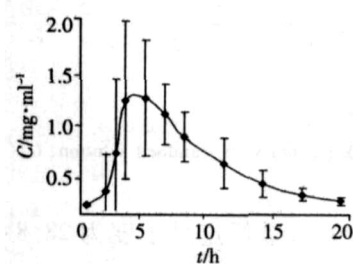


图 2 受试者口服阿司匹林肠溶片后活性代谢物水杨酸的平均药-时曲线图

Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of salicylic acid in volunteers after taking Aspirin

2 讨论

阿司匹林药动力学的文献均以测定其活性代谢物为检测指标^[2,3]。临床上,阿司匹林的使用剂量随治疗作用的不同而有所改变,所以,大剂量阿司匹林给药后,水杨酸的测定一般采用 HPLC-UV 法^[2],小剂量阿司匹林的测定则用 HPLC-UV 法或 HPLC-MS 法。我们曾尝试使用 HPLC-UV 法测定水杨酸的浓度,但处理样品时,按文献方法用乙

(表 2)。

1.2.8 质量控制 每次测定随行标准曲线时均随行测定低、中、高浓度的质控样品,每个浓度双样本,以控制每次测定的系统差异。测定结果显示系统稳定、结果可靠(表 3)。

醚-石油醚(4:1)提取时,回收率不稳定,受温度影响大;用氯仿-异丙醇(95:5)提取时易乳化,离心亦不能破乳;采用甲醇沉淀蛋白,稀释血浆 5 倍、乙腈稀释血浆 4 倍^[5]又不能测定小剂量阿司匹林的血液浓度。因此,我们首次采用了 HPLC-FLU 法测定水杨酸的浓度,具有较高的灵敏度和准确度,考虑 10%三氯乙酸沉淀蛋白的能力强、用量少,可避免血浆的多倍稀释^[6],所以,我们选用 10%三氯乙酸沉淀蛋白后直接进样,操作简单。水杨酸 $0.0288\sim 2.300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 有良好的线性关系,最低检测浓度为 $28.8 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,能满足小剂量阿司匹林药物动力学及生物利用度研究。阿司匹林血样在放置过程中会水解为水杨酸。虽然未考察阿司匹林体外水解对水杨酸测定的影响,但有文献报道,血样保存在 -20°C 条件下,一周内阿司匹林的体外水解对水杨酸的测定无影响。

文中小剂量阿司匹林肠溶片的药动学参数除 T_{max} 与文献^[4]的有较大差别以外,其余的药动学参数基本一致,但 T_{max} 与文献^[5]的较大口服剂量阿司匹林肠溶片的 T_{max} 基本一致。

参考文献:

- [1] 陈新谦,金有豫,汤光. 新编药理学 [M]. 北京:人民卫生出版社,2003. 180.
- [2] 邱相君,郑丽芬,胡国新,等. 阿司匹林缓释胶囊在健康志愿者体内的生物等效性 [J]. 中国临床药理学杂志,2003 (8), 19 (4): 284 - 287.
- [3] 杨燕云,李光平,刘茜,等. HPLC 测定阿司达莫缓释片的含量 [J]. 华西药学期刊,2007,22 (3): 336 - 338.
- [4] 乔海灵,张莉蓉,张启堂,等. 阿司匹林缓释片健康人体药动学 [J]. 中国医院药学杂志,2000,20 (10): 584 - 587.
- [5] 杨俊毅,蒋学华,何林,等. 阿司匹林片中阿司匹林的相对生物利用度研究 [J]. 生物医学工程学报,2003,20 (4): 661 - 663.
- [6] 曾经泽. 生物药物分析 [M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998. 28.

收稿日期:2007-10