

## HPLC-MS-MS 同时检测大鼠血浆中 荜草素、牡荆素和槲皮苷

黄勇, 何峰, 张治蓉, 郑林, 兰燕宇, 王永林\*  
(贵阳医学院药学院, 贵阳 550004)

**[摘要]** **目的:** 建立一种用于同时检测大鼠血浆中荜草素、牡荆素和槲皮苷 3 种黄酮成分的准确、灵敏的超高压液相色谱-串联质谱分析方法, 并研究其在大鼠体内的药代动力学。**方法:** 大鼠静脉注射注射用复方荜草后, 采用甲醇沉淀血浆蛋白, 通过 BEH C<sub>18</sub> 柱分离, 乙腈-0.1% 甲酸水梯度洗脱, 采用电喷雾离子化三重四级杆串联质谱, 以多反应监测 (MRM) 方式进行正离子检测。用于定量分析的二级碎片离子分别为 449.2 ~ 329.2 (荜草素)、433.2 ~ 313.0 (牡荆素) 和 449.2 ~ 303.4 (槲皮苷)。**结果:** 3 种黄酮成分在大鼠血浆中线性关系良好, 日内、日间精密性 (RSD) 均 < 15.71%, 准确度在 86.25% ~ 112.44% 之间。3 种黄酮成分在大鼠体内的平均滞留时间均较短在 21min 以内。**结论:** 本方法快速、专属性强、灵敏度高, 适用于注射用复方荜草临床前药代动力学研究。

**[关键词]** 血浆; 大鼠; 荜草素; 牡荆素; 槲皮苷; 药代动力学; 超高压液相色谱-串联质谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0080-05

## Simultaneous Determination of Orientin, Vitexin and Quercitrin in Rat Plasma by UPLC-MS-MS

HUANG Yong, HE Feng, ZHANG Zhi-rong, ZHENG Lin, LAN Yan-yu, WANG Yong-lin\*  
(School of Pharmacy, Guiyang Medical Collage, Guiyang 550004, 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 orientin, vitexin and quercitrin in rat plasma. **Method:** Following a protein precipitation with methanol for plasma samples after iv Compound Hongcao injection to rat. The analysis was achieved by BEH C<sub>18</sub> column and the mobile phase was consisted of acetonitrile and water (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) positive ion mode of the transitions 449.2-329.2, 433.2-313.0, 449.2-303.4 for orientin, vitexin and quercitrin, respectively. **Result:** Good linearity was achieved for the three flavonoids, the intra- and inter-day precisions were lower than 15.71%, and the accuracy were from 86.25% to 112.44%. The MRT of the three flavonoids were all blow 21 min in rats. **Conclusion:** The method was proved to be suitable for the pharmacokinetics of Compound Hongcao injection, which offers advantages of rapid, high sensitivity and selectivity.

**[Key words]** plasma; rats; orientin; vitexin; quercitrin; pharmacokinetics; UPLC-MS-MS

荜草素 (orientin) 属天然碳苷类黄酮, 具有抗氧化作用, 此外荜草素还具有保护心肌细胞、抑制 NO

**[收稿日期]** 20110604(001)

**[基金项目]** 国家科技重大专项课题(2008ZX09101-021); 国家自然科学基金(30860366); 贵州省科技计划重大专项项目(黔科合重大专项字[2007]6010号)

**[第一作者]** 黄勇, 硕士生, 副教授, 从事中药活性物质基础及药代动力学研究, Tel:0851-6908899, E-mail: mailofhy@126.com

**[通讯作者]** \* 王永林, 教授, 从事中药活性物质基础研究, Tel:0851-6908899, E-mail: gywyl@gmc.edu.cn

合酶、抗菌等多种药理活性<sup>[1]</sup>。牡荆素(vitexin)为异黄酮类化合物,在山楂、地耳草和荜草等多种植物中都有发现,其对缺血性心肌损伤具有良好的保护作用<sup>[2]</sup>。槲皮苷(quercitrin)为黄酮类化合物,具有很好的抗病毒、抗炎、降压和利尿等作用<sup>[3]</sup>。注射用复方荜草是由黔产荜草为主药研制而成的冻干粉针剂,其内主要含有荜草素、牡荆素和槲皮苷等黄酮类成分,临床上拟用于治疗冠心病、心绞痛和心血瘀阻证。前期药效学实验结果显示该药可明显改善急性心肌缺血、心肌梗死和降低心肌耗氧量<sup>[4-5]</sup>。本文建立了利用超高液相色谱-串联质谱同时检测大鼠血浆中荜草素、牡荆素和槲皮苷等3种黄酮成分的分析方法,并应用于大鼠静脉注射不同剂量的注射用复方荜草药代动力学研究,为研究该药体内作用规律和临床研究提供了科学依据。

