

丹酚酸 B 及其活性代谢产物在大鼠体内药动学研究

万仁忠^{1,2}, 许妍妍², 谷元², 林艳萍², 周茂金², 刘昌孝^{2*}

1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016

2. 天津药物研究院 天津药物动力学与药效动力学省部共建国家重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 建立了灵敏快速的同时测定大鼠血浆中丹酚酸 B 及其主要代谢产物丹参素的 LC-MS/MS 方法。方法 以氯霉素为内标, 用醋酸乙酯萃取, 色谱柱为 Symmetry C₁₈ 柱, 流动相为甲醇-乙腈-0.5%甲酸 (55:5:40), 体积流量为 0.4 mL/min。选用电喷雾电离 (ESI) 三重四极杆串联质谱仪, 在负离子模式下以选择反应监测 (SRM) 方式进行检测, 用于定量分析的离子反应分别为 m/z 717→519 (丹酚酸 B)、 m/z 197→135 (丹参素) 和 m/z 321→152 (氯霉素)。结果 在该测定条件下丹酚酸 B、丹参素和内标物的保留时间分别为 3.12、2.60、3.98 min。丹酚酸 B 的线性范围为 10~5 000 ng/mL, $r>0.995$; 丹参素的线性范围为 5~5 000 ng/mL, $r>0.995$, 丹酚酸 B 和丹参素定量限分别为 10、5 ng/mL。批内、批间精密度 (RSD) 均小于 12.6%。大鼠 ig 给予丹酚酸 B 后, 迅速吸收并逐渐转化成丹参素, 丹酚酸 B 和丹参素的 $C_{\max}$ 分别为 (1.21±0.31)、(0.27±0.05) $\mu\text{g/mL}$, $t_{\max}$ 分别为 (0.50±0.00)、(0.56±0.18) h, $t_{1/2}$ 分别为 (1.20±0.11)、(1.57±0.16) h, AUC_{0-t} 分别为 (1.31±0.30)、(0.39±0.05) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$ 。结论 本方法可用于大鼠 ig 丹酚酸 B 后的血浆中丹酚酸 B 及其代谢产物丹参素药动学研究。

关键词: 丹酚酸 B; 丹参素; 电喷雾电离; 液相色谱-串联质谱法; 药动学

中图分类号: R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)02-0335-05

In vivo pharmacokinetics of salvianolic acid B and its metabolite in rats

WAN Ren-zhong^{1,2}, XU Yan-yan², GU Yuan², LIN Yan-ping², ZHOU Mao-jin², LIU Chang-xiao²

1. College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. Tianjin State Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective A rapid and sensitive method using liquid chromatography-tandem mass spectroscopy (LC-MS/MS) was developed and validated for the simultaneous quantitative determination of salvianolic acid B (Sal B) and its main active metabolite danshensu (DSS) in rat plasma. **Methods** The analytes were extracted by liquid-liquid extraction with ethyl acetate after IS (IS, chloramphenicol) spiked. The separation was performed on a Symmetry C₁₈ column with methanol-acetonitrile-0.5% formic acid (55:5:40) as mobile phase at a flowrate of 0.4 mL/min. The triple quadrupole LC-MS system was operated under selected reaction monitoring (SRM) mode using the electrospray ionization technique in negative mode. Quantification was performed using SRM of the transitions m/z 717→519 for Sal B, 197→135 for DSS, and 321→152 for the IS, respectively. **Results** The nominal retention times for Sal B, DSS, and IS were 3.12, 2.60, and 3.98 min, respectively. The standard calibration curve for spiked rat plasma containing Sal B was linear over the range 10—5 000 ng/mL with a correlation coefficient ($r>0.995$). And DSS was linear over the range 5—5000 ng/mL with a correlation coefficient ($r>0.995$). The lower limits of quantification (LLOQ) of Sal B and DSS of the method were 10 and 5 ng/mL, respectively. The intra- and inter-day accuracy and precision of the assay were less than 12.6%. After Sal B was ig administered to rats, absorption of Sal B was rapidly metabolized to DSS. Pharmacokinetic parameters of Sal B and DSS after ig administration Sal B to Wistar rats were: $C_{\max}$ (1.21±0.31) and (0.27±0.05) $\mu\text{g/mL}$, $t_{\max}$ (0.50±0.00) and (0.56±0.18) h, $t_{1/2}$ (1.20±0.11) and (1.57±0.16) h, AUC_{0-t} (1.31±0.30) and (0.39±0.05) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$. **Conclusion** This method has been applied successfully to a pharmacokinetic study of Sal B and its metabolite DSS involving the ig administration of Sal B to rats.

