

## 在线固相萃取-HPLC法测定比格犬血浆中丹参素的含量

王 丽<sup>1,2</sup>, 崔晓如<sup>2</sup>, 窦颖辉<sup>1,2</sup>, 闻 俊<sup>2</sup>, 杭太俊<sup>1\*</sup>, 范国荣<sup>2\*</sup>

(1. 中国药科大学药学院药物分析学教研室, 南京 210009; 2. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的: 建立测定比格犬血浆中丹参素含量的在线固相萃取-HPLC法。方法: 血浆样品经蛋白质沉淀, 采用 Lichrospher C<sub>18</sub> 为富集柱, 以乙腈-10 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5: 95) 为富集流动相, 流速 2 ml/min; 选择 Ultimate XB-C<sub>18</sub> (50 mm×4.6 mm, 5 μm) 为分析柱, 以乙腈-10 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (11: 89) 为分析流动相, 流速为 0.8 ml/min, 检测波长 285 nm。结果: 丹参素在 20~2 000 ng/ml 浓度范围内线性关系良好, 最低定量限为 20.0 ng/ml, 日内和日间 RSD 均 < 10%, 平均绝对回收率 > 80%。结论: 本方法简便、快速、灵敏、可靠, 适用于比格犬血浆中丹参素含量的测定。

[关键词] 丹参素; 血药浓度; 在线固相萃取; 色谱法, 高效液相

[中图分类号] R 927.2 [文献标志码] A [文章编号] 1674-2838(2011)03-0203-04

DOI: 10.5428/pcar20110316

### Determination of danshensu concentration in beagle dog plasma by on-line solid phase extraction-HPLC method

WANG Li<sup>1,2</sup>, CUI XiaoRu<sup>2</sup>, DOU YingHui<sup>1,2</sup>, WEN Jun<sup>2</sup>, HANG TaiJun<sup>1\*</sup>, FAN GuoRong<sup>2\*</sup> (1. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish an on-line solid phase extraction(SPE)-HPLC method for the determination of plasma concentration of danshensu in beagle dog. **Methods:** The plasma samples were treated by protein precipitation. A Lichrospher C<sub>18</sub> (37 mm×4.6 mm, 25 μm) column was used as trap column, with the loading solvents of acetonitrile 10 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5: 95) at a flow rate of 2 ml/min. An Ultimate XB-C<sub>18</sub> (50 mm×4.6 mm, 5 μm) column was used as analytical column, with the mobile phase of acetonitrile-10 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (11: 89) at a flow rate of 0.8 ml/min. The detection wavelength was 285 nm. **Results:** The calibration curve was linear in the concentration range of 20-2 000 ng/ml. The low limit of quantification was 20 ng/ml. The inter- and intra-day RSDs were less than 10%. The average recovery rate was more than 80%. **Conclusion:** This method is simple, rapid, sensitive, reliable and suitable for the determination of plasma concentration of danshensu in beagle dog.

[KEY WORDS] danshensu; plasma drug concentration; on-line solid phase extraction; chromatography, high performance liquid

[Pharm Care Res, 2011, 11(3): 203-206]

丹参素(danshensu)又名 D(+)-β-(3,4-二羟基苯基)-乳酸, 是从唇形科植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.) 的根中提取分离的一种酚性芳香酸类化合物, 是丹参的主要有效成分之一, 具有保护心肌、抗血栓、抗炎、抗肿瘤等多种药理活性<sup>[1]</sup>。近年来, 中药的药动学研究已经成为药学研究的一个热点, 目前已有多篇以丹参素作为指标成分的药动学研究, 不过这些文献中多采用 HPLC<sup>[2]</sup>、HPLC/MS/MS<sup>[3]</sup>、在线固相萃取-HPLC法<sup>[4]</sup>、在线固相萃

取-HPLC/MS/MS法<sup>[5]</sup>、胶束毛细管电泳法<sup>[6]</sup>和荧光光谱法<sup>[7]</sup>等方法, 上述方法中样品前处理较为复杂耗时, 分析时间较长或检测限较高, 不适于大量生物样品的分析。本研究在文献方法的基础上进行了优化, 建立了一种简便、快速的新型在线固相萃取-HPLC法测定犬血浆中丹参素的浓度。

