

· 药物代谢 ·

## 豆腐果苷与天麻素家兔体内相互作用研究

王茜, 廖昌军\*, 臧志和, 田茜, 唐漫  
(成都医学院药学院, 成都 610083)

**[摘要]** **目的:**建立 LC-MS 同时测定豆腐果苷与天麻素血浆药物浓度的方法,并探讨豆腐果苷与天麻素在家兔体内是否存在相互作用。**方法:**安捷伦 C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 1.7 μm),流动相甲醇-水(0.1% 甲酸)梯度洗脱,三重串联四级杆质谱电喷雾(ESI)离子源,多反应监测(MRM)方式进行检测,离子化方式为负离子模式。18 只家兔分 3 组进行单剂量 ig 100 mg·kg<sup>-1</sup> 天麻素和豆腐果苷,采用 LC-MS 测定得到血药浓度数据,利用药动学软件 DAS 3.0 计算其在家兔体内动力学参数,比较两者单独灌胃和同时灌胃后药动学参数。**结果:**豆腐果苷在 0.125 ~ 1.00 mg·L<sup>-1</sup>,天麻素在 0.25 ~ 1.50 mg·L<sup>-1</sup> 质量浓度与峰面积比值呈良好的线性关系。数据经药动学软件 DAS 3.0 处理后,单独灌胃组与同时灌胃组相比较,豆腐果苷和天麻素 C<sub>max</sub> 与 AUC<sub>0→∞</sub> 均有明显增加。**结论:**采用 LC-MS 同时测定血浆中豆腐果苷与天麻素具有快速、灵敏和专属性强的特点;豆腐果苷与天麻素在家兔体内存在相互作用。

**[关键词]** 豆腐果苷; 天麻素; 液质联用; 药代动力学; 相互作用

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0120-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140120

## Interaction of Helicid and Gastrodin in Rabbits

WANG Qian, LIAO Chang-jun\*, ZANG Zhi-he, TIAN Qian, TANG Man  
(School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the method of LC-MS for evaluating helicid and gastrodin plasma drug concentration, and investigate whether there was a interaction between helicid and gastrodin in rabbits. **Method:** Agilent C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 150 mm, 1.7 μm), mobile phase of methanol-water (0.1% formic acid) gradient elution, triple quadrupole mass spectrometry electrospray ionization (ESI) ion source, multiple reaction monitoring (MRM) mode were used, ionization mode was the negative mode. 18 rabbits were divided into 3 groups, LC-MS method was used to measure the blood drug concentration data, the pharmacokinetic software DAS 3.0 was used calculate kinetic parameters in rabbits, and compare their plasma drug concentration in a single and a simultaneous administration. **Result:** LC-MS method had the characteristics of rapid, sensitive, and strong specificity, helicid was within the concentration range of 0.125-1.00 mg·L<sup>-1</sup>, gastrodin was in the concentration range of 0.25-1.50 mg·L<sup>-1</sup>, the ratio of concentration and peak area had a good linear relationship. C<sub>max</sub> and AUC<sub>0→∞</sub> of helicid and gastrodin are both increased. **Conclusion:** LC-MC method had the characteristics of rapid, sensitive, and strong specificity. Helicid with gastrodin have interactions in rabbits.