Key words: salvianolic acid B (Sal B); danshensu (DSS); electrospray ionization; liquid chromatography-tandem mass spectroscopy (LC-MS/MS); pharmacokinetics

收稿日期: 2010-06-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (306030075, 20675056); 国家“973”计划基金项目 (2004CB518902)

作者简介: 万仁忠 (1967—), 男, 山东定陶人, 博士研究生, 副教授, 研究方向为药动学。Tel: 13505388926 E-mail: wrzh63@163.com

*通讯作者 刘昌孝 中国工程院院士 Tel: (022)23006283 E-mail: liuchangxiao@163.com

丹参别名紫丹参、血参、大红袍、红根等，为双子叶植物唇形科丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge，以根入药。丹参为《中国药典》所收载，丹参及其复方制剂被广泛地用于治疗冠心病、心绞痛和脑血管疾病的治疗^[1-3]。丹参的化学成分包括脂溶性成分二萜醌类和水溶性成分酚酸类^[4]。丹参的酚酸类化合物具有抗氧化^[5]、扩张冠状动脉^[6]、抗血小板凝集、抑制血栓形成^[7]，以及抗心肌和脑缺血^[8-9]等多种活性。丹酚酸 B 为丹参的主要水溶性酚酸类成分，丹酚酸 B 制剂及药动学方面已有相关研究^[10-11]，已有文献报道丹酚酸 B 在大鼠体内代谢可生成丹参素^[12]，而同时定量测定血浆样品中丹酚酸 B 及代谢物的方法未见报道。本实验为进一步了解丹酚酸 B 及代谢物体内的药动学过程，应用液相色谱-质谱联用 (LC-MS/MS) 技术，建立了灵敏、可靠的定量分析血浆样品中丹酚酸 B 及其活性代谢产物丹参素的方法，并进行大鼠体内药动学研究。

1 材料

1.1 药品与试剂

丹酚酸 B 及丹参素 (质量分数 >98%，天津金测分析技术有限公司)，内标氯霉素 (质量分数 >99%，山东农业大学药理教研室)，乙腈、甲醇和甲酸为色谱纯 (天津市康科德科技有限公司)，其他试剂为市售分析纯，水为超纯水。

1.2 实验动物

Wistar 大鼠，雄性，体质量 210~230 g，天津药物研究院实验动物中心提供，动物生产合格证：W.J 津实动质 R.A 准字第 001 号。

1.3 仪器

美国 Thermo Finnigan 公司 TSQ Quantum Discovery MAX 型液相色谱-三重四极杆质谱联用仪，配有 Thermo Surveyor 四元输液泵、自动进样器、柱温箱以及电喷雾离子源，Xcalibur 2.0 数据处理系统，美国 Caliper 公司 TurboVAP 浓缩仪。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 Symmetry C₁₈ (100 mm×4.6 mm, 5 μm, Waters, 美国)，流动相为甲醇-乙腈-0.1% 甲酸水溶液 (55:5:40)，体积流量为 0.4 mL/min，柱温 30 °C，自动进样器温度 4 °C，进样量为 20 μL。

2.2 质谱条件

电喷雾离子化源，负离子检测方式，离子源喷射电压为 -3.8 kV，毛细管温度为 260 °C，毛细管

电压为 32 V，鞘气流速为 275.8 kPa，辅助气体体积流量为 5 L/min，诱导碰撞解离 (CID) 碰撞气 (Ar) 压力 7.5 Pa。扫描方式为选择性反应监测 (SRM) 方式：测定待测物时的离子反应为 m/z 717→519 (丹酚酸 B) 和 m/z 197→135 (丹参素)，测定内标物时的离子反应为 m/z 321→152，扫描宽度 0.5，扫描时间 0.5 s。丹酚酸 B、丹参素和内标氯霉素的产物离子全扫描质谱图见图 1。

