

UPLC-MS-MS法同时检测大鼠血浆中没食子酸和芍药苷的浓度及其药代动力学研究

苏红¹, 何峰², 刘志宝³, 黄勇², 王永林^{2*}

(1. 大庆医学高等专科学校, 黑龙江 大庆 163312; 2. 贵阳医学院药学院, 贵阳 550004;
3. 大庆油田总医院, 黑龙江 大庆 163312)

[摘要] **目的:**建立一种用于同时检测大鼠血浆中没食子酸和芍药苷的准确、灵敏的超高压液相色谱-串联质谱分析方法,并研究没食子酸、芍药苷在大鼠体内的药代动力学。**方法:**大鼠静脉注射赤芍提取物后,采用乙腈沉淀血浆蛋白,通过 BEH C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) 柱分离, 0.1% 甲酸乙腈-0.1% 甲酸水梯度洗脱, 流速 0.35 mL·min⁻¹, 1 μL 进样分析, 采用电喷雾离子化三重四极杆串联质谱, 以多反应监测 (MRM) 方式进行负离子模式检测。用于定量分析的二级碎片离子分别为 *m/z* 169.0 → 125.0 (没食子酸) 和 *m/z* 525.1 → 449.1 (芍药苷)。**结果:**没食子酸、芍药苷分别在 0.056 ~ 41.2 mg·L 和 0.36 ~ 265.1 mg·L 线性关系良好, 日内、日间精密度 (RSD) 均 < 10.5%, 低、中、高浓度下没食子酸的回收率分别为 87.5%, 103.3%, 89.5%, 芍药苷的回收率为 88.5%, 105.0%, 107.4%。两种成分在大鼠体内的平均滞留时间均较短在 37 min 以内。**结论:**方法快速、专属性强、灵敏度高, 适用于赤芍提取物的临床前药代动力学研究。

[关键词] 血浆; 没食子酸; 芍药苷; 药代动力学; 超高压液相色谱-串联质谱

[中图分类号] R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0094-05

[doi] 10.11653/syfy2014040094

Simultaneous Determination and Pharmacokinetics of Gallic Acid and Paeoniflorin in Rat Plasma by UPLC-MS-MS

SU Hong¹, HE Feng², LIU Zhi-bao³, HUANG Yong², WANG Yong-lin^{2*}

(1. Daqing Medical Collage, Daqing 163312, China; 2. Guiyang Medical Collage, School of Pharmacy, Guiyang 550004, China; 3. Daqing Oilfield General Hospital, Daqing 163312, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a sensitive and reliable ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MS) method for simultaneous determination and pharmacokinetics of gallic acid and paeoniflorin in rat plasma. **Method:** Following a protein precipitation with acetonitrile for plasma samples after iv *Paeoniae Radix Rubra* extract to rat. The analysis was achieved by BEH C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) column and the mobile phase was consisted of acetonitrile and water (both 0.1% formic acid included) follow step gradient elution. A TQD tandem mass spectrometry equipped with electrospray ionization source was used as detector and operated by multiple reaction monitoring (MRM) negative ion mode of the transitions *m/z* 169.0 → 125.0, *m/z* 525.1 → 449.1 for gallic acid and paeoniflorin, respectively. **Result:** Good linearity was achieved with concentration over the range of 0.056-41.2, 0.36-265.1 mg·L⁻¹ for gallic acid and paeoniflorin, the intra- and inter-day precisions were lower than 10.5%, while the low, mid and high concentration levels extraction recoveries were 87.5%, 103.3%, 89.5%, and 88.5%, 105.0%, 107.4% for gallic acid and paeoniflorin, respectively. The MRT of the two compounds were all blow 37 min in rats. **Conclusion:** The method was proved to

[收稿日期] 20130413 (013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81060335, 81260636); 贵州省社会发展攻关计划项目(黔科合 SY 字[2011]3033)

[第一作者] 苏红, 硕士, 讲师, 从事中药药效物质基础研究及新药研究, Tel: 18945620195, E-mail: suhong_2010@126.com

[通讯作者] * 王永林, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础研究及新药研究, Tel: 0851-6908899, E-mail: gywyl@gmc.edu.cn

be suitable for the pharmacokinetics of *Paeoniae Radix Rubra* extract, which offers advantages of rapid, high sensitivity and selectivity.

