

HPLC-MS 法测定大鼠注射丹红注射液后血浆中 3 种酚酸类成分

王小平^{1,2}, 刘峰², 杨东华¹, 屠鹏飞³, 马存德²

1. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046

2. 陕西步长制药有限公司, 陕西 咸阳 712000

3. 北京大学, 北京 100191

摘要: 目的 建立定量测定大鼠注射丹红注射液后血浆中迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 的方法。方法 采用 HPLC-MS 法, Diamonsil (钻石) C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-0.4% 甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min, MS 检测器选用正离子模式。结果 迷迭香酸在 0.45~100.0 μg/mL ($r^2=0.9965$) 线性关系良好, 回收率在 85.0%~101.4%, 日内、日间精密度的 RSD<8%; 紫草酸在 0.45~100.0 μg/mL ($r^2=0.9959$) 线性关系良好, 回收率在 84.4%~93.94%, 日内、日间精密度的 RSD<9%; 丹酚酸 B 在 0.7~200.0 μg/mL ($r^2=0.9989$) 线性关系良好, 回收率在 80.0%~97.4%, 日内、日间精密度的 RSD<5%。结论 所建立的方法灵敏度好、准确率高, 可用于丹红注射液中酚酸类成分药动学研究。

关键词: 丹红注射液; 迷迭香酸; 紫草酸; 丹酚酸 B; HPLC-MS 法

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)02-0275-04

Determination of three kinds of phenolic acids in rat plasma after iv administration of Danhong Injection by HPLC-MS

WANG Xiao-ping^{1,2}, LIU Feng², YANG Dong-hua¹, TU Peng-fei³, MA Cun-de²

1. Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

2. Shaanxi Buchang Pharmaceuyical Co., Ltd., Xianyang 712000, China

3. Peking University, Beijing 100191, China

Abstract: Objective To establish an HPLC-MS method for determining the level of three kinds of phenolic acids (rosmarinic acid, lithospermic acid, and salvianolic acid B) in rat plasma. **Methods** Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. Acetonitrile-0.4% formic acid solution was used as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min, and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) was used to detect and quantify. **Results** Rosmarinic acid had a good linear relationship during 0.45—100.0 μg/mL ($r^2 = 0.9965$), with absolute recoveries 85.0%—101.4%. The RSD values of intra- and inter-day were less than 8%. Lithospermic acid had a good linear relationship during 0.45—100.0 μg/mL ($r^2 = 0.9959$), with absolute recoveries 84.4%—93.94%. The RSD values of intra- and inter-day were less than 9%. Salvianolic acid B had a good linear relationship during 0.7—200.0 μg/mL ($r^2 = 0.9989$), with absolute recoveries 80.0%—97.4%. The RSD values of intra- and inter-day were less than 5%. **Conclusion** The method is simple, quick, and convenient for the pharmacokinetic study on phenolic acids in Danhong Injection.

Key words: Danhong Injection; rosmarinic acid; lithospermic acid; salvianolic acid B; HPLC-MS

丹红注射液 (Danhong Injection, DHI) 是步长集团独家拥有自主知识产权的主导品种之一^[1-2], 具有活血化瘀、通脉舒络功能, 用于瘀血闭阻所致的胸痹及中风、冠心病、心绞痛、心肌梗死等症, 临床疗效确切^[3-6]。本实验建立测定大鼠血浆中丹红注射液中酚酸类成分的方法, 为研究丹红注射液的药

动学特征奠定基础。

1 仪器与材料

Agilent 1200 型高效液相色谱仪、Agilent XCT 6320 质谱仪 (美国 Agilent 公司); MVS-1 型涡旋混合器 (北京金北德工贸有限公司); TGL-16G-A 高速冷冻离心机 (上海安亭科学仪器厂)。Discovery

