

HPLC 测定大鼠血浆中盐酸川芎嗪及其代谢物

袁芳¹, 陈卓佳², 陈杰^{3*} (1.广东药学院药科学院, 广州 510006; 2.中山大学药学院临床药理研究所, 广州 510080; 3.中山大学附属第一医院药剂科, 广州 510006)

摘要: 目的 建立川芎嗪(TMP)及其代谢物 2-羟甲基-3, 5, 6-三甲基吡嗪(HTMP)大鼠血浆中的高效液相色谱测定方法。方法 血浆碱化后用氯仿-1-氯正丁烷(3:1)萃取, 采用 HPLC 检测, 色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为 20 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钾缓冲液(pH 5.6)-甲醇(72:28), 2-甲基吡嗪为内标, 流速: 1.0 mL·min⁻¹。检测波长为 285 nm, 柱温为室温。结果 TMP 大鼠血浆浓度测定方法在 0.031 25~50 μg·mL⁻¹ 内线性良好($r=0.999\ 5$); HTMP 线性范围为 0.031 25~5 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 8$)。TMP、HTMP 的定量下限均为 0.031 25 μg·mL⁻¹, 提取回收率为 86.2%~93.0%(TMP)、73.8%~95.1%(HTMP), 相对回收率为 96.9%~117.7%(TMP)、97.5%~104.9%(HTMP), 批内和批间 RSD 均<9%($n=5$)。结论 该方法简便、准确, 重复性好, 灵敏度高, 适合于 TMP 及其主要代谢产物 HTMP 血药浓度测定及药动学研究。

关键词: 川芎嗪; 血药浓度; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)06-0529-06

基金项目: 广东省自然科学基金(8451008901000788); 广东省医学科研基金(A2009163)

作者简介: 袁芳, 女, 博士, 讲师 Tel: (020)39352128 E-mail: efang92@sina.com *通信作者: 陈杰, 男, 博士, 主管药师 Tel: (020)87755766-8812 E-mail: chenjiezs@163.com

中国现代应用药学 2012 年 6 月第 29 卷第 6 期

Chin JMAP, 2012 June, Vol.29 No.6

· 529 ·

Determination of Tetramethylpyrazine and its Active Metabolite in Rat Plasma by HPLC

YUAN Fang¹, CHEN Zhuojia², CHEN Jie^{3*} (1.School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2.Institute of Clinical Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3.Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for the determination of concentration of tetramethylpyrazine (TMP) and its active metabolite, 2-hydroxymethyl-3,5,6-trimethylpyrazine (HTMP) in rat plasma and apply this method to the pharmacokinetic study of TMP. **METHODS** 2-Methylpyrazine was used as internal standard. The alkalified serum samples were extracted with a chloroform-1-chloro-butane (3 : 1) induced liquid-liquid extraction. The target analytes were quantitatively determined by HPLC. Hypersil BDS C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of 20 mmol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate buffer(pH 5.6)-methanol(72 : 28). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, 15 μL sample was injected and detected by the ultra-violet detector at 285 nm. **RESULTS** The linearity was obtained over the concentration ranges of 0.031 25–50 μg·mL⁻¹ for TMP(*r*=0.999 5) and 0.031 25–5 μg·mL⁻¹ for HTMP(*r*=0.999 8). The lower limit of quantitation (LLOQ) was 0.031 25 μg·mL⁻¹ for TMP and HTMP. The inter- and intra-batch precisions (RSD%) were less than 9% for both analyses. The accuracies and extracted recoveries were 86.2%–93.0% for TMP and 73.8%–95.1% for HTMP. The relative recoveries were 96.9%–117.7% for TMP and 97.5%–104.9% for HTMP. **CONCLUSION** The method has good selectivity, acceptable accuracy, precision and sensitivity. It can be applied to pharmacokinetic study of TMP in rats.