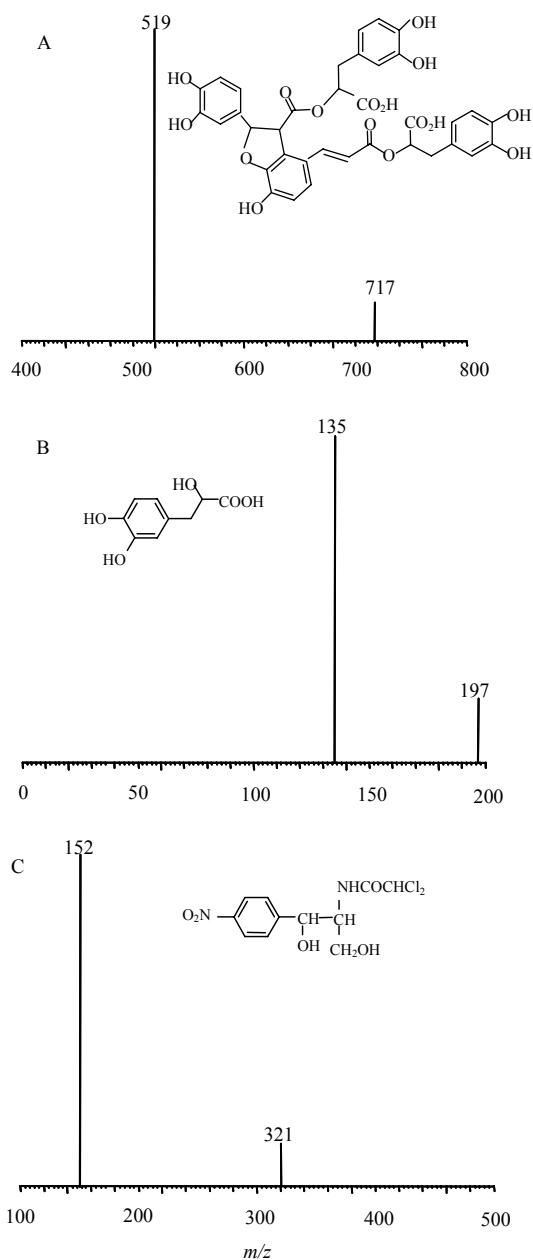


图 1 丹酚酸 B (A)、丹参素 (B) 和内标 (C) 的离子全扫描质谱图

Fig. 1 Ion full-scan spectra of Sal B (A), DSS (B), and IS (C)

2.3 血浆样品处理

取血浆 0.1 mL, 加入内标溶液 (2 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素) 10 μL , 加入 10 μL 10% 盐酸, 振荡混匀; 加入醋酸乙酯 3.0 mL, 涡旋振荡 1 min, 离心 10 min, 分离上层有机相 2.5 mL, 30 $^{\circ}\text{C}$ 氮气流吹干。加流动相 100 μL 溶解, 涡旋振荡 1 min, 离心 10 min, 进样 20 μL , 进行 LC-MS/MS 分析。

2.4 方法学质控

在生物样本分析方法确证完成后开始测定未知样品, 同时进行质量控制。每批生物样品测定时建立新的标准曲线, 并进行三浓度双样本质控样品 (QC) 分析, QC 数大于未知样品总数的 5%, 将 QC 准确度 $<15\%$ 作为当日数据是否接受的标准。

2.5 丹酚酸 B 和丹参素药动力学研究

健康雄性 Wistar 大鼠 6 只, 禁食不禁水 12 h 后按 500 mg/kg 丹酚酸 B (5 mL/kg) ig 给药, 溶媒为水。分别于给药前和给药后 0.083、0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、6 h 于眼底静脉丛取血约 0.25 mL, 置肝素处理的 Eppendorf 管中, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血浆, 置 -20°C 冰箱保存。按“2.3”项

方法处理, 进样分析。每天建立 1 条标准曲线, 同时分析低、中、高 3 个浓度的 QC 样本, 根据当日标准曲线计算未知样品及 QC 样品。

2.6 数据处理

血药浓度-时间数据采用 Topfit 2.0 软件 (Thomae GmbH, Germany) 按非室模型处理计算主要药动力学参数。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 专属性试验 取 Wistar 大鼠空白血浆 0.1 mL, 按“血浆样品处理”项下操作, 不加内标进样 20 μL , 获得空白样品色谱图 (图 2-A)。将一定浓度的丹酚酸 B、丹参素对照溶液和内标溶液, 加入空白血浆, 依同法操作, 获得相应的色谱图 (图 2-B)。在该测定条件下待测物丹酚酸 B、丹参素和内标物的保留时间分别为 3.12、2.60、3.98 min。大鼠 ig 给予丹酚酸 B 500 mg/kg 1 h 后的血浆样品依同法操作, 获得血浆样品色谱图 (图 2-C)。结果表明, 空白血浆中内源性物质不干扰待测物丹酚酸 B、丹参素和内标物氯霉素的测定。

