

LC-MS/MS 在冠心舒胶囊大鼠体内药动学中的应用

陈俊杰¹, 王丹辉², 傅国强¹, 候莉¹, 何秀菊¹, 杨世林¹, 范玫玫^{1*}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330006

2. 解放军 94 医院, 江西 南昌 330053

摘要: **目的** 建立测定丹参素在大鼠血浆中浓度的 LC-MS/MS 方法, 并将该方法用于冠心舒胶囊在大鼠体内的药动学。**方法** 色谱柱为 C₁₈ 柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 采用梯度洗脱的方式分离被测物质, 利用液液萃取的方法处理血浆样品, 以多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 扫描方式检测。**结果** 丹参素在线性范围内线性关系良好, 日内日间精密度 (RSD) 均小于 15%, 准确度 (RE) 在 ±15% 以内, 平均提取回收率在 80% 以上, 基质效应在 90%~110%。**结论** 该方法适合于冠心舒胶囊在大鼠体内的药动学研究。

关键词: 液质联用; 丹参素; 大鼠血浆; 液液萃取; 药动学

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2014)03-0227-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.03.008

Application of LC-MS/MS on pharmacokinetics of Guanxinshu Capsule in rats

CHEN Jun-jie¹, WANG Dan-hui², FU Guo-qiang¹, HOU Li¹, HE Xiu-ju¹, YANG Shi-lin¹, FAN Mei-mei¹

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

2. The 94 Hospital of PLA, Nanchang 330053, China

Abstract: Objective To establish an LC-MS/MS method for determining danshensu (DSS) in rat plasma, and to apply the method to the pharmacokinetics of Guanxinshu Capsule in rats. **Methods** The analytes were separated on a C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) and a triple-quadrupole mass spectrometry equipped with electrospray ionization (ESI) source was applied for detection. The liquid-liquid extraction cartridge was employed to extract the analyte from rat plasma, and multiple reaction monitoring was used to detect the samples. **Results** The method was linear over the concentration ranges of 1—1 000 ng/mL for DSS. The intra- and inter-day relative standard deviation (RSD) were less than 15% and the relative errors were all within 15%, with the recovery of DSS (> 80%) and matrix effect of 90%—110%. **Conclusion** The method is successfully applied to the pharmacokinetic study of Guanxinshu Capsule in rat.

Key words: UPLC-MS/MS; danshensu; rat plasma; liquid-liquid extraction; pharmacokinetics

丹参最早收载于《神农本草经》, 被列为上品, 其功效主要是祛瘀止痛、活血通经、清心除烦等^[4]。本课题组提取了丹参中的酚酸类成分, 制备了冠心舒胶囊, 动物体内的药理实验表明, 冠心舒胶囊能很好的治疗心血管系统疾病^[1-7]。在本研究中, 建立大鼠血浆中丹参素的 LC-MS/MS 测定方法, 并将该方法应用于冠心舒胶囊在大鼠体内的药动学研究。

1 仪器和材料

沃特斯 Premier XE 三重四级杆串联质谱仪和 Acquity 超高效液相(美国沃特斯公司), 沃特斯 BEH

C₁₈ column (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm, 美国沃特斯公司)。

丹参素 (danshensu, DSS) 对照品 (批号 134678-201101) 和对羟基苯甲酸对照品 (批号 389213-201005) 购自中国食品药品检定研究院, 质量分数均为 99.3%。冠心舒胶囊 (批号 20100912) 由中药固体制剂制造技术国家工程研究中心制备。甲醇、乙腈 (色谱级, 美国 Fisher 公司), 醋酸乙酯 (分析纯, 天津科密欧化学试剂有限公司), 甲酸 (色谱级, Sigma 公司)。

收稿日期: 2014-01-30

基金项目: 江西省青年科技基金 (20114BAB205077)

