

反相高效液相色谱法测定水杨酸血药浓度及其应用

张丽, 何林, 余继英, 吴正中, 孙世明(四川省人民医院药剂科, 成都市 610072)

中图分类号 R97 文献标识码 A 文章编号 1001-0408(2003)05-0289-03

摘要 目的: 建立反相高效液相色谱测定水杨酸血药浓度的方法, 并将其用于阿司匹林复方制剂中水杨酸药代动力学及生物利用度的研究。方法: 采用 Waters2690 高效液相色谱仪, 以 Diamonsil C₁₈ 为色谱柱(4.6mm ×250mm, 5μm), 以甲醇-乙腈-0.2%磷酸(18 32 50)为流动相, 检测波长为 237nm, 流速为 1.0ml/min。结果: 水杨酸的浓度在 0.40~101.00μg/ml 范围内线性关系良好($r = 0.999$)。结论: 本法操作简便、灵敏、快速, 适用于水杨酸的药代动力学研究。

关键词 反相高效液相色谱法; 水杨酸; 血药浓度; 药代动力学

Determination of the Concentrations of Salicylic Acid in Serum With RP-HPLC and Its Application

ZHANG Li, HE Lin, YU Jiying, WU Zhengzhong, SUN Shiming (Dept. of Pharmacy, People's Hospital of Sichuan Province, Chengdu 610072)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a RP-HPLC method for the determination of salicylic acid in serum and to apply this method to the pharmacokinetic and bioavailability study of salicylic acid in compound aspirin preparations. METHODS: Waters 2690 HPLC instrument was used with Diamonsil C₁₈ column(5μm, 250mm ×4.6mm) as stationary phase and methanol-acetonitrile-0.2% phosphoric acid(18 32 50) as mobile phase at a flow rate of 1.0ml/min, and the detective wavelength was 237nm. RESULTS: Calibration curve of salicylic acid was linear in the range of 0.40~101.00μg/ml($r = 0.999$). CONCLUSION: The method is simple, sensitive, rapid and suitable for pharmacokinetic and bioavailability study of salicylic acid.

KEY WORDS RP-HPLC; salicylic acid; serum concentration of drug; pharmacokinetics

阿司匹林是临床广泛应用的解热镇痛和消炎、抗风湿药物, 至今仍常用不衰, 被制成各种缓释制剂^[1,2]或复方制剂应用。由于该药在体内可很快转化为活性代谢物水杨酸, 故在进行阿司匹林的药代动力学及生物利用度的研究时, 大多选择水杨酸作为测定对象。笔者建立了以反相高效液相色谱测定水杨酸血药浓度的方法, 并用于阿司匹林复方制剂中水杨酸药代动力学及生物利用度的研究, 效果良好。

1 仪器与试剂

Waters2690 高效液相色谱仪, 配置有 996 二极管阵列检测器及 Millennium 数据处理系统; H-1 漩涡混合器(上海青浦沪西仪器厂); TGL-16 高速离心机(上海医用仪器厂)。

水杨酸、苯甲酸对照品(中国药品生物制品检定所); 磷酸为分析纯, 乙腈为色谱纯; 水为超纯水。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(4.6mm ×250mm, 5μm), 流动相为甲醇-乙腈-0.2%磷酸(18 32 50), 检测波长为 237nm, 流速为 1.0ml/min。

2.2 溶液配制

精密称取 10.10mg 水杨酸对照品(批号: 0106-9501), 用甲醇溶解, 并定容至 10ml, 得到 1.010mg/L 水杨酸的储备液, 并用甲醇稀释成不同浓度的系列溶液。

精密称取 10.44mg 苯甲酸, 用甲醇溶解, 并定容至 10ml,

得到 1.044mg/L 苯甲酸的储备液。取 1ml 储备液, 用甲醇稀释至 10ml, 得到 104.4μg/ml 的内标工作液。

2.3 样品处理与测定

精密量取血清样品 0.5ml, 加入内标苯甲酸溶液(104.4μg/ml) 50μl, 乙腈 2ml, 漩涡振荡 2min, 15 000r/min 离心 5min, 取上清液 20μl, 在上述色谱条件下进样, 分别记录内标与样品的色谱图与峰面积。

按选定的色谱条件测得的水杨酸标准溶液、空白血清、空白血清加水杨酸标准溶液与血清样品色谱详见图 1。

由图 1 可见, 血清中物质不影响水杨酸的分离、测定, 阿司匹林、内标峰与样品峰分离良好, 复方组分中的其它组分在色谱条件下也不影响水杨酸的分离测定。血清中内标峰与水杨酸的保留时间分别为 6.2min 和 8.3min。

