

# 纳米纤维固相萃取高效液相色谱法测定人血浆中川芎嗪含量

邱新峰

**[摘要]** **目的:**建立纳米纤维固相萃取高效液相色谱法检测人血浆中川芎嗪含量。**方法:**样品经 1% 氨水稀释 3 倍,用活化后的 PCAX 型复合阴离子交换纳米纤维固相萃取柱净化富集,用去离子水淋洗,以 50  $\mu\text{L}$  甲醇洗脱,取 20  $\mu\text{L}$  进样检测。以甲醇 1% 冰醋酸水溶液(45:55, V/V)为流动相在岛津 ODS-2 色谱柱(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )上进行分离,流速 1.0 mL/min,检测波长 295 nm。**结果:**该方法的线性范围为 0.01 ~ 2.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,检出限为 0.003  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,回收率为 94.88% ~ 103.11%,相对标准偏差为 2.6% ~ 4.3%。**结论:**该方法操作简单,具有样品需要量少、灵敏度高等优点,可用于人血浆中川芎嗪的含量测定。

**[关键词]** 川芎嗪;高效液相色谱;纳米纤维;固相萃取;人血浆

[中图法分类号] R 96

[文献标志码] A

DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.06.023

## Determination of ligustrazine in human plasma using nanofiber-packed solid-phase extraction-high performance liquid chromatography

QIU Xin-feng

(Department of Pharmacy, Anqing Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Anqing Anhui, 246003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a nanofiber-packed solid-phase extraction—high performance liquid chromatography to determine the serum level of ligustrazine. **Methods:** The sample was diluted by 1% ammonia solution for 3 times, purified and enriched with activated PCAX composite anion exchange nanofiber solid-phase extraction column, eluted with deionized water, eluted with 50  $\mu\text{L}$  methanol, and 20  $\mu\text{L}$  sample was detected. The methanol-1% acetic acid solution (45:55, V/V) was used as mobile phase for separation on Shimadzu ODS-2 column (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) with flow rate for 1.0 mL/min and detection wavelength for 295 nm. **Results:** The linear range of this method was from 0.01 to 2.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the detection limit was 0.003  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the recovery rate was from 94.88% to 103.11%, and the relative standard deviations was from 2.6% to 4.3%. **Conclusions:** The method has the advantages of simple operation, low sample requirement and high sensitivity, and can be used to determine the content of ligustrazine in human plasma.

**[Key words]** ligustrazine; high performance liquid chromatography; nanofiber; solid-phase extraction; plasma

川芎嗪又称四甲基吡嗪,存在于川芎、当归等中药材中,具有理气、化痰、活血的功效,临床上用于心脑血管、呼吸系统等疾病的治疗,适用于冠心病、脉管炎、心绞痛、脑血栓、缺血性脑血管病等<sup>[1-3]</sup>。建立血浆中川芎嗪的检测方法,对深入研究川芎嗪在生物体内的作用及作用机制具有重要意义。

目前,川芎嗪的分析方法主要包括高效液相色谱法<sup>[4-6]</sup>和色谱质谱联用法<sup>[7-8]</sup>,其中液相色谱质谱联用法虽然检测灵敏度高,但设备昂贵、检测成本较高,高效液相色谱法一般使用紫外检测器或二极管阵列检测器,检测成本较低,但检测灵敏度较色谱质谱联用法低。为了提高高效液相色谱法的检测灵敏度,通常使用固相萃取技术对样品进行浓缩、净化<sup>[9-10]</sup>。纳米纤维固相萃取技术是一种以电纺纳米纤维为吸附材料的固相萃取技术<sup>[11]</sup>,与传统的固

相萃取技术相比,纳米纤维作为吸附剂具有更大的比表面积,能更有效地吸附目标物,因此,少量的纳米纤维就能达到很好的吸附效果,同时具有样品量、洗脱剂用量和有机溶剂用量少等优势。目前纳米纤维固相萃取技术已经在食品中有害物质检测、环境中有害物质检测、生物样品中生物标志物以及药物检测等分析领域中成功应用<sup>[12-20]</sup>。生物样品一般样品量较少,使用纳米纤维固相萃取技术,将有效提高目标物的提取效率,同时能有效提高目标物的浓缩倍数,提高检测灵敏度。本研究建立基于纳米纤维固相萃取技术的人血浆中川芎嗪的高效液相色谱检测方法。现作报道。

