维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)03-0398-03

高效液相色谱-荧光法检测丹参酮ⅡA血药浓度探讨

杨洁芳[1],徐梦雪[2],陈 邕[3]

(1. 重庆市第九人民医院药剂科,重庆 400700;2. 重庆医科大学儿科学院药剂科,重庆 400014;
3. 重庆医科大学附属第一医院药剂科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨采用高效液相色谱-荧光法检测血浆中的丹参酮ⅡA浓度的可行性。方法:采用高效液相色谱-荧光法检测10名受试者血浆中的丹参酮ⅡA浓度。结果:口服丹参酮ⅡA后吸收较为迅速,消除较快,血药浓度个体差异较大。结论:高效液相色谱-荧光法检测具有灵敏度高,杂峰干扰少的优点,为研究健康人体药代动力学试验提供测定方法。

【关键词】高效液相色谱-荧光法;丹参酮ⅡA

【中国图书分类法分类号】R94 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-03-01

Exploration method for detection of tanshinone ⅡA serum level by HPlC chromatograms

YANG Jiefang, et al

(*Department of Pharmacy, The nineth People' s Hospital , Chongqing*)

【Abstract】*Objective*: To explore the possibility for detecting tanshinone ⅡA serum level by HPlC chromatograms. *Methods*: To detect tanshinone ⅡA serum level in 10 healthy subjects by HPLC chromatograms. *Results*: After take tanshinone ⅡA, they were absorbed quickly and removed rapidly, had significant difference of blood drug level in different subjects. *Conclusion*: The method is demonstrated to be high sensitive with less disturbance which will provide a new way to perform pharmacokinetic experiment.

【Key words】HPLC chromatograms; Tanshinone ⅡA

丹参酮ⅡA作为应用较为广泛的中药制药原料中间体,具有扩展血管、降低血压、抗血栓、抗菌消炎的功效,对治疗冠心病、心绞痛、心律过速、痤疮等病症具有显著的疗效。据文献报道[1]对于丹参酮ⅡA的测定主要有HPLC-UV法、毛细管电泳法(CE)和HPLC-荧光法,目前,国内尚无用高效液相色谱法测定人体血浆丹参酮ⅡA浓度的报道。本试验采用高效液相色谱-荧光法检测血浆中的丹参酮ⅡA浓度,灵敏度高,杂峰干扰少,用于研究健康受试者口服丹参酮ⅡA片剂后体内的血药浓度,为研究健康人体药代动力学试验提供测定方法。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

丹参酮ⅡA片剂,内标丹参酸甲酯(由吉林通化巴里莫尔制药有限公司提供,含量99.8%),丹参酮ⅡA对照品(由上海第一生化制药有限公司提供,批号:010600160,含量99.5%)。乙腈、甲醇为色谱纯,三乙胺、磷酸为分析纯,水为重蒸馏水。

1.2 仪器与色谱条件

仪器:Shimadazu-10A高效液相色谱系统(荧光检测器,自动进样器、柱温箱,ClassVP液相工作站);

色谱条件:固定相:Inersil C_{18}色谱柱,(150mm×4.6mm,5μm);流动相为0.25%三乙胺水溶液-乙腈=40∶60(v/v),20%磷酸调节pH为5.0;荧光检测波长Ex为295nm,Em为390nm;流速1.0ml/min,柱温、自动进样器温度均为25℃,进样量40μl测定。

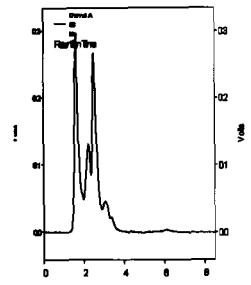
在选定的色谱条件下,测得的色谱图见图1,丹参酮ⅡA与内标物的保留时间分别为:6.3 min和4.5min,两者峰形良好,分离完全,无杂质峰干扰。

1.3 溶液配置

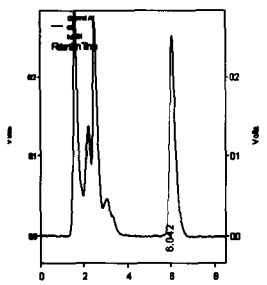
精密称取丹参酮ⅡA对照品适量,置于50ml量瓶中,用甲醇溶解并用甲醇稀释定容至刻度,成640.0μg/ml;取出1ml置于100ml容量瓶中,用蒸馏水稀释定容至刻度,成6400.0 ng/ml对照品贮备液。