KEY WORDS: tetramethylpyrazine; serum concentration of drug; HPLC

川芎嗪(ligustrazine)是从川芎总生物碱中分离出来的一种具有多种生物活性的酰胺类生物碱,其化学结构为四甲基吡嗪(tetramethylpyrazine, TMP)。TMP对心血管系统有强大活性,对血管平滑肌有解痉作用,对由肾上腺素或氯化钾引起的主动脉条收缩有明显拮抗作用^[1-2]。心血管药理及生理研究提示TMP类似“钙离子拮抗剂”^[3]。从20世纪70年代中期以来,TMP在临床上广泛用于治疗心脑血管疾病、部分泌尿系统疾病及眼耳鼻喉科等有关系统疾病,取得良好的效果。

江骥等^[4]研究表明TMP体内主要代谢产物是其甲基的氧化产物,其中2-羟甲基-3,5,6-三甲基吡嗪(2-hydroxymethyl-3,5,6-trimethylpyrazine, HTMP)是TMP的主要活性代谢物,具有与TMP相近的药效,因此联合测定血浆中TMP、HTMP浓度具有重要意义。目前,血浆中TMP检测多采用HPLC法^[5-7]。大鼠作为药物研究中的一类重要模型,同时测定TMP及HTMP大鼠血浆浓度的方法少见报道。本实验旨在建立TMP及HTMP在大鼠血浆中的检测方法,为研究TMP、HTMP在大鼠体内的药动学特点提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱系统: Waters 515 泵、Waters 717 plus 自动进样器、Waters 2487 紫外检测器、Waters Millennium 32 色谱工作站(Waters,

USA)。甲醇(色谱纯); TMP(广东珠海联邦制药有限公司,批号:1008026,纯度≥99%); HTMP(中山大学药学院古练权教授合成提供,纯度≥99%); 2-甲基吡嗪(Sigma 公司,批号:402BJ,含量≥99%); 其余试剂为分析纯。

1.2 实验动物

SD 大鼠,体质量:250~290 g,♂,中山大学实验动物中心提供,实验动物合格证号:SYXK(粤)2011-0112。

2 方法

2.1 溶液制备

2.1.1 TMP对照品储备液的配制 精密称取5 mg TMP标准品,置于5 mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得到浓度为1 mg·mL⁻¹的TMP标准母液,以甲醇-水(1:1)稀释配制500, 50, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.4, 0.312 5 μg·mL⁻¹的TMP标准溶液,4℃冰箱保存。

2.1.2 HTMP对照品储备液的配制 精密称取2.5 mg HTMP标准品,用甲醇-水(1:1)溶解后以玻璃管移至5 mL量瓶,并稀释至刻度,摇匀得到浓度为500 μg·mL⁻¹的HTMP标准母液,以甲醇-水(1:1)稀释配制50, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.4, 0.312 5 μg·mL⁻¹ HTMP标准溶液,4℃冰箱保存。

2.1.3 内标2-甲基吡嗪的对照品储备液的配制 精密称取2.5 mg 2-甲基吡嗪,用甲醇-水(1:1)溶解后以玻璃管移至5 mL量瓶,并稀释至刻度,摇

匀得到浓度为 $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 2-甲基吡嗪标准溶液,以甲醇-水(1:1)稀释配制 50, 25, $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 2-甲基吡嗪标准溶液, 4°C 冰箱保存。

2.1.4 血清样本处理与测定 取大鼠血浆样品 $90 \mu\text{L}$ 于 EP 管中,加入 $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内标溶液 $10 \mu\text{L}$,加入 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液 $30 \mu\text{L}$ 碱化血样,混匀,用 $700 \mu\text{L}$ 氯仿-1-氯正丁烷(3:1)于漩涡混合器上混匀萃取 1 min, $16\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,吸取全部有机相置于另一预先加有 $45 \mu\text{L}$ 磷酸甲醇溶液($0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的 EP 管中,混匀,于室温下用氮气流吹干,残留物加 $50 \mu\text{L}$ 甲醇-水(1:1)溶解,涡旋 2 min, $16\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,吸取上清移入进样管,进样量为 $15 \mu\text{L}$ 。

2.2 色谱条件

色谱柱: Hypersil BDS C_{18} (大连依利特科学仪器有限公司生产, $4.6 \text{ mm}\times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相: $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾缓冲液(50%三氟乙酸调节 pH 至 5.6)-甲醇(72:28); 流速: $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长为 285 nm ; 进样量: $15 \mu\text{L}$; 以 2-甲基吡嗪为内标。取“2.3”项下混合对照品溶液进样测定,记录色谱图。在此色谱条件下,供试品中其他成分对 TMP、HTMP、2-甲基吡嗪的测定无干扰,保留时间分别约为 19.7, 7.4 和 5.0 min 。色谱图见图 1。

