

## HPLC-MS/MS 测定大鼠肝脏组织中丹参素钠的浓度

王晶<sup>1,2</sup>, 董昕<sup>3</sup>, 邹豪<sup>1</sup>, 金磊<sup>1</sup>, 张川<sup>1</sup> (1. 第二军医大学药学院新药研究中心, 上海 200433; 2. 上海市中山医院青浦分院药剂科, 上海 201700; 3. 第二军医大学药学院分析测试中心, 上海 200433)

**[摘要]** 目的 建立液质联用色谱法(HPLC-MS/MS)测定SD大鼠肝脏组织中丹参素钠的浓度。方法 肝脏组织样品制成匀浆后,加入内标酮洛芬,采用液液萃取方法进行预处理。色谱柱:Diamonsil C<sub>18</sub>柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(含0.01%甲酸)(80:20);流速:1.0 ml/min;质谱条件:采用ESI离子源,负离子检测,选择MRM测定丹参素钠和酮洛芬 197→135 m/z 和 253→209 m/z。结果 丹参素钠在20.2~1 010 ng/ml检测浓度范围内呈良好的线性关系( $r=0.9998$ ),最低定量限为20.2 ng/ml,日内精密度和日间精密度的RSD < 10%,回收率在92%~107%之间。结论 该方法灵敏度高、快速、简单、准确,适用于肝脏组织样品中丹参素钠的含量测定,可以满足药动学研究的需要。

**[关键词]** 液质联用色谱法;丹参素钠;组织浓度

**[中图分类号]** R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)01-0052-03

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.01.014

## Determination of sodium Danshensu in rat liver by HPLC-MS/MS

WANG Jing<sup>1,2</sup>, DONG Xin<sup>3</sup>, ZOU Hao<sup>1</sup>, JIN Lei<sup>1</sup>, ZHANG Chuan<sup>1</sup> (1. New drug research center, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of pharmacy, Qingpu District Central Hospital, Shanghai 201700, China; 3. Center of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a HPLC-MS/MS method for determination of sodium Danshensu in SD rat liver. **Methods** Tissue samples were pretreated by liquid-liquid extraction method after homogenate, and ketoprofen was used as the internal standard. Analytical column was Diamonsil C<sub>18</sub> (200 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol; water (0.01% formic acid) = 80:20 with flow rate as 1.0 ml/min. Mass spectrum determination was performed in the MRM mode with target ions m/z 197→135 (Sodium Danshensu), m/z 253→209 (ketoprofen), using ESI ion resource and negative ion detection. **Results** The calibration curve was linear over the range of 20.2~1 010 ng/ml. The LLOQ of sodium Danshensu in liver was 20.2 ng/ml. The intra-and inter-day RSD were both less than 10%. The extracted recovery rate ranged from 92% to 107%. **Conclusion** The method was sensitive, rapid, simple and accurate to determine sodium Danshensu distribution in rat liver and was suitable for preclinical test of Sodium Danshensu.

**[Key words]** HPLC-MS/MS; sodium Danshensu; drug concentration in tissue

丹参素[D(+)-β-(3,4-二羟基苯基)-乳酸]是中药丹参的主要活性成分,具有扩张冠状动脉<sup>[1]</sup>、抗炎、抗氧化<sup>[2]</sup>、抗凝血<sup>[3]</sup>、抗血栓、抗心肌缺血<sup>[4]</sup>、抗肿瘤<sup>[5]</sup>等作用,并且能清除自由基和抗氧化<sup>[6]</sup>,改善微循环,调节血脂代谢<sup>[7]</sup>,抑制血小板聚集<sup>[8]</sup>等作用。关于丹参素的检测方法有LC-UV<sup>[9]</sup>, LC-FLD<sup>[10]</sup>, LC-DAD<sup>[11]</sup>, RP-HPLC<sup>[12]</sup>。本文采用HPLC-MS/MS方法建立了SD大鼠肝脏组织样品中丹参素钠的含量测定方法。

### 1 材料与仪器

#### 1.1 药品和试剂 丹参素钠对照品(纯度

99.6%)、酮洛芬对照品(含量95.6%),均由中国药品生物制品检定所提供,甲醇为美国Merck公司生产的色谱纯试剂,乙酸乙酯为上海胜德化工有限公司生产,甲酸为FEDIA公司生产,浓盐酸为国药集团化工有限公司生产,水为去离子水。

