

· 药物代谢 ·

## 丹参提取物中 5 种酚酸类成分在大鼠血浆中的 LC-MS/MS 分析

林晓斐, 林力, 张颖, 孙明谦, 任常英, 刘建勋\*

(中国中医科学院 西苑医院 基础医学研究所, 中药药理北京市重点实验室, 北京 100091)

**[摘要]** 目的:建立 LC-MS/MS 同时检测大鼠血浆中 5 种酚酸类成分的分析方法,为丹参提取物血浆样品的测定提供参考。方法:采用 LC-MS/MS 同时检测丹酚酸 A,B,C 和紫草酸、迷迭香酸含量,流动相 0.1% 甲酸水溶液-甲醇和乙腈等体积混合液(含 0.1% 甲酸)梯度洗脱,流速 0.6 mL·min<sup>-1</sup>。质谱条件采用多反应监测方式进行负离子监测。定量分析的离子对 *m/z* 分别为 493.3/295.1,717.5/519.1,491.2/293.2,537.3/295.1,359.1/161.0,5 种成分的定量分析可在 7 min 内完成。结果:丹酚酸 A,B 和紫草酸线性范围均为 0.78~100 μg·L<sup>-1</sup>,丹酚酸 C 和迷迭香酸线性范围均为 0.39~50 μg·L<sup>-1</sup>。日内及日间精密度 RSD 均 <15%,准确度 92%~112%。结论:该法选择性强、灵敏度高、操作简便,适用于丹参总酚酸中 5 种酚酸类成分在大鼠血浆中的药代动力学研究。

**[关键词]** 丹参; 总酚酸; 丹酚酸 C; 紫草酸; 迷迭香酸

**[中图分类号]** R969.1;R945;O657.63 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0093-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015080093

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150225.1605.003.html>

**[网络出版时间]** 2015-02-25 16:05

**Methodological Study of Five Kinds of Phenolic Acids from *Salvia miltiorrhiza* Extract in Rat Plasma by LC-MS/MS** LIN Xiao-fei, LIN Li, ZHANG Ying, SUN Ming-qian, REN Chang-ying, LIU Jian-xun\*  
(Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for simultaneously determining plasma concentration of five kinds of phenolic acids from *Salvia miltiorrhiza* extract in rat plasma by LC-MS/MS. **Method:** LC-MS/MS was adopted to determine contents of lithospermic acid, rosmarinic acid and salvianolic acid A, B, C with mobile phase of 0.1% aqueous formic acid-equal volume mixture of methanol and acetonitrile for gradient eluent, flow rate of 0.6 mL·min<sup>-1</sup>. Mass spectrum was operated by an electrospray ionization probe in the negative ion mode. Scan was in multiple reaction ion monitoring mode. Ion pairs for quantitative analysis of this five phenolic acids were *m/z* of 537.3/295.1, 359.1/161.0, 493.3/295.1, 717.5/519.1, 491.2/293.2. Determination of this five phenolic acids could be accomplished within 7 min. **Result:** Linear ranges of salvianolic acid A, B and lithospermic acid were 0.78-100 μg·L<sup>-1</sup>, linear ranges of rosmarinic acid and salvianolic acid C were 0.39-50 μg·L<sup>-1</sup>. Their inter-day and intra-day precisions represented by RSD were within 15%, their accuracies were between 92%-112%. **Conclusion:** A sensitive, accurate and easy LC-MS/MS method has been successfully developed, which can be applied to pharmacokinetic study of five phenolic acids from *S. miltiorrhiza* in rat plasma.