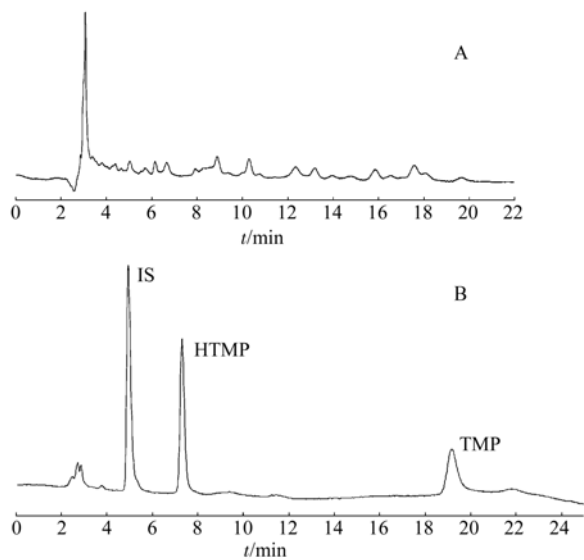


图 1 大鼠血浆中 TMP、HTMP 和内标的 HPLC 色谱图
A-大鼠空白血浆; B-TMP、HTMP 和内标混合物

Fig 1 HPLC chromatograms of TMP, HTMP and internal standard

A-blank plasma; B-mixed standard solution of TMP, HTMP and internal standard

2.3 线性关系考察

取大鼠空白血浆 $70 \mu\text{L}$,精密加入不同浓度的 TMP 标准溶液 $10 \mu\text{L}$,使血浆中 TMP 浓度分别为 0.031 25, 0.04, 0.062 5, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 5, $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 每个样品再精密加入不同浓度的 HTMP 标准溶液 $10 \mu\text{L}$,使血浆中 HTMP 浓度分别为 0.031 25, 0.04, 0.062 5, 0.125, 0.25, 0.5, 1, $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 每个样品再加入 $10 \mu\text{L}$ 的 $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内标溶液,按“2.1”项下方法处理。以 TMP、HTMP 浓度为横坐标, TMP、HTMP 分别和内标色谱峰面积之比值为纵坐标,加权最小二乘法进行回归运算,分别求得直线回归方程, TMP 的直线回归方程为 $Y=0.075X-0.054\ 9(r=0.999\ 5)$; HTMP 的直线回归方程为 $Y=0.038\ 9X+0.040\ 2(r=0.999\ 8)$ 。血浆中 TMP、HTMP 的定量下限均为 $0.031\ 25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结果表明 TMP 及 HTMP 在 $0.031\ 25\sim 50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.4 稳定性试验

将已知浓度的 TMP、HTMP 和内标 2-甲基吡嗪储备液分别置于室温、冰冻条件下存放不同时间,再测定含量,考察储备液稳定性。结果显示, TMP、HTMP 和内标 2-甲基吡嗪储备液室温下 48 h 仍保持稳定, -4°C 条件下,保存 28 d 仍保持稳定。另取大鼠空白血浆制成每 $100 \mu\text{L}$ 含 TMP $0.062\ 5$, 0.5, $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 含 HTMP $0.062\ 5$, 0.5, $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品,于室温放置 4 h 后或 -20°C 冰冻 24 h,取出溶解完全,如此反复冻融 3 次,按“2.1”项下方法操作,求得标准血浆样品偏离度。TMP、HTMP 血浆样品置室温(25°C)下存放 4 h 可保持稳定,偏离度分别为 $-0.2\%\sim 1.9\%$ 、 $-4.0\%\sim 4.6\%$ 。TMP、HTMP 血浆样品在冻融 3 次(-20°C)条件下,偏离度分别为 $-2.0\%\sim 1.7\%$ 、 $-4.3\%\sim 1.3\%$ 。结果见表 1 和表 2。

表 1 大鼠血浆中 TMP 的稳定性($n=5$)

Tab 1 The stability of TMP in rat plasma($n=5$)

浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	25 $^\circ\text{C}$ 放置 4 h		3 次冻融	
	$\bar{x} \pm s$	RSD/%	$\bar{x} \pm s$	RSD/%
0.062 5	$0.062\ 8 \pm 0.002\ 1$	3.3	$0.063\ 6 \pm 0.000\ 4$	0.6
0.50	0.51 ± 0.0054	1.0	0.49 ± 0.021	4.4
5.0	5.0 ± 0.23	4.5	4.90 ± 0.20	4.0