### 1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂 LC-20AD 高效液相色谱仪(包括 LC-20AD 泵, SPD-M20A 二极管阵列检测器, CTO-10ASVP 柱温箱)(日本,岛津), JEM-2010 透射电子显微镜(日本,Jeol), AB265-S 分析天平(瑞士,

METTLER TOLEDO), Master-S15UVF 纯水系统(上海和泰仪器有限公司), XH-C 涡旋混合器(白塔新宝仪器厂), A-6 纳米纤维固相萃取仪(苏州东奇生物科技有限公司), PCAX 型复合阴离子交换纳米纤维固相萃取柱(苏州东奇生物科技有限公司, 纳米纤维直径 200 ~ 300 nm)。

盐酸川芎嗪(纯度 83.4%, 化学对照品, 批号 110817-201608, 中国食品药品检定研究院), 空白人血浆(健康成人, 安庆市立医院), 氨水(分析纯, 上海阿拉丁生化科技有限公司), 磷酸(分析纯, 上海联试化工试剂有限公司), 冰乙酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

## 1.2 方法

1.2.1 材料表征 电子显微镜观察纳米纤维固相萃取柱中的纳米纤维, 纤维直径为 200 ~ 300 nm, 纤维表面略粗糙(见图 1)。

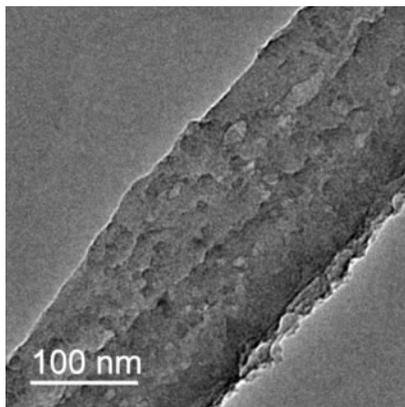


图1 电子显微镜下观察纳米纤维

1.2.2 色谱条件 按照参考文献方法<sup>[4-6]</sup>和预实验, 确定色谱条件为: 岛津 ODS-2 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇 1% 冰醋酸水溶液(45:55, V/V); 流速 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 295 nm; 进样量 20 μL。

1.2.3 标准溶液配制 取适量盐酸川芎嗪对照品, 甲醇溶解, 配制成 1 mg/mL 标准储备液, 于 4 °C 保存。以甲醇逐级稀释标准储备液, 得到实验所需浓度的系列标准溶液。

### 1.2.4 样品前处理条件优化

1.2.4.1 样品稀释液选择 人血浆中的其他成分如蛋白质、盐等浓度较高, 会影响纳米纤维固相萃取柱的提取效率, 同时样品 pH 值也影响纳米纤维固相萃取柱的提取效率。本实验分别选取 5% 氨水、1% 氨水、0.5% 氨水、0.1% 氨水、去离子水和 0.5% 磷酸水溶液, 在控制其他条件不变的基础上, 考察 pH 值以及不同浓度氨水对川芎嗪提取效率的影响。

结果表明酸性环境不利于川芎嗪的提取, 同时, 随着氨水浓度的提高, 芎嗪的提取效率升高, 因此本实验选择 1% 氨水作为样品稀释液。

1.2.4.2 样品溶液稀释倍数 提高样品溶液的稀释倍数可以减少杂质浓度, 降低杂质对川芎嗪提取效率的影响, 在控制其他条件不变的基础上, 本实验观察样品溶液稀释 1、2、3、4、5 倍后对回收率的影响。结果表明稀释倍数为 3 倍时, 提取效率较稀释倍数为 2 倍和 1 倍的高, 稀释倍数大于 3 倍后, 提取效率趋于稳定, 但较大的稀释倍数会增加过柱时间, 降低样品处理效率, 因此本实验选择使用样品稀释液把血浆样品稀释 3 倍。

1.2.4.3 淋洗溶液选择 选择适当淋洗溶液可减少洗脱液中杂质, 一方面能净化色谱图, 去除杂质干扰, 一方面能防止血浆中的蛋白质污染色谱柱, 延长色谱柱寿命。本实验分别采用 200 μL 去离子水、5% 甲醇水溶液、10% 甲醇水溶液、20% 甲醇水溶液进行淋洗。结果表明随着甲醇浓度的提高, 目标物的回收率逐渐降低, 色谱图中目标物附近均无干扰, 因此选择 200 μL 去离子水对 PCAX 型纳米纤维固相萃取柱进行淋洗。