作者简介: 陈俊杰, 男, 在读硕士, Tel: 15070977609 E-mail: jonejay_chen@foxmail.com

*通信作者 范玫玫, 女, 研究员, 硕士生导师。Tel: (0791)87117101 E-mail: f_mei@163.com

SD 大鼠, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司(合格证号 SLK20110215)。

2 方法和结果

2.1 溶液的配制及样品的处理

2.1.1 系列标准曲线溶液的配制 取丹参素约 12.5 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 用水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制备成质量浓度是 500 $\mu\text{g/mL}$ 的储备液 I。稀释储备液 I, 制备质量浓度是 10 $\mu\text{g/mL}$ 的储备液 II。

将储备液 II 逐级稀释, 制备质量浓度分别是 1、2、5、50、100、500、1 000 ng/mL 的系列标准曲线溶液。将储备液 II 稀释, 制备低、中、高 3 个质量浓度的质量控制 (QC) 溶液, 质量浓度分别是 2、500、800 ng/mL。所有溶液置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.1.2 内标溶液的制备 取对羟基苯甲酸 10.1 mg, 精密称定, 置 20 mL 量瓶中, 用水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制备成质量浓度是 505.0 $\mu\text{g/mL}$ 的储备液。取该储备液适量, 用水稀释成质量浓度是 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的内标工作溶液。

2.1.3 血浆样品的处理方法 取血浆样品 60 μL , 加入内标工作溶液 60 μL , 水 60 μL , 加 10 μL 的盐酸溶液 (1 mol/L), 涡旋 1 min 之后, 加入 1.5 mL 的醋酸乙酯溶液, 涡旋 5 min 后, 5 000 r/min 离心, 取上清液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干, 残留物用 200 μL 乙腈-水 (80 : 20) 的混合溶液复溶, 取 5 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

2.2 测定条件

2.2.1 液相条件 色谱柱为沃特斯 UPLC BEH C₁₈ column (50 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm , 美国沃特斯公司)。流动相 A 是乙腈, 流动相 B 是水 (含 0.1% 甲酸), 梯度程序如下: 0 min, 5%A; 2.6 min, 30%A; 2.61 min, 5%A; 4.0 min, 5%A。体积流量 0.2 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 5 μL 。弱洗和强洗溶液分别是乙腈-水-0.1% 甲酸 (5 : 95 : 0.1) 和乙腈-水-0.1% 甲酸 (95 : 5 : 0.1)。

2.2.2 质谱条件 离子源: ESI 源, 负离子检测, 高纯氮气用作脱溶剂气 (600 L/h) 和锥孔气 (50 L/h), 气体温度 380 $^{\circ}\text{C}$, 离子源温度是 120 $^{\circ}\text{C}$, 毛细管电压 2 700 V, 锥孔电压是 22 V。以多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 为扫描模式, 用于定量反应的离子分别是 197 \rightarrow 135 (丹参素, 碰撞能量是 17 eV), 137 \rightarrow 93 (对羟基苯甲酸, 碰撞能量是 22 eV)。二级扫描图见图 1。