[Key words] plasma; gallic acid; paeoniflorin; pharmacokinetics; UPLC-MS-MS

没食子酸又名五倍子酸,属有机酸类化合物,可见于五倍子、漆树、茶等药用植物中,具有抗菌、抗病毒和抗肿瘤等多种药理活性^[1]。芍药苷为具萜烷结构的单萜苷类化合物,在芍药、牡丹和紫牡丹等多种植物的根中都有发现,具有显著的镇痛、镇静、抗惊厥作用,同时能扩张冠状动脉,增加冠脉流量,对抗急性心肌缺血^[2-3]。赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall 或川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch 的干燥根,性味苦、微寒,归肝经,具有清热凉血、散瘀止痛之功能,主要用于治疗温毒发斑、目赤肿痛、肝郁胁痛、经闭痛经、跌扑损伤、痈肿疮疡等症^[4-5]。赤芍中含有丰富的苷类化合物,其中芍药苷的含量为 3.5%~7.9%,此外化学成分研究表明其内还含有没食子酸、没食子酸甲酯、鞣质、糖和蛋白质等成分。本研究以赤芍提取物中的指标性成分没食子酸和芍药苷作为研究对象,建立利用超高液相色谱-串联质谱(UPLC-MS-MS)同时检测大鼠血浆中没食子酸、芍药苷的快速、准确、灵敏的分析方法,并将建立的方法应用于大鼠静脉注射不同剂量的赤芍提取物药代动力学研究,为研究赤芍体内作用规律和临床前药代动力学研究提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器 超高液相色谱色-三重四级杆质谱联用仪(美国 Waters 公司), Allegra 64R 型高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司), ZH-2 型涡旋混合器(天津药典标准仪器厂), MTN-2800D 型氮吹仪(天津奥特塞恩斯公司)。

1.2 试剂与试药 没食子酸对照品(批号 110831-200803)、芍药苷对照品(批号 110736-201136)、葛根素对照品(批号 0752-9605)均购自中国食品药品检定研究院,色谱乙腈(德国 Merck 公司),其余溶剂均为分析纯;赤芍提取物:取赤芍药材分别用 10 倍、8 倍水煎煮 1 h,减压浓缩滤液至相对密度为 1.06~1.08 g·mL⁻¹,加乙醇使含醇量达 60%,静置 12 h,抽滤,减压回收乙醇,浓缩液用 1/2 倍的正丁醇萃取 4 次,合并正丁醇层减压回收,药液过聚酰胺柱,回收乙醇洗脱液,浓缩后微波真空干燥^[6],即得赤芍提取物(得膏率 3.46%)。

1.3 动物 健康 Wistar 大鼠 18 只,雌雄兼用,体重为(210±10)g,由贵阳医学院动物中心提供,动物

许可证号 SCXK(黔)2002-0001。

2 方法

2.1 标准溶液的配制 分别精密称取各对照品适量,用甲醇溶解并定容,得 0.68 g·L⁻¹没食子酸,0.97 g·L⁻¹芍药苷的对照品储备液。同法配制 20 mg·L 的葛根素内标溶液。

2.2 色谱条件 Waters Acquity BEH C₁₈ (2.1 mm×50 mm,1.7 μm)色谱柱,0.1%甲酸乙腈(A)-0.1%甲酸水(B)梯度洗脱(0~2 min,5%~25%A,2~3 min,25%~90%A,4 min,5%A,流速 0.35 mL·min⁻¹,柱温 45℃)。

2.3 质谱条件 Waters Acquity TQD 质谱仪,Mass LynxV 4.1 工作站,电喷雾电离源,毛细管电压 3 kV,离子源温度 120℃,去溶剂气温度 350℃,去溶剂气为氮气(650 L·h⁻¹),碰撞气为氩气(0.16 mL·min⁻¹),扫描方式为多反应离子监测模式(MRM),用于定量的正离子对等质谱信息见表 1。

表 1 没食子酸等检测成分的定量离子对和锥孔电压等质谱信息

检测物	模式	离子对 /m/z	驻留时间 /ms	锥孔电压 /V	碰撞能量 /eV
没食子酸	-	169.0→125.0	50	25	15
芍药苷	-	525.1→449.1	50	25	10
葛根素(内标)	+	417.0→267.0	50	30	15