表2 大鼠血浆中 HTMP 的稳定性(n=5)

Tab 2 The stability of HTMP in rat plasma(n=5)

浓度/ μg·mL ⁻¹	25 °C 放置 4 h		3 次冻融	
	$\bar{x} \pm s$	RSD/%	$\bar{x} \pm s$	RSD/%
0.062 5	0.065 4±0.002 2	3.3	0.063 3±0.002 8	4.4
0.50	0.48±0.003 24	6.6	0.50±0.041	8.0
5.0	5.00±0.10	2.0	4.78±0.34	7.0

2.5 精密度试验

在同一天内,用大鼠空白血浆制成每 100 μL 含 TMP 0.062 5, 0.5, 5 μg·mL⁻¹, 含 HTMP 0.062 5, 0.5, 5 μg·mL⁻¹ 的样品,按“2.1.4”项下方法操作,重复萃取 5 批后进样分析,测得各浓度的平均实测浓度及其标准差,算出相对标准偏差(RSD)。另外于不同的工作日对 TMP 0.062 5, 0.5, 5 μg·mL⁻¹, HTMP 0.062 5, 0.5, 5 μg·mL⁻¹ 的样品,以上述方法处理,连续测定 3 d,得日间相对标准偏差 RSD。结果表明, TMP 批内 RSD ≤ 5.7%, 偏离度为 -3.1%~17.7%; HTMP 批内 RSD ≤ 7.6%, 偏离度为 -2.5%~4.9%(n=5); TMP 批间 RSD ≤ 8.1%, 偏离度为 1.8%~18.5%(n=5); HTMP 批间 RSD ≤ 7.0%, 偏离度为 3.7%~5.6%(n=5)。精密度符合生物样品分析的要求。结果见表 3 和表 4。

表3 HPLC 测定大鼠血浆中 TMP 的批间和批内精密度(n=5)
Tab 3 Intra- and inter-batch precision and accuracy of HPLC method for TMP determination in rat plasma(n=5)

浓度/ μg·mL ⁻¹	批内精密度		批间精密度	
	$\bar{x} \pm s$	RSD/%	$\bar{x} \pm s$	RSD/%
0.062 5	0.074±0.001 2	1.6	0.074±0.000 5	0.6
0.50	0.57±0.033	5.7	0.52±0.042	8.1
5.0	4.84±0.15	3.2	5.08±0.24	4.8

表4 HPLC 法测定大鼠血浆中 HTMP 的批间和批内精密度(n=5)

Tab 4 Intra-and inter-batch precision and accuracy of HPLC method for HTMP determination in rat plasma(n=5)

浓度/ μg·mL ⁻¹	批内精密度		批间精密度	
	$\bar{x} \pm s$	RSD/%	$\bar{x} \pm s$	RSD/%
0.062 5	0.061±0.003 4	5.6	0.065±0.004 5	7.0
0.50	0.52±0.028	5.4	0.52±0.012	2.2
5.0	5.21±0.40	7.6	5.28±0.078	1.5

2.6 回收率试验

2.6.1 提取回收率 大鼠空白血浆制成每 100 μL 含 TMP 0.062 5, 0.5, 5 μg·mL⁻¹, 含 HTMP 0.062 5, 0.5, 5 μg·mL⁻¹ 的样品,按“2.1.4”项下方法操作,记录色谱图, TMP 峰面积为 A1;另取 TMP 0.062 5,

0.5, 5 μg·mL⁻¹ 的标准溶液和 HTMP 0.062 5, 0.5, 5 μg·mL⁻¹ 的标准溶液以同体积进样(n=5), 记录色谱图, TMP 峰面积为 A2。按公式: 提取回收率=(A1/A2)×100%计算 TMP 提取回收率(%). 同理计算 HTMP 提取回收率。TMP、HTMP 低、中、高(0.062 5, 0.5, 5 μg·mL⁻¹)的提取回收率分别接为 86.2%~93.0%(RSD ≤ 7.7%), 73.8%~95.1%(RSD ≤ 7.1%), 结果见表 5 和表 6。符合生物样品分析的要求。