**1.2 仪器** VARIAN 1200L液相色谱-质谱联用仪,包括VARIAN ProStar 210高压泵,VARIAN ProStar 410自动进样器,VARIAN 1200L Quadrupole MS/MS仪,VARIAN MS 6.8工作站。XW-80A旋涡混合器(上海医科大学仪器厂),CR3i台式高速冷冻离心机(ThermoFisher公司),thermofisher SPD121减压离心浓缩(ThermoFisher公司),HA-202M电子天平(A&D Company LTD.)。

### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件 色谱柱:Diamonsil C<sub>18</sub>, 5 μm, 200

**[基金项目]** 上海市中药现代化专项基金(08DZ1970802)。

**[作者简介]** 王晶(1984-),女,硕士研究生。E-mail:laoer-wangjing@163.com。

**[通讯作者]** 张川。Tel:(021)81871358,E-mail:zhangchuan@smmu.edu.cn。

mm × 4.6 mm, 柱温 25 °C, 流动相: 甲醇-水 (含 0.01% 甲酸) (80 : 20), 采用等梯度洗脱方式, 流速 0.80 ml/min, 3 : 2 分流入质谱的流速为 0.32 ml/min, 进样量 20 μl, 分析时间 9.0 min。

**2.2 质谱条件** 采用气动辅助电喷雾离子化电源 (ESI), 负离子方式检测; 喷雾电压 (SP) 4 700 V; 加热毛细管温度 (TEM) 为 250 °C; 碰撞气 (CID) 压力 1.65 mTorr; 源内碰撞诱导解离 (Source CID) 能量为 18.0 V; 质谱扫描方式为多反应监测 (MRM), 分别测定丹参素钠和酮洛芬反应离子  $m/z$  197 → 135 和  $m/z$  253 → 209; 扫描时间为 0.5 s。

**2.3 对照品溶液的制备** 精密称取丹参素钠对照品 10.1 mg, 用甲醇定容于 10 ml 容量瓶中, 制备成 1.01 mg/ml 的丹参素钠对照品溶液, 同时精确称取一定量的酮洛芬, 用甲醇制备 0.526 mg/ml 的酮洛

芬供试品溶液 (内标溶液)。

**2.4 组织供试品溶液的制备** 取 SD 大鼠肝脏组织样品, 称重, 加入定量生理盐水制成匀浆。吸取组织匀浆 100 μl, 加入 50 μl 内标 (酮洛芬甲醇溶液, 52.6 ng/ml), 涡旋 30 s, 再加入 50 μl 的盐酸溶液 (3 mol/L), 涡旋 30 s, 再加入 1 ml 乙酸乙酯, 涡旋混合 3 min, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清 800 μl 转移至另一 1.5 ml 塑料离心管中, 冷冻离心机吹干, 100 μl 流动相复溶, 涡旋混合 1 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清 20 μl 进样检测。

**2.5 专属性试验** 按照“2.4”项下方法制备空白肝脏组织溶液、含丹参素钠的供试品溶液。分别精密吸取空白肝脏组织溶液、含丹参素钠的供试品溶液、对照品溶液 20 μl 进样并测定, 色谱图见图 1。结果表明, 肝脏组织中内源性物质不干扰测定。