**[Key words]** helicid; gastrodin; LC-MS; pharmacokinetic; interaction

豆腐果苷(helicid)是从山龙眼科植物萝卜树的果实中提取的有效成分,经药理和临床研究证明,具

**[收稿日期]** 20131023(016)

**[基金项目]** 成都医学院药学重点学科建设项目(CYXK2012006)

**[第一作者]** 王茜,助理实验师,从事药物代谢研究,Tel:028-62308661,E-mail:86742867@qq.com

**[通讯作者]** \*廖昌军,硕士,实验师,从事实验室管理和药物代谢研究,028-62308660,E-mail:lcj@cme.edu.cn

有止痛、安眠和镇静作用,对神经衰弱、神经衰弱综合征和血管性头痛疗效肯定<sup>[1-3]</sup>。天麻素(gastrodin)为兰科植物天麻的干燥块茎,药理研究表明,天麻素具有镇静,抗惊厥,镇痛作用、可降压、还有抗心肌缺血、改善心脏功能和组织氧化、抑制血小板聚集、抗炎和抗心律失常等作用<sup>[4-6]</sup>。由此可见,豆腐果苷和天麻素具有相似的药理药效。在国内外研究中关于豆腐果苷与天麻素分别在体内的LC-MS测定方法和药代动力学研究有相关报道<sup>[7-8]</sup>,但LC-MS同时测定血浆中豆腐果苷与天麻素含量和两者在体内是否存在相互作用的研究,国内外尚未见文献报道。本文建立了LC-MS同时测定家兔血浆中豆腐果苷与天麻素含量的方法,估算了豆腐果苷与天麻素单独灌胃和同时灌胃家兔体内的药动学参数,证明了两剂同时灌胃时存在相互作用,为豆腐果苷与天麻素药理药效协同作用研究和临床用药提供了依据。

## 1 材料

**1.1 仪器** CP225D型电子天平(德国赛多利斯公司),XW-80A型旋涡混合器(上海青浦沪西仪器厂),TGL-16G型离心机(上海安亭科学仪器),MTN-2800D氮吹仪(天津奥特塞恩斯仪器有限公司),液质联用仪(安捷伦1260液相,安捷伦6410B三重串联四级杆质谱,MassHunter工作站B.03.00版本)。

**1.2 试剂** 天麻素对照品(批号110807-200205,纯度99.6%),豆腐果苷对照品(批号110008-200810,纯度99.6%),内标物阿魏酸(批号110773-201012,纯度99.6%),天麻素和豆腐果苷为原料药;甲醇、甲酸为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为实验室超纯水。

**1.3 动物** 雄性家兔18只,SPF级。由四川省中医药科学院实验动物中心提供,许可证号SCXK(川)2008-19。

## 2 方法与结果

### 2.1 家兔体内血药浓度LC-MS测定方法的建立

**2.1.1 色谱条件** 安捷伦C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 50 mm, 1.7 μm);流动相A为甲醇,B为水(0.1%甲酸),梯度洗脱(程序见表1);流速0.4 mL·min<sup>-1</sup>;柱温40℃;进样量2 μL。

**2.1.2 质谱条件** 安捷伦三重串联四级杆质谱,干燥气为氮气,干燥气温度为350℃,干燥气流速为11 L·min<sup>-1</sup>,电喷雾离子源(ESI),毛细管电压4 kV,雾化气压力0.276 MPa,裂解电压105 V,离子化方式为负模式。碎裂电压105 V(天麻素),105 V(豆

表1 梯度洗脱程序

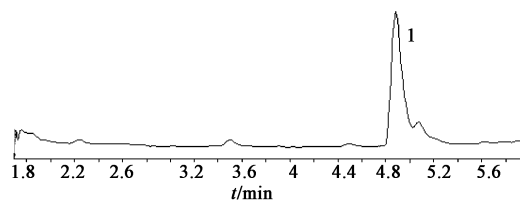
时间/min	流动相 A-流动相 B
0	20:80
0~4	80:20
4~5	100:0
5~8	20:80

腐果苷),115 V(阿魏酸)。碰撞能量15 V(天麻素),10 V(豆腐果苷),15 V(阿魏酸),碰撞池加速电压3 V,检测方式为多反应监测(MRM)方法,用于定量分析的离子反应分别为  $m/z$  329.1 →  $m/z$  329.1(豆腐果苷,  $[M + COOH]^-$ ),  $m/z$  331.1 →  $m/z$  331.1(天麻素,  $[M + COOH]^-$ ),  $m/z$  193.1 →  $m/z$  193.1(阿魏酸,  $[M-H]^-$ )。

**2.1.3 溶液配制** 精密称取天麻素对照品、豆腐果苷对照品以及阿魏酸各25 mg,流动相B定容到50 mL,再分别取0.2 mL定容到10 mL量瓶中,分别得到质量浓度为10 mg·L<sup>-1</sup>的对照品和内标贮备液。

**2.1.4 血浆样品处理方法** 取家兔血浆0.5 mL,加入0.5 mL内标物阿魏酸(10 mg·L<sup>-1</sup>),加甲醇4 mL,涡旋振荡10 min,16 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min。取上清液,氮吹仪挥干,0.4 mL流动相互溶,16 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min后取上清液待测。

