

高效液相色谱法测定犬血浆中丹参素钠

智红英^{1,2}, 钟大放^{1,3*}, 马晓菊², 宋吉伦², 李桂生^{2,4}, 刘珂^{2,4}

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 山东绿叶天然药物研究开发有限公司, 山东 烟台 264003;
3. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203; 4. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264005)

摘要:目的 建立了紫外检测的快速灵敏的高效液相色谱法, 用于测定犬血浆中的丹参素钠。方法 血浆样品经液-液萃取后, 以原儿茶酸为内标, 采用 Discovery C₁₈ 色谱柱进行分离, HPLC 测定犬血浆中的药物浓度。结果 犬分别静脉滴注给予 10、20、40 mg/kg 丹参素钠后, AUC₀₋₁、AUC_{0-∞}、C_{max} 均与给药剂量呈线性相关。AUC₀₋₁、AUC_{0-∞} 的相关系数分别为 0.964、0.964。C_{max} 的相关系数为 0.9347; 丹参素钠在犬体内的药动学过程符合二室模型。结论 通过方法学确证, 该方法可以应用于丹参素钠在犬血浆中的药物动力学研究。

关键词: 丹参素钠; 二室模型; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)06-0886-03

Determination of sodium danshensu in dog plasma by HPLC

ZHI Hong-ying^{1,2}, ZHONG Da-fang^{1,3}, MA Xiao-ju², SONG Ji-lun², LI Gui-sheng^{2,4}, LIU Ke^{2,4}

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Shandong Luye Natural Drugs Research & Development Co., Ltd., Yantai 264003, China; 3. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 4. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract: Objective To develop a high-performance liquid chromatographic method for the determination of sodium danshensu in dog plasma. **Methods** The samples were extracted from plasma by liquid-liquid extraction, separated through a Discovery C₁₈ column, and protocatechuic acid was used as the internal standard in determination of sodium danshensu in dog plasma by HPLC. **Results** After iv administration of sodium danshensu to dogs at doses of 10, 20, and 40 mg/kg, respectively, the AUC₀₋₁, AUC_{0-∞}, and C_{max} dose relationships were evaluated to be linear ($r = 0.964, 0.964, \text{ and } 0.9347$). The results of the compartmental analysis indicated that the kinetic process of sodium danshensu in dogs *in vivo* was best fitted to a two-compartment model. **Conclusion** The method is successfully applied to definition of the plasma concentration-time curves after iv drop administration of sodium danshensu to dogs.

Key words: sodium danshensu; two-compartment model; HPLC

丹参素[$D(+)-\beta(3,4\text{-二羟基苯基})\text{-乳酸}$]是丹参的主要有效成分之一, 具有抗心肌缺血, 改善微循环, 抗炎^[1]和对脑损伤有良好的保护等作用^[2]。丹参单味药材及其复方制剂口服或注射的丹参素体内过程研究结果相差较大^[3-5]。本实验建立了丹参素钠在犬血浆中的定量分析, 获得了可靠的药动学参数, 为临床药动学研究提供参考。

1 仪器与材料

美国安捷伦公司 Agilent 1100 高效液相色谱仪 (在线脱气机, 四元泵, 自动进样器, 柱温箱, UV 检测器, Chemstations 色谱工作站), 飞鸽牌 Anke DC-

6000B 低速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

丹参素钠对照品和丹参素钠原料药均由山东省天然药物工程技术研究中心提供, 质量分数分别为 99.4%、99.4%; 内标原儿茶酸购自中国药品生物制品鉴定所(批号: 809-200102); 甲醇为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

健康 Beagle 犬 18 只, 雌雄各半, 体质量 9.5~11.5 kg, 南海市科金实验动物科技有限公司提供, 合格证号: Scxk(粤)2003-0006。

