

研究论文

正常人口服磷酸川芎嗪的药代动力学研究

蔡伟* 董善年 楼雅卿**

(北京医科大学分析化学教研室, 北京 100083)

摘要 本文建立了用高效液相色谱法测定人体内川芎嗪血药浓度的方法,以 C 18 化学键合硅胶 (10 μm) 为固定相,以甲醇-水 (58:42) 为流动相,280 nm 检测,安眠酮为内标,进行定量测定,得出检测限为 3.5 ng (S/N=4),最低检测血清浓度为 17.4 ng/ml,川芎嗪血药浓度在 0.029~5.82 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内,线性关系良好,方法回收率为 99.84%。方法重现性好,专一性强,内源性物质、代谢产物及同时服用的药物均不干扰。用本法测定了健康人口服川芎嗪的药代动力学参数。

关键词 川芎嗪; 高效液相色谱法; 药代动力学

川芎嗪 (tetramethylpyrazine, 以下简称 TMPz) 是一种用于治疗急性闭塞性脑血管疾患如脑血栓形成、脑动脉栓塞等的药物^(1,2)。有关川芎嗪血药浓度测定、药物代谢及药代动力学等方面的研究尚未见较完善的报道。楼雅卿等报道用紫外分光光度法测定川芎嗪大鼠和狗体内血药浓度,并进行其药代动力学研究⁽³⁾。动物实验研究表明,给狗口服磷酸川芎嗪后,消除迅速。但在进行人体内川芎嗪药物浓度的测定时,由于方法灵敏度的限制,给药 3 h 后就无法检测出川芎嗪的血药浓度。根据人体给药量较少及川芎嗪的药代动力学性质,为研究药物在人体内过程,必须建立一个专一性强、灵敏度高、准确简单的药物浓度测定方法。通过研究药物在人体内吸收、分布、生物转化和消除的动态规律,将对临床合理使用川芎嗪、药物剂型的研究及新药的设计具有重要的指导意义,并有助于川芎嗪作用机理方面的研究及认识其疗效与毒性的关系。

实验部分

一. 仪器、试剂及药品

(一) 高效液相色谱仪包括 M 510 型泵, 490 型 UV/VIS 检测器, μ -Bondapak - C 18 (10 μm) 色谱柱 (3.9 \times 300 mm), U 6 K 进样阀均为 Waters 公司产品; YEW -3066 型记录仪 四川仪表四厂。

(二) 溶剂及试剂均为分析纯, 重蒸水, 健康人血清 (北京红十字血液中心)。磷酸川芎嗪标准品 ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4$), mp 174~175.5 $^\circ\text{C}$, 含量 100.74% (批号 862004, 东北第六制药厂)。内标物安眠酮, mp 120 $^\circ\text{C}$, 含量 >99% (上海集成制药厂)。磷酸川芎嗪胶囊

本文于 1988 年 10 月 10 日收到。

*本校 88 届硕士研究生

**本校药理教研室

每粒含磷酸川芎嗪 100 mg (自装)。

(三) 磷酸川芎嗪贮备液 1 mg/ml 水溶液, 相当于川芎嗪浓度为 581.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 安眠酮贮备液 120.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (5% 甲醇溶液), 均置冰箱中备用。

二. 分析条件

流动相 甲醇—水 (58:42), 流速 1 ml/min, 泵压 21.0 MPa, 检测波长 280 nm, 纸速 20 cm/h, 内标安眠酮。

三. 实验与结果

(一) 内标物及流动相

根据内标物的选择原则, 经试验认为安眠酮符合作为内标物的条件。试验了不同比例的甲醇—水为流动相, 确定以甲醇—水 (58:42) 为好, 能将血清中内源性物质、TMPz 及内标物较好分离 (图 1)。TMPz 的 $t_R=5.34$ min, 安眠酮的 $t_R=8.73$ min。

(二) 血清样品的预处理

曾试用二氯甲烷、乙醚、乙酸乙酯萃取, 并试用 pH 7, pH 8 磷酸盐缓冲液, pH 10 Na_2CO_3 — NaHCO_3 缓冲液和 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液调节血清的酸碱性, 进行样品预处理, 结果表明用 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液碱化、用二氯甲烷萃取效果最好, 内源物干扰最少 (图 2), 由于游离川芎嗪易升华, 故在萃取液中加入盐酸, 使川芎嗪成盐, 随萃取液酸度增加, 川芎嗪蒸发损失减小, 以 pH 1.3 左右为宜, 可避免蒸除溶剂时川芎嗪蒸发损失。方法: 取空白血清 1 ml, 加一定量 TMPz 标准品、安眠酮 1.201 μg 及 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液 0.50 ml, 摇匀, 加二氯甲烷 3.5 ml, 旋摇萃取 2 min, 离心 10 min (2500 r/min), 然后将二氯甲烷转移至一尖底试管中, 加入 1 mol/L 盐酸甲醇溶液 100 μl , 混匀, 置水浴中于 47~50°C 蒸干, 残渣用甲醇 30~100 μl 溶解, 取 5~10 μl 进样。