收稿日期: 2011-07-23

作者简介: 王小平 (1976—), 女, 陕西宝鸡人, 副教授, 博士, 从事中药药效物质基础及新药研究。

Tel: 13992052795 E-mail: wangxiaoping323@126.com

网络出版时间: 2012-01-13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120113.1029.003.html>

DV215CD 型双量程电子分析天平 (瑞士梅特勒-托利多国际股份有限公司)。

丹酚酸 B 对照品 (批号 111562-200807)、肉桂酸对照品 (批号 110786-200503) 均由中国药品生物制品检定所提供; 迷迭香酸对照品 (批号 090327, 质量分数 98.5%) 购自上海融禾医药科技发展有限公司; 紫草酸对照品 (批号 070304, 质量分数 99.5%) 购自上海友思生物技术有限公司; 丹红注射液 (批号 20101120) 由山东菏泽步长制药有限公司提供; 乙腈 (色谱纯) 美国迪马公司; 其他试剂均为分析纯。

雄性 SD 大鼠 (220~250 g), 由北京大学医学部实验动物部提供, 使用许可证号: SYXK (京) 2002-0002, 合格证号: SCXK (京) 2002-0001。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取迷迭香酸、紫草酸对照品各 1.0 mg, 丹酚酸 B 对照品 2.0 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀。用甲醇稀释成系列质量浓度的对照品溶液 (含丹酚酸 B 分别为 0.7、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、20.0、200.0 $\mu\text{g/mL}$)。

2.1.2 内标溶液的制备 精密称取肉桂酸对照品 2.18 mg, 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 检测条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil (钻石) C_{18} 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.4% 甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~5 min, 5%~12% 乙腈; 5~10 min, 12%~15% 乙腈; 10~15 min, 15%~20% 乙腈; 15~25 min, 20%~23% 乙腈; 25~55 min, 23%~30% 乙腈; 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 288 nm, 进样量 20 μL , 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.2 质谱条件 EI 离子源, 分别以正、负离子模式检测, m/z : 100~1 500, 干燥气体积流量 12.0 L/min, 干燥气温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 干燥气为氮气; 氮气压力 241.325 kPa; 毛细管电压 3 500 V。

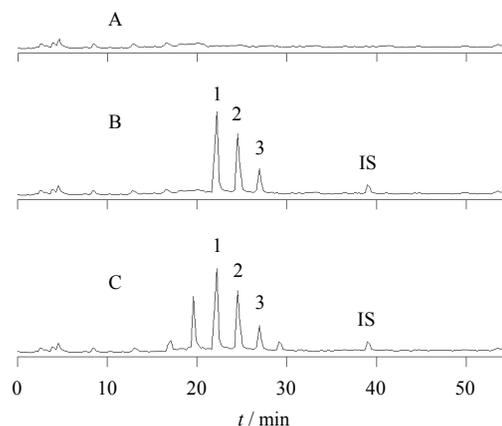
2.3 血浆样品的预处理

精密吸取大鼠血浆样品 200 μL , 精密加入内标溶液 50 μL , 涡旋混合 1 min, 再加入 20% 盐酸溶液 50 μL , 涡旋混合 2 min, 加入醋酸乙酯 2 mL, 涡旋混合 2 min。分取上层有机相, 常温下氮气吹干, 残渣精密加入甲醇 150 μL , 涡旋 1 min, 0.22 μm 微孔

滤膜滤过, 即得。

2.4 专属性考察

精密取大鼠空白血浆 200 μL 、含药血浆 200 μL , 分别精密加入内标溶液 50 μL , 涡旋混匀 1 min, 其余按照“血浆样品预处理”项下方法操作, 按“2.2”项下检测条件测定, 结果见图 1。



1-迷迭香酸 2-紫草酸 3-丹酚酸 B IS-内标物
A-空白血浆样品 B-空白血浆+对照品 (迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B)+内标 (肉桂酸) C-静脉注射丹红注射液 1 min 的血浆样品+内标
1-rosmarinic acid 2-lithospermic acid 3-salvianolic acid B IS-internal standard A-blank rat plasma sample B-blank rat plasma sample spiked with mixed reference substances and IS C-rat plasma sample of 1 min after iv DHI and IS