2 方法与结果

2.1 丹参素钠对照品溶液的配制: 精密称取丹参素

* 收稿日期: 2008-10-12

作者简介: 智红英 (1973-) 女, 山东聊城人, 主管药师, 主要从事药代和毒代方面研究工作。

Tel: (0535) 2128672 E-mail: zhihongying@126.com

* 通讯作者 钟大放 Tel: (021) 50800738 E-mail: Dfzhong@mail.shenc.ac.cn

钠对照品 12.5 mg, 用 0.1 mol/L 盐酸(含 0.2% 亚硫酸氢钠)溶解并定容至 50 mL, 配制成 250 μg/mL 的对照品溶液, 并依次稀释成 100、25、10、2.5、1.0、0.2 μg/mL 系列对照品溶液。

2.2 内标原儿茶酸溶液的配制: 精密称取原儿茶酸对照品 10 mg, 用 0.1 mol/L 盐酸(含 0.2% 亚硫酸氢钠)溶解并定容至 50 mL, 并稀释成 10 μg/mL 的内标溶液。

2.3 色谱条件: Discovery C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相 甲醇-水-磷酸(10:90:0.2); 检测波长: 281 nm; 体积流量: 0.8 mL/min; 柱温: 35 °C。

2.4 给药方案与样品采集: Beagle 犬 18 只随机分成 3 个剂量组, 雌雄各半, 试验期间自由进食与饮水。丹参素钠原料用生理盐水配制成 10、20、40 mg/kg 的剂量经犬前肢静脉点滴给药, 30 min 点滴完成, 于点滴过程中第 10、20 分钟及给药前(0 h)和点滴结束后 0.083、0.17、0.33、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 h 经犬前或后肢中静脉取血

约 2 mL, 置肝素化离心管中, 离心, 分离血浆, -20 °C 冰箱中保存待测。

2.5 血浆样品的预处理: 取肝素抗凝血浆 100 μL, 加内标溶液(10 μg/mL 原儿茶酸溶液) 100 μL, 再加 0.1 mol/L 盐酸(含 0.2% 亚硫酸氢钠) 100 μL, 1 mol/L 盐酸 100 μL, 混匀; 加入 4 mL 醋酸乙酯, 涡流混合 5 min, 离心 10 min(4 000 r/min) 取上层有机相于另一试管中, 40 °C 水浴缓和氮气流下吹干, 残渣加入流动相 100 μL, 涡旋溶解, 取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。

2.6 方法专属性: 分别取 6 只受试犬的空白血浆(0 h) 100 μL, 除不加内标溶液并补加 0.1 mol/L 盐酸(含 0.2% 亚硫酸氢钠) 100 μL, 其余按“血浆样品的预处理”项下方法操作, HPLC 进样 20 μL。将丹参素钠对照品溶液和内标溶液加入空白血浆中, 依同法操作, 进样测定。取受试犬给药后收集的血浆样品, 依同法操作, 进样测定, 结果见图 1。结果表明空白血浆中的内源性物质不干扰丹参素与内标的测定。

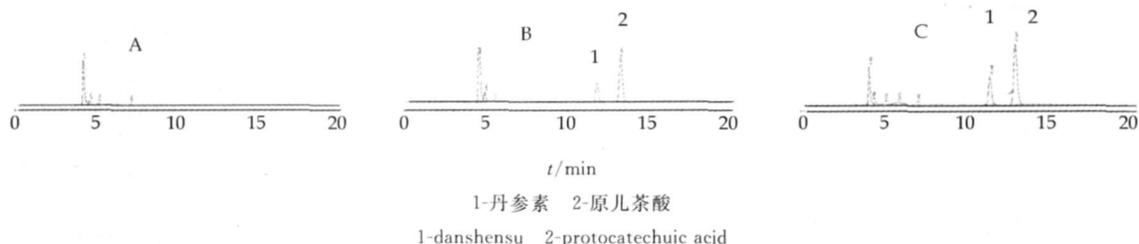


图 1 空白血浆色谱图(A)、空白血浆加入丹参素钠和内标(B)以及犬静脉滴注丹参素钠的血浆(C) HPLC 图谱

Fig 1 HPLC Chromatograms of blank plasma (A), blank plasma spiked with sodium danshensu and protocatechuic acid (internal standard) (B), and plasma sample after iv administration of sodium danshensu (C)