1.2.4.4 洗脱液选择 川芎嗪易溶于有机溶剂, 且流动相使用的有机相为甲醇, 故考虑以甲醇为洗脱液。由于样品在进行固相萃取前, 需用氨水稀释, 可能由于碱性环境能促进川芎嗪与纳米纤维的相互作用, 相反酸性环境可能会破坏川芎嗪与纳米纤维之间的作用。本实验考察 50 μL 5% 乙酸水溶液甲醇(5:95)、1% 乙酸水溶液甲醇(5:95)、0.5% 乙酸水溶液甲醇(5:95)、95% 甲醇、甲醇等洗脱液的洗脱效果。结果表明不同浓度的乙酸甲醇溶液与甲醇的洗脱效果相当, 因此本实验使用甲醇作为洗脱液。

1.2.5 样品前处理 取适量人血浆置于离心管中, 加入氨水, 涡旋 2 min 后待处理。甲醇活化 PCAX 型纳米纤维固相萃取柱后, 用 200 μL 甲醇冲洗, 然后将处理后的血浆溶液上样, 待所有血浆溶液通过后, 用 200 μL 去离子水冲洗, 再用 50 μL 洗脱液洗脱, 收集洗脱液, 进行高效液相色谱分析。

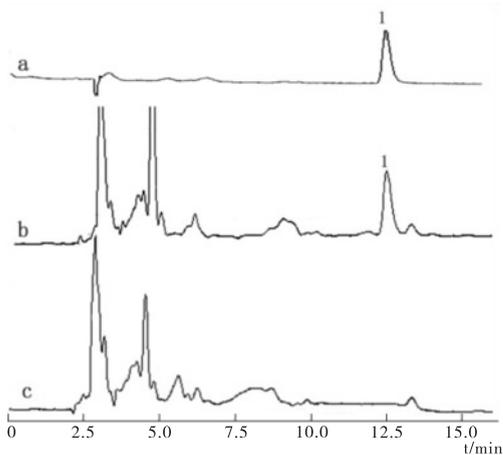
1.2.6 川芎嗪标准曲线制备 准确量取 0.5 mL 空白血浆, 加入川芎嗪标准溶液, 使血浆中川芎嗪的浓度分别为 0.01、0.05、0.10、1.00、2.00 μg/mL, 按 1.2.5 方法进行处理。以标准血浆中川芎嗪浓度为横坐标(X), 以川芎嗪的峰面积为纵坐标(Y), 得血浆中川芎嗪标准曲线。

1.2.7 回收率与精密度 精确量取 0.5 mL 空白血

浆,分别加入含0.1、0.4、1.0  $\mu\text{g}$  川芎嗪的标准溶液50  $\mu\text{L}$ ,按1.2.5方法进行处理,每个样品平行5次,计算回收率和相对标准偏差(RSD)。

## 2 结果

在1.2.2色谱条件下进行分析,川芎嗪的保留时间为12.55 min,未见明显干扰物质(见图2)。该条件下人血浆中川芎嗪的标准曲线方程为: $Y = 36\,576 * X + 2\,335$ , $r = 0.998$ ,在0.01 ~ 2.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内有良好线性关系。该方法的检出限( $S/N > 3$ )为0.003  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,回收率为94.88% ~ 103.11%,RSD为2.6% ~ 4.3%(见表1)。



a: 川芎嗪标准溶液; b: 人血浆加标样品; c: 空白血浆; 1: 川芎嗪  
图2 人血浆中川芎嗪的高效液相色谱图

表1 人血浆中川芎嗪的加标回收率与精密度( $n = 5$ )

加标量/ $\mu\text{g}$	回收率/%	RSD/%
0.1	103.11 $\pm$ 3.29	3.2
0.4	94.88 $\pm$ 2.51	2.6
1.0	98.19 $\pm$ 4.22	4.3

## 3 讨论

在药物的药理学和药代学研究中,常常需要检测血浆中药物的浓度,而动物实验中,可获取的生物样品的量比较少,尤其是血浆样品。本文使用纳米纤维作为固相萃取法的吸附材料,凭借纳米纤维的高效吸附和脱附性能,血浆样品仅需0.5 mL,经过碱化稀释后,即可进行固相萃取处理,免去蛋白沉淀以及有机溶剂萃取,大大提高样品处理的效率,减少因蛋白沉淀和有机溶剂萃取时所造成的误差。由于纳米纤维具有较高的吸附性能,因此填装量只有10 mg左右,有效减少柱床体积,洗脱液用量只需50  $\mu\text{L}$ 即可满足洗脱需求,洗脱液不需要进一步氮吹