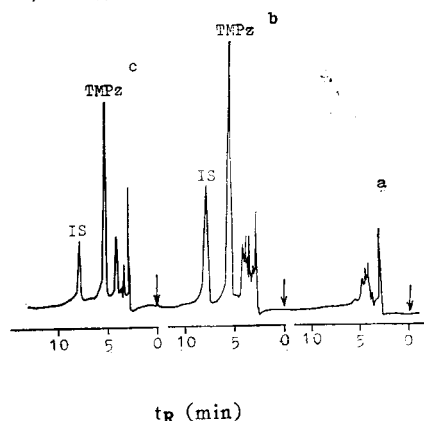


Fig 1. Chromatograms of human serum. a. Blank serum; b. Serum with added TMPz and internal standard; c. Serum sample 2 h after oral dose of 174.4 mg TMPz.

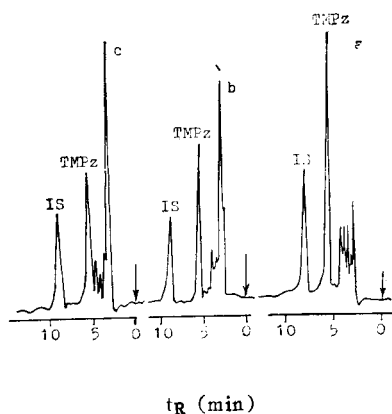


Fig 2. Chromatograms of serum samples containing TMPz and IS extracted with dichloromethane (a), ethyl acetate (b) and ether (c).

(三) 线性关系

于空白血清中加入川芎嗪标准液, 使川芎嗪浓度分别为 0.0291, 0.0582, 0.2908, 0.5816, 1.163, 1.745, 2.908, 4.071, 5.816 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 如前述方法处理, 色谱测定。重复 5 次, 以 C 对 Y ($H_{\text{TMPz}}/H_{\text{IS}}$) 回归计算, 实验结果表明川芎嗪血药浓度在 0.0291~5.816 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内线性良好, 回归方程为 $C=0.0118+0.2632 Y$, $r=0.9999$ 。

(四) 精密度

日间精密度与日内精密度分别以含一定量 TMPz 的血清样品进行测定, 日间精密度的连续 5 d 测得值。结果 (表 1) 表明, 精密度均较好, 符合体内药物浓度测定的要求。

Tab 1. Precision of the method (n=5)

Theoretical ($\mu\text{g/ml}$)	Within-day experiment ($\mu\text{g/ml}$) C \pm SD	CV (%)	Day-to-day experiment ($\mu\text{g/ml}$) C \pm SD	CV (%)
0.0291	0.0295 \pm 0.0003	1.02	0.0295 \pm 0.0008	2.71
0.5816	0.5809 \pm 0.0049	0.84	0.5846 \pm 0.0029	0.50
5.816	5.799 \pm 0.051	0.88	5.845 \pm 0.042	0.72

(五) 回收率

分别于 1ml 血清中加入不同量的川芎嗪标准品和内标 1.201 μg , 经预处理, 色谱测定, 与标准液直接进样所得结果对照, 见表 2。

Tab 2. Extraction recovery

TMPz levels ($\mu\text{g/ml}$)	Determined by HPLC* ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)	Mean (SD) (%)	CV (%)
0.0291	0.0294 \pm 0.0002	101.03		
0.0582	0.0578 \pm 0.0005	99.31		
0.2908	0.2839 \pm 0.0079	97.63		
0.5816	0.5774 \pm 0.0108	99.28		
1.163	1.165 \pm 0.009	100.17	99.8	0.90
1.745	1.751 \pm 0.043	100.34	(0.90)	
2.908	2.911 \pm 0.040	100.10		
4.071	4.086 \pm 0.033	100.37		
5.816	5.850 \pm 0.019	100.58		

Mean of five determinations

(六) 检测限

配制川芎嗪标准于血清中的浓度为 0.0174 $\mu\text{g/ml}$ 的样品四份, 每份 1 ml, 经样品预处理, 残渣中加入 50 μl 甲醇溶解, 取 10 μl 进样。取信噪比为 4 时的川芎嗪量作为检测限, 结果表明, 其检测限为 3.48 ng, 血清中最低检测浓度为 17.4 ng/ml。