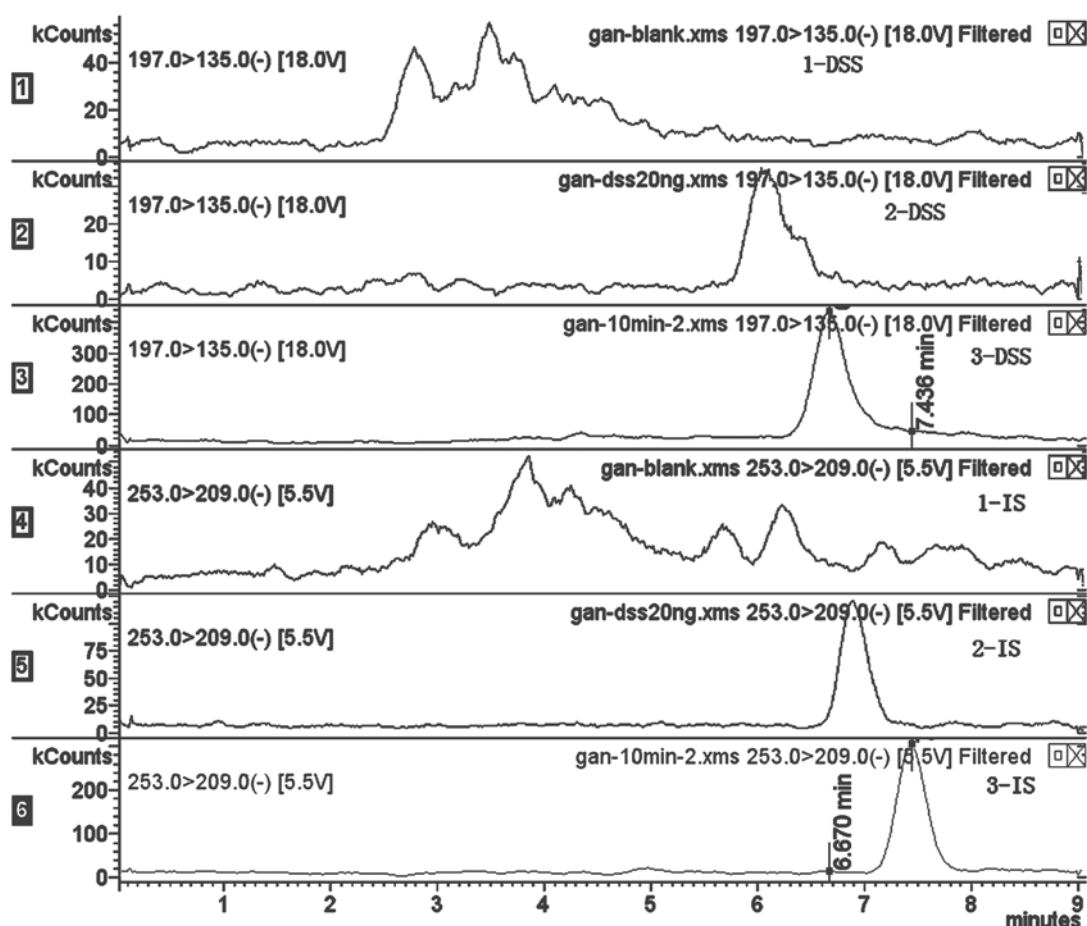


图 1 SD 大鼠肝脏组织匀浆中丹参素钠的 LC-MS/MS 图

1、4-空白肝脏组织; 2、5-空白肝脏组织 + 丹参素钠标准样品 + 内标;

3、6-受试大鼠注射丹参素钠后 10 min 后肝脏组织样品

**2.6 线性关系考察** 精密吸取不同浓度的丹参素钠对照品溶液, 用肝脏组织匀浆配成浓度为 20.2、

50.5、101、202、505 和 1 010 ng/ml 的系列标准组织液, 按“2.4”项下方法处理进样。以丹参素钠和酮

洛芬的峰面积比( $Y$ )为纵坐标,以丹参素钠肝脏组织浓度( $X$ )为横坐标,进行加权( $1/X$ )线性回归方程为: $Y=0.004\ 935X-0.030\ 124$ , $r=0.999\ 8$  ( $n=6$ ),在 20.2~1 010 ng/ml 范围内线性关系良好。

**2.7 基质效应** 取空白肝脏组织匀浆配制 50.5、202.0 和 808.0 ng/ml 3 种浓度肝脏组织匀浆溶液。另取空白肝脏组织匀浆样品 9 份,残渣用 0.1 ml 混合标准品溶液复溶,12 000 r/min 离心 10 min,20  $\mu$ l 进样分析,为基质样品。空白肝和肠组织匀浆基质样品和标准品峰面积比值为样品的基质效应。基质效应在 94%~100% 之间,说明组织样品基质不干扰样品测定。

**2.8 精密度与回收率实验** 取空白肝脏组织匀浆配制 50.5、202.0 和 808.0 ng/ml 3 种浓度进行连续 3 d 的 5 份样本分析,以考察方法的日内、日间精密度。同时以流动相代替空白肝脏组织匀浆,同样方法配制 50.5、202.0、808.0 ng/ml 的标准样品,计算回收率。低、中、高 3 个浓度的准确度分别为(50.65  $\pm$  2.67)、(186.42  $\pm$  10.89)、(801.04  $\pm$  8.14) ng/ml;日内精密度分别为 5.26%、5.84%、1.02%;日间精密度分别为 3.59%、5.20%、1.01%;提取回收率分别为(100.30  $\pm$  5.28)%、(92.29  $\pm$  5.39)%、(99.14  $\pm$  1.01)%。