2.7 工作曲线的绘制: 空白血浆 100 μL, 加入丹参素钠系列对照品溶液 100 μL, 配制成含丹参素钠 0.2、1.0、2.5、10、25、100、250 μg/mL 血浆样品, 每个质量浓度 3 个样本, 除不加 100 μL 0.1 mol/L 盐酸(含 0.2% 亚硫酸氢钠)外, 其他按照“血浆样品的预处理”项下方法操作, 进样 20 μL, 记录色谱图。以血浆中待测物的质量浓度为横坐标, 待测物与内标物的峰面积之比为纵坐标, 用加权最小二乘法进行回归运算, 得回归方程 $Y = 0.03527X + 0.00154$, $r > 0.9983$ 。根据工作曲线, 本方法的线性范围为 0.2~250 μg/mL, 定量下限为 0.2 μg/mL。

2.8 方法的准确度和精密度: 取空白血浆 100 μL, 分别取含丹参素钠 0.2、10、100 μg/mL 样品各 6 个样本, 按 2.7 项下方法操作, 连续测定 3 d, 以当日的工作曲线回归方程计算质量浓度, 与配制质量浓度比较, 计算本法的准确度和精密度, 结果见表 1。

2.9 提取方法回收率试验: 取空白血浆 100 μL, 按

表 1 准确度和精密度试验结果

Table 1 Precision and accuracy test

质量浓度 (μg · mL ⁻¹)	测定质量浓度 (μg · mL ⁻¹)	日内 RSD/ %	日间 RSD/ %	准确度 RE / %
0.2	0.21 ± 0.01	4.5	9.1	4.50
10	9.8 ± 0.44	3.5	8.7	-1.98
100	100.3 ± 3.32	3.1	4.5	0.29

“标准曲线的绘制”项下方法操作, 分别取含丹参素钠 1.0、10、100 μg/mL 样品各 6 份, 进样测定, 记录被测物的峰面积, 与未经处理的相同质量浓度的对照品溶液峰面积比较, 计算得提取回收率分别为 84.9%、78.7%、77.5%。内标物经相同提取过程处理, 其回收率为 88.7%。

2.10 稳定性试验: 取空白血浆 100 μL, 分别取含丹参素钠 1.0、10、100 μg/mL 样品各 6 份, 按“标准曲线的绘制”项下方法操作, 即时测定质量浓度, 室温放置 22 h 后, 重复测定 1 次, 并以当日的工作曲线计算质量浓度, 计算测定值与加入值之间的平均相对偏差,

分别是 2.4%、-0.7%、-2.3%。表明血浆样品经过处理后室温放置 22 h, 待测物仍可被准确测定。血浆样品在冷冻-融溶循环 3 次试验中, 3 个质量浓度的相对偏差分别为 1.0%、2.1%、4.1%。

2.11 数据处理: 采用 DAS2.0 药动力学软件, 对犬体内的动力学过程进行房室模拟并计算药动力学参数, 结果见图 2。

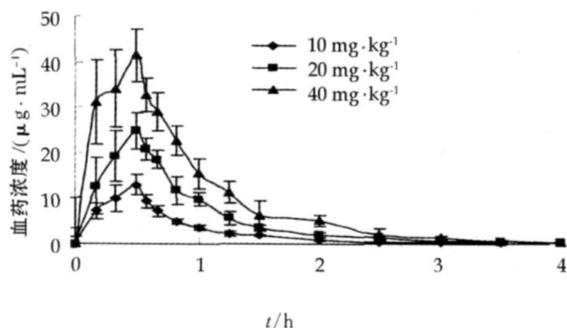


图 2 犬静脉点滴不同剂量丹参素的平均血药浓度-时间曲线 (n=6)

Fig 2 Mean plasma concentration-time curves after iv sodium danshensu in dogs (n=6)

犬分别静脉给 10、20、40 mg/kg 丹参素钠,

AUC_{0-t}、AUC_{0-∞}、C_{max} 均与给药剂量呈线性相关。AUC_{0-t} 和 AUC_{0-∞} 的相关系数为 0.964 和 0.964 (P<0.001)。C_{max} 的相关系数为 0.934 7 (P<0.05)。丹参素钠在犬体内的药动力学过程符合二室模型, 其主要药动力学参数见表 2。

表 2 犬静脉点滴丹参素的药动力学参数 (n=6)