2.4 血浆样品处理方法^[7-9] 取大鼠血浆 100 μL,依次加入 10 μL 葛根素内标溶液(20 mg·L),50 μL 1%甲酸溶液,400 μL 乙腈,涡混 1 min,于 4℃ 15 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液置离心管中,45℃氮吹仪下空气吹干,残留物用 300 μL 初始流动相溶解,1 μL 进样。

2.5 方法学验证

2.5.1 专属性 分别取 6 份空白血浆 100 μL,除不加内标外,其余按 2.4 项下操作,得典型的空白样品色谱图 A;将没食子酸和芍药苷的混合标液和内标溶液加入空白血浆,依法操作,得相应色谱图 B;取大鼠给药后血浆,依法操作,得相应色谱图 C,结果见图 1。由结果可以看出大鼠血浆中内源性物质均不干扰没食子酸和芍药苷的测定。

2.5.2 线性范围和最低检测限(LLOD) 取大鼠空白血浆 100 μL,分别加入 6 个逐步稀释的混合标

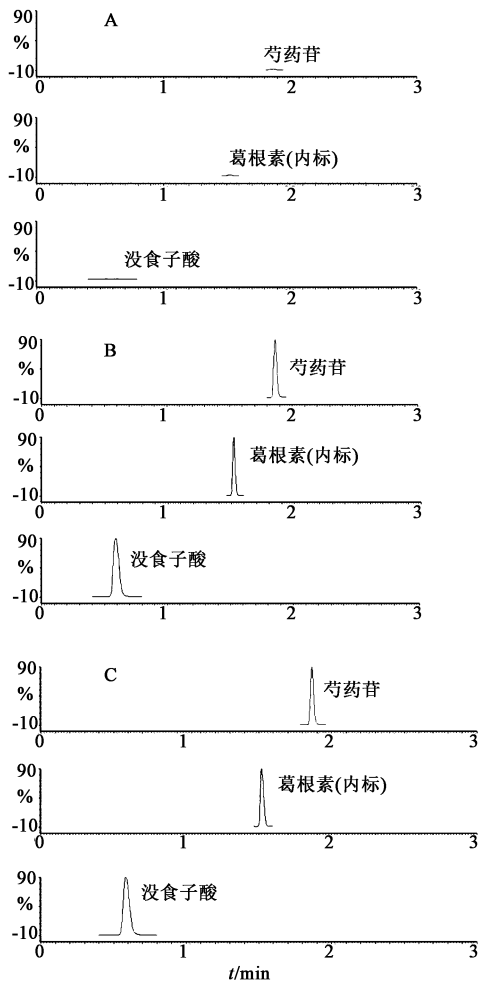


图 1 空白血浆(A)、空白血浆加入两种混合标液和 20 mg·L⁻¹ 内标葛根素溶液(B)、大鼠 iv 120 mg·kg⁻¹ 赤芍提取物 10 min 后典型的色谱图谱(C)药动学

准溶液 30 μL (n = 3), 按 2.4 项下操作, 建立标准曲线。以待测物的峰面积与内标峰面积之比 (A/A_i) 为纵坐标 Y, 各物质浓度 (C) 为横坐标 X 进行线性回归, 权重系数为 1/X, 求得标准曲线^[10]。结果两种成分的线性方程分别为 $Y_{\text{没食子酸}} = 0.37X + 0.026$ ($r = 0.991$, 线性范围 0.056 ~ 41.2 mg·L, LLOD 为 0.016 mg·L); $Y_{\text{芍药苷}} = 0.07X + 0.05$ ($r = 0.996$, 线性范围 0.36 ~ 265.1 mg·L, LLOD 为 0.11 mg·L)。

2.5.3 准确度和精密度 按 2.5.2 项下分别配制低、中、高浓度的质控 (QC) 样品, 连续测定 3 d (n = 5)。根据当日随行标准曲线计算 QC 样品浓度, 求得方法的准确度和日内、日间精密度, 结果见表 2。3 个浓度下没食子酸和芍药苷的日内、日间精密度 RSD (%) 分别 < 9.85%, 10.49%, 准确度范围在 87.5% ~ 107.4%。

