

8-O-乙酰山栀苷甲酯和山栀苷甲酯 在大鼠体内的药代动力学分析

陈健苗, 王双虎, 丁汀*, 周云芳
(丽水市人民医院, 浙江 丽水 323000)

[摘要] 目的:建立超高效液相串联质谱法(UPLC-MS/MS)同时检测大鼠体内8-O-乙酰山栀苷甲酯和山栀苷甲酯血药浓度的方法,并考察二者在大鼠体内的药代动力学过程。方法:利用乙腈沉淀蛋白法处理血浆样品,检测条件为流动相乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~1.5 min,20%~60%A;1.5~2 min,60%~95%A;2~2.5 min,95%A;2.5~2.6 min,95%~20%A;2.6~3 min,20%A),流速0.4 mL·min⁻¹,柱温40℃,进样量2 μL,内标物为芦丁;采用正离子多离子反应监测(MRM)扫描。结果:血浆中8-O-乙酰山栀苷甲酯和山栀苷甲酯的线性范围均为1~250 μg·L⁻¹,定量下限均为0.2 μg·L⁻¹。低、中、高质量浓度8-O-乙酰山栀苷甲酯和山栀苷甲酯质控样品的日内、日间精密度RSD均<8.8%;8-O-乙酰山栀苷甲酯的相对回收率依次为(103.89±9.18)%,(99.34±6.63)%和(95.88±3.69)%;山栀苷甲酯的相对回收率分别为(105.33±8.64)%,(101.55±1.22)%和(96.89±5.42)%。结论:该方法操作简便、快捷、灵敏度高,适用于大鼠血浆中8-O-乙酰山栀苷甲酯和山栀苷甲酯的药代动力学研究。

[关键词] 独一味;8-O-乙酰山栀苷甲酯;山栀苷甲酯;药物代谢;超高效液相串联质谱法

[中图分类号] R969.1;R945;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)08-0100-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016080100

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160311.1032.004.html>

[网络出版时间] 2016-03-11 10:32

Simultaneous Determination and Pharmacokinetics Analysis of 8-O-acetyl Shanzhiside Methyl Ester and Shanzhiside Methyl Ester in Rat Plasma by UPLC-MS-MS

CHEN Jian-miao, WANG Shuang-hu, DING Ting*, ZHOU Yun-fang
(People's Hospital of Lishui City, Lishui 323000, China)

[Abstract] **Objective:** To develop UPLC-MS/MS for determination of 8-O-acetyl shanzhiside methyl ester and shanzhiside methyl ester in rat plasma and their pharmacokinetics study. **Method:** Plasma was precipitated with acetonitrile, mobile phase was consisted of acetonitrile and 0.1% formic acid solution with gradient elution pumped at a flow rate of 0.4 mL·min⁻¹. Analysis was detected with positive electrospray ionization in multiple reaction monitoring (MRM) mode and rutin was used as internal standard. **Result:** Excellent linear calibration curves of 8-O-acetyl shanzhiside methyl ester and shanzhiside methyl ester were obtained in the concentration range of 1-250 μg·L⁻¹, their lower limits of quantification were 0.2 μg·L⁻¹. Intra-day and inter-day relative standard deviations of low, medium and high quality control samples were all less than 8.8%; Average recovery of 8-O-acetyl shanzhiside methyl ester were (103.89±9.18)%,(99.34±6.63)% and (95.88±3.69)%, while average recovery of shanzhiside methyl ester were (105.33±8.64)%,(101.55±1.22)% and (96.89±5.42)%, respectively. **Conclusion:** This method is simple, rapid and sensitive, which

[收稿日期] 20150716(012)

[基金项目] 浙江省医药卫生一般研究计划项目(2015KYB457)

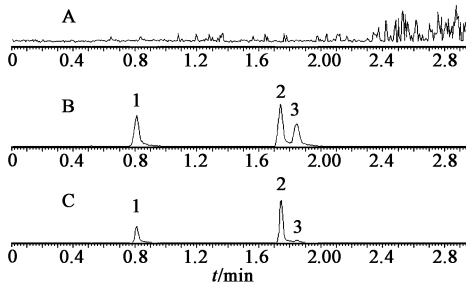
[第一作者] 陈健苗,副主任药师,从事医院药学研究,Tel:0578-2780158,E-mail:chenjianmiao1976@163.com

[通讯作者] *丁汀,主任药师,从事中药药理学和药代动力学研究,Tel:0578-2780158,E-mail:chenjianmiao1976@163.com

淀并涡旋 2 min, 将样品在 4 °C, 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 上清液转移至 1.5 mL 离心管中, 精密吸取 2 μL 上样检测。