### 1 仪器、试剂和动物

岛津超高效液相色谱仪: LG-20AD 型泵, SIL-20A 型自动进样器, CTQ-20AC 型柱温箱, SPD-20A 型紫外可见检测器, DGU-20A<sub>3</sub> 型脱气机, LV-306R 型自动高压切换阀及 LG-solution 色谱工作站(日本岛津公司)。XW-80A 型涡旋混合器(上海医科大学仪器厂), Thermo CR3i 冷冻离心机(美国热电公司)。HA-202M 电子天平(日本 A&D 公司)。

基金项目 国家“重大新药创制”科技重大专项 (No. 2009ZX09301-011)

作者简介 王 丽(女), 硕士生。

\* 通讯作者: 杭太俊, E-mail: hangtj@cpu.edu.cn; 范国荣, E-mail: guofan@yahoo.com.cn

丹参素对照品(含量 103%, 批号: 20081103-2-1)由第二军医大学药学院新药研究中心提供; 内标对羟基苯甲酸对照品(含量 99%, 批号: H0207)购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司。氯化钠注射液购自上海百特医疗用品有限公司, 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。比格尔犬 6 条, 雌雄各半, 犬龄 6~8 个月, 体重 9~10 kg, 由上海新冈实验动物场提供, 实验动物合格证号: SCXK(沪)2007-0009。

## 2 方法和结果

**2.1 色谱条件** 富集柱 Lichrospher C<sub>18</sub> 柱 (37 mm × 4.6 mm, 25 μm), 分析柱 Ultimate XB-C<sub>18</sub> 柱 (50 mm × 4.6 mm, 5 μm); 富集流动相: 乙腈-10 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5:95), 流速 2 ml/min; 分析流动相: 乙腈-10 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (11:89), 流速 0.8 ml/min; 切换时间 0.2 min, 切回时间 3.0 min, 分析时间 5 min; 检测波长 285 nm; 进样量 100 μl。

**2.2 溶液配制** (1) 丹参素标准溶液 精密称取丹参素对照品 10 mg, 置于 10 ml 棕色量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 制成浓度为 1 mg/ml 的丹参素对照品贮备液。以 40% 甲醇稀释该贮备液获得浓度依次为 0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00、20.00 μg/ml 的丹参素系列浓度标准溶液, 4℃ 冰箱中避光保存备用。(2) 内标工作溶液 精密称取对羟基苯甲酸对照品 10 mg, 置于 10 ml 棕色量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 制成浓度为 1 mg/ml 的内标贮备液。同样以 40% 甲醇稀释得 1 μg/ml 的内标工作溶液, 4℃ 冰箱中避光保存备用。

**2.3 在线固相萃取过程** 在线固相萃取系统示意图见图 1<sup>[8]</sup>。在线固相萃取过程主要是通过一个切换阀来实现的。当切换阀在 1 号位时, 样品先进入富集柱, 经富集流动相冲洗, 使血浆中的干扰分子和其他水溶性杂质被冲掉, 而被测物保留在柱子上。转动切换阀至 0 号位, 此时富集柱和分析柱成串联状态, 分析流动相把样品从富集柱上反冲进入分析柱, 进行分离测定。最后切回切换阀至 1 号位, 分析流动相继续对被测物进行分析, 富集流动相冲洗并平衡富集柱, 等待下次进样。

**2.4 血浆样品预处理** 取犬血浆样品 0.1 ml, 加入内标工作溶液 10 μl, 涡旋混匀, 加入 6% 高氯酸溶液 80 μl, 涡旋混合 3 min, 2.125 × 10<sup>4</sup> × g 离心 10 min, 取上清液 100 μl 进样分析。