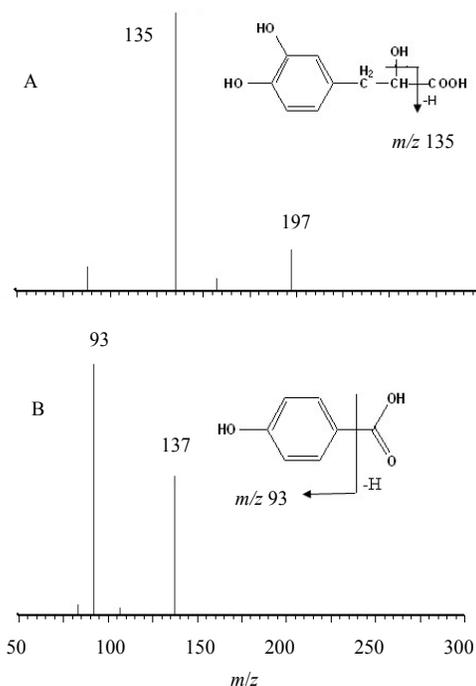


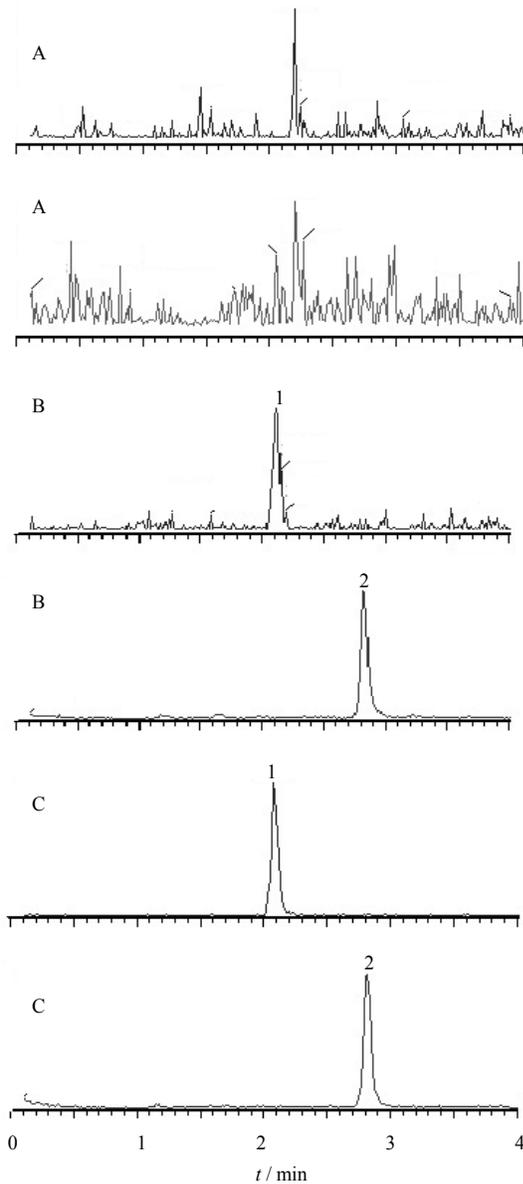
图 1 丹参素 (A) 和对羟基苯甲酸 (B) 的 MRM 图
Fig. 1 Representative MRM chromatograms of DSS (A) and *p*-hydroxybenzoic acid (B)

2.3 分析方法的确证

2.3.1 专属性考察 分别取 6 只大鼠的空白血浆 60 μL , 除不加内标外 (补加相应体积的甲醇), 其余按照 2.1.3 操作, 进行 LC-MS/MS 分析, 获得空白血浆色谱图, 见图 2A; 将最低定量限的丹参素和内标加入到空白血浆中, 按照 2.1.3 操作, 获得色谱图, 见图 2B; 取大鼠给药后的血浆 60 μL , 按照 2.1.3 操作, 获得样品色谱图, 见图 2C。由图 2 可知, 空白血浆中内源性物质不干扰丹参素和内标的测定。

2.3.2 标准曲线的制备 取空白血浆 60 μL , 分别加入系列标准溶液 60 μL , 按照 2.1.3 操作, 每一浓度进行双样本分析, 记录色谱图, 连续记录 3 d。以待测物浓度为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标, 用加权最小二乘法进行回归运算, 得回归方程如下, 丹参素: $Y=0.007 2X-0.008 5$, $r=0.9956$, 线性范围 1.0~1 000.0 ng/mL。信噪比 (S/N) 为 10 时丹参素的最低定量限是 1.0 ng/mL。

2.3.3 精密度和准确度 取空白血浆 60 μL , 将 60 μL 的水换成相应体积的 QC 样品, 其余按照 2.1.3 操作, 连续测定 3 d, 并与标准曲线同时进行, 计算 QC 样品的测得浓度, 与配制浓度对照, 计算精密度与准确度, 结果见表 1。