2.6.2 相对回收率 用大鼠空白血浆制成每 100 μL 含 TMP 0.062 5, 0.5, 5 μg·mL⁻¹, 含 HTMP 0.062 5, 0.5, 5 μg·mL⁻¹ 的样品(n=5), 按“2.1.4”项下方法操作, 所得 TMP 和内标峰面积之比值代入标准曲线计算测得量, 以测得量与添加量之比计算相对回收率(%), 同理计算 HTMP 的相对回收率。相对回收率分别为 96.9%~117.7%(RSD ≤ 5.8%), 97.5%~104.9% (RSD ≤ 7.6%), 结果见表 5 和表 6。符合生物样品分析的要求。

表5 HPLC 法测定大鼠血浆中 TMP 的回收率(n=5)

Tab 5 Recoveries for the analysis of TMP in rat plasma (n=5)

浓度/ μg·mL ⁻¹	提取回收率/%		相对回收率/%	
	$\bar{x} \pm s$	RSD/%	$\bar{x} \pm s$	RSD/%
0.062 5	86.2±3.7	4.3	117.7±1.9	1.6
0.50	93.0±7.2	7.7	114.0±6.6	5.8
5.0	92.0±7.15	7.7	96.9±3.1	3.2

表6 HPLC 法测定大鼠血浆中 HTMP 的回收率(n=5)

Tab 6 Recoveries for the analysis of HTMP in rat plasma (n=5)

浓度/ μg·mL ⁻¹	提取回收率/%		相对回收率/%	
	$\bar{x} \pm s$	RSD/%	$\bar{x} \pm s$	RSD/%
0.062 5	73.8±5.2	7.1	97.5±5.4	5.4
0.50	95.1±2.2	2.9	104.9±7.0	7.8
5.0	93.1±4.7	4.7	104.2±4.9	4.9

2.7 大鼠灌胃 TMP 单次给药后血药浓度测定

SD 大鼠 5 只, ♂, 实验前禁食 12 h, 可自由饮水。按 TMP 80 mg·kg⁻¹ 剂量灌胃给药, 于给药前和给药后 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10 h, 采用颈静脉穿刺法取血 0.25 mL, 置于 1.5 mL 含肝素钠的 EP 管中, 16 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 分出血浆, 按“2.1.4”项下方法操作, 所得 TMP、HTMP 和内标峰面积之比值代入标准曲线计算出血药浓度, 以 TMP、HTMP 血药浓度均值

为纵坐标, 抽血时间为横坐标, 药时曲线见图 2, 利用 3P87 药动学软件计算大鼠口服 TMP 后 TMP 和 HTMP 的主要药动学参数, 结果见表 7。

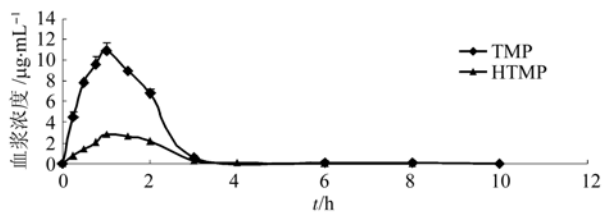


图 2 大鼠灌胃单次给予 80 mg·kg⁻¹ TMP 后, TMP 和 HTMP 的平均血浆药物浓度曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time curves of TMP and HTMP following its oral administration at 80 mg·kg⁻¹ TMP in rats

表 7 大鼠灌胃单次给药 80 mg·kg⁻¹ TMP 后的 TMP 和 HTMP 的主要药动学参数(n=5)

Tab 7 Main pharmacokinetic parameters after a single oral dose of 80 mg·kg⁻¹ TMP in SD rats(n=5)

参数	TMP	HTMP
AUC _{0-∞} /h·μg·mL ⁻¹	21.7±0.13	5.97±0.85
AUC _{0-10 h} /h·μg·mL ⁻¹	20.6±0.13	5.95±0.89
C _{max} /μg·mL ⁻¹	11.2±0.40	3.00±0.10
T _{max} /h	1.00±0.00	1.25±0.35
t _{1/2} /h	1.55±0.50	1.35±0.28
CL/F/L·kg ⁻¹ ·h ⁻¹	1.2±0.007	3.67±0.05
Vd/F/L·kg ⁻¹	2.71±0.90	7.12±1.35
K/h ⁻¹	0.47±0.15	0.53±0.11
MRT	1.44±0.002 5	1.63±0.015