Table 2 Pharmacokinetic parameters after iv administration of sodium danshensu in dogs (n=6)

参数	单位	剂量/(mg·kg ⁻¹)		
		10	20	40
t _{1/2α}	h	0.12±0.12	0.19±0.10	0.11±0.14
t _{1/2β}	h	0.52±0.26	0.87±0.39	0.57±0.21
K ₁₀	h ⁻¹	10.09±16.39	2.12±0.32	4.13±2.18
K ₁₂	h ⁻¹	35.71±73.87	3.49±6.17	38.81±70.74
K ₂₁	h ⁻¹	4.21±3.19	2.90±3.88	7.85±8.83
CL	L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	0.95±0.12	0.92±0.24	0.91±1.23
AUC _{0-t}	h·g·mL ⁻¹	9.96±1.29	21.39±4.12	41.49±5.29
AUC _{0-∞}	h·g·mL ⁻¹	10.68±1.34	22.74±4.42	44.56±5.99
V _c	L·kg ⁻¹	0.28±1.18	0.44±0.11	0.32±0.24

3 讨论

本实验曾选用乙睛、甲醇等沉淀蛋白, 结果由于

丹参素极性大, 保留时间短, 内源性杂质干扰大, 灵敏度达不到分析的要求; 采用醋酸乙酯进行液-液萃取, 在酸性条件下, 游离的丹参素容易被醋酸乙酯提取, 且回收率高, 重现性好, 内源性杂质干扰小。采用结构和极性相近的原儿茶酸做内标, 保留时间比对羟基苯甲酸短, 可以加快样品分析速度。

丹参素和原儿茶酸结构中含有邻二酚羟基, 易被氧化成苯醌而变色, 水溶液不稳定。经试验, 用 0.1 mol/L 盐酸 (含 0.2% 亚硫酸氢钠) 配制对照品溶液, 室温下放置两周, 两成分的量及溶液颜色基本不变。

由药动力学参数消除半衰期 t_{1/2β} > t_{1/2α}, 表明丹参素钠在体内主要以消除为主, 并且消除较快。这与高晔等^[6,7]的研究结果相一致。而洪馨^[8]和王娟^[9]的研究结果为丹参素在大鼠体内的药动力学过程符合二室模型, 以消除相为主, 以上结果有一定差异, 其原因一方面可能为实验对象存在种属差异, 另一方面也可能是所给药物形式不同, 不排除其他成分对丹参素体内过程存在影响的可能。

参考文献:

- [1] 杨春欣. 丹参素的药理研究进展 [J]. 中国药理学通报, 1997, 13(4): 298-301.
- [2] 张婷, 王超云, 田京伟, 等. 丹参素对脑损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2005, 36(7): 1041-1043.
- [3] 刘琦, 晁若冰. 尿中丹参素的测定及其在人体的药代动力学 [J]. 药学学报, 2003, 38(10): 771-774.
- [4] 潘桂湘, 张伯礼, 高秀梅. 大鼠灌服复方丹参方后血清中丹参素的测定 [J]. 中国中药杂志, 2003, 27(6): 562-565.
- [5] 赵新峰, 祝忠民, 刘爱芳, 等. 柱切换法在复方丹参滴丸中丹参素药代动力学研究中的应用 [J]. 中成药, 2004, 26(6): 490-492.
- [6] 高晔, 刘长义, 林阳. 益脉灵注射液在兔体内的药代动力学研究 [J]. 中国中医药科技, 1995, 2(3): 28-29.
- [7] Zhao F Q, Zheng N X, Lsato H, et al. Pharmacokinetics of a Chinese traditional medicine danshensu (3, 4 dihydroxy-4-phenylactic acid) in rabbits using high-performance liquid chromatography [J]. Biol Pharm Bull, 1997, 20(3): 285-287.
- [8] 洪馨, 宓穗卿, 王宁生. 复方丹参滴丸中丹参素的药代动力学研究 [J]. 中国新药与临床药理, 2000, 11(5): 286-288.
- [9] 王娟, 马张庆, 宋建国. 丹参注射液在大鼠体内的药代动力学研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2003, 8(2): 183-185.