

复方丹参注射液 II 中丹酚酸 B 在大鼠体内的 HPLC 测定

王秀丽*, 赵保胜

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 探讨复方丹参注射液 II 的制备及其指标成分丹酚酸 B 在大鼠体内的含量测定方法。方法: 通过羟丙基- β -环糊精包合增加降香挥发油溶解性; 用 HPLC 法测定主成分丹酚酸 B 在大鼠体内的含量。结果: 成功制备复方丹参注射液 II, 建立注射液中指标成分丹酚酸 B 在大鼠体内的 HPLC 测定方法。结论: 复方丹参注射液 II 的制备工艺可行, 指标成分丹酚酸 B 在大鼠体内的含量测定方法准确可靠。

[关键词] 复方丹参注射液; 丹酚酸 B; 高效液相色谱法

[中图分类号] R285.5; R284.1 **[文献标识码]** B

[文章编号] 1005-9903(2010)02-0110-03

复方丹参注射液, 是丹参水提液和降香挥发油饱和水溶液混合后的灭菌溶液, 在临床上应用于冠心病、心绞痛、心肌梗死等疾病的治疗。复方丹参注射液中丹参的有效成分是丹参素和原儿茶醛, 二者在丹参药材中的含量均较低。丹酚酸 B 在丹参药材中含量很高, 约占总丹酚酸的 70%, 且在水溶性成份中的活性最强^[1], 但丹酚酸 B 已经在高温煎煮的提取过程中分解失活。降香挥发油可明显抑制血栓形成; 提高血小板 cAMP 的水平, 对血浆纤溶酶活性

有显著促进作用, 缩短血浆的“再钙化时间”, 还有抗凝、增加冠脉流量, 减慢心率, 轻度增加心跳幅度的作用。但原制备工艺是以降香挥发油饱和水溶液的形式加入, 不仅降香挥发油含量降低, 也增加了给药体积。基于以上考虑, 本研究制备了复方丹参注射液 II, 由以丹酚酸 B 为主成分的丹参水提液和降香挥发油-羟丙基- β -环糊精(降香挥发油-HP- β -CD)混合后的灭菌溶液组成, 并建立了指标成分丹酚酸 B 在大鼠体内的 HPLC 检测方法。

1 仪器与材料

Varian series ProStar 高效液相色谱仪(美国); Büchi Rotavapor R-114 旋转蒸发仪(瑞士); LD4-2 低速离心机(北京医用离心机厂); AG-285 分析天平

[收稿日期] 2009-04-08

[通讯作者] * 王秀丽, Tel: (010) 84738658; E-mail: lnwangxiuli@163.com

(瑞士);BS-3200 超声波清洗器(上海新芝生物技术研究所);调温电热套 ZDHW (2000 mL,河北黄骅中兴仪器有限公司);挥发油测定器(上海建强玻璃仪器有限公司);81-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司);大孔吸附树脂:D101 型(天津市海光化工有限公司);羟丙基- β -环糊精注射用辅料(HP- β -CD,西安德立生物化工有限公司);水为重蒸水,甲醇、乙腈为色谱纯(上海陆忠工贸有限公司),其余试剂为分析纯;丹参药材,四川中江丹参基地提供,降香药材饮片购于海南九龙山;丹酚酸 B 对照品(批号:111562-200403)中国药品生物制品检定所。

2 处方与制备

2.1 处方 丹参1 000 g,降香1 000 g。

2.2 制备方法 丹参药材加 10 倍量水,85 °C 恒温水浴提取 1.5 h,提取两次,提取液过滤后合并,调 pH 至 2.8,过滤,上清液减压浓缩后用乙酸乙酯萃取 4 次,萃取液合并,回收乙酸乙酯,得丹酚酸 B 浸膏。浸膏用 1.6 L 蒸馏水溶解,以 0.3 BV · h⁻¹ 的流速上 800 g D101 大孔吸附树脂柱,静止吸附 2 h。40% 乙醇以 0.5 BV · h⁻¹ 的流速洗脱,减压浓缩除去乙醇,冷冻干燥。降香加 10 倍量水浸润 3 h,水蒸气蒸馏 18 h,收集挥发油,称取 30 倍量 HP- β -CD (mL/g),同时置于密闭容器中,加入适量无水乙醇溶解,室温磁力搅拌 3 h 后回收乙醇。丹参提取物冻干粉与降香挥发油-HP- β -CD 溶解于 600 mL 注射用水,用 10% 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 5,加注射用水使成 1 000 mL,滤过,灌封,即得。