**2.5 标准曲线与线性范围** 取比格尔犬空白血浆 90 μl, 共 7 份, 分别加入丹参素系列浓度标准溶液 10 μl, 制得相当于丹参素浓度分别为 20、50、100、

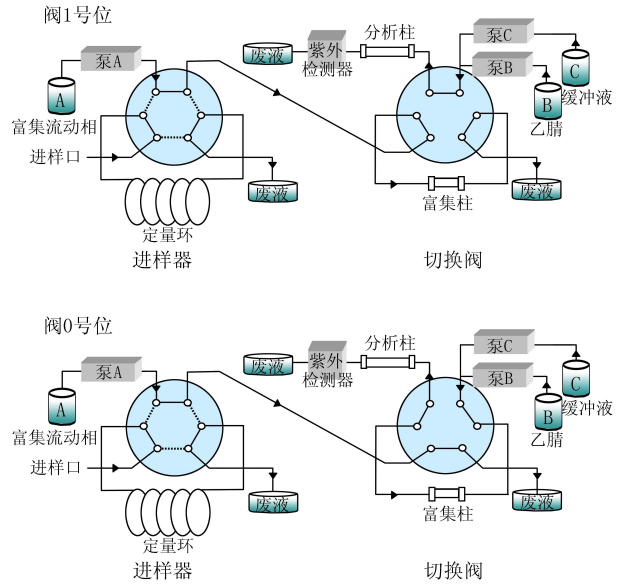


图 1 在线固相萃取系统示意图<sup>[8]</sup>

Figure 1 Schematic diagram of the on-line SPE system using a six-port switching valve (step 1, valve 1; step 2, valve 0; step 3, valve 1)

200、500、1 000、2 000 ng/ml 标准含药血浆样品。按 2.4 项下操作, 以丹参素浓度(*c*)为横坐标, 丹参素与内标峰面积比值(*Y*)为纵坐标, 用最小二乘法进行加权线性回归, 得回归方程为  $Y = 6.120 \times 10^{-3}c + 6.907 \times 10^{-3}$ ,  $r = 0.9996$  ( $n = 7$ )。在 20~2 000 ng/ml 浓度范围内血浆药物浓度与峰面积比值线性关系良好。定量下限为 20 ng/ml。

**2.6 方法专属性** 以 2.1 项下色谱条件测得空白血浆、空白血浆标准添加丹参素和对羟基苯甲酸及给药后血浆样品的色谱图见图 2。由图 2 可见, 丹参素和对羟基苯甲酸的保留时间分别约为 2.5、4.3 min, 内源性物质均不干扰丹参素和对羟基苯甲酸的色谱分离。

**2.7 精密度及相对回收率实验** 取空白血浆 15 份分为 3 组, 分别制备含 50、200 和 1 600 ng/ml 3 种浓度的含药血浆样品, 各 5 份。按 2.4 项下方法处理后 1 d 内连续进样, 计算得日内 RSD 分别为 5.82%、2.40%、2.45% ( $n = 5$ ); 连续测定 3 d, 计算得日间 RSD 分别为 6.35%、2.37%、6.06% ( $n = 3$ )。3 种浓度的丹参素含药血浆样品的相对回收率分别为 (100.07 ± 6.35)%、(106.86 ± 2.54)%、(105.90 ± 6.42)% ( $n = 15$ )。

**2.8 绝对回收率实验** 同上配制低、中、高浓度的含药血浆样品, 按 2.4 项下方法处理并测定, 测得的丹参素峰面积与等浓度丹参素溶液直接进样所得峰面积作比, 得 3 种浓度血浆样品的绝对回收率分别

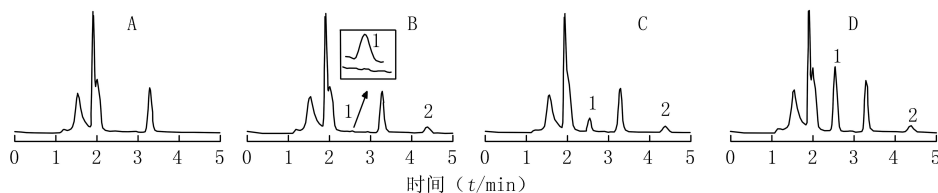


图 2 比格尔犬血浆中丹参素的 HPLC 谱图

Figure 2 HPLC photograms of danshenso in beagle dog plasma

A: 空白血浆; B: 空白血浆标准添加丹参素对照品溶液(20 ng/ml)和内标溶液; C: 空白血浆标准添加丹参素对照品溶液(200 ng/ml)和内标溶液; D: 实测血浆样品(1号犬静脉注射丹参素 10 mg/kg 后 1.5 h 的血浆样品); 1: 丹参素; 2: 内标对羟基苯甲酸

为 80.05%、80.21% 和 84.89% ( $n=5$ )。

2.9 稳定性实验 同上配制 50、1 600 ng/ml 的含药血浆样品,按 2.4 项下方法处理后分别进行稳定性实验。分别考察血浆样品在室温放置 2 h、进样器放置 10 h、冻融 3 次和  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻放置 20 d 的稳定性。结果见表 1。结果表明丹参素血浆样品在上述条件下稳定。