**[Key words]** *Salvia miltiorrhiza*; total phenolic acids; salvianolic acid C; lithospermic acid; rosmarinic acid

**[收稿日期]** 20141117(008)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81102795,81202950);中国中医科学院科技创新团队项目(ys1303)

**[第一作者]** 林晓斐,在读硕士,从事中药复方药代动力学研究,Tel:010-62835618,E-mail:434492349@qq.com

**[通讯作者]** \*刘建勋,博士,研究员,从事中药药理学研究,Tel:010-62835610,E-mail:liujx0324@sina.com

丹参具有活血调经、祛瘀止痛、凉血消痈、清心除烦、养血安神等功效,主要成分为脂溶性的二萜醌类化合物和水溶性的酚酸类化合物<sup>[1]</sup>,其中酚酸类成分有紫草酸、迷迭香酸及丹酚酸 A,丹酚酸 B,丹酚酸 C 等。丹参总酚酸具有很强的抗脂质过氧化和清除自由基等作用,以含量最高的 2 个成分丹酚酸 A, B 活性最强,对脂质过氧化引起的细胞膜损伤有明显保护作用<sup>[2]</sup>,对心脏和脑的缺血再灌注有保护作用,临床常用于治疗心脑血管疾病<sup>[3]</sup>。但丹参的应用范围已被逐渐扩大到呼吸系统、消化系统及内分泌系统疾病中<sup>[4]</sup>。LC-MS/MS 含量测定方法有良好的检测灵敏度和稳定性,已成为生物样品分析的首选方法。目前,关于血浆中丹酚酸类成分的含量测定研究较多<sup>[5-8]</sup>,但缺少实验动物血浆中丹酚酸 C 的定量分析方法。在前期工作基础上<sup>[9]</sup>,本实验建立了丹酚酸 C 的检测方法,优化包括丹酚酸 C 在内的 5 种酚酸类成分生物样品处理方法,缩短了样品预处理时间,提高了样品分析效率,为丹参水溶性成分的体内定量分析提供参考。

## 1 材料

API 4000 Q-TRAP 型串联质谱仪(美国 Applied Biosystem 公司),1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),Turbo Vap LV Evaporator 型样品浓缩仪(美国 Caliper Life Sciences 公司),Minishaker MS1 型涡旋混合器(德国 IKA 公司),VX-02 Multi-Tube Vortex 型涡旋混合器(北京绿锦科技有限公司),MIKRO 22R 型低温超速离心机(德国 Hettich 公司),AG-245 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。丹酚酸 B(中国食品药品检定研究院,批号 111562-201202),紫草酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 对照品(南京泽朗医药科技有限公司,批号分别为 20131117,20131204,20131026),丹酚酸 C 对照品(成都谨哲生物科技有限公司,批号 130413),抗坏血酸(国药集团化学试剂有限公司,批号 20080107),甲醇、乙腈及甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。SPF 级 SD 大鼠,雄性,体重(220 ± 20) g,由斯贝福(北京)实验动物科技有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2011-0004。

## 2 方法与结果

**2.1 血浆样品预处理** 向血浆样品中加入抗坏血酸溶液 20 μL,涡旋混匀,加入乙酸乙酯 500 μL,涡流混合 0.5 min,于 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 3 min,取上清液 400 μL 于 30 °C 氮气流下吹干,残留物用流动相

100 μL 复溶,涡流混合 0.5 min,于 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,取上清液待测。

**2.2 检测条件** 色谱条件为 Luna C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 50 mm, 5 μm),预柱采用 0.2 μm 过滤筛板,柱温 10 °C,进样量 20 μL,自动进样器温度 4 °C,运行时间 7.0 min,流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-甲醇和乙腈等体积混合液(含 0.1% 甲酸)(B)梯度洗脱(0~2.5 min,35% B;2.5~3.5 min,80% B;3.5~7 min,35% B),流速 0.6 mL·min<sup>-1</sup>。质谱条件为电喷雾离子源 ESI 源,检测方式负离子检测,扫描方式多反应监测,气帘气体 103.35 kPa,源内温度 650 °C,源内气体(GS1)447.85 kPa,源内气体(GS2)344.50 kPa,离子喷射电压 4 500 V。利用多反应监测器对特异的离子碎片进行检测。5 种酚酸类成分用于定量分析的离子质荷比及优化的质谱参数见表 1,质谱见图 1。

表 1 丹参提取物中 5 种酚酸类成分的离子质荷比及质谱参数  
Table 1 Mass to charge ratio and mass spectrum parameters of five phenolic acids from *Salvia miltiorrhiza* extract

化合物	母离子质荷比	子离子质荷比	去簇电压/V	碰撞电压/V
丹酚酸 A	493.2	295.1	-47	-24
丹酚酸 B	717.2	519.1	-47	-25
丹酚酸 C	491.2	293.2	-70	-28
紫草酸	537.2	295.0	-40	-13
迷迭香酸	359.2	161.0	-60	-23