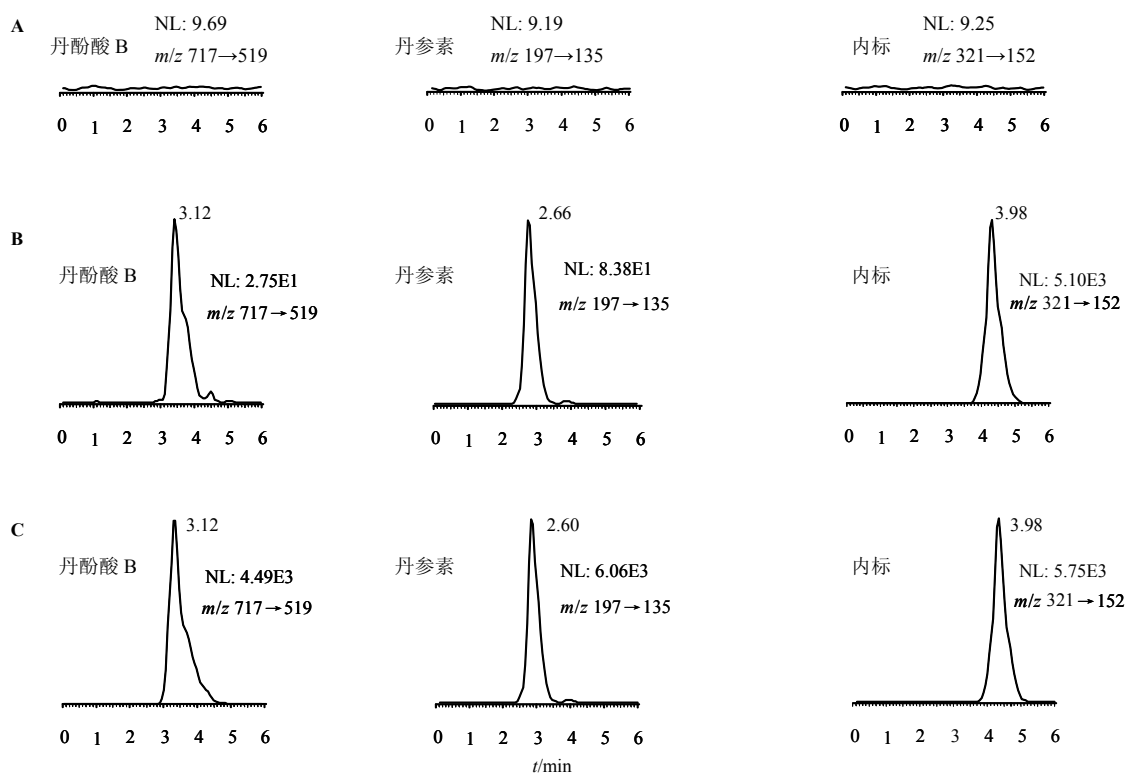


图 2 大鼠空白血浆 (A)、大鼠空白血浆加入丹酚酸 B、丹参素对照品和内标 (B) 和大鼠 ig 丹酚酸 B 500 mg/kg 1 h 后血浆样品 (C) 的 SRM 色谱图

Fig. 2 Representative SRM chromatograms of blank plasma (A), blank plasma spiked with Sal B, DSS, and IS (B), and plasma sample of 1 h after ig Sal B at a dose of 500 mg/kg (C) in rats

3.1.2 标准曲线及线性范围 取空白 Wistar 大鼠血浆 90 μL , 加丹酚酸 B 和丹参素对照系列溶液 10 μL , 配制成相当于丹酚酸 B 和丹参素质量浓度分别为 10、20、100、500、2 000、4 000、5 000 ng/mL 和 5、10、100、500、2 000、4 000、5 000 ng/mL 的血浆样品, 从加入内标溶液起按“血浆样品处理”项下依法操作; 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(权重为 $1/x^2$) 进行回归运算, 求得的直线回归方程即为标准曲线。每天测定 3 条标准曲线, 连续测定 3 d, 其中大鼠血浆测定待测物典型标准曲线为丹酚酸 B: $Y=0.0465X-1.79\times 10^{-3}$ ($r=0.9963$, 线性范围为 10~5 000 ng/mL), 定量限为 10 ng/mL; 丹参素: $Y=5.21\times 10^{-3}X+1.28\times 10^{-4}$ ($r=0.9986$, 线性范围为 5~5 000 ng/mL), 定量限为 5 ng/mL。