2.5 方法学验证

2.5.1 系统适应性及专属性试验 分别取大鼠空白血浆, 空白血浆 + 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯、山栀苷甲酯和内标对照品, 大鼠给药 1 h 后的血浆样品, 按 2.4 项下方法操作, 见图 2。结果显示各组间分离良好并在相应的离子通道中, 不受血浆中内源性物质干扰。



A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 对照品; C. 灌胃给药 1 h 后的血浆样品;
1. 山栀苷甲酯; 2. 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯; 3. 芦丁

图 2 血浆中 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯和山栀苷甲酯 UPLC

Fig. 2 Typical UPLC chromatograms of 8-*O*-acetyl shanzhiside methyl ester and shanzhiside methyl ester in rat plasma

2.5.2 标准曲线和定量下限 分别精密吸取 2.3 项下对照品储备液置于 8 个 100 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 加空白血浆配成质量浓度分别为 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250 μg·L⁻¹ 的系列 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯和山栀苷甲酯血浆样品溶液, 按 2.4 项下方法操作, 以 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯和山栀苷甲酯的峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标, 血药浓度为横坐标, 得回归方程分别为 $Y = 110.996 \times 10^{-5} X - 760.869 \times 10^{-6}$ ($r = 0.9979$), $Y = 937.381 \times 10^{-7} X + 502.498 \times 10^{-6}$ ($r = 0.9962$), 线性范围均为 1 ~ 250 μg·L⁻¹。通过信噪比 (S/N) > 10 考察二

表 1 血浆中 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯和山栀苷甲酯的精密度和回收率 ($n = 6$)

Table 1 Precision and recovery of 8-*O*-acetyl shanzhiside methyl ester and shanzhiside methyl ester in rat plasma ($n = 6$)

成分	质量浓度/μg·L ⁻¹	精密度 RSD	精密度 RSD	相对回收率	绝对回收率
8- <i>O</i> -乙酰山栀苷甲酯	2	8.8	5.4	103.89 ± 9.18	84.84 ± 7.99
	25	6.7	4.4	99.34 ± 6.63	81.95 ± 4.18
	250	3.8	4.1	95.88 ± 3.69	82.1 ± 2.92
山栀苷甲酯	2	8.2	8.1	105.33 ± 8.64	85.27 ± 7.29
	25	1.2	2.4	101.55 ± 1.22	83.39 ± 4.48
	250	5.6	4.8	96.89 ± 5.42	81.7 ± 5.82

者的定量下限 (LLOQ) 均为 0.2 μg·L⁻¹。平行对 6 个分别含 0.2 μg·L⁻¹ 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯和山栀苷甲酯的血浆样品处理后进行色谱分析, 得方法回收率平均值分别为 95.28% 和 98.17%, RSD 分别为 6.5% 和 9.0%; 二者定量下限回收率 RSD 均 < 15%。

2.5.3 精密度、准确度和提取回收率 取质量浓度分别为 2, 25, 250 μg·L⁻¹ 的 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯和山栀苷甲酯血浆样品溶液, 按 2.4 项下方法操作, 分别在 1 d 内和连续 3 d 内进样, 计算相对回收率、日内精密度和日间精密度。取质量浓度分别为 2, 25, 250 μg·L⁻¹ 的 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯和山栀苷甲酯血浆样品溶液, 按 2.4 项下方法操作, 进样分析得峰面积 A1; 另取空白血浆按 2.4 项下方法操作, 并在洗脱液中加入对照品和内标溶液, 质量浓度和上述溶液一样, 进样分析得峰面积 A2, 计算绝对回收率。结果 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯和山栀苷甲酯的日内和日间精密度 RSD 均 < 8.8%, 见表 1。

2.5.4 基质效应 向空白基质中分别添加质量浓度为 2, 25, 250 μg·L⁻¹ 的 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯和山栀苷甲酯血浆样品溶液, 按 2.4 项下方法操作, 待测物的峰面积记为 A2; 相同质量浓度对照品溶液按 2.4 项下方法操作与测定, 待测物的峰面积记为 A3, 按 $A2/A3 \times 100\%$ 计算基质效应。结果低、中、高质量浓度 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯的基质效应分别为 (104 ± 5.65)%, (98.48 ± 4.30)% 和 (96.08 ± 3.92)%; 山栀苷甲酯的基质效应依次为 (101.69 ± 3.58)%, (95.45 ± 5.41)% 和 (97.56 ± 4.67)%, 内标芦丁的基质效应 (93.26 ± 6.18)%, 均符合生物样品测定要求。