2.5.4 提取回收率和稳定性 按 2.5.2 项下分别配制低、中、高浓度的 QC 样品; 另取空白血浆, 按

表 2 大鼠血浆中没食子酸和芍药苷的准确度
和日内、日间精密度 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

检测物	加入浓度 /mg·L ⁻¹	实测值 /mg·L ⁻¹	准确度 /%	精密度	
				日内	日间
没食子酸	0.4	0.35 ± 0.05	87.5	1.88	2.12
	3.6	3.72 ± 0.30	103.3	5.76	5.18
	32.4	29.0 ± 0.74	89.5	6.57	5.05
芍药苷	3.0	3.15 ± 0.06	105.0	4.34	8.24
	27.0	29.0 ± 0.07	107.4	9.24	10.49
	243.0	215.0 ± 0.23	88.5	9.85	8.17

2.4 项下操作, 离心后获得上清液, 加入与上述样品等浓度的混合标液 (n = 5), 于 40 °C 氮吹仪下吹干, 残留物用 300 μL 流动相溶解, 获得相应峰面积, 以每一浓度的两种处理方法的峰面积比值计算提取回收率。经测定 3 种成分的提取回收率分别为没食子酸 83.5% ~ 85.4%, 芍药苷 83.8% ~ 86.5%。同法测定内标的提取回收率为 91.4%。

此外, 还考察了低、中、高 3 个浓度的含药血浆样品在室温 (约 20 °C) 下放置 8 h, -20 °C 下冷藏 3 d, 经测定 3 种情况下得到的两种检测成分的峰面积与零时间点的偏差均在 15% 以内, 提示实验条件下血浆样品稳定性良好。

2.6 方法学应用^[10] 将 18 只 Wistar 大鼠随机分为低、中、高 (30, 60, 120 mg·kg⁻¹) 3 个剂量组, 给药前禁食 12 h, 自由饮水。大鼠尾静脉注射赤芍提取物药液, 分别于给药前与给药后 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140 min 经尾静脉取血约 0.3 mL, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 血浆置于 -20 °C 冰箱中保存至分析。样品测定方法按 2.4 项进行, 每批次生物样品测定随行标准曲线及低、中、高 3 个浓度的 QC 样品, 根据每一分析批的标准曲线计算 QC 样品和未知样品的浓度。

2.7 数据处理 实验所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 DAS2.0 软件 (中国数学药理专业委员会) 计算各检测成分的药动学参数, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

3 结果

大鼠静脉注射低、中、高 3 个剂量的赤芍提取物后, 没食子酸和芍药苷的平均 c-t 曲线见图 2, 采用 DAS2.0 软件对药动学参数进行拟合 (主要药动学参数见表 3)。所有批次实验的低、中、高 QC 样品回收率均在 85.0% ~ 115.0%, 符合生物样品分析方法的要求。

表3 没食子酸和芍药苷低、中、高剂量下的主要药动学参数($\bar{x} \pm s, n = 6$)

检测物	剂量	$t_{1/2\alpha}$ /min	$t_{1/2\beta}$ /min	$t_{1/2\gamma}$ /min	$AUC_{(0-t)}$ $mg \cdot L^{-1} \cdot min^{-1}$	$AUC_{(0-\infty)}$ $mg \cdot L^{-1} \cdot min^{-1}$	$MRT_{(0-t)}$ /min	$MRT_{(0-\infty)}$ /min	V_z $L \cdot kg^{-1}$	CL_z $L \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$
没食子酸	低	5.22 ± 2.11	21.48 ± 12.52	24.47 ± 15.26	17.28 ± 12.72	17.89 ± 12.15	19.43 ± 13.14	22.34 ± 13.19	12.11 ± 4.38	1.67 ± 0.35
	中	14.61 ± 7.85	26.64 ± 17.45	26.65 ± 16.74	115.93 ± 80.13	119.17 ± 81.25	28.12 ± 15.64	31.53 ± 17.25	16.82 ± 11.36	0.50 ± 0.21
	高	23.40 ± 12.51	23.41 ± 11.02	38.29 ± 30.48	428.71 ± 124.35	437.46 ± 134.87	31.29 ± 12.17	34.21 ± 13.54	10.23 ± 5.26	0.27 ± 0.09
芍药苷	低	23.14 ± 20.12	23.15 ± 20.47	-	1 016.16 ± 456.21	1 025.38 ± 462.37	31.35 ± 11.82	32.87 ± 10.69	1.02 ± 0.49	0.04 ± 0.01
	中	20.52 ± 17.45	20.53 ± 15.65	-	2 649.45 ± 978.21	2 701.10 ± 890.45	31.93 ± 12.34	34.67 ± 13.74	0.78 ± 0.29	0.02 ± 0.01
	高	26.12 ± 17.61	26.13 ± 15.42	-	5 249.18 ± 2931.48	5 382.82 ± 3012.73	33.65 ± 11.79	37.23 ± 12.64	0.85 ± 0.34	0.02 ± 0.00