3.1.3 精密度与准确度 取大鼠空白血浆 90 μL , 按“标准曲线及线性范围”项下方法配制丹酚酸 B 和丹参素低、中、高 3 个质量浓度(分别为 20、500、4 000 ng/mL 和 10、500、4 000 ng/mL)的 QC, 每一个质量浓度 6 个样本, 连续测定 3 d, 并与标准曲线同时进行。根据当日工作曲线, 分别计算 QC 的测得浓度, 与配制浓度对照, 求得测定方法的准确度与精密度。3 对 QC 的准确度小于 $\pm 9.0\%$, 3 个批次的批内精密度(RSD) $< 11.2\%$ 、批间 RSD $< 12.6\%$, 表明测定方法精密度及准确度符合规定, 可以满足实验要求^[13]。

3.1.4 回收率 以药物在血浆中经过提取处理后的测定值, 与相应浓度的标准工作液直接吹干用流动相复溶的测定值相比, 计算其提取回收率, 内标的提取回收率采用相同方法计算, 每个质量浓度进行 6 个样本分析。丹酚酸 B 20、500、4 000 ng/mL 各质量浓度点 QC 的平均提取回收率分别为 $(81.6\pm 4.3)\%$ 、 $(83.3\pm 3.9)\%$ 、 $(82.8\pm 5.2)\%$; 丹参素 10、500、4 000 ng/mL 各质量浓度点 QC 的平均提取回收率分别为 $(75.3\pm 5.7)\%$ 、 $(77.6\pm 4.2)\%$ 、 $(76.1\pm 4.9)\%$; 内标的提取回收率为 $(94.2\pm 5.6)\%$ 。

3.1.5 样品稳定性 按“标准曲线及线性范围”项下方法配制丹酚酸 B 和丹参素低、中、高 3 个质量浓度(分别为 20、500、4 000 ng/mL 和 10、500、4 000 ng/mL)的 QC。分别考察 QC 血浆样品经室温放置 8 h; 3 次冻融循环; $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 30 d 的稳定性。所有样品测量值与新鲜配置的 QC 样本测量值进行比较, 质量浓度变化在 $85\%\sim 115\%$, 结果表

明待测物的血浆样品在上述条件下均较稳定。

3.2 血药浓度经时曲线及药动学参数

丹酚酸 B 和丹参素的平均血药浓度-时间变化趋势见图 3。血药浓度数据经 Topfit 2.0 软件(Thomae GmbH, Germany)按非室模型处理求算主要药动学参数见表 1。达峰浓度($C_{\max}$)、达峰时间($t_{\max}$)为实测值, 以半对数作图法由消除相的浓度点计算消除速率常数(k_e)和消除半衰期($t_{1/2}$), $AUC_{0\sim t}$ 为实测值经梯形法计算结果, $AUC_{0\sim \infty}=AUC_{0\sim t}+C_t/k_e$ 。

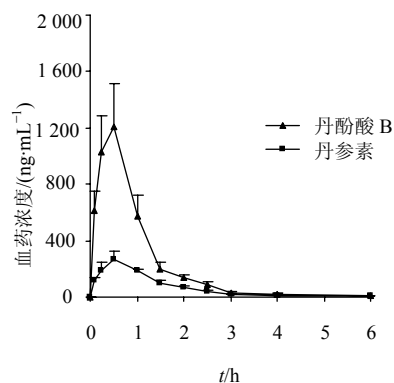


图 3 大鼠 ig 500 mg/kg 丹酚酸 B 后丹酚酸 B 和丹参素的平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 3 Mean plasma concentration-time profiles of SalB and DSS after ig Sal B to rats at a dose of 500 mg/kg ($\bar{x}\pm s, n=6$)

表 1 大鼠 ig 500 mg/kg 丹酚酸 B 后丹酚酸 B 和丹参素的药动学参数 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Main pharmacokinetic parameters of Sal B and DSS after ig Sal B to rats at a dose of 500 mg/kg ($\bar{x}\pm s, n=6$)

参数	单位	丹酚酸 B	丹参素
$C_{\max}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1.21 ± 0.31	0.27 ± 0.05
$t_{\max}$	h	0.50 ± 0.00	0.56 ± 0.18
k_e	h^{-1}	0.58 ± 0.05	0.45 ± 0.05
$t_{1/2}$	h	1.20 ± 0.11	1.57 ± 0.16
$AUC_{0\sim t}$	$\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	1.31 ± 0.30	0.39 ± 0.05
$AUC_{0\sim \infty}$	$\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	1.32 ± 0.30	0.41 ± 0.05