图 1 3 种酚酸类成分和内标物在大鼠血浆中的总离子流图
Fig. 1 Total ion chromatograms of three kinds of phenolic acids and IS in rat plasma after iv administration of DHI

2.5 线性关系考察

精密取大鼠空白血浆 200 μL , 分别精密加入系列质量浓度的混合对照品溶液 200 μL , 内标溶液 50 μL , 涡旋混匀 1 min, 其余按照“血浆样品预处理”项下方法操作, 得到系列质量浓度的血浆对照品溶液, 每个质量浓度平行制备 3 份。将制备好的血浆对照品溶液在上述色谱条件下分析测定, 每个样品进样 2 次, 记录各对照品与内标峰面积比, 以峰面积比 (Y) 为纵坐标, 对照品质量浓度 (X) 为横坐标进行线性回归, 得回归方程及相关系数 (r), 要求生物样品的 r 大于 0.99。所得回归方程分别为: 迷迭香酸 $Y=0.017 X+0.033 3$, $r^2=0.996 5$, 迷迭香酸血浆质量浓度在 0.45~100 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好; 紫草酸 $Y=0.015 6 X+0.044 4$, $r^2=0.995 9$, 紫草酸血浆质量浓度在 0.45~100 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好; 丹酚酸 B $Y=0.018 6 X+0.048 4$, $r^2=0.998 9$,

丹酚酸 B 血浆质量浓度在 0.7~200 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.6 最低定量限试验

在空白血浆中精密加入一定量的混合对照品溶液适量, 混匀, 逐步稀释, 以对照品峰信号与噪音信号比 10:1 为最低定量质量浓度, 重复测定 3 次。迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 最低定量限分别为 0.45、0.45、0.70 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.7 稳定性试验

精密取大鼠空白血浆 200 μL , 分别精密加入高、中、低 (含丹酚酸 B 200.0、8.0、2.0 $\mu\text{g/mL}$) 3 个质量浓度的混合对照品溶液 200 μL , 内标溶液 50 μL , 涡旋混匀 1 min, 其余按照“血浆样品预处理”项下方法操作, 得到高、中、低质量浓度的血浆质控样品, 每个质量浓度平行制备 5 份样品。将高、中、低 3 个质量浓度的血浆样品于常温下保存 12 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存 24 h, 每 4 h 测定 1 次, 迷迭香酸高、中、低质量浓度的 RSD 分别为 5.6%、3.2%、2.5%; 紫草酸高、中、低质量浓度的 RSD 分别为 5.2%、3.0%、4.8%; 丹酚酸 B 高、中、低质量浓度的 RSD 分别为 9.9%、6.8%、3.5%; 在冻融-冷冻循环试验中, 将质控样品置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 24 h, 取出后于室温下自然融解后, 再置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 24 h, 如此冻融-冷冻循环至少 2 次后测定, 迷迭香酸高、中、低质量浓度的 RSD 分别为 8.1%、7.8%、4.7%; 紫草酸高、中、低质量浓度的 RSD 分别为 7.7%、6.2%、2.9%; 丹酚酸 B 高、中、低质量浓度的 RSD 分别为 7.4%、6.8%、3.6%; 长期稳定性试验中, 将质控样品于 -60 $^{\circ}\text{C}$ 保存 15 d 后进行测定, 迷迭香酸高、中、低质量浓度的 RSD 分别为 9.4%、5.4%、4.8%; 紫草酸高、中、低质量浓度的 RSD 分别为 8.2%、7.9%、4.7%; 丹酚酸 B 高、中、低质量浓度的 RSD 分别为 8.6%、3.5%、2.5%。说明样品可以在常温下保存 12 h、4 $^{\circ}\text{C}$ 下冻融-冷冻循环至少 2 次、-60 $^{\circ}\text{C}$ 保存 15 d, 药物质量浓度无明显变化, 基本稳定。