表 1 丹参素血浆样品稳定性考察结果

Table 1 Stability test results of danshenso in beagle dog plasma

浓度 ( $\rho_B/\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	平均初始比值	血浆样品 放置条件	平均峰面 积比值	平均偏差 (RE, %)
50	0.313	进样器放置 10 h	0.319	1.76
1 600	9.384	进样器放置 10 h	9.887	5.36
50	0.313	室温放置 2 h	0.317	1.30
1 600	9.384	室温放置 2 h	9.433	0.53
50	0.313	冻融 3 次	0.296	- 5.52
1 600	9.384	冻融 3 次	9.742	3.82
50	0.313	$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻放置 20 d	0.285	- 8.95
1 600	9.384	$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻放置 20 d	10.380	10.61

2.10 稀释效应实验 静脉给药时部分血浆样品中药物浓度较高,部分犬血浆样品需要稀释,因此要考察丹参素血浆样品的稀释效应。由于血浆样品直接稀释到相应浓度会引起较大的操作误差,本实验以 1/2、1/5 为基数对血浆样品做相应的稀释。配制血浆标准曲线样品和血浆质量控制样品,并配制稀释至 1/2、1/5、1/10、1/100 后的中浓度和高浓度血浆质量控制样品各 5 份,按 2.4 项下方法处理后分别进样,计算得血浆样品经过稀释后,其相对偏差值均  $< 6\%$ ,符合生物样品分析测定要求,说明高浓度血浆样品经稀释后测定结果不影响其实际血药浓度。

2.11 比格尔犬体内血药浓度测定 健康成年比格尔犬 6 只,雌雄各半,依次称重,按 10 mg/kg 的剂

量静脉注射丹参素氯化钠注射液,分别于给药前及给药后 0、2、5、10、20、40 min,以及 1、1.5、2、3、4、6、8、12 h 在比格尔犬一侧后肢静脉取血 2 ml,置肝素钠抗凝离心管中,离心( $4.555 \times 10^3 \times g$ ) 10 min,分取上层血浆, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  避光保存。取血浆样品,按 2.4 项下方法处理并测定,按标准曲线方程计算各时间点血浆药物浓度,结果见图 3。

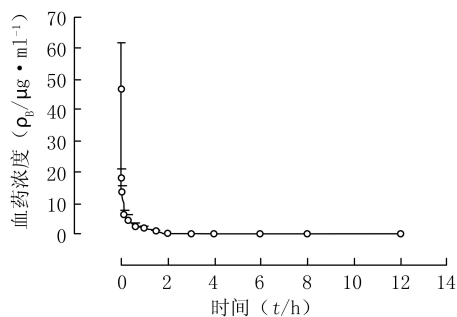


图 3 比格尔犬单剂量静注 10 mg/kg 丹参素后的药-时曲线

Figure 3 Mean drug plasma concentration-time curve of danshenso after single intravenous dose of 10 mg/kg in beagle dogs;  $n=6$

### 3 讨论

3.1 富集流动相的选择 富集流动相常以水溶性溶液为主,以除去部分蛋白质及其他内源性水溶性杂质并使被测组分保留在富集柱上。但由于犬血浆样品中干扰物质较多,故在富集流动相中加入低比例乙腈,更有利于除去血浆中的干扰物质。

3.2 预处理方法的选择 在线固相萃取技术允许血浆样品直接进样,但血浆样品内大量蛋白质及内源性杂质会使柱子阻塞、柱压升高,影响柱子的柱效并减少柱子的使用寿命。因此在实际操作过程中,通常用沉淀法除去血浆样品中的部分蛋白质后再进样分析,既提高分离效果,又延长柱子使用寿命。

3.3 切换时间和切回时间的选择 在线固相萃取

时切换时间较短,富集流动相的流速较大,以有利于在短时间内冲掉大部分蛋白质并使被测物保留在富集柱上。选择合适的切回时间,有利于被测物完全转移至分析柱并有充足的时间平衡富集柱。因此选择 0.2 min 作为切换时间,3.0 min 作为切回时间,整个分析时间 5 min。

3.4 富集柱的选择 富集柱的长度应适宜,防止高流速时两根柱子串联造成极高的柱压;富集柱填料的粒径应适宜,既利于冲掉大分子蛋白质,又利于保留被测物。因此选择了自制 Lichrospher C<sub>18</sub> 柱 (37 mm × 4.6 mm, 25 μm) 作为富集柱。

本研究采用在线固相萃取-HPLC 法测定比格犬血浆样品中丹参素的浓度,使样品的纯化、富集与分析同步进行,操作简单,提取效率高,分析时间短,适于大量生物样品的分析。

【参考文献】

[1] 李艳杰,孙玉华.丹参素药理作用研究进展[J].延边大学学报,2006,29(1):73-74.  
Li YanJie, Sun YuHua. Advances in research on pharmacological effects of danshensu[J]. J Med Sci Yanbian Univ, 2006, 29(1): 73-74. Chinese.