浓缩,即可达到浓缩效果。纳米纤维直径只有300 nm左右,使得纳米纤维固相萃取柱中的纤维间隙较小,虽然这使得样品的过柱阻力较大,但能有效阻挡溶液中的颗粒物,洗脱液不需要进行过滤便可直接进色谱检测。

本研究建立的方法,使用1%氨水稀释血浆样品,经PCAX型复合阴离子交换纳米纤维固相萃取柱萃取血浆中的川芎嗪,然后用200  $\mu\text{L}$ 去离子水冲洗,再用50  $\mu\text{L}$ 洗脱液洗脱,最后进行高效液相色谱分析,大大减少了样品前处理的步骤,提高样品前处理的效率,同时降低血浆样品的需要量,减少有机溶剂的使用,有效提高检测灵敏度,可满足药理学和药代学等研究中川芎嗪血药浓度测定的要求。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] 梁桂才,欧念飞. 丹参川芎嗪注射液在脑血栓患者中的应用价值[J]. 中国实用神经疾病杂志,2014,17(10):110.
- [2] 赵龙,庄严. 丹参川芎嗪注射液治疗老年冠心病心绞痛32例[J]. 内蒙古中医药,2013,32(8):34.
- [3] 聂金艳. 川芎嗪治疗血栓闭塞性脉管炎的临床观察及护理[J]. 航空航天医药,2000,11(1):48.
- [4] 杨丽铃,冯兵. HPLC法测定延肾胶囊中川芎嗪的含量[J]. 西南国防医药,2016,26(2):148.
- [5] 韩锋,程艳静,邓晋丽,等. RP-HPLC法测定兔血浆中盐酸川芎嗪和阿魏酸[J]. 现代药物与临床,2014,29(4):359.
- [6] 王利胜,袁爱贤,韩坚,等. HPLC法测定川芎嗪在小鼠血浆、脑、肝中的含量[J]. 中国药房,2008,19(9):654.
- [7] 孙进华,李先荣. UPLC-LTQ-Orbitrap快速鉴定丹参川芎嗪注射液中化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(15):64.
- [8] 秦焕杰,李春茹,王汝丹,等. 液相色谱质谱联用法测定比格犬血浆中川芎嗪的浓度[J/CD]. 临床医药文献电子杂志,2015,2(12):2247.
- [9] 胡晓,李新华,熊玉卿. 固相萃取 HPLC 测定人血清磷酸川芎嗪及其在药代动力学研究中的应用[J]. 药物分析杂志,2006,26(12):1754.
- [10] 翁伟宇,沈腾,徐惠南,等. 固相萃取-高效液相色谱法测定人血浆中的川芎嗪[J]. 色谱,2005,23(03):276.
- [11] KANG X, PAN C, XU Q, *et al.* The investigation of electrospun polymer nanofibers as a solid-phase extraction sorbent for the determination of trazodone in human plasma [J]. *Anal Chim Acta*,2007,587(1):75.
- [12] 王燕,陈利琴,康学军,等. 电纺纳米纤维固相萃取犬血浆中维拉帕米[J]. 中国药理学通报,2007,23(6):832.
- [13] KANG XJ, CHEN LQ, ZHANG YY, *et al.* Performance of electrospun nanofibers for SPE of drugs from aqueous solutions [J]. *J Sep Sci*,2008,31(18):3272.
- [14] QI D, KANG X, CHEN L, *et al.* Electrospun polymer nanofibers as a solid-phase extraction sorbent for the determination of trace pollutants in environmental water[J]. *Anal Bioanal Chem*,2008,390(3):929.

# 中药注射剂遮/避光药品管理的探索与实践

张乃菊<sup>1</sup>, 陈天平<sup>2</sup>, 刘金春<sup>3</sup>, 姜晓东<sup>1</sup>, 邢质君<sup>1</sup>, 姚 丹<sup>1</sup>, 陈媛媛<sup>1</sup>, 葛 林<sup>1</sup>, 刘 雁<sup>1</sup>, 石庆平<sup>1</sup>