## 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高速离心机(美国Beckman Coulter公司),MTN-2800D氮吹仪(天津奥特塞恩斯公司),ZH-2涡旋混合器(天津药典标准仪器厂)。

**1.2 试剂与试药** 荜草素对照品(批号111777-200801)、葛根素对照品(批号0752-9605)购自中国药品生物制品检定所,牡荆素、槲皮苷对照品为贵阳医学院药物研究开发中心自制(HPLC检测纯度 $\geq 98\%$ ),注射用复方荜草(贵州益佰股份有限公司提供,100 mg/支,批号20091223),色谱乙腈(德国Merck公司),其余溶剂均为分析纯。

**1.3 动物** 健康Wistar大鼠18只,雌雄兼用,体重为 $(210 \pm 10)$  g,由贵阳医学院动物中心提供,动物许可证号SCXK(黔)2002-0001。

**1.4 数据处理** 实验所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用DAS 2.0软件(中国数学药理专业委员会)计算各物质药动学参数。

## 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 $1.006 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 荜草素, $0.996 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 牡荆素, $1.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 槲皮苷的对照品储备液。同法配制 $9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葛根素内标溶液。

**2.2 色谱条件** Waters Acquity BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm  $\times$  50 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )色谱柱,乙腈-0.1%甲酸水梯度洗脱(0 ~ 0.5 min, 10% A), 2.0 ~ 2.5 min, 30% ~ 90% A, 3.5 min 10% A,流速为 $0.35 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;柱温 $45 \text{ }^\circ\text{C}$ ;进样器温度 $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

**2.3 质谱条件** Waters Acquity TQD质谱仪, MassLynx V4.1工作站,电喷雾电离源;毛细管电压3 kV;离子源温度 $120 \text{ }^\circ\text{C}$ ;去溶剂气温度 $350 \text{ }^\circ\text{C}$ ;喷雾气为 $\text{N}_2$  ( $650 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ );碰撞气为 $\text{Ar}_2$  ( $0.16 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ );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 荜草素等物质的定量离子对和锥孔电压等质谱信息

检测物	离子对/( $m/z$ )	驻留时间	锥孔电压	碰撞能量
		/ms	/V	/eV
荜草素	499.2 ~ 329.2	50	35	30
牡荆素	433.2 ~ 313.0	50	35	30
槲皮苷	449.2 ~ 303.4	50	35	30
葛根素(内标)	417.0 ~ 267.0	50	30	15

**2.4 血浆样品处理方法**<sup>[6-7]</sup> 取大鼠血浆 $100 \mu\text{L}$ ,依次加入 $20 \mu\text{L}$ 葛根素内标溶液( $9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), $30 \mu\text{L}$ 甲酸溶液( $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), $400 \mu\text{L}$ 甲醇,涡混1 min,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$   $15\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液置离心管中, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 氮吹仪下吹干,残留物用 $200 \mu\text{L}$ 初始流动相溶解, $1 \mu\text{L}$ 进样。

## 2.5 方法学验证

**2.5.1 专属性** 分别取6份空白血浆 $100 \mu\text{L}$ ,除不加内标外,其余按2.4项下操作,得典型空白样品色谱图;将3种物质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;取大鼠给药后血浆,依法操作,得相应色谱图,见图1。可以看出大鼠血浆中内源性物质均不干扰3种物质的测定。

**2.5.2 线性范围和最低检测限(LLOD)** 取大鼠空白血浆 $100 \mu\text{L}$ ,分别加入6个逐步稀释的混合标准溶液 $30 \mu\text{L}$  ( $n=3$ ),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。结果3种成分的线性方程分别为 $Y_{\text{荜草素}} = 0.137X + 0.028$  ( $r = 0.995$ ,线性范围 $0.11 \sim 27.66 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , LLOD为 $15.23 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ); $Y_{\text{牡荆素}} = 0.162X + 0.007$  ( $r = 0.998$ ,线性范围 $0.05 \sim 12.56 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , LLOD为 $0.55 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ); $Y_{\text{槲皮苷}} = 0.115X + 0.003$  ( $r = 0.991$ ,线性范围 $0.02 \sim 5.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , LLOD为 $1.90 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )。