2.4 标准曲线制备

取 7 支试管, 分别加入不同体积的水杨酸系列溶液, 氮气吹干, 各试管分别加入 0.5ml 空白血清, 使其浓度分别为 0.40、1.01、2.02、4.04、10.10、40.10、101.00μg/ml, 照“2.3”项下方法, 从“加入内标苯甲酸溶液(104.4μg/ml) 50μl”起, 进行操作。以测得的水杨酸与苯甲酸的峰面积之比(R)为纵坐标, 对应的水杨酸浓度(C)为横坐标, 进行线性回归, 得到回归方程 $R = -0.02710 + 0.1231C$, $r = 0.999$ 。结果表明, 血清中水杨酸浓度在 0.40~101.00μg/ml 范围内, 浓度与峰面积比线性关系良好。本方法的最低检测浓度, 以 $s/n = 3$ 计, 为 0.2μg/

方法学比较[J]. 中国药房, 1999, 10(增刊): 86.

[5] Vind PS, Kamal KM, Shrikant D, et al. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and

pharmacokinetic studies[J]. *Pharmaceutical Research*, 1992, 9(4): 588.

(收稿日期: 2002-09-16 修回日期: 2002-11-28)

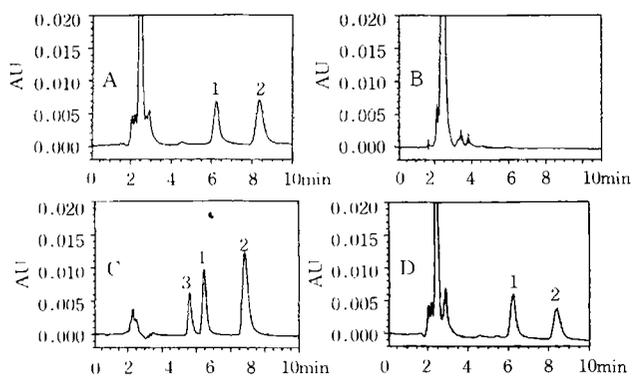


图1 高效液相色谱图

A. 苯甲酸及水杨酸标准溶液; B. 空白血清; C. 空白血清加阿司匹林、苯甲酸及水杨酸; D. 血清样品; 1. 苯甲酸; 2. 水杨酸; 3. 阿司匹林

Fig 1 HPLC chromatogram

A. chromatograms of standard solutions of benzoic acid and salicylic acid; B. chromatogram of blank serum; C. chromatograms of blank serum with aspirin and benzoic acid and salicylic acid; D. chromatogram of serum sample; 1. benzoic acid; 2. salicylic acid; 3. aspirin ml 血清。

2.5 回收率试验

分别于 0.5ml 的空白血清中加入 3 种不同浓度的水杨酸对照品溶液, 混匀, 得 1.01、10.10、101.00 $\mu\text{g/ml}$ 高、中、低 3 种不同水杨酸浓度的血清样品, 按“2.3”项下方法操作, 测定出血清中水杨酸浓度, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 回收率试验结果(n = 5)

加入量($\mu\text{g/ml}$)	测得量($\mu\text{g/ml}$)	回收率(%)	RSD(%)	$\bar{x} \pm s$ (%)
1.01	1.09 \pm 0.02	107.92 \pm 1.56	1.45	
10.10	10.62 \pm 0.05	105.11 \pm 0.47	0.44	104.76 \pm 3.02
101.00	102.25 \pm 1.18	101.25 \pm 1.14	1.16	

由表 1 可见, 3 种浓度的平均回收率为 (104.76 \pm 3.02) % (n = 15)。

2.6 精密度试验

分别于 0.5ml 的空白血清中加入高、中、低 3 种不同浓度的水杨酸对照品溶液, 混匀, 得到 1.01、10.10、101.00 $\mu\text{g/ml}$ 高、中、低 3 种不同水杨酸浓度的血清样品, 按“2.3”项下方法操作, 测定日内与日间精密度, 结果见表 2。

表 2 精密度试验结果(n = 5)

浓度($\mu\text{g/ml}$)	日内测得值					日间测得值				
1.01	1.07	1.08	1.11	1.09	1.10	1.10	1.11	1.09	1.06	1.04
	RSD = 1.45%					RSD = 2.57%				
10.10	10.60	10.62	10.61	10.69	10.56	10.60	11.66	10.68	10.90	10.79
	RSD = 0.44%					RSD = 3.75%				
101.00	103.95	102.48	101.26	102.56	101.10	102.56	110.55	110.03	113.09	109.84
	RSD = 1.16%					RSD = 3.61%				

