

应用 LC-MS/MS 技术检测血浆样品中丹参酚酸类成分的浓度

路 通, 陈 平, 杜飞飞, 李 川

(中国科学院上海药物研究所药物代谢研究中心, 上海 201203)

LC-MS/MS-Based Measurement of Danshen Phenolic Acids in Plasma

LU Tong, CHEN Ping, DU Fei-fei, LI Chuan

(Research Center for Drug Metabolism, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences,
Shanghai 201203, China)

Abstract: A sensitive and specific LC-MS/MS-based methods for measurement of plasma TSN, SAA, SAB, and SAD was developed to support the pharmacokinetic evaluation of Cardiotonic pills. The negative ion ESI gave a high ionization efficiency for the analytes. The precursor-to-product ion pairs m/z 197→135, 137→108, 493→295, 717→519, and 417→197 were used for sensitive and specific SRM of TSN, PCA, SAA, SAB, and SAD, respectively. For the best measurement of the analytes, two methods were developed, i.e., one for determination of plasma TSN and the other one for simultaneous determination of plasma PCA, SAA, SAB, and SAD. The sample preparation both involved acidifying the plasma sample with HCl following EtOAc-based liquid-liquid extraction. Matrix-matched standard curves are 2.74 - 2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for TSN, 1.37 or 4.12-1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for PCA, SAA, SAB, and SAD, with correlation coefficients > 0.99. The inter- and intra-day accuracy and precision are 90%-112% and 2.5%-15%, respectively. Further, the applicability of the analytical methods is demonstrated in a pilot plasma pharmacokinetics study in a beagle dog receiving an intravenous dose of injectable extract from Cardiotonic pills.

Key words: tanshinol; protocatechualdehyde; salvianolic acids; LC-MS/MS

中图分类号: O657.63

文献标识码: A

文章编号: 1004-2997 (2007) 增刊-85-03

复方丹参滴丸为《中华人民共和国药典》所收载, 由丹参、三七和冰片组成, 主要用于治疗冠心病、心绞痛^[1], 被国家列入临床急救必备的药物之一。目前已知的丹参中与上述疗效相关的活性成分主要是水溶性酚酸类成分, 包括丹参素 (TSN)、原儿茶醛 (PCA)、丹酚酸 A (SAA)、丹酚酸 B (SAB) 和丹酚酸 D (SAD)^[2]。

为了进一步了解这些活性成分对复方丹参滴丸疗效的贡献, 需要了解其体内的暴露水平。本工作应用液质联用技术建立了能灵敏可靠地定量分析血浆样品中 5 种酚酸类成分的方法。

1 实验部分

1.1 药物及试剂

将复方丹参滴丸的中间产物浸膏用生理盐水制成“复方丹参注射液”。分析用 TSN、PCA 均购自中国药品生物制品检定所; SAA、SAB、SAD 由上海药物研究所植化室提供。

甲醇、乙酸乙酯和甲酸: 美国 Sigma-aldrich 公司的 HPLC 纯试剂; 盐酸 (分析纯): 购于上海化学试剂公司; 分析用超纯水: 由美国 Millipore Direct-Q₃ 超纯水机制备而成。

1.2 分析仪器及实验条件

LC-MS/MS系统由Waters公司ACQUITY UPLC液相系统以及Thermo Finnigan公司TSQ_{quantum}三级四极杆质谱检测器组成, 由Empower软件和Xcalibur软件共同控制。

TSN的色谱条件: Synergi Fusion-RP C₁₈柱 (50×2.0 mm i.d, 4.0 μm, Phenomenex), 15% MeOH (含0.02%的HCOOH)梯度洗脱, 分析时间为3.0 min。PCA、SAA、SAB及SAD的色谱条件: Acquity UPLC BEH C₁₈柱 (50×2.1 mm i.d, 1.7 μm, Waters), 50%MeOH (含0.75% HCOOH) 流速梯度洗脱, 分析时间为4.0 min。质谱采用ESI离子源, 负离子SRM检测模式, m/z TSN 197→135、PCA 137→108、SAA 493→295、SAB 717→519、SAD 417→197。

1.3 样品处理及动物实验

血浆样品采用HCl酸化后EtOAc提取处理。雄性Beagle犬1只, 前肢静脉注射“复方丹参注射液”(0.44 mL·kg⁻¹, 含0.64 mgTSN, 0.33 mgPCA, 0.14 mgSAA, 0.19 mgSAB和0.16 mgSAD)。于给药前及给药后5、10、15、20、30 min、1、2、4、6和8 h前肢静脉取血。

2 结果与讨论

2.1 分析方法的建立

在正离子模式下, 丹参酚酸化合物的离子化效率很低; 在 APCI 负离子模式下, 信号强度明显低于 ESI 负离子模式, 示于图 1。ESI 负离子模式下, 流动相中含 0.75% HCOOH 时, 除 TSN 的基峰是[M+HCOO]⁻外, 其他 4 个化合物均以[M-H]⁻为基峰; 在 0.05% HCOOH 时, TSN 的基峰是[M-H]⁻。通过比较不同离子对空白犬血浆样品时的噪音水平, 最终确定用于定量分析的最佳离子对为 m/z TSN 197→135、PCA 137→108、SAA 493→295、SAB 717→519、SAD 417→197, 被测化合物的二级全扫描质谱图示于图 2。