**2.5.3 准确度和精密度的按** 2.5.2项下分别配制低、中、高浓度的质控(QC)样品,同法配制与定量下限浓度相当的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

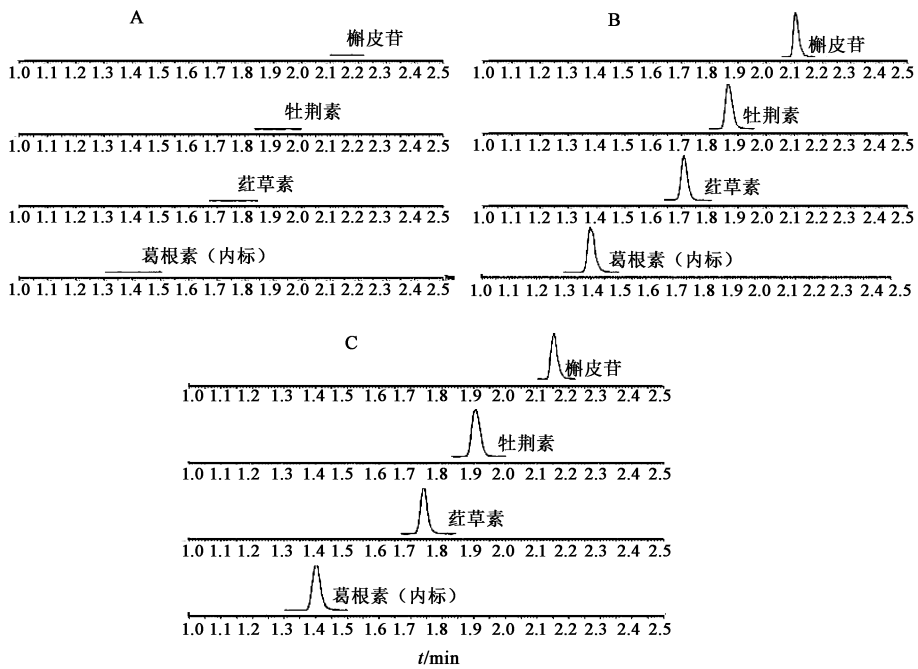


图 1 典型的色谱图分别为空白血浆(图 A)、空白血浆加入 3 种混合标液和  $9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  内标葛根素溶液(图 B)、大鼠  $iv \ 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  注射用复方荜草 40 min 后的药动学图谱(图 C)

的日内、日间精密度和准确度,结果见表 2。4 个浓度下荜草素等 3 种成分的日内、日间精密度 RSD 分

别小于 9.81% 和 12.57%, 准确度在 81.81% ~ 113.32% 之间。

表 2 大鼠血浆中 3 种物质的日内、日间精密度和准确度 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

检测物	加入浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$\bar{x} \pm s$	准确度 /%	日内精密度 RSD/%	日间精密度 RSD/%
荜草素	0.34	$0.32 \pm 0.04$	94.70	13.42	1.18
	3.07	$3.45 \pm 0.20$	112.44	6.02	1.97
	27.66	$26.68 \pm 0.64$	96.45	2.40	1.18
牡荆素	0.16	$0.14 \pm 0.02$	86.25	15.71	8.11
	1.40	$1.41 \pm 0.10$	100.43	6.92	3.88
	12.56	$11.80 \pm 0.54$	93.92	4.61	3.52
槲皮苷	0.062	$0.06 \pm 0.01$	90.65	9.62	3.03
	0.56	$0.55 \pm 0.04$	98.57	7.73	3.65
	5.05	$5.28 \pm 0.21$	104.63	3.93	1.38

**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 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  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  氮吹仪下吹干,残留物用  $200 \text{ }\mu\text{L}$  流动相溶解,获得相应峰面积,以每一浓度的 2 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荜草素 82.75% ~ 93.92%、牡荆素 80.83% ~ 100.00%、槲皮苷 74.41% ~ 103.04%。同法测定内标的提取回收率为 101.37%。

此外,实验还考察了低、中、高 3 个浓度的含药血浆样品在室温(约  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ )下放置 6 h,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  下冷藏 3 d,经测定 3 种情况下得到的 2 种物质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**<sup>[8-9]</sup> 将 18 只 Wistar 大鼠随机分为低、中、高( $20, 40, 80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )3 个剂量组,给药前禁食 12 h,自由饮水。大鼠尾静脉注射复方荜草药液,分别于给药前与给药后 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90 min 经尾静脉取血约  $0.3 \text{ mL}$ ,  $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$