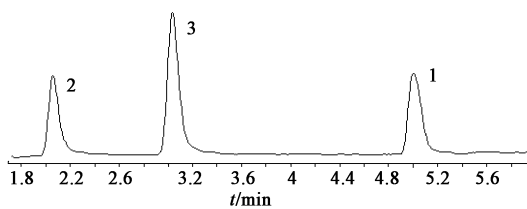
**2.1.5 方法专属性考察** 分别取空白血浆加内标对照液和灌胃后的血浆样品按照2.1.1、2.1.2和2.1.4项条件,分别进样2 μL,结果天麻素的保留时间约为2.0 min,豆腐果苷的保留时间约为3.0 min,内标物阿魏酸的保留时间约为4.9 min。血浆内源性成分不干扰样品的测定,见图1~4。



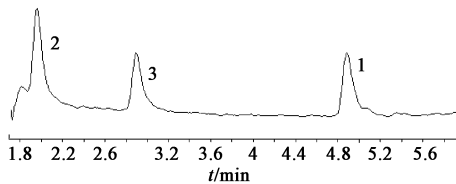
1. 阿魏酸

图1 空白血浆+内标色谱

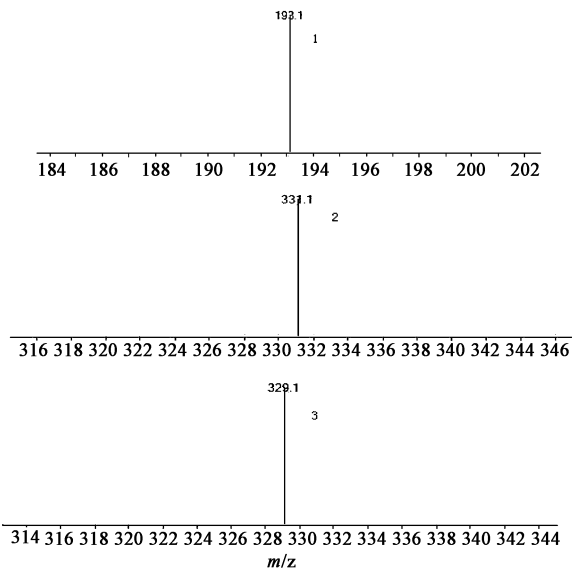
**2.1.6 基质效应** 精密量取豆腐果苷和天麻素对照品贮备液适量,用流动相B稀释成质量浓度分别为0.10,0.20,0.80 mg·L<sup>-1</sup>和0.20,0.40,1.20 mg·L<sup>-1</sup>的对照溶液。空白血浆样品按照2.1.4项下方法处理,取上清液作为空白基质溶液。取豆腐果苷和天麻素对照溶液各0.5 mL加流动相B 0.5 mL,



1. 阿魏酸; 2. 天麻素; 3. 豆腐果苷  
图 2 空白血浆 + 混合对照 + 内标色谱



1. 阿魏酸; 2. 天麻素; 3. 豆腐果苷  
图 3 豆腐果苷与天麻素同时灌胃 5 min  
后血浆样品 + 内标色谱



1. 阿魏酸; 2. 天麻素; 3. 豆腐果苷  
图 4 阿魏酸内标、天麻素和豆腐果苷质谱

混匀进样测定。分别记录豆腐果苷和天麻素的峰面积  $A_{\text{pure}}$ 。取豆腐果苷和天麻素标准溶液 0.5 mL 加空白基质溶液 0.5 mL, 各制备 6 份, 分别进样测定, 记录豆腐果苷和天麻素的峰面积  $A_{\text{matrix}}$ 。计算基质效应  $ME = A_{\text{matrix}}/A_{\text{pure}}$ 。结果豆腐果苷和天麻素低、中、高质量浓度的基质效应分别为 97.89%, 96.99%, 98.56% 和 97.34%, 96.58%, 98.12%。

**2.1.7 检测限** 取果豆腐果苷和天麻素对照品贮备液, 逐步稀释, 进样 2  $\mu\text{L}$ , 当 SNR 3 时, 得到豆腐果苷和天麻素最低检测质量浓度为 0.063, 0.05  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**2.1.8 线性试验** 精密量取豆腐果苷和天麻素对