注:时间均为 100 ms,射入电压均为 -10 V,碰撞室射出电压均为 -5 V。

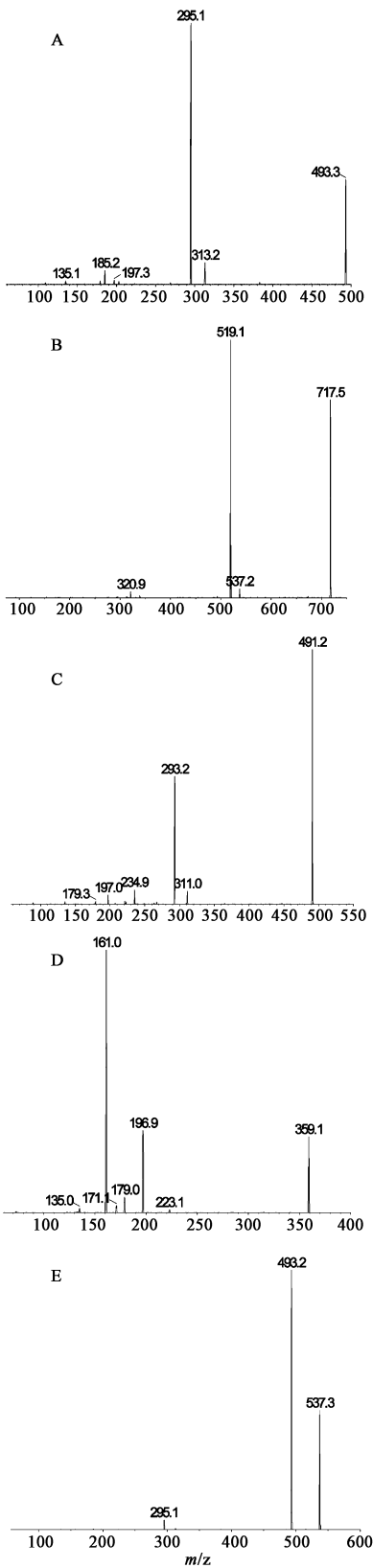
**2.3 对照品溶液的制备** 精密称定紫草酸、迷迭香酸及丹酚酸 A, B, C 对照品各约 5 mg,分别用甲醇溶解并定容至 1.0 mL,得各对照品储备液。精密吸取各对照品储备液适量,混匀,配成质量浓度分别为 1, 0.05, 1, 1, 0.05 g·L<sup>-1</sup> 的混合母液。

## 2.4 LC-MS/MS 方法学

**2.4.1 方法专属性** 取大鼠空白血浆和 5 种酚酸类成分对照品溶液,按 2.1 项下方法处理,按 2.2 项下方法测定,结果表明血浆处理方法及测定条件具有专属性,血浆对测定无干扰。丹酚酸 A,丹酚酸 B,丹酚酸 C 及紫草酸、迷迭香酸的保留时间分别为 3.95, 3.91, 4.46, 3.67, 3.65 min,见图 2。

**2.4.2 标准曲线和线性范围** 精密制备不同质量浓度的标准血浆,按 2.1 项下方法操作,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得 5 种成分的定量下限及线性方程见表 2。

**2.4.3 精密度和准确度** 配制低、中、高质量浓度的质控样品,丹酚酸 A, B 和紫草酸分别为 1.56,



A. 丹酚酸 A; B. 丹酚酸 B; C. 丹酚酸 C; D. 紫草酸; E. 迷迭香酸

图 1 丹参提取物中 5 种酚酸类成分质谱

Fig. 1 Mass spectrum of five phenolic acids from *Salvia miltiorrhiza* extract

表 2 血浆中 5 种酚酸类的定量下限、线性范围及回归方程

Table 2 Lower limit of quantification, linear range and regression equation of five phenolic acids from *Salvia miltiorrhiza* extract in plasma

成分	定量下限/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	相关系数
丹酚酸 B	0.78	0.78 ~ 100	0.997 7
丹酚酸 A	0.78	0.78 ~ 100	0.997 8
紫草酸	0.78	0.78 ~ 100	0.996 7
迷迭香酸	0.39	0.39 ~ 50	0.998 7
丹酚酸 C	0.39	0.39 ~ 50	0.994 8