3 丹酚酸 B 在大鼠体内的含量测定

3.1 HPLC 色谱条件 色谱柱为 shim-pack vp C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μ m);流动相为 0.025% 磷酸水溶液(v/v, A 相)-乙腈(B 相),采用梯度洗脱:0 ~ 5 min B 相由 0% 线性递增至 20%,5 ~ 18 min B 相由 20% 线性递增至 40%;流速 1.0 mL · min⁻¹,柱温 30 °C;检测波长 281 nm;进样量 10 μ L。

3.2 对照品溶液的配制 以乙腈为溶剂,配制丹酚酸 B(640 μ g · mL⁻¹)的储备液;以 0.025% (v/v) 磷酸水溶液:乙腈(50:50 (v/v)) 为稀释溶剂,取上述储备液稀释配制丹酚酸 B(32.00 μ g · mL⁻¹)的对照品溶液。

3.3 血浆样品的处理 健康雄性 Wistar 大鼠 200 ~ 220 g,在实验室动物房中饲养 3 d,自由进食、进水,每天 8:00 至 20:00 开灯,20:00 至次日 8:00 关

灯,室温 22 ~ 24 °C,室内相对湿度 60%。尾静脉注射复方丹参注射液 II (4 mL · kg⁻¹),注射前 12 h 禁食,注射后分别于 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90, 120 min 眼底静脉取血,以肝素浸润过的具塞离心管接收给药前和给药后的血液,立即于 4 °C 以 4 500 r · min⁻¹ 离心 1 min。量取 100 μ L 血浆,加 15 μ L 10% HCl 于水相中,再加入 1 mL 乙酸乙酯,涡旋混合 1 min,于 4 °C 以 15 000 r · min⁻¹ 离心 15 min,吸取上清液(有机相);重复 1 次,与之前的上清液合并。于 20 °C 下氮气流将上清液吹干,残渣加入 100 μ L 0.025% (v/v) 磷酸水溶液-乙腈(50:50, v/v),于 4 °C 下 15 000 r · min⁻¹ 离心 25 min,吸取 20 μ L 作为 HPLC 进样样品。

4 血浆样品分析方法的验证

4.1 方法的专属性 分别取空白血浆、空白血浆加入丹酚酸 B 对照品、大鼠尾静脉注射复方丹参注射液 II 的含药血浆,按建立的血浆预处理方法和 HPLC 方法操作和进样,空白血浆的内源性物质及复方丹参注射液 II 的其他成分对有效成分的含量测定没有干扰,丹酚酸 B 的保留时间是 15.35 min。结果如图 1 所示。

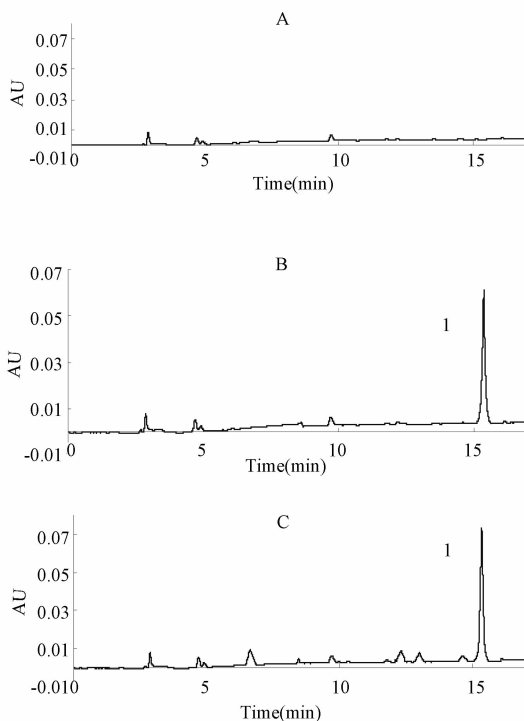


图1 丹酚酸 B 血清浓度测定的 HPLC 色谱图
A. 空白血清;B. 血清 + 丹酚酸 B;C. 血样
1. 丹酚酸 B (t_R = 15.35min)

4.2 线性关系考察 按照上述血浆样品的处理方法,取空白血浆 9 份,依次加入丹酚酸 B 对照品储备液适量,配制系列浓度的含有丹酚酸 B 1.28 ~ 32.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的血浆对照品标准溶液,于 3 d 中进行 HPLC 分析,均分别平行操作 3 份,以样品峰面积对应其浓度进行线性回归,得到丹酚酸 B 在大鼠体内的回归方程。根据信噪比大于 3:1 的最低浓度为检测限、准确度偏差的绝对值小于 20% 的最低浓度为定量限的定义求出检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。结果见表 1。