(七) 专一性

1. 血样中内源性物质的干扰 由图 1 可以看出, 血清中内源性物质与川芎嗪和内标物能很好地分离, 不干扰原药的测定。

2. 代谢物的干扰 川芎嗪动物体内的代谢物确定为 3, 5, 6-三甲基吡嗪-2-甲酸⁽⁴⁾。现将大鼠灌胃川芎嗪后, 取血, 经样品预处理 (萃取时不加氢氧化钠), 得色谱图, 作为人体内代谢物干扰情况的参考, 由图 3 可以看出, 代谢物于原药前出峰 ($t_r=3.80$ min), 与原药很好地分离, 不干扰原药的测定。

3. 其它药物的干扰 临床上川芎嗪作为静脉注射时, 一般不和其它药物合用。口服川芎嗪时, 同时可能应用的药物有维生素 C、烟酸和罂粟碱。用上述色谱条件, 对这三种药物进



Fig 3. Chromatogram of serum sample 2h after oral administration of TMPz in rat.

3, 4, 5, 8, 12 h 各取静脉血 3 ml, 静置凝血, 离心 (3000 r/min) 分离血清, 置冰箱中待分析。由每份样品中精密吸出血清 0.50 ml 各二份, 按上述方法预处理后色谱测定, 结果见表 3。

Tab 3. Mean serum concentration ($\mu\text{g/ml}$) after oral administration of 174.4 mg TMPz in 6 volunteers

t(h)	0.25	0.5	1	1.5	2	3	4	5	8	12
\bar{C}	2.088	3.285	2.399	1.300	0.8690	0.5029	0.3227	0.2113	0.1103	0.0404
SD	0.499	1.03	0.578	0.366	0.257	0.136	0.103	0.094	0.059	0.017

将药一时数据用 MCPKP 药代动力学程序 (夏之江编) 和 IBM 微机处理, 自动选择房室模型, 用非线性最小二乘法进行曲线拟合, 权重选择 $w = \frac{1}{g^2}$, 结果见表 4、图 4。

Tab 4. Pharmacokinetic parameters of TMPz in human body after oral administration of 174.4 mg (n=6)

Parameters	Mean	SD
C_0 ($\mu\text{g/ml}$)	5.590	2.20
α (h^{-1})	1.600	0.562
β (h^{-1})	0.2470	0.0474
K_a (h^{-1})	4.813	1.23
K_{12} (h^{-1})	0.4124	0.0970
K_{21} (h^{-1})	0.5010	0.325
K_{el} (h^{-1})	0.9338	0.197
T_c (h)	0.1288	0.0377
$T_{1/2}$ (K_a)(h)	0.1508	0.0327
$T_{1/2}$ (α)(h)	0.4855	0.188
$T_{1/2}$ (β)(h)	2.894	0.558
AUC ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$)	5.893	1.53
T_p (h)	0.5102	0.0475
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	3.114	0.902
Cl ($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$)	15.70	4.24
V_c (L)	17.76	6.76
V (L)	66.77	28.2

行考察, 维生素 C $t_R=2.04$ min, 烟酸 $t_R=2.15$ min, 罂粟碱 $t_R=13.23$ min。实验表明临床上与川芎嗪同时服用的上述药物均不干扰川芎嗪的测定。而且水溶性药物维生素 C 和烟酸经前述的样品预处理, 不可能萃取至有机相, 在色谱图上也未见到二者的色谱峰。

(八) 口服磷酸川芎嗪的药代动力学研究

健康志愿者男女各 3 名, 年龄 30.3 ± 2.7 岁, 体重 60 ± 6 kg, 早上空腹取空白血后, 口服 300 mg 磷酸川芎嗪胶囊 (相当于川芎嗪 174.5 mg), 于服药后 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2,

3, 4, 5, 8, 12 h 各取静脉血 3 ml, 静置凝血, 离心 (3000 r/min) 分离血清, 置冰箱中待分析。由每份样品中精密吸出血清 0.50 ml 各二份, 按上述方法预处理后色谱测定, 结果见表 3。

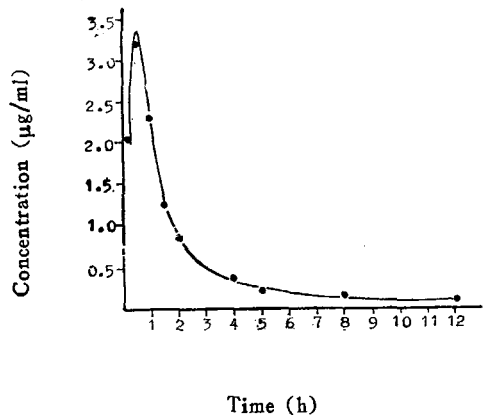


Fig 4. Mean serum concentration-time curve after oral administration of 174.4 mg TMPz in 6 volunteers.