12.5, 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 丹酚酸 C 和迷迭香酸依次选择 0.78, 6.25, 25  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 每个质量浓度 5 份样品, 按 2.1 项下方法操作, 连续测定 3 d, 计算精密度和准确度, 见表 3, 结果表明本方法的精密度和准确度符合生物样品检测要求。

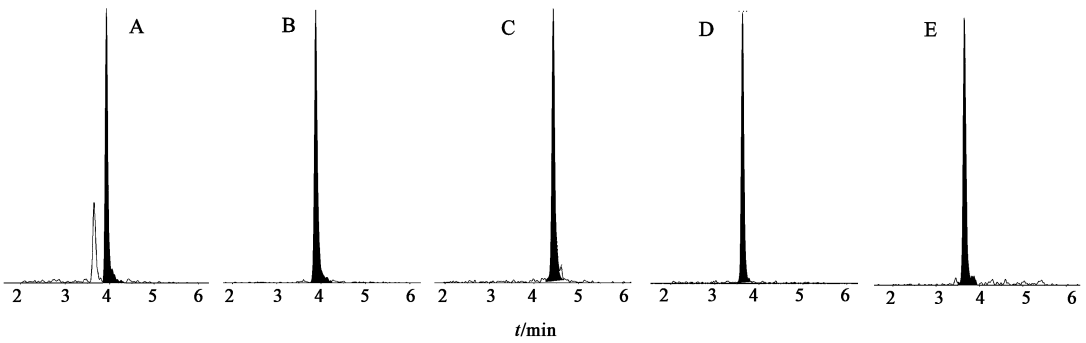
**2.4.4 回收率和稳定性** 取 2.4.3 项下的质控样品 ( $n=5$ ), 按 2.1 项下方法操作, 加流动相配制样品, 将处理后的样品与未处理的对照样品均按 2.2 项下方法分析, 计算 3 个质量浓度下大鼠血浆中 5 种成分的提取回收率在 34.27% ~ 62.06%。考察样品在自动进样器 (4  $^{\circ}\text{C}$ ) 放置 24 h 及样品置于 -80  $^{\circ}\text{C}$  下 24 h 的稳定性, 取出后室温自然融解后考察冻融稳定性, 结果表明 5 种成分 24 h 稳定性和冻融稳定性 RSD 均 < 15%, 符合相关要求。

**2.4.5 基质效应** 取低质量浓度混合对照品溶液 6 份, 各加入空白血浆适量, 按 2.1 项下方法处理 (终质量浓度为检出限); 另取低质量浓度混合对照品溶液 6 份, 各加入流动相适量, 按 2.1 项下方法处理, 制备对应质量浓度的样品, 按 2.2 项下方法检测, 计算基质效应。结果表明该条件下 5 种成分准确度 97% ~ 113%, 不存在明显的基质效应。

### 3 讨论

本文建立了 LC-MS/MS 测定大鼠血浆中丹酚酸 A, B, C 和迷迭香酸、紫草酸共 5 种成分的方法。目前丹酚酸类成分在血浆中含量测定已有文献报道<sup>[6-8]</sup>, 但取样量较大、灵敏度较差。Zhao 等<sup>[6]</sup>利用 LC-ESI/MS 测定大鼠血浆中丹酚酸 A, B 和迷迭香酸、紫草酸等成分的含量, 定量下限 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 而本法中这些成分的定量下限为 0.39  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  或 0.78  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 灵敏度更高, 更能满足生物样品分析的要求。

酚酸类成分性质不稳定, 容易被氧化, 处理血浆样品时, 加入抗坏血酸溶液可保证样品在放置和测定过程中的稳定性。预试验对血浆样品的处理方法



A. 丹酚酸 A; B. 丹酚酸 B; C. 丹酚酸 C; D. 紫草酸; E. 迷迭香酸

图 2 丹参提取物中 5 种酚酸类成分的血浆提取色谱

Fig. 2 Plasma chromatograms of five phenolic acids from *Salvia miltiorrhiza* extract