2.5.5 稳定性考察 考察低、中、高质量浓度 (2, 25, 250 μg·L⁻¹) 的 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯和山栀苷甲酯血浆样品溶液, 按 2.4 项下方法操作并分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 取样进行测定。同法将 3 种质量浓

表 2 8-O-乙酰山柃苷甲酯和山柃苷甲酯在大鼠体内的主要药代动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Pharmacokinetics parameters of 8-O-acetyl shanzhiside methyl ester and shanzhiside methyl ester in rat plasma ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数/单位	8-O-乙酰山柃苷甲酯		山柃苷甲酯	
	高	低	高	低
$t_{1/2}/h$	1.01 ± 0.33	2.24 ± 0.71	0.97 ± 0.14	1.03 ± 0.28
$CL/L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	11.12 ± 1.91	9.71 ± 1.98	7.36 ± 1.05	6.01 ± 1.87
$C_{max}/\mu g \cdot L^{-1}$	228.15 ± 60.19	99.77 ± 40.22	174.02 ± 27.81	118.53 ± 37.79
$AUC_{0-4}/\mu g \cdot h \cdot L^{-1}$	412.08 ± 83.22	240.43 ± 67.59	491.48 ± 61.57	320.89 ± 112.19
$AUC_{0-\infty}/\mu g \cdot h \cdot L^{-1}$	423.29 ± 70.62	247.25 ± 64.46	498.41 ± 62.67	329.3 ± 114.09
MRT_{0-4}/h	1.55 ± 0.22	2.22 ± 0.33	2.6 ± 0.29	2.41 ± 0.21
$MRT_{0-\infty}/h$	2.01 ± 1.05	2.56 ± 0.62	2.69 ± 0.33	2.56 ± 0.28
$V_z/L \cdot kg^{-1}$	13.67 ± 3.88	31.71 ± 12.83	10.14 ± 1.09	8.64 ± 2.55

度的血浆样品置于 -80 °C 冰箱中保存, 分别于第 1, 5, 15, 30 天解冻, 依法测定及经历 1, 3 次反复冻融的稳定性。结果 RSD 均 < 10.0%, 表明样品中 8-O-乙酰山柃苷甲酯和山柃苷甲酯在 24 h 内稳定和 -80 °C 放置 1 个月条件下稳定。

2.6 大鼠体内药理学考察 准备 SD 大鼠 6 只, 采用单次灌胃给药方式, 8-O-乙酰山柃苷甲酯的灌胃给药剂量分别为 4.6, 2.3 mg · kg⁻¹, 山柃苷甲酯给药剂量分别为 3.6, 1.8 mg · kg⁻¹。给药前和给药后 0.033, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12 h 由大鼠尾静脉取血 200 μL, 置于肝素化的离心管中, 于 13 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取血浆于 -20 °C 冷冻保存。按 2.4 项下方法操作, 按 2.1 和 2.2 项下条件测定, 绘制药-时曲线, 见图 3, 4, 药代动力学参数见表 2。

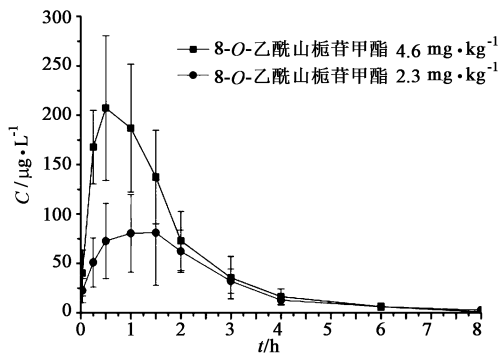


图 3 大鼠单次灌胃给予 8-O-乙酰山柃苷甲酯后的平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Mean plasma concentration-time profiles of 8-O-acetyl shanzhiside methyl ester in rat plasma after intragastric administration ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3 讨论

本文采用 UPLC-MS/MS 测定血药浓度, 与

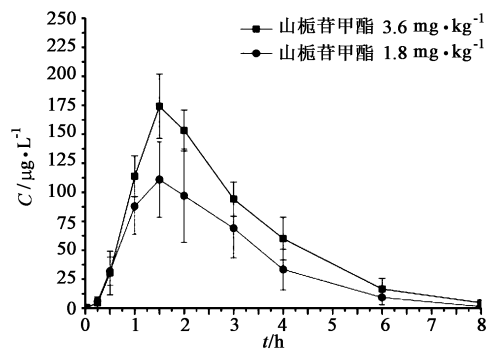


图 4 大鼠单次灌胃给予山柃苷甲酯后的平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Mean plasma concentration-time profiles of shanzhiside methyl ester in rat plasma after intragastric administration ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