离心 10 min, 血浆置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  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。

### 3 结果

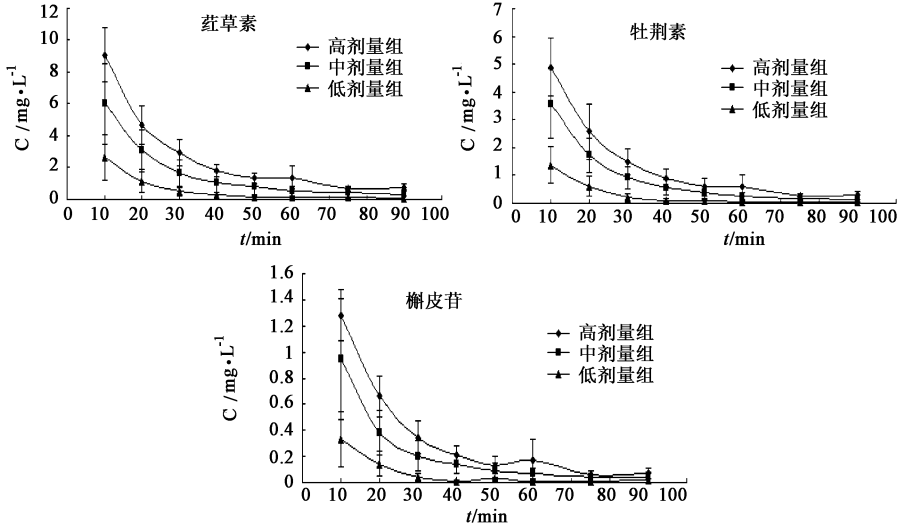


图 2 大鼠静脉注射 3 个剂量注射用复方荜草后 3 种黄酮的  $c-t$  曲线 ( $n=6$ )

表 3 低、中、高剂量下 3 种黄酮的主要药动学参数 ( $n=6$ )

检测物	$T_{1/2\beta}/\text{min}$			MRT/min			AUC/( $\text{mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$ )			$V_z/(\text{L}\cdot\text{kg}^{-1})$			CL/( $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ )		
	低	中	高	低	中	高	低	中	高	低	中	高	低	中	高
荜草素	10.44	14.72	13.79	12.41	17.80	20.48	79.87	204.39	307.48	6.98	8.64	11.04	0.3	0.24	0.25
牡荆素	7.70	10.51	20.23	8.52	15.45	17.44	45.03	114.25	159.33	12.59	21.88	20.45	8.15	10.99	14.49
槲皮苷	14.16	9.44	14.72	10.47	15.60	17.66	11.04	31.01	42.69	71.38	61.38	75.55	4.89	1.77	1.72

### 4 讨论

UPLC-MS-MS 与 HPLC-UV 相比, 检测灵敏度大大提高, 专属性强, 短时间即可完成对一个样品的分析。本实验需用血浆量较少, 利于大鼠连续取血。经预实验确证在血浆中加入  $30\text{ }\mu\text{L}\text{ }3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  甲酸后可使各检测物质更充分地由蛋白解离, 增加提取回收率。用甲醇沉淀血浆蛋白, 不仅可以有效提取荜草素、牡荆素和槲皮苷, 同时也能很好地溶解内标葛根素。此外, 流动相中 0.1% 甲酸溶液的加入, 有助于改善各物质的峰形和提高灵敏度, 同时实验中我们还对血浆样品的基质效应进行了考察, 结果显示各浓度血浆样品均无明显的基质效应干扰。本文为注射用复方荜草的临床前研究提供了稳定可靠而又方便易行的分析方法。

药代动力学参数显示, 荜草素、牡荆素和槲皮苷在大鼠体内的分布和消除半衰期很短, 在体内平均

滞留时间短; 3 种黄酮成分的血药浓度在大鼠体内都呈现特征性的三室动力学特征; 对低、中、高 3 个剂量组下 3 种物质的 AUC 进行剂量校正后单因素方差分析, 在实验剂量下荜草素表现出了线性药动学的特征, 而牡荆素和槲皮苷则表现出了非线性药动学的特征, 高剂量下代谢酶的饱和可能是产生非线性药动学的原因。由  $c-t$  曲线可以发现, 高剂量组下 3 种物质在 60 min 处出现了一个较小的吸收峰, 与文献中报道黄酮类的药物多存在双峰现象较为一致, 肝肠循环可能是导致此现象的重要原因。

