

HPLC 测定丹红注射液中迷迭香酸在大鼠血浆中的浓度

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: 建立丹红注射液中迷迭香酸在大鼠血浆中浓度的测定方法。方法: 雄性 SD 大鼠 6 只, 静脉注射丹红注射液(10 mL·kg⁻¹)后, 分别于不同时间取血, 以肉桂酸为内标, 液液萃取处理后, HPLC 测定浓度。Diamonsil(钻石) C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 乙腈-0.4% 的磷酸水为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 min·mL⁻¹, 检测波长 286 nm。结果: 迷迭香酸在 4.0~100.0 mg·L⁻¹ 呈良好线性关系 ($R^2 = 0.9965$); 回收率在 85.0%~101.4%, 方法的日内、日间精密性 (RSD) 分别为 4.00%~6.76%, 4.50%~7.81%。不同时间点血浆中迷迭香酸的质量浓度分别为 85.44, 75.09, 61.13, 54.73, 43.02, 20.92, 10.12, 7.18, 4.28 mg·L⁻¹。结论: 建立的方法灵敏度高、准确率高, 可用于丹红注射液中迷迭香酸的药代动力学研究。

[关键词] 丹红注射液; 迷迭香酸; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0112-03

Determination of Concentration of Rosmarinic Acid of Danhong Injecta in Rat Plasma by HPLC

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 Pharmaceutical Co. Ltd, Xianyang 712000, China; 3. Beijing University, Beijing 100191, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the determination of rosmarinic acid in rat plasma after iv Danhong Zhusheye. **Method:** Male SD rats six, after iv Danhong Zhusheye (10 mL·kg⁻¹), Separately at different times take blood, with cinnamic acid as internal standard, Liquid-liquid extraction processing, determination of rosmarinic acid by HPLC, Diamonsil C₁₈ colurme was used. Acetonitrile-0.4% phosphoric acid solution as mobile phase, gradient elution, at the flow rate of 1 min·mL⁻¹ with detection wave length at 286 nm. **Result:** Rosmarinic acid had good linear relationship when its concentration was between 4.0-100.0 g·L⁻¹. Recoveries were between 85.0%-101.4%. The intra-day and inter-day precision of this method were 4.00%-6.76% and 4.50%-7.81%, respectively. Concentration of rosmarinic acid in rat plasma at different times Separately were 85.44, 75.09 g·mL⁻¹, 61.13, 54.73, 43.02, 20.92, 10.12, 7.18, 4.28 mg·L⁻¹. **Conclusion:** The method is simple, quick and convenient for the determination of rosmarinic acid.

[Key words] Danhong Zhusheye; rosmarinic acid; HPLC

丹红注射液(国药准字 Z20026866)是步长集团独家拥有自主知识产权的主导品种之一,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,心肌梗塞等症。2005 年获得国家发明专利(专利号 ZL02153312.1)。2006 年入选“第三届百姓放心药品”十大中药注射液之一^[1-2]。本文对给药丹红注射液后的大鼠血样进行了研究,建立了测定大鼠血浆中迷迭香酸浓度的方法,为研究丹红注射液的药物代谢及药效物质基础奠定

[收稿日期] 20110312(004)

[第一作者] 王小平, 博士, 副教授, 研究方向: 中药药效物质基础及新药, Tel: 13992052795, E-mail: wangxiaoping323@126.com

基础。

1 材料

Anglent 1100 型高效液相色谱仪;MVS-1 型涡旋混合器(北京金北德工贸有限公司);TGL-16G-A 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。Discovery DV215CD 型双量程电子分析天平(瑞士,0.01 mg;0.1 mg)。

迷迭香酸对照品(纯度 98.5%)由北京大学医学部中药现代化研究中心提供,丹红注射液(批号 20101119)由山东菏泽步长制药有限公司提供。乙腈为色谱纯(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,动物合格证号 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 精密称取迷迭香酸对照品 1.0 mg 适量,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 4,6,8,10,25,50,100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 系列质量浓度的对照品溶液。

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。

2.2 色谱条件 Diamonsil(钻石) C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.4% 的磷酸水,梯度洗脱(见表 1),流速 1.0 $\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$,检测波长 286 nm,进样量 20 μL ,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

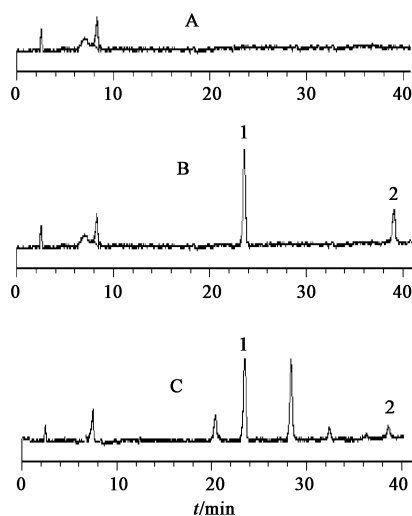
表 1 迷迭香酸梯度洗脱条件

t/min	乙腈/%	0.4% 磷酸水/%
0	5	95
3	12	88
5	15	85
7	20	80
10	23	77
42	30	70

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 100 μL ,涡旋混合 1 min,再加入 20% 盐酸溶液 50 μL ,涡旋混合 2 min,加入乙酸乙酯 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 的微孔滤膜过滤,即得。