[2] Li XiaoLi, Li XiaoRong, Wang LiJuan, et al. Simultaneous determination of danshensu, ferulic acid, cryptotanshinone and tanshinone II A in rabbit plasma by HPLC and their pharmacokinetic application in danxiongfang[J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 44(5): 1106-1112.

[3] Liu Yun, Li XiaoRong, Li YuHang, et al. Simultaneous determination of danshensu, rosmarinic acid, cryptotanshinone, tanshinone II A, tanshinone I and dihydrotanshinone I by liquid chromatographic mass spectrometry and the application to pharmacokinetics in rats[J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 53(3): 698-704.

[4] 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):490-492.  
Zhao XinFeng, Zhu ZhongMin, Liu AiFang, et al. Qualitative and quantitative analysis of Compound Danshen Dripping Pills by CS-HPLC[J]. Chin Tradit Pat Med, 2004, 26(6): 490-492. Chinese with abstract in English.

[5] Pei WeiJing, Zhao XinFeng, Zhu ZhongMin, et al. Study of the determination and pharmacokinetics of compound Danshen dripping pills in human serum by column switching liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004, 809(2): 237-242.

[6] 杨燕,杨荣,卫引茂,等.胶束毛细管电泳法测定家兔体内的丹参素及药代动力学和组织分布[J].药物分析杂志,2008,28(3):362-366.  
Yang Yan, Yang Rong, Wei YinMao, et al. MEKC determination of pharmacokinetic and tissue distribution study of Danshensu in rabbits[J]. Chin J Pharm Anal, 2008, 28(3): 362-366. Chinese with abstract in English.

[7] 何怀冰,王蓓,陈运,等.荧光光谱法测定家兔中丹参素血浓度及其药物动力学参数[J].上海第一医学院学报,1983,10(4):295-300.  
He HuaiBing, Wang Bei, Chen Yun, et al. Spectrofluorometric determination of rabbit plasma level and pharmacokinetic parameters of "Dan-shen-su" [J]. Acta Acad Med Primae Shanghai, 1983, 10(4): 295-300. Chinese with abstract in English.

[8] Xie Rui, Wen Jun, Wei Hua, et al. High-throughput determination of faropenem in human plasma and urine by on-line solid-phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography with UV detection and its application to the pharmacokinetic study[J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 52(1): 114-121.

[收稿日期] 2011-04-08 [修回日期] 2011-05-17  
[本文编辑] 阳凌燕

## 第二军医大学长海医院病理科开展分子靶点荧光原位杂交(FISH)检测技术,为肿瘤靶向治疗提供依据

随着肿瘤细胞信号传导途径研究的不断深入,目前,肿瘤靶向治疗已成为肿瘤治疗中最有前景的方案。临床医师在选择靶向药物治疗肿瘤之前,必须了解病人的肿瘤中是否存在相应的靶点,而病理科可以帮助肿瘤病人正确检测肿瘤的分子靶点。据悉,肿瘤分子靶点的主要检测方法有免疫组织化学方法(IHC)、荧光原位杂交(FISH)、显色原位杂交(CISH)和DNA测序技术等。FISH技术是一种通过荧光标记的DNA探针与细胞核内的DNA靶序列杂交,在荧光显微镜下能原位显示细胞核内杂交信号的分子细胞遗传学技术。FISH技术检测基因扩增的准确性比其他检测技术高,可以避免由于染色体的多体而呈现的假阳性,被誉为“金标准”。但FISH技术操作较为复杂,试剂和仪器设备昂贵,目前国内只有少数病理科具有相应技术条件进行该技术的检测。

第二军医大学长海医院病理科紧跟分子靶向治疗的发展前沿,积极开展肿瘤分子靶点检测工作,形成了以FISH检测为主,其他检测方法为辅的特色。到目前为止,病理科已经完成了两千余例各种肿瘤的分子靶点检测工作,结果准确、可靠,为临床科室开展肿瘤靶向治疗提供了科学依据。