讨 论

本文所建立的高效液相色谱法测定人体内川芎嗪血药浓度,方法简便、快速,一次测定仅需 10 min,且灵敏度高,检出限量为 3.48 ng ($S/N=4$),最低检测血清中药浓度为 0.0174 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。方法重现性好,专一性强,内源性物质、代谢产物及同时服用的药物均不干扰川芎嗪的测定。本法既可用于药代动力学的血药浓度分析,也可用于临床血药浓度测定,制剂生物利用度比较等实际工作。

由实验结果可见,六条药代动力学曲线上的估算值与实验的观测值的偏差平方和均较小 (<0.456),说明测定结果很好地符合程序所选定的药代动力学模型。

研究结果表明,六名健康志愿者口服 300 mg 磷酸川芎嗪胶囊(相当于川芎嗪 174.4 mg)后的药代动力学模型均为二室开放模型,由药代动力学参数可以认为:口服磷酸川芎嗪药物在人体内的吸收速度比较快,30 min 左右就达到血药浓度的最高峰 $3.114 \pm 0.902 \mu\text{g}/\text{ml}$,随即药物由中央室向周边室快速分布,半衰期为 $0.4855 \pm 0.188 \text{ h}$,中央室表观分布容积为 17.76 L,总表观分布容积为 66.77 L,说明川芎嗪在人体内分布较广,同时药物在体内迅速消除,其消除半衰期为 $2.894 \pm 0.558 \text{ h}$,说明川芎嗪排泄及/或代谢较快,给药后 3 h,血药浓度就降到约 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,随后药物浓度下降缓慢,此时血液和组织中的药物基本上达到平衡。

结果还表明,六个人的药代动力学参数看不到明显的性别差异,但具有一定的个体差异。

参 考 文 献

- 1.北京制药工业研究所.川芎嗪治疗缺血性脑血管疾病 218 例报告.中华医学杂志 1977;58:467.
- 2.中医研究院西苑医院内科心血管病研究组.川芎 I 号碱治疗急性闭塞性脑血管病的疗效观察.北京医药工业 1975; (4): 39.
- 3.楼雅卿,等.磷酸川芎嗪在狗和大鼠的药代动力学和体内命运.药学报 1986;21:481.
- 4.蔡伟,等.川芎嗪药物代谢的研究:川芎嗪在大鼠体内外代谢的研究.待发表.

HPLC DETERMINATION OF TETRAMETHYLPYRAZINE IN HUMAN SERUM AND ITS PHARMACOKINETIC PARAMETERS

W Cai, SN Dong and YQ Lou

(Department of Analytical Chemistry, Beijing Medical University, Beijing 100083)

ABSTRACT An HPLC method for the determination of tetramethylpyrazine in serum and application of this method to tetramethylpyrazine deposition studies in human body were described. Tetramethylpyrazine was extracted from alkalized serum with dichloromethane using methaqualone as internal standard. A RP μ -Bondapak-C₁₈ (10 μ m) column fitted with a variable-wavelength UV spectrophotometer operated at 280 nm was used. The mobile phase was methanol-water (58:42). The detection limit of the method was 0.0174 μ g/ml serum. Assay linearity was shown over the range of 0.0291~5.816 μ g/ml serum with a regression coefficient of 0.9999. The extraction recovery was 99.84% and no interference was found from endogenous compounds, metabolites of parent drug or other commonly used drugs. For the serum concentration following oral administration of tetramethylpyrazine capsules to healthy volunteers (n=6), the best fit was found to be with a two compartment open model. After administration of 174.5 mg dose, the pharmacokinetic parameters were as follows: $T_P=0.5102$ h, $C_{max}=3.114$ μ g/ml, $AUC=5.893$ mg/L \cdot h, $T_{1/2}(K_a)=0.1508$ h, $T_{1/2}(\alpha)=0.4855$ h, $T_{1/2}(\beta)=2.894$ h, $Cl=15.7$ L \cdot h⁻¹, $V_c=17.70$ L, $V=66.77$ L. The result imply that tetramethylpyrazine is absorbed rapidly, distributed widely in the body, and also eliminated at a fairly rapid rate.

Key words Tetramethylpyrazine; HPLC; Pharmacokinetics