**[摘要]** **目的:**探索提高药剂科中药注射剂避光药品管理水平的方法。**方法:**对某医院各中药房和静脉配制中心的中药注射剂进行检查,分析不合格药品分布情况,找出中药注射剂不合格药品占比高的问题类型,解析存在的问题,制订相应的管理制度和措施,并进行复查。**结果:**共检出中药注射剂不合格现象 37 次,其中遮/避光药品未有效避光为主要的合格原因(25/37, 67.57%)。以中药注射剂遮/避光药品未有效避光为本次重点整改对象干预后,复查共检出未有效避光的合格中药注射剂 1 次,中药注射剂拆零未有效避光现象明显下降。并根据医院实际情况,制作尺寸大小适宜和材质合适的遮光盒,申请获批遮光盒外观设计专利(ZL 2015 3 0420142.9)。**结论:**结合中药注射剂遮/避光药品的特点和管理中存在的问题,制订了切实可行的管理制度和保障措施,明显提高了药剂科中药注射剂遮/避光药品的管理水平。

**[关键词]** 中药注射剂;避光药品;遮光药品;药事管理;不合格药品检查

**[中图分类号]** R 283.6

**[文献标志码]** A

**DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.06.024

## Exploration and practice of the management of traditional Chinese medicine injections with light-protecting/shading

ZHANG Nai-ju<sup>1</sup>, CHEN Tian-ping<sup>2</sup>, LIU Jin-chun<sup>3</sup>, JIANG Xiao-dong<sup>1</sup>, XING Zhi-jun<sup>1</sup>,  
YAO Dan<sup>1</sup>, CHEN Yuan-yuan<sup>1</sup>, GE Lin<sup>1</sup>, LIU Yan<sup>1</sup>, SHI Qing-ping<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmacy, 2. Department of Cardiovascular, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004; 3. Department of Pharmacy, The Affiliated Drum Tower Hospital, School of Medicine, Nanjing University, Nanjing Jiangsu 210008, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the ways to improve the management level of traditional Chinese medicine injections with light-protecting/shading. **Methods:** The Chinese medicine pharmacy injections in dispensary of traditional Chinese medicine and intravenous preparation center in a hospital were examined, the distribution of nonconforming drugs were analyzed, the problem types with high proportion of unqualified drugs in TCM injections were identified and analyzed, and the corresponding management system and measures were formulated and reexamined. **Results:** A total of 37 cases of unqualified TCM injections were detected, and the main reason for the unqualified drugs was that the drugs failed to effectively avoid the light (25/37, 67.57%). One case of unqualified TCM injections without effective shading was detected by review after the intervention measure targeting at effective avoiding the light was implemented, and no effective protection from light in dismantling of traditional Chinese medicine injections significantly decreased. According to the actual situation of hospital, some light-shielding box with appropriate size and material were made, and the design patent of the shading

[收稿日期] 2018-08-03 [修回日期] 2019-05-28

[基金项目] 安徽省高等学校自然科学研究一般项目(KJ2015B125by); 南京市科技发展计划项目(201503020); 南京大学医学管理研究所课题(NDYG2015005); 蚌埠医学院科研课题(BYKY13119sk, BYKY14118sk); 蚌埠医学院高新技术项目(20140157); 蚌埠医学院自然科学项目(Byky1369)

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 1. 药剂科, 2. 心血管科, 安徽蚌埠 233004; 3. 南京大学医学院附属鼓楼医院 药学部, 江苏南京 210008

[作者简介] 张乃菊(1981-), 女, 硕士, 主管药师。

[通信作者] 石庆平, 硕士研究生导师, 主任药师, 教授。E-mail: ziyuanzj@163.com

[15] 黄亮, 杨立刚, 耿彬彬, 等. 纳米纤维在辣椒粉中苏丹红 II 测定中的应用[J]. 分析实验室, 2010, 29(11): 28.

[16] CHEN LQ, KANG XJ, SUN J, et al. Application of nanofiber-packed SPE for determination of salivary-free cortisol using fluorescence precolumn derivatization and HPLC detection[J]. J Sep Sci, 2010, 33(15): 2369.

[17] 周小玲, 王羽, 陈利琴, 等. 纳米纤维固相萃取-高效液相色谱法测定血浆中的 5-羟色胺[J]. 色谱, 2011, 29(11): 1107.

[18] DENG J, KANG X, CHEN L, et al. A nanofiber functionalized

with dithizone by co-electrospinning for lead (II) adsorption from aqueous media[J]. J Hazard Mater, 2011, 196(1): 187.

[19] 郑胜兰, 陈利琴, 曲子健, 等. 牛奶中氯霉素的纳米纤维固相萃取快速前处理方法[J]. 食品科学, 2012, 33(24): 180.

[20] 邓思维, 邓剑军, 王婷婷, 等. 纳米纤维固相萃取-高效液相色谱-荧光检测麻辣烫汤液中喹诺酮类药物[J]. 分析化学, 2014, 42(8): 1171.

(本文编辑 赵素容)