2.7 稳定性试验

取已知浓度水杨酸血清样品数份, 分别置于室温、冰融、冰冻条件下存放不同时间后, 按血清样品的处理与测定方法操作, 测定水杨酸含量, 考察样品放置稳定性。结果表明, 水杨酸在室温条件下至少能稳定 8h, 在冰融条件下至少能稳定 12h, 在冰冻条件下至少能稳定 28d。此外, 笔者还考察了阿司匹林的体外水解对水杨酸测定的影响。结果表明, 在冰冻条件下

1wk 内, 阿司匹林与水杨酸的浓度都保持恒定, 说明将样品保存在冰冻条件下, 1wk 内阿司匹林的体外水解对水杨酸的测定没有影响。

2.8 药代动力学研究

选择 24 名经体检合格并签署知情同意书的男性健康志愿受试者, 禁食 12h 后, 口服含 250mg 阿司匹林的某复方制剂供试品及参比品。服药前取空白血清, 服药后分别在 0.17、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、6.0、9.0、12.0、15.0h 肘静脉采血约 3ml。血样立即分取血清, 血清置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰柜放置供测定。服药后 3h 内禁食并禁止饮水, 受试期间受试者禁烟、酒、茶, 进食统一餐。

用本法测定水杨酸血清浓度, 得到口服含 250mg 阿司匹林复方制剂后水杨酸均值的药-时曲线, 详见图 2。

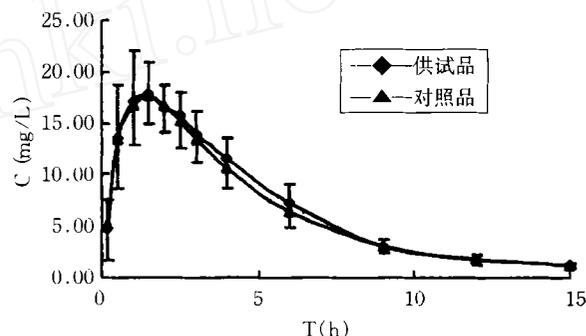


图 2 单剂量口服含 250mg 阿司匹林的复方制剂后水杨酸血清浓度均值的药-时曲线

Fig 2 Concentration - time curve of salicylic acid in serum sample after taking a single dose of the compound preparation containing 250mg aspirin

经 3p97 药代动力学程序进行处理, 按无滞后时间的一室模型进行拟合, 得到有关药代动力学参数, 详见表 3。

表 3 单剂量口服含 250mg 阿司匹林的复方制剂后水杨酸的药代动力学参数

Tab 3 Pharmacokinetic parameters of salicylic acid after taking a single dose of the preparation containing 250mg aspirin

参数	供试品	参比品
AUC _{0-t} ($\mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{ml})$)	103.02 \pm 11.49	98.52 \pm 13.45
AUC _{0-∞} ($\mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{ml})$)	109.73 \pm 11.80	105.52 \pm 14.55
T _{max} (h)	1.58 \pm 0.57	1.48 \pm 0.58
C _{max} ($\mu\text{g/ml}$)	17.36 \pm 3.08	17.01 \pm 2.83
A ($\mu\text{g/ml}$)	34.82 \pm 12.74	32.72 \pm 12.82
K _e (1/h)	0.25 \pm 0.04	0.25 \pm 0.04
K _a (1/h)	1.59 \pm 0.80	2.02 \pm 1.58
T _{1/2} (h)	2.83 \pm 0.41	2.83 \pm 0.36
CL/F(L/h)	2.46 \pm 0.35	2.56 \pm 0.35
V/F(L)	9.98 \pm 1.67	10.41 \pm 1.80
F (%)	105.57 \pm 12.76	
F ₁ (%)	105.13 \pm 13.25	

$$F_1 = \text{AUC}_{0-t} \text{ 供试品} / \text{AUC}_{0-t} \text{ 参比品}; F_2 = \text{AUC}_{0-\infty} \text{ 供试品} / \text{AUC}_{0-\infty} \text{ 参比品}$$

$$F = \text{AUC}_{0-t} \text{ test agent} / \text{AUC}_{0-t} \text{ reference substance}; F = \text{AUC}_{0-\infty} \text{ test agent} / \text{AUC}_{0-\infty} \text{ reference substance}$$

3 讨论

阿司匹林血样在放置过程中不稳定, 会继续水解为水杨酸, 故前、后所测水杨酸是否受阿司匹林的体外水解影响尚需

帕歌斯治疗前列腺痛 30 例疗效观察

张 磊,何有华,陈志勇(温州医学院附属第二医院,温州市 325000)