表 3 血浆中 5 种酚酸类的精密度和准确度 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Precision and accuracy of five phenolic acids from *Salvia miltiorrhiza* extract in plasma ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

成分	低质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$			中质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$			高质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		
	测得值 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD /%	准确度 /%	测得值 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD /%	准确度 /%	测得值 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD /%	准确度 /%
日内 丹酚酸 B	1.70 ± 0.03	1.7	108.97	11.98 ± 0.66	5.5	95.84	49.78 ± 1.659	3.3	99.56
丹酚酸 A	1.69 ± 0.10	5.6	108.33	11.68 ± 0.60	5.1	93.44	49.70 ± 1.801	3.6	99.40
紫草酸	1.54 ± 0.15	9.8	98.72	12.20 ± 0.56	4.6	97.60	48.82 ± 2.846	5.8	97.64
迷迭香酸	0.83 ± 0.07	9.0	106.41	6.24 ± 0.09	1.4	99.84	24.60 ± 1.140	4.6	98.40
丹酚酸 C	0.85 ± 0.06	7.2	108.97	5.75 ± 0.43	7.5	92.00	27.84 ± 0.680	2.4	111.36
日间 丹酚酸 B	1.59 ± 0.22	13.8	101.83	12.47 ± 1.54	12.4	99.74	50.15 ± 4.10	8.2	100.29
丹酚酸 A	1.61 ± 0.12	7.2	102.91	11.95 ± 1.21	10.1	95.63	49.53 ± 4.35	8.8	99.05
紫草酸	1.59 ± 0.14	8.9	101.67	12.26 ± 1.49	12.1	98.11	48.26 ± 4.17	8.6	96.52
迷迭香酸	0.83 ± 0.08	10.0	106.04	6.39 ± 0.43	6.7	102.20	24.54 ± 2.23	9.1	98.16
丹酚酸 C	0.78 ± 0.07	9.1	100.32	6.05 ± 0.50	8.3	96.86	25.44 ± 2.62	10.3	101.76

进行了优化,比较了萃取法和固相萃取法的提取效果,结果表明本文采用的高浓度抗坏血酸对固相萃取法的萃取效果影响较大。液-液萃取法考察了不同萃取试剂,结果表明将血浆样品酸化后,以乙酸乙酯为溶剂,5 个成分虽未获得特别高的提取回收率,但检测灵敏度、离子抑制均满足要求,且样品处理快速,故最终确定采用液-液萃取法处理血浆样品。

[参考文献]

[1] 马丙祥,董宠凯. 丹参的药理作用研究新进展[J]. 中国药房,2014,25(7):663-665.  
 [2] 王长虹,程雪梅,何芋岐,等. LC-MS-MS 法同时测定大鼠血浆中丹参素和葛根素血药浓度及其在通脉滴丸药代动力学和生物等效性评价中的应用[C]. 武汉:第九届全国药物和化学异物代谢学术会议,2009.  
 [3] 刘建梅,朱明磊,郭鄂平. 丹酚酸 B 的研究概况[J]. 医学理论与实践,2014,27(2):166-168.  
 [4] 赵春娟,马玉清,郭杨志,等. 丹参提取物药理作用研究进展[J]. 光明中医,2014,29(9):2013-2015.  
 [5] 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 Analyt Technol Biomed Life Sci,2013,912(1):75-84.

[6] Zhao D, Han D E, Li N, et al. Simultaneous determination of six phenolic constituents of Danshen injection in rat plasma by LC-ESI-MS and its application to a pharmacokinetic study[J]. Eur J Mass Spectrom,2011,17(4):395-403.  
 [7] 周琳,刘宪英,郑金凤,等. 丹参多组分渗透泵片在 Beagle 犬体内的药代动力学研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(12):1761-1764.  
 [8] 王小平,刘峰,杨东花,等. 丹参总酚酸在大鼠血浆中的药代动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(12):141-144.  
 [9] 林力,刘建勋,张颖,等. LC-MS/MS 法同时测定犬血浆中丹酚酸 A、丹酚酸 B、紫草酸和迷迭香酸及其在丹参提取物的药代动力学研究应用[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2012,14(3):1567-1571.

[责任编辑 刘德文]