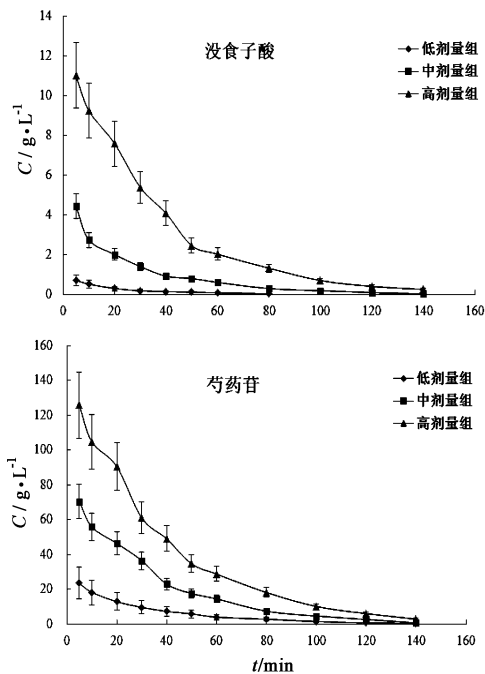


图2 大鼠静脉注射3个剂量赤芍提取物后没食子酸和芍药苷的C-t曲线($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

本实验中采用的UPLC-MS-MS与传统的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实验中需用血浆量较少,可以利于大鼠的连续取血,同时仪器超快速的分析使得4 min就可完成对一个药动样品的分析,适合于高通量的药动学实验。

在血浆样品的前处理过程中发现,在血浆中加入50 μ L 1%的甲酸后可使各检测成分更充分地于蛋白解离,大大提高了提取回收率。同时比较甲醇和乙腈沉淀蛋白,结果用乙腈处理的样品不仅可以有效提取没食子酸和芍药苷,同时也能更好地溶解内标葛根素。此外,实验中在水相和有机相的流动相中均加入0.1%的甲酸溶液,更有助于改善各检测成分的峰形和提高灵敏度。

在给药剂量为30 $mg \cdot kg^{-1}$ 的低剂量组由于在80 min以后没食子酸的药浓度低于最低定量限故药动学参数的拟合采用前80 min的数据。药代动力学参数显示,没食子酸在大鼠体内呈现特征性的三室药动学开放模型,其在大鼠体内的平均滞留时间(MRT)分别为19.4,28.1,31.3 min,提示其在体内的滞留时间较短;清除率(CL)分别为1.7,0.5,0.3 $L \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$,提示其在体内的清除较为迅速;表观分布容积(V)分别为12.1,16.8,10.2 $L \cdot kg^{-1}$,提示其在体内的血管外分布较为广泛;对低、中、高剂量下的 $AUC_{(0-t)}$ 进行剂量校正后利用SPSS统计软件进行单因素方差分析,结果在实验剂量下没食子酸表现出了非线性药动学的特征。

芍药苷在大鼠体内呈现特征性的二室药动学开放模型,其在大鼠体内的MRT分别为31.4,31.9,33.6 min,提示其在体内的滞留时间较短;CL分别为0.04,0.02,0.02 $L \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$,提示其在体内的清除较为迅速;对低、中、高3个剂量组下 $AUC_{(0-t)}$ 进行剂量校正后进行单因素方差分析,在实验剂量下芍药苷表现出了线性药动学的特征。

[参考文献]