表 1 不同浓度范围的线性关系及相关参数

组分	浓度范围 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	线性回归方程	相关系数 <i>r</i>	LOD ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
丹酚酸 B	0.256 ~ 6.40	$Y = 0.073X + 0.010$	0.999 4	0.043	0.085
	6.40 ~ 32.00	$Y = 0.089X - 0.100$	0.999 4		

4.3 准确度和精密度 取低浓度 (含丹酚酸 B 0.256 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、中浓度 (含丹酚酸 B 6.40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、高浓度 (含丹酚酸 B 32.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的对照品溶液 100 μL ,于 20 $^{\circ}\text{C}$ 氮气流吹干后加入 100 μL 的大鼠空白血浆,按 3.1 的方法操作,求出丹酚酸 B 的峰面积,代入回归方程得出相应浓度。平行操作 5 次,求出日内精密度、相对回收率和准确度;每天 1 次,连续 5 d,求出日间精密度、相对回收率及准确度。结果如表 2 所示。

表 2 回收率与精密度试验结果

组分	实际浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率 (%) ($n=5$)	日内 ($n=5$)			日间 ($n=5$)		
			测定浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	精密度 RSD (%)	准确度 R.E. (%)	测定浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	精密度 RSD (%)	准确度 R.E. (%)
丹酚酸 B	0.256	92.2	0.236	5.2	-7.7	0.235	5.7	-9.1
	6.40	94.0	5.96	3.1	-6.9	5.97	4.1	-6.8
	32.00	98.9	30.60	2.6	-4.3	30.70	2.9	-4.1

4.4 稳定性考察 制备高、中、低 3 种浓度的血浆样品各两组,第 1 组置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻,再于室温融化,反复操作 3 次;第 2 组置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 48 h。所得样品进样 HPLC,计算丹酚酸 B 的浓度,结果如表 3 所示,表明丹酚酸 B 在两组存放方式下,于血浆中是稳定的。

5 讨论

含丹酚酸 B 的药物 (制剂) 临床应用广泛,研究丹酚酸 B 的体内过程有实际意义。文中所建立的研

表 3 稳定性试验结果

组分	实际浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测定浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
		-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻— 融化循环 3 次	4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 48 h
丹酚酸 B	0.256	0.232 \pm 0.012	0.233 \pm 0.009
	6.40	5.90 \pm 0.19	5.90 \pm 0.25
	32.00	30.46 \pm 0.84	30.50 \pm 0.70

究方法,在实验动物生理给药剂量的条件下,可以完整测算出丹酚酸 B 体内药物动力学所需的不同时间点的血药浓度。

预试验中对于血浆处理时所选择的溶剂进行了详细考察:尝试乙酸乙酯、正丁醇、甲醇、乙腈、乙酸乙酯-甲醇不同配比混合液、甲醇-乙腈不同配比混合液,结果以乙酸乙酯效果最好,不仅萃取效率高,且杂质少,HPLC 图谱中对指标成分峰无干扰。

丹酚酸 B 容易降解,为了保证血浆样品处理过程中指标成分的稳定,对 pH 值、萃取时间等因素均加以考察。加入 10% HCl 不仅能防止丹酚酸 B 降解,还能增加其萃取率;萃取时间每次以 1 min 为宜,保证萃取率的同时还可防止指标成分降解、变性。

色谱条件的选择:比较了 SHIM-PACK VP-ODS、Diamonsil C₁₈、Polaris C₁₈-Ether 3 种色谱柱,以 SHIM-PACK VP-ODS 的分离效果更好些;以 0.025% (v/v) 的磷酸为水相,可以很好地保证指标成分的峰型 (无拖尾),色谱图中各峰的分离也比较理想;柱温以 30 $^{\circ}\text{C}$ 优于 20, 25, 35, 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

文中给药方式选用大鼠尾静脉注射给药,该操作有一定难度。为了保证给药量准确,操作过程中不仅要求操作者技巧熟练,选用大鼠时还需选用尾部皮肤光洁、血管较为明显的大鼠,本试验中的给药成功率在 90% 以上。

制备复方丹参注射液 II 是依据对复方丹参注射液制备方法不合理之处的理论分析,对于复方丹参注射液 II 工艺及功效的合理性需要进一步实验验证,作者另文报道。

[参考文献]

[1] 王文祥,周巧霞,蒋木岗,等. 比色法测定丹参及提取物水溶性总酚的改进[J]. 中草药, 2001, 32(8): 711.