中图分类号 R97 文献标识码 A 文章编号 1001-0408(2003)05-0291-02

摘要 目的:评价帕歌斯治疗前列腺痛的疗效。方法:30 例前列腺痛患者服用帕歌斯片,每次 1 片,每日 3 次。治疗前及治疗 4 周内每周进行 1 次慢性前列腺症状积分指数评分,观察服药前、后评分变化。结果:第 1 周~第 4 周帕歌斯有效率分别为 16.7%、33.3%、40.0%、76.7%,服药期间未发现明显的不良反应。结论:帕歌斯治疗以疼痛为主要症状的前列腺痛具有明显疗效,且患者易耐受,不良反应少,但起效较慢。建议初始治疗加用起效较快的非甾体类抗炎镇痛药。

关键词 帕歌斯;前列腺痛;疗效

Observation of the Therapeutic Effect of Pagosid on Prostatodynia

ZHANG Lei, HE Youhua, CHEN Zhiyong (The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To evaluate the therapeutic effect of pagosid on prostatodynia. **METHODS:** 30 patients with prostatodynia were evaluated; pagosid was taken orally 1 tablet t.i.d and NIH-CPSI was scored before treatment and q.w. 4 weeks after treatment. The results were evaluated. **RESULTS:** Effective rates from the first to the fourth week were 16.7%, 33.3%, 40.0%, 76.7% respectively. No obvious adverse reactions were found in the period of treatment. **CONCLUSION:** Pagosid has obvious effect on prostatodynia with pain as chief complaint, and few adverse reactions will develop. However it is slower to take effect, and therefore nonsteroid analgesic is recommended in the early stage of treatment.

KEY WORDS pagosid; prostatodynia; therapeutic effect

前列腺痛在泌尿科门诊较常见,约占慢性前列腺炎患者的 31%,表现为慢性前列腺炎的症状,但前列腺液白细胞、卵磷脂小体在正常范围内^[1,2]。由于前列腺痛的病因尚不清楚,故治疗效果至今不理想。帕歌斯往往被用于治疗骨关节炎、类风湿病。笔者尝试用帕歌斯治疗前列腺痛,发现也有一定疗效。

1 资料与方法

1.1 对象:选择 2001 年 12 月~2002 年 6 月在我院泌尿外科门诊确诊为前列腺痛的患者共 30 例,年龄 18 岁~48 岁,平均 31 岁;病程 2 个月~3 年,平均 13 个月;初诊 12 例,其余均在外院治疗但效果不佳。

1.2 方法:帕歌斯片(瑞士端纳博士药厂生产)1 片,每日 3 次。治疗前及治疗 4 周内每周进行 1 次美国国立卫生研究所的慢性前列腺症状积分指数(NIH-CPSI)1~4(疼痛积分)^[1]评分,评分均下降<30%为无效,30%为有效,60%为显效。

2 结果

帕歌斯治疗前列腺痛的疗效详见表 1。

3 讨论

有人认为,前列腺痛与盆部肌肉的张力升高有关,即“骨盆

表 1 帕歌斯治疗前列腺痛疗效比较

Tab 1 Comparison of the therapeutic effect of pagosid on prostatodynia

	无效	有效	显效	总有效率
第1周	25	5	0	16.7%
第2周	20	9	1	33.3%
第3周	18	5	7	40.0%
第4周	7	14	9	76.7%*

与前 3 周比较,* $P < 0.01$;与第 2 周比较, $P > 0.05$;与第 1 周比较, $P > 0.05$

* vs the first 3 weeks: $P < 0.01$; vs the 2nd week: $P > 0.05$; vs the 1st week: $P > 0.05$

张力性肌痛”,系由局部的疼痛和炎症刺激,导致盆底肌肉的习惯性痉挛所致,常表现为阴茎、会阴、睾丸、腰骶、耻骨上疼痛,有的患者还表现为尿频、尿急、尿痛、排尿不畅以及尿流率的改变。帕歌斯是选用纯天然珍稀植物“魔鬼爪”块状根茎,经科学的提取方法精制而成的植物制剂,其主要有效成分是 Harpagoside、Harpagide、Procumbide,可抑制由乙酰胆碱、缓激肽、烟碱、5-羟色胺、前列腺素 E₂ 所引起的刺激反应,同时

加以研究。笔者考查了阿司匹林血样在冰冻过程中的水解情况,结果发现,经冰冻保存,阿司匹林血样可稳定 1wk,能够满足测定要求。由此说明,通过测定阿司匹林的代谢产物水杨酸来研究阿司匹林的药代动力学及生物利用度是可行的。

参考文献

[1] 杜江波,张媚,陆红,等.阿司匹林肠溶缓释胶囊的

人体药代动力学及生物利用度[J].中国药房,1998,9(2):73.

[2] 宗红心,赵钰,李竟.阿司匹林缓释片的研制及药代动力学[J].中国药理学杂志,2000,35(2),110.

(收稿日期:2002-08-16 修回日期:2002-11-11)