- [1] 王教玉,张起辉,邓旭明,等. 没食子的药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(10):2570.
- [2] 郑亚萍,刘春杰. 赤芍对早期糖尿病肾病大鼠肾脏Ang II、ET-1、PKC及TGF- β 1的影响[J]. 当代医学, 2012, 18(23):20.
- [3] 高世乐,胡宗涛,董六一. 赤芍总苷对大鼠放射性肝纤维化的保护作用及机制[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(2):65.
- [4] 郑世存,李晓宇,欧阳兵,等. 芍药苷药理作用研究新进展[J]. 中国药物警戒, 2012, 9(2):100.
- [5] 王君萍,韦颖梅,郭梅,等. 芍药苷对大鼠脑缺血再灌注损伤细胞凋亡相关基因的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2008, 6(3):310.

大鼠口服二苯乙烯苷及其 β -环糊精包合物的组织分布研究

王萌¹, 任晓亮^{2*}, 欧阳慧子², 王贵芳², 戚爱棣²

(1. 天津中医药大学中医药研究院, 天津 300193; 2. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193)

[摘要] **目的:**通过对大鼠分别灌胃给予二苯乙烯苷(THSG)单体及其 β -环糊精(β -CD)包合物,研究THSG在大鼠主要8种脏器组织中的含量-时间分布。**方法:**首先将给药后15,30,60 min各组织样品取出后处理,随后采用高效液相-紫外法(HPLC-UV)测定生物样品中THSG含量。**结果:**THSG在多个组织中均能被检测到,证明其体内组织分布较为广泛,THSG- β -CD包合物对大鼠灌胃给药后,虽然THSG的血药浓度较给予同剂量的THSG单体有显著增加,但在脾脏、肺、脑、胰腺中的分布并无显著差异;而在心脏、肾脏、脂肪组织中的分布则表现出含量达峰时间延后的特点。**结论:** β -CD的包合作用仅改变了药物在组织中的达峰时间,并不会造成药物在组织中的蓄积。

[关键词] 二苯乙烯苷; 何首乌; β -环糊精; 组织分布

[中图分类号] R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0098-05

[doi] 10.11653/syfy2014040098

Study on Tissue Distribution of Stilbene Glycoside (THSG) and its β -cyclodextrin Inclusion

WANG Meng¹, REN Xiao-liang^{2*}, OUYANG Hui-zi², WANG Gui-fang², QI Ai-di²

(1. Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** The tissue distribution characteristics of stilbene glycoside (THSG) and its β -cyclodextrin inclusion in 8 tissues after oral administration to rats were studied. **Method:** The samples of 8 different tissues were collected at 15, 30, 60 min, respectively. The content of THSG was determined by HPLC-UV. **Result:** The HPLC-UV method established was available for analysis of THSG in tissues and met the requirements of biological sample analysis. There was no significant difference of THSG concentration in the spleen, lung, brain

[收稿日期] 20130415(013)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81102732);高等学校博士学科点专项科研基金项目(新教师类)(20111210120006)

[第一作者] 王萌,助理研究员,从事药物分析及药剂学研究,E-mail:mengwangr@163.com

[通讯作者] *任晓亮,Tel:022-59596221,E-mail:xiaoliang_ren@sina.com

[6] 史伟国,张玉,杜永强,等. 赤芍中芍药苷的匀浆提取工艺优化[J]. 黑龙江医药科学, 2012, 35(2):59.

[7] Zhang T H, Meng P, Kou M, et al. Rapid and sensitive UPLC-MS-MS for the determination of trimetazidine in human plasma[J]. Chromatographia, 2010, 71(11/12):1101.

[8] 刘英慧,陈晓玲,黄琪,等. 高效液相色谱法测定樺木叶中没食子酸的含量[J]. 中南药学, 2012, 10(1):33.

[9] 鲍天冬,李玉洁,杨庆,等. LC/MS测定大鼠灌胃黄

连提取物后血浆中小檗碱、巴马汀及其药物动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13):186.

[10] KIM Y H, JEONG D W, KIM Y C, et al. Pharmacokinetics of baicalein, baicalin and wogonin after oral administration of a standardized extract of *Scutellaria baicalensis*, PF-2405 in rats [J]. Arch Pharm Res, 2007, 30(2):260.

[责任编辑 邹晓翠]