作者介绍:杨洁芳(1964-),女,主管药师,
主要研究方向:临床医学。

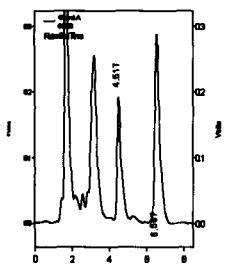
维普资讯 http://www.cqvip.com



A



B



C

A 空白血浆（blank plasma）；B 丹参酮ⅡA 加空白血浆（tanshinoneⅡA in blank plasma）；C 健康受试者服药 2h 后血浆加内标（plasma，2h after an oral dose）

1 内标（internal standard） 2 丹参酮ⅡA（tanshinoneⅡA）

图 1 人血浆中丹参酮ⅡAHPLC 图

精密称取丹参酸甲酯适量，置于 100ml 量瓶中，用甲醇溶解并稀释定容至刻度，为 200μg/ml；精密量取 1.0ml，置 50ml 量瓶中，用蒸馏水定容成 4.0μg/ml 内标溶液备用。

1.4 血浆预处理

精密取血浆 200μl 置于 1.5ml 离心管中，精密加入内标液 100μl，蛋白沉淀剂乙腈 600μl，涡旋振荡混匀 10s，10000r/min 离心 10min，取上清液进样 40μl 测定。

2 方法学评价

2.1 标准曲线的制备

精密取 6400.0 ng/ml 丹参酮ⅡA 标准贮备液适量，用空白血浆依次稀释成 3200.0、1600.0、800.0、400.0、200.0、100.0、50.0、25.0、12.5、6.25 ng/ml 系列浓度，按上述血浆处理方法处理后进样分析，以丹参酮ⅡA 峰面积与内标峰面积的比值对浓度进行线性回归，得血浆中丹参酮ⅡA 标准曲线的回归方程（n=5）：

$As/Ai=0.0056\ C+2.57\times10^{-5}$（r=0.9998）

线性检测范围：6.25～3200ng/ml，最低检测浓度为 1.25 ng/ml（S/N>3）。

2.2 回收率及精密度试验

在空白血浆中精密加入丹参酮ⅡA 标准贮备液适量，使成 6.25,200.0, 1600.0 ng/ml 3 个浓度的样品，按上述血浆处理方法处理后进样，由标准曲线求出各样品的浓度，各点浓度测定 5 次，将求得的浓度与已知加入浓度相比，计算样品的相对回收率。连续测定 5 天（n=5），计算日内、日间精密度。

另用乙腈配制相应系列浓度的丹参酮ⅡA 标准溶液，不经沉淀直接测定，以此为标准，将两组峰面积相比，计算丹参酮ⅡA 的绝对回收率。结果见表 1。

2.3 稳定性试验

在空白血浆中精密加入丹参酮ⅡA 贮备液适量，使成 6.25，200.0，1600.0 ng/ml 3 个浓度的样品，按上述血浆处理方法处理进样，并于 -76℃冰箱放置 0h，24h，48h，72h，96h 后取出放至室温测定，RSD 为 0.73%～6.1%。

在空白血浆精密加入丹参酮ⅡA 贮备液适量，使成 6.25，200.0，1600.0 ng/ml 3 个浓度的样品，按上述血浆处理方法处理后置于自动进样器中，于自处理后的 0h，2，4h，8h，12h 进样，测定，RSD 为 0.99%～2.3%。

表 1 丹参酮ⅡA 血浆回收率及精密度测定结果（n=5）

加入量（added）ng/ml	相对回收率(relative recovery) /($\bar{x}\pm s$)%	绝对回收率(absolute recovery)/($\bar{x}\pm s$)%	精密度（precision），RSD/%	
			日内（within-day）	日间（between-day）
6.25	102.3 ± 6.0	105.3 ± 4.6	5.9	6.2
200.0	100.8 ± 2.0	96.67 ± 0.3	2.0	4.6
1600.0	99.7 ± 2.2	97.51 ± 2.8	2.2	1.1

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.4 方法应用

10 名男性健康受试者禁食 12h 后，清晨空腹，单次口服丹参酮ⅡA 片剂 1 片（80mg），用温开水 250ml 吞服，于给药后 0.25、0.50、0.75、1.0、1.5、3.0、5.0、8.0、12.0、24.0、36.0、48.0 、60.0h，各取上肢静脉血约 3ml，将血浆收集于肝素抗凝的试管中，3000r/min 离心 10min，分离出血浆，进行血浆预处理或 -80℃冷冻保存至测定。用本法测定服药后血浆中丹参酮ⅡA 浓度，10 名健康受试者口服 80mg 后的平均血药浓度 - 时间曲线见图 2。