2.8 重现性试验

取空白血浆 200 μL , 按“2.3”项下方法配制质控样品相当于迷迭香酸、紫草酸质量浓度为 4.0、10.0、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 的血浆样品, 相当于丹酚酸 B 质量浓度为 2.0、8.0、200.0 $\mu\text{g/mL}$ 的血浆样品各 6 份, 依法测定, 迷迭香酸高、中、低质量浓度的 RSD 分别为 3.43%、2.86%、4.14%, 紫草酸高、中、低质量浓度的 RSD 分别为 3.85%、2.45%、4.04%, 丹酚

酸 B 高、中、低质量浓度的 RSD 分别为 2.81%、2.05%、4.62%。

2.9 回收率试验

按“2.7”项下的方法制备高、中、低质量浓度的血浆质控样品, 照“2.2”项下色谱条件分析, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 与未经处理的相应质量浓度的对照品溶液的峰面积比较, 计算提取回收率 (表 1)。同法测定并计算内标提取回收率, 其 RSD 均小于 10%。

表 1 3 种酚酸类成分和内标物的回收率

Table 1 Recoveries for three kinds of phenolic acids and IS

分析成分	加入量 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率 / %	标准偏差 / %	RSD / %
迷迭香酸	4.0	85.0	4.25	5.00
	10.0	90.0	3.25	3.61
	100.0	101.4	2.13	2.10
紫草酸	4.0	84.4	7.78	9.22
	10.0	93.9	1.97	2.10
	100.0	93.1	3.63	3.90
丹酚酸 B	2.0	80.0	3.92	4.90
	8.0	93.0	5.21	5.60
	200.0	97.4	3.31	5.30
肉桂酸	43.6	98.4	9.74	9.90

2.10 精密度试验

按“2.7”项下的方法制备高、中、低质量浓度的血浆质控样品。按照“2.2”项下色谱条件分析, 每个浓度连续进样 6 次, 测定日内精密度。重复操作, 连续测定 3 d 并随行回归曲线, 测定日间精密度, RSD 均小于 5%, 结果见表 2。

2.11 血浆中 3 种酚酸类成分的测定

雄性 SD 大鼠 6 只, 正常饲养 3 d, 试验前禁食 24 h, 自由饮水。iv 给予丹红注射液 (10 mL/kg)。分别于注射后 1、5、10、15、20、30、45、60、90 min 取血, 采用眼眶静脉丛取血 0.5 mL, 血样用肝素浸润过的离心管收集。所取血液在冰浴中放置 30 min 后, 6 000 r/min, 0 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 分离血浆, 按“2.3”项下方法处理, 在“2.2”项的色谱条件下进样 20 μL , 记录峰面积, 代入回归方程, 计算血浆中迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 的量 (表 3)。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

考察了多种不同的流动相组成^[7-10], 结果发现,

表 2 3 种酚酸类成分日内、日间精密度

Table 2 Intra- and inter-day precision data for three kinds of phenolic acids

分析成分	加入量 / (μg·mL ⁻¹)	日内 (n=6)			日间 (n=3)		
		实测值 / (μg·mL ⁻¹)	回收率 / %	RSD / %	实测值 / (μg·mL ⁻¹)	回收率 / %	RSD / %
迷迭香酸	4.0	3.40±0.23	85.0	6.76	3.20±0.25	80.0	7.81
	10.0	9.00±0.36	90.0	4.00	9.34±0.42	93.4	4.50
	100.0	101.40±5.36	101.4	5.29	100.30±4.63	100.3	4.62
紫草酸	4.0	3.38±0.18	84.4	5.33	4.09±0.33	102.2	8.07
	10.0	9.39±0.27	93.9	2.88	9.26±0.53	92.6	8.72
	100.0	93.10±3.63	93.1	3.90	100.10±4.02	100.1	4.02
丹酚酸 B	2.0	1.60±0.04	80.0	2.50	1.67±0.05	83.5	2.99
	8.0	7.44±0.19	93.0	2.55	7.27±0.31	90.8	4.26
	200.0	194.80±6.73	97.4	3.45	191.40±6.50	95.7	3.40