2.4 方法专属性试验 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 2.3 项下方法操作,进样后所得色谱图见图 1。



A. 空白血浆样品;B. 空白血浆+对照品(迷迭香酸)+内标(肉桂酸);C. 静脉注射丹红注射液 5 min 的血浆样品+内标;1. 迷迭香酸;2. 肉桂酸

图 1 大鼠血浆中迷迭香酸和内标物的 HPLC

2.5 线性关系及最低定量限试验 精密取大鼠空白血浆 200 μL ,分别精密加入系列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 2.3 项下方法操作,得到系列浓度的血浆标准曲线样品,每个浓度平行制备 3 份样品。

将制备好的血浆标准样品在上述色谱条件分析测定,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 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) X 为横坐标,计算回归方程及相关系数(r),要求生物样品的 $r > 0.99$ 。所得回归方程为 $Y = 0.017 X + 0.033 3 (R^2 = 0.996 5)$,结果表明迷迭香酸血浆质量浓度在 4.0~100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

最低定量限试验 在空白血浆中精密加入一定量的各对照品溶液适量,混匀,逐步稀释,以对照品峰信号与噪音信号比例 10:1 为最低定量浓度,重复测定 3 次。其最低定量限为 4.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.6 稳定性试验 精密取大鼠空白血浆 200 μL ,分别精密加入 4,10,100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 3 个质量浓度的对照品溶液 200 μL ,内标溶液 50 μL ,涡旋混匀 1 min,其余按照 2.3 项下方法操作,得到高、中、低浓度的血浆质控样品,每个浓度平行制备 5 份样品。将高、中、低 3 个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; 在冻融-冷冻循环实验中, 将质控样品置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 24 h, 取出后于室温下自然融解后, 再置于 $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 24 h, 如此冻融-冷冻循环至少 2 次后测定; 长期稳定性实验中, 将质控样品于 $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 15 d 后进行测定。其 RSD 均 $< 10\%$ 。说明样品可以在常温下保存 12 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存 24 h, $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 15 d, 药物浓度无明显变化, 基本稳定。

2.7 回收率试验 按 2.6 项下的方法制备高、中、低质量浓度的血浆质控样品, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 与未经处理的相应质量浓度的标准溶液的峰面积比较, 计算提取回收率。同法测定并计算内标提取回收率, 其 RSD 均 $< 5\%$ 。

表 2 迷迭香酸和内标物的回收率 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

成分	加入量 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	测得量 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率 / $\%$	RSD / $\%$
迷迭香酸	4.00	3.40 ± 0.15	85.01 ± 4.25	5.00
	10.00	9.00 ± 0.25	90.01 ± 3.25	3.61
	100.00	101.41 ± 1.25	101.41 ± 2.13	2.10
肉桂酸	43.60	41.61 ± 1.05	95.43 ± 1.94	2.03

2.8 精密度试验 按 2.6 项下的方法制备高、中、低浓度的血浆质控样品, 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 并随行标准曲线, 测定日间精密度。本法的日内、日间精密度 (RSD) 分别为 $4.00\% \sim 6.76\%$ 和 $4.50\% \sim 7.81\%$ 。

2.9 血浆中迷迭香酸的含量测定 雄性 SD 大鼠 6 只, 正常饲养 3 d, 试验前禁食 24 h, 自由饮水。静脉注射丹红注射液 ($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)。静脉注射后分别于 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, $6\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 分离血浆, 按 2.3 项下方法处理, 进样 $20\text{ }\mu\text{L}$, 记录峰面积, 代入标准曲线方程, 计算血浆中迷迭香酸的含量, 各时间点对应的血药质量浓度分别为 (85.44 ± 10.01), (75.09 ± 4.81), (61.13 ± 7.70), (54.73 ± 2.77), (43.02 ± 1.96),

(20.92 ± 0.95), (10.12 ± 1.81), (7.18 ± 0.66), (4.28 ± 0.18) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化 同文献 [3-4] 采用的色谱条件相比, 本文的色谱条件能够使色谱图的背景噪音低, 基线平直, 待测成分和内标物均能得到理想的分离。

3.2 内标的选择 考察了不同的化合物如肉桂酸, 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 在预实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) 法对迷迭香酸和内标物的提取效果。结果表明, 采用沉淀蛋白法, 迷迭香酸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得体积较大, 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, 以乙酸乙酯作为萃取试剂, 迷迭香酸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. 正交实验法优化丹参总酮提取工艺[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12 (6): 133.
- [2] 王小平, 刘峰, 韩翠. 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, 38.
- [3] 姚燕, 陈晓辉, 果德安. 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理学[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45 (15): 1163.
- [4] 孙士丰. 丹参中活性成分迷迭香酸的代谢研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2008.

[责任编辑 邹晓翠]