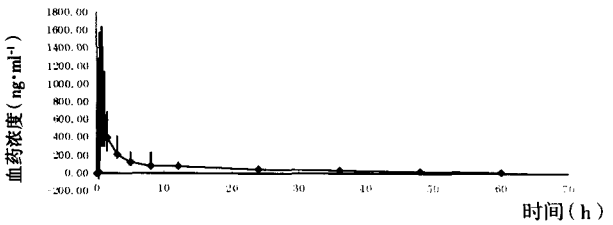


图 2 10 名健康受试者口服 80mg 丹参酮ⅡA 片剂后血药浓度均值-时间曲线

10 名中国健康志愿者单剂量口服丹参酮ⅡA 片剂 80mg 的血药浓度经时变化趋势基本相似，图 2 表明服药后吸收较为迅速，分布相短暂，消除较快，血药浓度个体差异较大。

3 讨 论

本试验采用离子抑制色谱法测定血浆中丹参酮ⅡA 的浓度，通过对乙腈和水不同配比进行筛选，并对不同的 pH 条件（pH=3.0，5.0，7.0，9.0）进行了试验，结果发现 pH 越偏酸性，系统的灵敏度越高，但峰的保留时间相应延后。另外，如果单纯用乙腈和水作流动相，峰形会比较差，所以在流动相中加入少量三乙胺减弱峰的拖尾现象。最终兼顾灵敏度、保留时间及峰形等因素，确定流动相为 0.25%三乙胺水溶液 - 乙腈 = 40 ∶ 60 （v/v），20%磷酸调节 pH 为 5.0 色谱条件。

综合考虑内标物结构、性质、吸收曲线等因素选择内标。丹参酸甲酯与丹参酮ⅡA 具有相同的母核结构，与丹参酮ⅡA 色谱行为相近，性质稳定，两者分离度良好且能够与杂质峰基线分离，系统理论板数较高，故采用丹参酸甲酯为内标[2,3]。

经荧光扫描显示丹参酮ⅡA 流动相中的最佳激发波长为 295nm，发射波长为 390nm，且内标在此波长下检测亦有良好荧光效率，杂质干扰少，因此选择在此波长下检测。

文献报道中[4,5]，丹参酮ⅡA 血浆预处理方法采用液 - 液萃取，方法繁琐，我们在试验过程中摸索了采用高氯酸、乙腈作为沉淀剂。经高氯酸处理后丹参酮ⅡA 绝对回收率很低，可能是由于其被酸分解；而乙腈作为沉淀剂不仅与流动相中的有机相一致，而且沉淀蛋白效果最佳，进样后峰形良好。文献报道[6]，采用 1:3 的比例可以沉淀 99.8%的蛋白，综合考虑沉淀蛋白效果和检测限的要求，我们采用了此比例进行蛋白沉淀。

本试验通过优化流动相、乙腈沉淀法，并选择合适内标，对已报道的 HPlC 方法进行了改进[7]，并选择荧光检测法，提高了检测的灵敏度和准确性，同时也减少了杂峰的干扰。

参 考 文 献

[1] 郑占虎，董泽宏，佘 靖.中药现代研究与应用[M].学苑出版社，1998;415-3202.

[2] 吴俊芳，王 洁，张均田. 总丹酚酸对小鼠和大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中草药，2001；32(3):227-229.

[3] 武玉鹏，贾力丽，杨艳华，等. 复方丹参片对实验性脑缺血的保护作用[J]. 山西职工医学院学报，2000；10(2):3-4.

[4] 陈向荣，陆京伯，石汉平. 丹参的药理作用研究新进展[J]. 中国医院药学杂志，2001；21(1):44-45.

[5] 丁章森.丹参的临床药理研究概况[J].湖北中医学院学报，2000；2(4):56-57.

[6] 陈 奇. 中药药理研究方法学 [M]. 人民卫生出版社，1993；540-543.

[7] 陈 邕.HPLC 测定朱砂莲胶囊中马兜铃酸 A 的含量[J]. 重庆医科大学学报，2003；28(1): 84-86.

《检验医学与临床》杂志征稿、征订启事

《检验医学与临床》杂志前身是 2000 年由卫生部批准举办的《中国检验医学与临床》。本杂志现为双月刊，公开发行，刊号为 ISSN 1672-9455/CN50-1167/R，邮发代号 78-157；办刊宗旨：面向基层，侧重临床，以刊登临床各科（包括教学、管理）论文为主，与检验医学并重。本刊是中国核心期刊（遴选）数据库、中文科技期刊数据库、中国学术期刊（光盘版）、中文生物医学期刊文献数据库（CMCC）收录期刊。预计从今年 7 月起将改为月刊，刊载量增大，用稿周期缩短，用稿率可达 80%左右。欢迎投稿和订阅。

编辑部地址：重庆市渝中区长江一路 30 号广璐大厦 5 楼 邮编：400014

联系电话：（023）63613484 E-mail：cqwsxx@163.com