表 3 样品测定结果

Table 3 Determination of samples

t / min	质量浓度 / (μg·mL ⁻¹)		
	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸 B
1	80.94±8.10	70.08±5.13	120.05±4.10
5	79.05±4.51	51.02±3.23	104.22±1.05
10	63.32±6.70	48.25±3.55	75.09±8.10
15	53.73±2.27	31.05±1.25	40.09±4.51
20	42.02±1.86	20.25±1.34	20.65±2.81
30	22.92±0.92	15.77±1.52	10.62±1.09
45	11.12±1.51	8.31±1.15	5.62±0.36
60	7.08±0.46	5.99±0.49	3.99±0.09
90	4.08±0.15	4.17±0.18	2.00±0.11

“2.2”项下的色谱条件能够使待测成分和内标得到理想的分离。

3.2 内标的选择

考察了不同化合物如肉桂酸、甲基肉桂酸、3, 4-二羟基苯乙酸等, 结果表明肉桂酸与其他待测成分有很好的分离度, 确定肉桂酸为内标。

3.3 血浆样品处理方法优化

在预试验中对血浆样品的处理方法进行了优化, 比较了沉淀法、萃取法、固相萃取 (SPE) 法^[11]对 3 种酚酸类成分和内标物的提取效果。结果表明, 采用沉淀蛋白法, 3 种酚酸类成分和内标的提取回收率较低; SPE 法在生物样品的前处理过程中被广泛使用, 但在本实验中, 要达到 75% 以上的回收率需要洗脱剂的体积较大, 耗费时间和费用, 因此没有选择; 采用液-液萃取法, 考察了不同的萃取试剂,

结果表明, 将血浆样品酸化后, 以醋酸乙酯作为萃取试剂, 3 种酚酸类成分和内标均具有较高的提取回收率且较少引入杂质, 样品处理快速, 省时省力, 故最终确定液-液萃取法为血浆样品的处理方法。

参考文献

- [1] 王小平, 刘峰, 张勤, 等. 正交试验法优化丹参总酚提取工艺 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(6): 133-134.
- [2] 王小平, 刘峰, 韩翠, 等. 丹参总酚酸提取工艺的优化 [J]. 云南中医学院学报, 2010, 33(2): 32-33.
- [3] 汪军荣. 丹红注射液的临床应用观察 [J]. 临床医药实践, 2011, 20(1): 51-52.
- [4] 杨丽君. 丹红注射液对急性冠脉综合征患者血浆内皮素的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(1): 51-52.
- [5] 董立丽. 丹红注射液的临床应用进展 [J]. 海南医学, 2010, 21(2): 115-117.
- [6] 韩永鹏, 安芸. 丹红注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 药物评价研究, 2010, 23(5): 388-390.
- [7] 张向荣, 潘卫三. HPLC 法测定大鼠血浆中丹参酚酸 A 的浓度 [J]. 中草药, 2002, 33(5): 410-412.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [9] 刘嘉, 李俊松, 狄留庆, 等. 丹酚酸 B 及其磷脂复合物在 SD 大鼠的生物利用度研究 [J]. 中国药学杂志, 2010, 45(18): 1408-1411.
- [10] 姚燕, 陈晓辉, 果德安, 等. 丹参总酚酸与三七总皂苷合用 4 种丹酚酸成分在大鼠体内的药动学 [J]. 中国药学杂志, 2010, 45(15): 1163-1167.
- [11] 郑振佳, 王晓, 王明林, 等. 固相萃取-快速分离液相-四级杆串联飞行时间质谱联用分析荷叶中的生物碱 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1066-1068.