2.2 方法学认证

所建方法具有较高的特异性和灵敏度。TSN 的线性范围为 2.74~2 000 μg·L⁻¹; PCA 与 SAA、SAB 和 SAD 的线性范围为 1.37 或 4.12~1 000 μg·L⁻¹。日间及日内准确性为 90%~112%, 精密度为 2.5%~15%。提取回收率为 50%~60% (TSN, SAA, SAB, SAD) 和 30%~40% (PCA)。

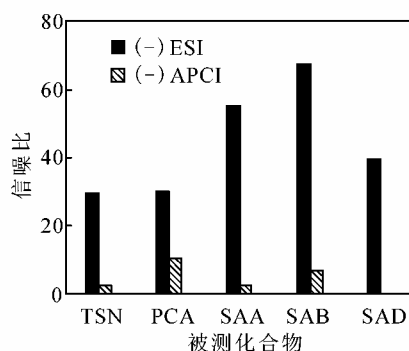


图 1 TSN、PCA、SAA、SAB 及 SAD 在 ESI 和 APCI 离子源负离子扫描模式下的离子化效率比较
(选择最强的离子进行比较)

2.3 应用

Beagle 犬静脉单剂量注射复方丹参注射液后, 血中 5 种丹参酚酸的药-时曲线示于图 3。TSN、PCA、SAA、SAB 及 SAD 消除半衰期分别为 0.39、1.00、2.06、0.25 及 0.38 h; 平均滞留时间分别为 0.75、1.38、1.86、0.21 及 0.27 h。

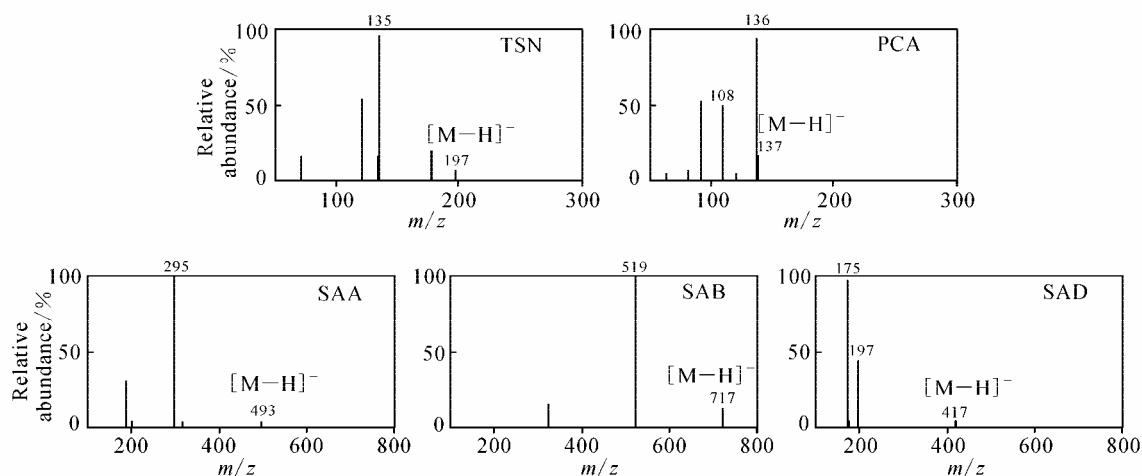


图 2 TSN、PCA、SAA、SAB 及 SAD 的二级质谱图

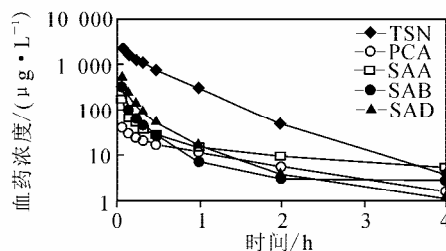


图 3 Beagle 犬静脉注射复方丹参后 TSN、PCA、SAA、SAB 及 SAD 的血药浓度-时间曲线

参考文献:

- [1] WANG G, WANG L, XIONG Z Y, et al. Med Sci Monitor, 2006,12: Sr1-Sr7.
- [2] JIANG R W, LAU K M, HON P M, et al. Curr Med Chem, 2005,12: 237-246.

.....

欢迎订阅 欢迎投稿 承接广告

《岩矿测试》

《岩矿测试》杂志是中国地质学会岩矿测试专业委员会和国家地质实验测试中心共同主办的分析测试技术科技期刊。《岩矿测试》的宗旨是突出服务于地球科学和地质找矿事业以及促进岩矿测试技术的发展;根据国家地质工作的重点由单一资源向资源环境并重的转变,《岩矿测试》的内容有所拓宽,主要报道国内与分析科学、资源环境、地球科学相关的新技术、新方法、新理论和新设备等研究成果、动态、评述及相关实践经验。适合于地质、冶金、环保、石油、化工、煤炭等部门从事分析测试的科技工作者及大专院校分析化学、环境资源、地球科学等相关专业的师生阅读。

《岩矿测试》为双月刊,大 16 开版本,80 页/期,逢双月出版;国内邮发代号 2-313;国际书店发行代号 BM4089;广告经营许可证:京西工商广字第 0227 号;定价 10.00 元/本,全年 60.00 元。漏订的读者可直接与编辑部联系。

《岩矿测试》编辑部地址:北京阜外百万庄大街 26 号 国家地质实验测试中心;邮政编码:100037

电话: 010-68999562; 传真: 010-68999563; E-mail: ykcs_zazhi@sina.com, ykcs_zazhi@163.com。