1-丹参素; 2-对羟基苯甲酸
1-DSS; *p*-hydroxybenzoic acid

图2 空白血浆(A)、空白血浆加最低定量限的丹参素和内标(B)及大鼠给予冠心舒胶囊后的血浆(C) LC-MS/MS谱图

Fig. 2 LC-MS/MS chromatogram of blank rat plasma sample(A), blank plasma spiked with DSS at LLOQ and IS(B), and rat plasma sample following an oral dose of Guanxinshu Capsule (C)

2.3.4 提取回收率 取空白血浆 60 μL , 将 60 μL 的水换成相应体积的 QC 样品, 其余按照 2.1.3 操作, 制备低浓度和高浓度的质量控制血浆样品, 6 样本平行分析, 峰面积是 A_1 ; 另取空白血浆 60 μL , 按照 2.1.3 操作, 残留物用丹参素 QC 样品的溶液溶解, 制成的样品浓度分别是丹参素 (2.0、800.0 ng/mL)

表 1 LC-MS/MS 法测定丹参素的精密度和准确度

Table 1 Precision and accuracy of DSS in rat plasma by LC-MS/MS

质量浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)		RSD/%		RE/%
加入量	实测值	日间	日内	
2.0	1.9	6.8	7.4	-5.0
500.0	534.1	8.2	5.3	6.8
800.0	865.3	3.9	6.7	8.1

进样分析, 获得峰面积是 A_2 。以每一浓度正常提取样品所得的峰面积 A_1 , 与未提取样品峰面积 A_2 均值的比值计算提取回收率。内标按照同样的方法测定回收率。丹参素和内标的提取回收率分别是 $(87.1 \pm 6.6)\%$ 和 $(89.3 \pm 5.4)\%$ 。

2.3.5 基质效应 丹参素低浓度和高浓度的 QC 样品分别进样分析, 记录峰面积 A_3 。与 2.3.4 制备的血浆样品的峰面积 A_2 进行比较, 以同一质量浓度血浆基质样品的峰面积 A_2 和无基质样品的峰面积 A_3 的比值计算基质效应。丹参素的平均基质效应是 $(106.5 \pm 3.7)\%$ 。

2.3.6 稳定性研究 考察处理后的血浆样品 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h 的稳定性, 考察血浆样品在 3 个冻融循环 ($-80 \sim 22^{\circ}\text{C}$), 长期稳定性 (-80°C 放置 30 d) 和室温放置 2 h 的稳定性。实验结果表明, 样品在上述条件下是稳定的。见表 2。

表 2 丹参素在不同条件下的稳定性

Table 2 Stability of DSS in human plasma under different conditions

储存条件	质量浓度/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)			
	加入量	实测值	RSD/%	RE/%
室温放置 2 h	2	1.9	4.3	-5.0
	800	771.2	5.2	-3.6
3 个冻融循环 ($-80 \sim 22^{\circ}\text{C}$)	2	2.1	3.8	5.1
	800	857.6	5.7	7.2
4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h	2	1.8	6.2	-10.1
	800	838.4	4.9	4.8
-80°C 放置 30 d	2	2.2	8.1	9.6
	800	848.0	3.2	6.0

2.4 分析方法在临床药物监测和药动学中的应用

2.4.1 给药方案 6 只 SD 大鼠, 给药前禁食过夜, 给水, ig 给予冠心舒胶囊内容物的羧甲基纤维素钠混悬液, 在 5.0、15.0、30.0 min 和 1、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、12.0、24.0 h 眼眶取血 0.2 mL, 放置在

涂有肝素的离心管中, 4 000 r/min 离心 10 min, 取血浆, 放在-80 °C 冰箱中待测。

2.4.2 血浆样品测定 按照 2.1.3 进行血浆样品的处理, 同时制备丹参素低、中、高 3 个质量浓度的 QC 样品, 每一质量浓度进行双样本分析。以当日的标准曲线计算 QC 样品及各时间点样品中丹参素的质量浓度, 质量控制样品测定结果的 RE 在±15% 之内。血药质量浓度-时间曲线见图 3。