HPLC-UV 相比, 具有检测灵敏度高和检测时间短的优点。仪器的高灵敏度使得血浆用量较少, 有利于大鼠的连续取血, 1 个样本的检测只需 3 min, 样本处理仅需血浆 50 μL, 大大减少大鼠采血的压力, 保证了每个采血时间点的准确性。预试验采用沉淀蛋白法处理血浆样品, 比较了高氯酸、甲醇和乙腈沉淀蛋白, 由于高氯酸酸性较强对质谱影响较大, 甲醇沉淀在质谱中易出现溶剂峰从而影响出峰时间, 而乙腈沉淀则不会出现上述问题^[9]。从 8-O-乙酰山柃苷甲酯和山柃苷甲酯响应值比较发现, 0.1% 甲酸水溶液作为水相具有较高的响应值和峰型, 8-O-乙酰山柃苷甲酯和山柃苷甲酯的 LLOQ 均为 0.2 μg · L⁻¹, 比文献报道更低, 并具有良好的分离度^[9-11]。选择芦丁作为内标是因为芦丁的结构与 8-O-乙酰山柃苷甲酯、山柃苷甲酯相似, 都具有多个羟基, 并且在样品处理过程中具有良好的回收率。

药代动力学参数显示 8-O-乙酰山柃苷甲酯和

山梔苷甲酯在大鼠体内的分布和消除半衰期($t_{1/2}$)较长,在体内的平均滞留时间(MRT)较长。运用SPSS 16.0软件对 $t_{1/2}$ 和清除率(CL)及剂量校正后的药时曲线下面积(AUC)进行独立样本 t 检验,结果显示8-*O*-乙酰山梔苷甲酯的高、低剂量的 $t_{1/2}$ 存在统计学差异($P < 0.01$)。8-*O*-乙酰山梔苷甲酯和山梔苷甲酯在大鼠体内均呈现特征性的二室动力学特征;前者表现为非线性药代动力学特征,而后者则呈现线性药代动力学特征。

[参考文献]

[1] 郑晓珂,刘媛媛,冯卫生,等.天然苯乙醇苷类化合物研究进展[J].中国新药杂志,2011,20(3):230-234.
[2] 袁涛,王森,顿珠,等.藏药独一味的研究进展[J].中成药,2014,36(9):1958-1961.
[3] 潘正,高运玲,张涛,等.HPLC法测定独一味根中环烯醚萜苷和苯乙醇苷[J].中草药,2011,42(2):279-281.
[4] 樊鹏程,马慧萍,景临林,等.反相制备液相色谱同时分离制备独一味中4种环烯醚萜苷类化合物[J].中草药,2012,43(4):699-701.
[5] 高运玲,潘正,张涛,等.HPLC测定独一味不同制剂中4种环烯醚萜苷的含量[J].中成药,2010,32(1):71-74.

[6] 邱建国,张泉龙,尉丽力,等.工业化提取分离纯化独一味总环烯醚萜苷类成分[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(13):32-35.
[7] 钟世红,古锐,王铃鑫,等.HPLC同时测定独一味中7种成分含量[J].中国中药杂志.2014,39(22):4373-4378.
[8] 颜芳,曾光尧,谭健兵,等.植物中苯乙醇苷类化合物研究进展[J].中南药学,2013,11(5):358-362.
[9] 王争,邓瑞雪,杨友亮,等.HPLC法同时测定糙苏中3个苯乙醇苷类化合物含量[J].药物分析杂志,2011,31(4):668-670.
[10] 樊鹏程,李茂星,贾正平,等.RP-HPLC同时测定不同产地独一味药材中4种环烯醚萜苷[J].中草药,2010,41(3):483-485.
[11] 尉丽力,邱建国,李茂星,等.独一味环烯醚萜苷胶囊质量标准研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(22):137-140.
[12] 袁涛,王森,管咏梅,等.HPLC同时测定奇正消痛贴膏中3种成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(19):72-75.
[13] 郭伟一,卢胜明,廖立东,等.山梔苷甲酯在大鼠体内的药动学[J].中国新药与临床杂志,2013,32(12):993-997.

[责任编辑 刘德文]