照品贮备液适量, 用流动相 B 稀释成 0.1, 0.15, 0.2, 0.4, 0.8  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和 0.2, 0.3, 0.4, 0.8, 1.2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  溶液。分别取 0.5 mL 加空白血浆和内标对照贮备液各 0.5 mL, 加甲醇 4 mL, 涡旋振荡 10 min 后 16 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清液氮吹仪挥干, 0.4 mL 流动相 B 互溶, 即得对照品血浆样品溶液, 分别进样 2  $\mu\text{L}$ 。记录豆腐果苷与天麻素及内标物峰面积。豆腐果苷与天麻素的峰面积与内标物峰面积的比值为纵坐标, 浓度为横坐标, 进行线性回归, 得到天麻素与豆腐果苷的标准曲线方程为  $Y = 0.7318X - 0.1063, R^2 = 0.9960$  和  $Y = 0.5623X + 0.1081, R^2 = 0.9923$ 。结果表明: 豆腐果苷和天麻素在 0.125 ~ 1.00  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和 0.25 ~ 1.50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  线性关系良好。

**2.1.9 精密度试验** 精密量取豆腐果苷和天麻素对照品贮备液适量, 用流动相 B 稀释成 0.10, 0.20, 0.80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和 0.20, 0.40, 1.20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的溶液, 各加空白血浆 0.5 mL, 按照 2.1.4 项下方法处理, 分别取上清液进样 2  $\mu\text{L}$ , 结果表明豆腐果苷和天麻素血浆对照样品精密度良好 (见表 2 ~ 3)。

表 2 豆腐果苷血浆样品精密度试验 ( $n = 5$ )

质量浓度 $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	日内		日间	
	平均值 $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD /%	平均值 $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD /%
0.10	0.08	8.89	0.08	9.63
0.20	0.19	6.02	0.19	6.82
0.80	0.81	4.12	0.785	4.45

表 3 天麻素血浆样品精密度试验 ( $n = 5$ )

质量浓度 $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	日内		日间	
	平均值 $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD /%	平均值 $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD /%
0.20	0.19	7.49	0.19	7.65
0.40	0.41	5.43	0.39	5.85
1.20	1.19	3.28	0.18	3.05

**2.1.10 稳定性试验** 精密量取豆腐果苷和天麻素对照品贮备液适量, 用流动相 B 稀释成 0.10, 0.20, 0.80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和 0.20, 0.40, 1.20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的对照溶液, 各加空白血浆 0.5 mL, 按照 2.1.4 项下方法处理, 取上清液 4  $^{\circ}\text{C}$  放置 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h, 按照 2.1.2 项下分析条件分别进样 2  $\mu\text{L}$ , 结果豆腐果苷低、中、高浓度 RSD 分别为 2.89%, 2.99%, 2.56%; 天麻素低、中、高浓度 RSD 分别为 2.34%, 2.58%,

2.12%,表明该方法稳定性良好。

**2.1.11 回收率试验** 精密量取豆腐果苷和天麻素对照品贮备液适量,用流动相 B 稀释成质量浓度分别为 0.10, 0.20, 0.80  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和 0.20, 0.40, 1.20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照溶液,各加空白血浆 0.5 mL,按照 2.1.4 项下方法处理,分别进样 2  $\mu\text{L}$  计算豆腐果苷和天麻素的回收率,结果见表 4。

表 4 豆腐果苷与天麻素回收率试验 ( $n=5$ )

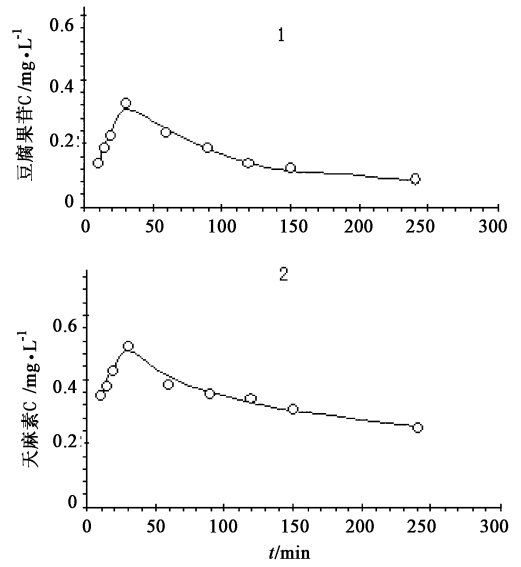
豆腐果苷			天麻素		
质量浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	平均值 $/\%$	RSD $/\%$	质量浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	平均值 $/\%$	RSD $/\%$
0.10	89.85	8.78	0.20	90.26	7.25
0.20	94.62	4.92	0.40	95.38	4.35
0.80	96.54	2.89	1.20	97.84	2.04