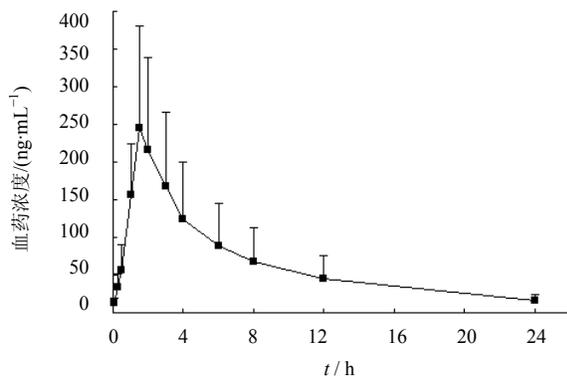


图 3 大鼠口服冠心舒胶囊后的血药浓度-时间曲线

Fig. 3 Blood drug concentration-time profiles of DSS following oral administration of Guanxinshu Capsule

2.4.3 药动学参数 丹参素大鼠体内的最大血药浓度 (C_{max}) 和达峰时间 (T_{max}) 直接由实测值读出。由血药浓度-时间曲线末四点做半对数图, 以 $\lg C-t$ 按最小二乘法进行线性回归, 所得斜率的绝对值即为消除速率常数 (k_e); 消除半衰期 ($t_{1/2}$) 为 $\ln 2/k_e$ 。药时曲线下面积 (AUC_{0-t}) 由梯形法求得。 C_{max} 和 T_{max} 分别是 245.7 ng/mL 和 1.5 h, AUC_{0-t} 是 1582.1 ng·h/mL, 消除半衰期 ($t_{1/2}$) 是 2.1 h。

3 讨论

本文建立了 HPLC-MS/MS 法测定大鼠血浆中的丹参素浓度。本方法灵敏度高, 满足了血浆样品中低浓度成分的测定。液液萃取的样品制备方法提

高了样品的洁净度, 降低了基质效应。最后本方法成功应用于冠心舒胶囊大鼠体内的药动学研究, 为中药新药的开发提供了支持。

参考文献

- [1] Lu T, Yang J L, Gao X M, *et al.* Plasma and urinary tanshinol from *salvia miltiorrhiza* (Danshen) can be used as pharmacokinetic markers for cardiogenic pills, a cardiovascular herbal medicine [J]. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36: 1578-1586.
- [2] Luo X J, Bi K S, Zhou S Y, *et al.* Determination of danshensu, a major active compound of *salvia miltiorrhiza* in dog plasma by HPLC with fluorescence detection [J]. *Biomed Chromatogr*, 2001, 15: 493-496.
- [3] Chang B B, Zhang L, Cao W W, *et al.* Pharmacokinetic interactions induced by content variation of major water-soluble components of Danshen preparation in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31: 638-646.
- [4] Guo X R, Chen X H, Li L, *et al.* LC-MS determination and pharmacokinetic study of six phenolic components in rat plasma after taking traditional Chinese medicinal-preparation: Guanxinning lyophilized powder for injection [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 873: 51-58.
- [5] Li X H, Yu C, Cai Y B, *et al.* Simultaneous determination of six phenolic constituents of danshen in human serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2005, 820: 41-47.
- [6] Liu Y, Li X R, Li Y H, *et al.* Simultaneous determination of danshensu, rosmarinic acid, cryptotanshinone, tanshinone IIA, tanshinone I and dihydrotanshinone I by liquid chromatographic-mass spectrometry and the application to pharmacokinetics in rats [J]. *J Pharm Biomed Ana*, 2010, 53: 698-704.
- [7] Wang S P, Liu L, Wang L L, *et al.* Simultaneous determination of six hydrophilic components in rat plasma after oral administration of Jitai tablet by liquid chromatography- electrospray ionization-tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B*, 2013, 912: 75-84.