4 讨论

有文献报道^[12], 丹酚酸 B 在大鼠体内代谢可转化成丹参素, 而同时测定大鼠血浆中丹酚酸 B 和代谢物丹参素的分析方法及其药动学研究尚未见报道, 因此, 本实验通过综合优化色谱条件与质谱条

件,建立了灵敏度高、选择性好、专属性强的LC-MS/MS法,并对丹酚酸B及其代谢产物丹参素在大鼠体内的药动学进行了研究。

大鼠ig给予丹酚酸B后,迅速吸收并逐渐转化成丹参素,丹酚酸B和丹参素在大鼠体内达峰时间较快,消除半衰期较短。丹酚酸B在大鼠体内转化成丹参素的部位还有待于深入研究。

本实验开始用甲醇-水系统时,出峰时间晚,质谱响应不高,而且有明显的拖尾现象,加入一定比例的乙腈可以明显改善。最后经过调试选用甲醇-乙腈-0.1%甲酸水溶液(55:5:40)为流动相,峰形较好,质谱响应增高,且保留时间恰当,可以满足实验要求。待测物和内标使用醋酸乙酯作为提取剂,在血浆中加入10%盐酸溶液,调节酸碱度,可以使待测物和内标易被有机溶剂提取。

实验使用ESI源,扫描类型为SRM,将分析物直接进样,由于能够选择和监测两组特定而且直接相关的离子,同时对前体离子和产物离子进行监测,使得方法的专属性和待测物的信噪比大大提高,色谱分离也变得简单。利用它们的前体离子或产物离子质荷比的不同,通过SRM方式即可分离定量。而在本实验所选定的色谱条件下,既能与生物样品的内源性成分实现分离,从而避免发生离子抑制,又使分析物都在较短的时间内出峰,且可以增加待测物的质子化效率,提高检测的灵敏度。

参考文献

- [1] Sugiyama A, Zhu B M, Takahara A, *et al.* Cardiac effects of *Salvia miltiorrhiza*/ *Dalbergia odorifera* mixture, an intravenously applicable Chinese medicine widely used for patients with ischemic heart disease in China [J]. *Circ J*, 2002, 66(2): 182-184.
- [2] Sze F K, Yeung F F, Wong E, *et al.* Does Danshen improve disability after acute ischaemic stroke? [J]. *Acta Neurol Scand*, 2005, 111(2): 118-125.
- [3] Tian Y P, Wang Q, Yang W, *et al.* Determination of shionone in rat plasma by HPLC and its pharmacokinetic study [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2): 132-135.
- [4] Li L N. Water soluble active components of *Salvia miltiorrhiza* and related plants [J]. *J Chin Pharm Sci*, 1997, 6(2): 57-64.
- [5] Liu G T, Zhang T M, Wang B E, *et al.* Protective acation of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes [J]. *Biochem Pharm*, 1992, 43(2): 147-152.
- [6] 陈磊, 陆茵, 郑仕中. 丹参药理活性成分的整合效应 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 476-479.
- [7] 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.
- [8] 刘杰, 高秀梅, 王怡, 等. 丹酚酸B对急性心肌缺血大鼠血流动力学的影响及作用分子机制研究 [J]. 中草药, 2006, 37(3): 409-412.
- [9] 王洁, 吴俊芳, 张均田. 总丹酚酸的抗脑缺血研究 [J]. 中国药理学通报, 1999, 15(2): 164-166.
- [10] 李自强, 刘志东, 顾慧, 等. 药物溶出/吸收仿生系统研究丹酚酸B缓释片释放规律 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(5): 367-373.
- [11] 邹晓丽, 王湘敏, 郭海芳, 等. 丹酚酸与牛血清白蛋白结合反应的特性和结构相关性研究 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1271-1274.
- [12] Zhang J L, He Y, Cui M, *et al.* Metabolic studies on the total phenolic acids from the roots of *Salvia miltiorrhiza* in rats [J]. *Biomed Chromatogr*, 2005, 19(1): 51-59.
- [13] Vinod P S, Kamal K M, John W A F, *et al.* Bioanalytical method validation-a revisit with a decade of progress [J]. *Pharm Res*, 2000, 17(12): 1551-1557.