3 讨论

3.1 分析方法的建立

目前川芎嗪的提取方法常采用固相萃取^[8], 但该方法成本高, 限制其应用。本实验采用液-液萃取法, 通过正交法确定萃取液为氯仿-一氯正丁烷(3:1)。TMP 为酰胺类生物碱, 呈碱性, 为提高其回收率, 本实验采用 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液调节血清 pH。同时, 由于游离 TMP 易升华, 故在萃取液中加入盐酸-甲醇、磷酸-甲醇, 使 TMP 成盐, 避免吹干溶剂时 TMP 蒸发损失, 结果表明用 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸-甲醇溶液酸化效果最好。实验还考察了真空干燥和氮气吹干的效果, 结果表明采用氮气吹干, 控制温度不高于 40 °C, 可以大大提高提取回收率。本方法不仅操作简便, 回收率较高, 提高了检测灵敏度, 而且通过萃取纯化后进样, 延长了色谱柱使用寿命。

3.2 流动相的选择

本实验使用以硅胶基体的 C₁₈ 为填料的反相柱, 在流动相使用缓冲盐, 以竞争或部分阻断硅醇基的影响, 可以有效地改善峰形, 提高分离效能。

预试验结果提示, 对 TMP、HTMP 色谱行为影响较大的因素有水相的 pH 值、甲醇与水相的配比、水相的离子浓度。通过考察不同配比的流动相对 TMP、HTMP 的保留时间和峰高的影响显示, 甲醇比例较大时峰形变化不大, 但出峰时间缩短, TMP、HTMP 和内标峰的分度度较小。当磷酸二氢钾缓冲液的 pH 增大, 出峰时间延长。综上所述, 最后确定流动相组成为 20 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钾缓冲液(pH 5.6)-甲醇(72:28)。

3.3 内标物的选择

本实验通过对与 TMP 结构相近的 2-甲基吡嗪、咖啡因、甲硫咪唑、氟尿嘧啶的考察, 发现选用 2-甲基吡嗪时, 提取率稳定, 色谱峰分离良好, 可满足测试要求。

3.4 方法应用

该方法成功用于研究 TMP 在大鼠体内药动学。大鼠单次灌胃 80 mg·kg⁻¹ TMP 后达峰时间为 1 h, 峰浓度为 11.2 μg·mL⁻¹, 然后血药浓度迅速下降, 在给药后 4 h, TMP 血药浓度已几乎测不到, 半衰期为 1.55 h, TMP 在大鼠体内的药动学性质与人、狗等相似^[9]。

该方法简便、准确, 重复性好, 灵敏度高, 适合于 TMP 及其主要代谢产物 HTMP 血药浓度测定及药动学研究。

REFERENCES

- [1] YANG X M. Research progress on the pharmacological effects of Ligustrazine [J]. Chin J Biochem Pharm(中国生化药物杂志), 2010, 31(3): 215-216.
- [2] DENG J, WU Q, HUANG X N. Protective effects of tetramethylpyrazine against myocardial hypertrophy induced by pressure overload in rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(9):785-788.
- [3] LI W M, LIU H T, LI XY, et al. Effect of tetramethylpyrazine on lipopolysaccharide-induced damage in vascular endothelial cell [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2009, 25(11): 1516-1521.
- [4] JIAN J, JIAN G H, YE Y P, et al. The metabolism of TMPz *In vivo* [J]. Acta Acad Med Sin(中国医学科学院学报), 1993, 15(2): 79-82.
- [5] CAI W, DONG S N, LOU Y Q. HPLC determination of tetramethylpyrazine in human serum and its pharmacokinetic parameters [J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 1989, 24(12): 881-886.

- [6] LI X H, ZHOU T H. Advances in analysis of alkaloids by HPLC [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2002, 33(4): 368-372.
- [7] WANG L S, YUAN A X, HAN J, et al. Determination of Ligustrazine in rats plasma, brain and liver by HPLC [J]. J China Pharm(中国药房), 2008, 24(9): 654-656.
- [8] HU X, LI X H, XIONG Y Q. HPLC determination of ligustrazine phosphate concentrations in human serum with solid phase extraction and its pharmacokinetics studies [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2006, 26(12): 1754-1756.
- [9] LOU YQ, ZHANG H, CAO X et al. The pharmacokinetics and disposition of tetramethylpyrazine phosphine in dogs and rats [J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 1986, 21(7): 481-487.

收稿日期: 2011-11-25