**2.2 豆腐果苷与天麻素在家兔体内相互作用** 雄性家兔 18 只,随机分成 3 组,每组 6 只,禁食 12 h。豆腐果苷和天麻素原料药用生理盐水配制成 10  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  溶液。第 1 组:豆腐果苷单独 ig 给药 100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,分别于给药前和给药后 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 min 从家兔耳缘静脉取血 1 mL;第 2 组:天麻素单独 ig 给药 100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,分别于给药前和给药后 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 min 从家兔耳缘静脉取血 1 mL;第 3 组:豆腐果苷和天麻素同时 ig 给药,剂量均为 100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,分别于给药前和给药后 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 min 从家兔耳缘静脉取血 1 mL;按照 2.1.4 项方法处理后进样。单独 ig 的豆腐果苷、天麻素以及同时 ig 的豆腐果苷和天麻素的平均药-时曲线见图 5~6。数据经 DAS3.0 药动学软件进行处理,采用非房室模型拟合,计算其药代动力学参数(表 5),SPSS 11.5 统计学软件进行  $t$  检验分析。

由表 5 可知,与单独灌胃组比较,同时灌胃组豆腐果苷和天麻素的  $C_{\text{max}}$ ,  $\text{AUC}_{0-\infty}$  均显著增加,  $\text{CLz}/F$ ,  $V_z/F$  显著减小 ( $P < 0.05$ ),其他药动学参数未见明显变化,提示豆腐果苷和天麻素同时灌胃后在家兔体内存在相互作用。

### 3 讨论

本研究建立了家兔血浆中豆腐果苷和天麻素 LC-MS 同时测定方法。在前期质谱条件摸索中,正离子模式和负离子模式测定均进行了尝试。最后采用 MRM 多反应监测进行测定,母离子和子离子都选择的甲酸加合负离子,相比 SIM 模式而言提高了检测的灵敏度和准确性,同时血浆中的杂质不干扰



1. 豆腐果苷;2. 天麻素

图 5 家兔单独灌胃 100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  豆腐果苷(1)和天麻素(2)平均药-时曲线

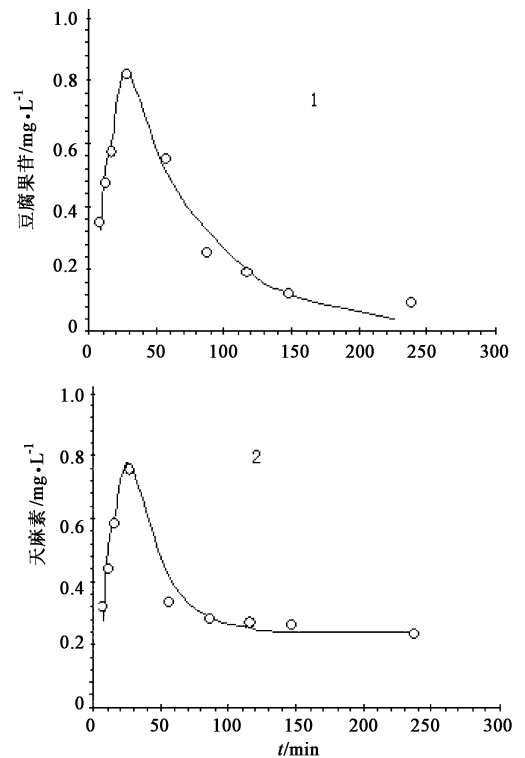


图 6 家兔同时灌胃 100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  豆腐果苷(1)和天麻素(2)平均药-时曲线

样品峰测定。

豆腐果苷和天麻素两者结构类似,不仅有类似的药理作用和色谱行为,而且质谱响应也相似。本研究采用 LC-MS 同时测定血浆中豆腐果苷与天麻素的血药浓度,血药浓度数据经药动学软件 DAS3.0 处理和 SPSS 11.5 统计学软件进行  $t$  检验分析后,可