利用质谱全扫描模式发现给药后血浆中有代谢物的色谱峰迅速出现, 提示注射用复方荜草在大鼠体内可能存在比较快速的生物转化。荜草素和牡荆素的碳苷键难以水解, 推测其在体内可能以甲基化和羟基的葡萄糖醛酸化等二相代谢为主, 对于代谢产物的分析还有待进一步的研究。

# HPLC 测定裸花紫珠药材中毛蕊花糖苷的含量

李才堂<sup>1</sup>, 文萍<sup>1</sup>, 郭琦丽<sup>2</sup>, 虞金宝<sup>1\*</sup>

(1. 江西省中医药研究院, 南昌 330046; 2. 江西护理职业技术学院, 南昌 330029)

**[摘要]** 目的: 测定裸花紫珠药材中毛蕊花糖苷的含量。方法: 采用 HPLC, 色谱条件为 Dikma Diamonsil C<sub>18</sub> (钻石) (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 乙腈-0.1% 醋酸 (16:84) 为流动相, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 332 nm, 柱温室温。结果: 毛蕊花糖苷在 8.24~206 mg·L<sup>-1</sup> 线性关系良好 ( $r = 0.9995$ ), 加样回收率为 98.74%, RSD 为 2.31% ( $n = 6$ ), 重复性 RSD 为 2.12% ( $n = 6$ )。结论: 该方法简便可行, 重复性好, 可用于裸花紫珠药材的质量控制。

**[关键词]** 裸花紫珠; 毛蕊花糖苷; 高效液相色谱法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0084-03

## HPLC Determination of Verbascoside in *Callicarpa nudiflora*

LI Cai-tang<sup>1</sup>, WEN Ping<sup>1</sup>, GUO Qi-li<sup>2</sup>, YU Jin-bao<sup>1\*</sup>

(1. Jiangxi Institution of Trational Chinese Medical and Pharmaceutical Science, Nanchang 330046, China;  
2. Jiangxi Care Vocational and Technical College, Nanchang 330046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To determine the content of verbascoside in *Callicarpa nudiflora*. **Method:** HPLC was performed with chromatographic conditions as follows: Dikma Diamonsil C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), the mobile phase of acetonitrile-0.1% acetic acid (16:84), flow rate at 1 mL·min<sup>-1</sup>, and the detection wavelength at 332 nm. **Result:** The linearity of verbascoside was good in the range of 8.24-206 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9995$ ). The average recovery was 98.74%, RSD was 2.31%, with good repeatability RSD was 2.12%, ( $n = 6$ ) **Conclusion:** The method is simple, feasible and reproducible, and can be used to control the quality of C.

**[收稿日期]** 20110511(010)

**[第一作者]** 李才堂, 硕士, 助理研究员, 从事中药新药研发及质量标准, Tel:0791-88501125, E-mail: lic963@sina.com

**[通讯作者]** \* 虞金宝, 研究员, 从事中药制剂及质量控制, Tel:0791-88501404, E-mail: yjb2217@163.com

### [参考文献]

- [1] 张淑贤, 管庆霞. 荛苳的化学成分及药理学研究进展[J]. 黑龙江医药, 2008, 21(5): 97.
- [2] 朱晓新, 李连达, 刘建勋, 等. 牡荆素鼠李糖苷对缺氧再给氧损伤心肌细胞的保护作用研究[J]. 中国天然药物, 2003, 1(1): 44.
- [3] 李钦, 郑晓亮, 陈爱君, 等. 槲皮苷防治溃疡性结肠炎的药效学研究[J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(3): 180.
- [4] 陶玲, 沈祥春, 王永林, 等. 复方荛苳冻干粉针剂对麻醉犬血流动力学的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2006, 31(2): 142.
- [5] 荣华, 李大锋. 复方荛苳冻干粉针剂治疗冠心病心绞

痛(心血瘀阻证)临床研究[J]. 湖北中医杂志, 2008, 30(3): 14.

- [6] 俞建平, 张文婷, 祝明. 高效液相色谱法测定鱼腥草中槲皮苷的含量[J]. 医药导报, 2008, 27(3): 331.
- [7] 潘莹. 大鼠口服川芎和通脉方后阿魏酸的药动学比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 193.
- [8] 童成亮, 刘晓东. HPLC法测定犬血浆中牡荆素及药代动力学研究[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(9): 1149.
- [9] 胡楠, 梁日欣, 王岚, 等. 延胡索提取物在大鼠血浆中的药代动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 186.

[责任编辑 蔡仲德]