**2.9 分析样品的稳定性** 将丹参素钠标准溶液配制的(50.5、202.0、808.0 ng/ml)的肝脏组织匀浆样品,按上述操作进行稳定性考察:肝脏组织样品室温放置 2 h 的稳定性;肝脏组织样品处理后放置 4 h 的稳定性;室温与 -80  $^{\circ}$ C 冻融 3 次的稳定性;-80  $^{\circ}$ C 保存 30 d 的稳定性。每个浓度点测定 5 份样品与放置 0 h 的样本进行比较, $RSD$  均小于 15%,稳定性符合指导原则。

### 3 讨论与小结

**3.1 内标物的选择** 在内标溶液选择上,考虑到结构的相似性以及丹参素钠为酸性化合物,先后尝试了阿魏酸、阿司匹林、尼泊金甲酯、山奈酚、对羟基苯甲酸。阿魏酸在分析过程中出现双峰,而且在丹参素钠离子( $m/z=135$ )出峰时间很接近;阿司匹林响应太低;尼泊金甲酯基线很高,相同浓度响应为丹参素钠的 20 倍(一般内标和标准品相同浓度的响应应在 10 倍以内);山奈酚无碎片离子出峰;最后选择了出峰时间合适、无内源性物质干扰、响应比较适中的对羟基苯甲酸作为内标。

**3.2 色谱条件的选择** 选择固定比例的流动相洗脱药物,甲醇-水(含 0.1%甲酸)(80:20)为流动

相,采用固定比例的流动相洗脱药物。实验发现,增加流动相中的甲醇比例时,分析时间缩短,但是内源性杂质的干扰比较大,使定量误差较大,因此选择甲醇:水(含 0.1%甲酸)(80:20)为流动相;降低流动相中的甲酸比例时,响应变小,峰形变差,因此选择加入 0.1%的甲酸;升高柱温时,样品与内标出峰会叠加,因此选用 25  $^{\circ}$ C 柱温。在柱温 25  $^{\circ}$ C,流动相为乙腈-水(含 0.1%甲酸)(10:90)时,样品出峰时间为 1.67 min,内标出峰时间为 3.90 min,分离度大于 1.5,且不存在干扰,响应也比较高,分析时间短。可以满足大量样品的快速测定的要求。

### 【参考文献】

- [1] Lain FFY, Yeung JHK, Chan KM, *et al.* Relaxant effects of danshen aqueous extract and its constituent danshensu on rat coronary artery are mediated by inhibition of calcium channels[J]. *Vascular Pharmacology*, 2007, 46: 271.
- [2] Huang YS, Zhang JT. Antioxidative effect of three watersoluble components isolated from *Salvia miltiorrhiza* in vitro[J]. *Acta Pharm Sin*, 1992, 27(2): 96.
- [3] 顾扬洪,张彩英,黄桂秋.丹参和丹参素对牛内皮细胞抗凝和纤溶功能的影响[J]. *上海第二医科大学学报*, 1990, 10(3): 208.
- [4] Sun XM, Cai HJ, Song QY, *et al.* Studies on new pharmacological action of an extract from Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 1991, 22(1): 20.
- [5] Zhang LJ, Chen L, Lu Y, *et al.* Danshensu has anti-tumor activity in B16F10 melanoma by inhibiting angiogenesis and tumor cell invasion[J]. *Int J Pharm*, 2010, 643(2-3): 195.
- [6] Zhao GR, Zhang HM, Ye TX, *et al.* Characterization of the radical scavenging and antioxidant activities of danshensu and salvianolic acid B[J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(1): 73.
- [7] 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.
- [8] 金昔陆,陈滨凌,吴卫江,等.8种丹参素衍生物对兔血小板聚集性的影响[J]. *上海医科大学学报*, 2000, 27(3): 181.
- [9] Li XL, Li XR. Simultaneous determination of Danshensu, ferulic acid, cryptotanshinone and tanshinone IIA in rabbit plasma by HPLC and their pharmacokinetic application in danxiongfang[J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2007, 44(5): 1106.
- [10] 胡珊珊,刘洁,刘文静,等.HPLC-FLD法测定丹参素在家兔组织中的分布[J]. *第四军医大学学报*, 2008, 29(7): 670.
- [11] 张雪,梅文静,刘文娜,等.高效液相色谱二极管阵列检测法同时测定丹参滴注液中四种水溶性成分的含量[J]. *分析化学学报*, 2010, 29(1): 109.
- [12] 曾忠荣. RP-HPLC法测定人血浆中丹参素的浓度[J]. *中国药房*, 2009, 20(33): 2622.

【收稿日期】 2011-04-21

【修回日期】 2011-06-14