表 5 豆腐果苷与天麻素单独或同时灌胃 100 mg·kg<sup>-1</sup> 后主要药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

参数	豆腐果苷		天麻素	
	单独灌胃	和天麻素同时灌胃	单独灌胃	和豆腐果苷同时灌胃
$C_{max}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.325 ± 0.122	0.816 ± 0.245 <sup>1)</sup>	0.501 ± 0.156	0.754 ± 0.214 <sup>1)</sup>
$t_{max}/\text{min}$	30 ± 3	30 ± 3	30 ± 3	30 ± 3
$AUC_{0\rightarrow\infty}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	60.00 ± 5.20	80.71 ± 8.40 <sup>1)</sup>	181.61 ± 20.50	276.37 ± 50.80 <sup>1)</sup>
$MRT_{0\rightarrow\infty}/\text{min}$	254 ± 60	129 ± 40	415 ± 50	812 ± 80
$t_{1/2Z}/\text{min}$	187 ± 30	105 ± 20	286 ± 40	586 ± 60
$CL_z/F/L\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	1.65 ± 0.77	1.25 ± 0.35 <sup>1)</sup>	0.55 ± 0.15	0.36 ± 0.11 <sup>1)</sup>
$V_z/F/L\cdot\text{kg}^{-1}$	444 ± 42	189 ± 26 <sup>1)</sup>	306 ± 35	228 ± 24 <sup>1)</sup>

注:与单独灌胃组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

以看出豆腐果苷与天麻素在家兔体内具有相互作用,但是二者在家兔体内是如何产生相互作用,是否具有药理协同作用,仍需进一步研究。

### [参考文献]

[1] 刘苹,耿菊敏,李健,等.豆腐果苷对大鼠仔代的早期神经行为毒性[J].中成药,2002,24(4):278.  
 [2] 刘苹,李健,纳冬荃,等.母鼠妊娠期服用豆腐果苷对仔代的神经行为效应[J].中草药,2002,33(3):238.  
 [3] 石英,刘松青,代青.LC-MS和HPLC法测定人血浆中格列本脲和二氢双胍方法的建立[J].第三军医大学学报,2005,27(8):731.

[4] 孟德玉,毛子成,何兴金,等.药用前胡研究进展[J].中国野生植物资源,2005,24(3):10.  
 [5] 王德才,马健,也志峰,等.白花前胡总香豆素解热镇痛抗炎作用的实验研究[J].中国中医药信息杂志,2004,11(8):688.  
 [6] 潘九英,吴飞华,金芝贵.白花前胡有效成分药理作用研究进展[J].上海中医药杂志,2006,40(5):64.  
 [7] 陈卓,蒋学华,任静,等.豆腐果苷在大鼠体内的药动学研究[J].中国中药杂志,2008,33(22):2662.  
 [8] 程刚,郝秀华,刘国良,等.天麻素在大鼠体内的药动学研究[J].中国药理学杂志,2003,38(2):127.

[责任编辑 聂淑琴]

## 《中国中药杂志》2015 年征订启事

《中国中药杂志》创刊于 1955 年 7 月,是由中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中医药学术期刊,在国际国内医药学领域内具有广泛影响。位居中国中文核心期刊、中国科技核心期刊“双核心”首位。曾荣获第三届国家期刊奖百种重点期刊、国家新闻出版广电总局“中国百强报刊”,以及历届国家中医药管理局全国优秀中医药期刊评比一等奖、百种中国杰出学术期刊、中国精品科技期刊等奖项。在国际上被 Medline,Scopus 等国外十余家著名数据库收录。全面反映我国中药与天然药物学科领域最新进展与研究动态。主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、临床等专业。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、民族药、学术探讨、药事管理等栏目。主要读者对象为各级管理部门、科研院所、大专院校、工厂企业以及医院等从事中医药科研、管理、生产、医院制剂及临床等方面的人员。

2015 年本刊每期定价为 50 元,208 页,全年定价 1200 元。国内刊号 11-2272/R,国际刊号 1101-5302。欢迎广大读者到本编辑部或当地邮局订阅,邮发代号 2-45。本刊地址:北京东直门内南小街 16 号;邮政编码 100700;电子信箱 cjmm2006@188.com;联系方式详见中国中药杂志网站 www.cjmm.com.cn