

LC-MS-MS 方法测定大鼠血浆中蝉翼素的 药代动力学及代谢物

马玉凤¹, 胡方弟¹, 李文¹, 封士兰^{1*}, 孙秋², 石义凯¹, 毕映燕¹, 胡芳¹, 王珍¹

(1. 兰州大学药学院药物分析教研室, 兰州 730000;

2. 兰州大学第二临床医学院, 兰州 730000)

[摘要] 目的:建立测定蝉翼素血浆药物浓度的液相色谱-电喷雾离子化-质谱(LC-MS-MS)联用的分析方法,探讨其在大鼠体内的药代动力学及其在体内的代谢产物。方法:大鼠灌胃蝉翼素后不同时间点采血,LC-MS-MS法测定血药浓度,拟合药代动力学模型并计算相关药代动力学参数。结果:蝉翼素在 $0.1325 \sim 53.00 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性关系良好($r = 0.9992$),方法学考察均符合要求。日内、日间变异系数(RSD)均 $< 10\%$,精密度和准确度等均符合生物样品分析的要求。结论:该法准确、灵敏、特异,适用于蝉翼素的体内定量分析,蝉翼素在大鼠体内药代动力学过程属于二室模型,蝉翼素吸收后经过胃肠道转化为代谢产物2-甲基丁酸。

[关键词] 液相色谱-电喷雾离子化-质谱;蝉翼素;药代动力学;代谢物

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)10-0112-04

Pharmacokinetics Study and Its Main Metabolite of Pteryxin in Rats by LC-MS-MS

MA Yu-feng¹, HU Fang-di¹, LI Wen¹, FENG Shi-lan^{1*},

SUN Qiu², SHI Yi-kai¹, BI Ying-yan¹, HU Fang¹, WANG Zhen¹

(1. School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;

2. The Second Clinical Medical School, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a LC-MS-MS method to determine pteryxin concentration and its metabolite in rats plasma. **Method:** Blood samples were collected at different time after oral administration of *Peucedanum harry-smithii* var *subglabrum* extract at doses of $80 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. The pteryxin concentration and its metabolite in plasma was determined by LC-MS-MS. Pharmacokinetic parameters were fitted by DAS 2.0 software package. **Result:** The linear range and the average recovery of pteryxin were $0.1325\text{-}53.00 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($r = 0.9992$), and more than 83% ($n = 5$), respectively. The inner and inter-days precision were both less than 10%. **Conclusion:** The method described in this report has high sensitivity and selectivity, and was suitable for pharmacokinetic study of pteryxin. The process of pteryxin in plasma showed two compartment model after oral administration of *Peucedanum harry-smithii* var *subglabrum* extract at doses of $80 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ to rats.

[Key words] LC-MS-MS; pteryxin; pharmacokinetics; metabolite

[收稿日期] 20101222(008)

[基金项目] 甘肃省科技计划项目(1011WCGA162);兰州大学中央高校基本科研业务专项资金(lzujbky-2010-191);教育部“春晖计划”合作科研项目(Z2009-1-62002);兰州大学国家大学生创新性实验计划(101073039)

[第一作者] 马玉凤, 硕士, 研究方向:中药活性成分及质量分析, E-mail:myf08@lzu.cn

[通讯作者] *封士兰, 博导, 教授, Tel: 0931-8915686, E-mail: fengshl@lzu.edu.cn

前胡具有发散风热、化痰止咳的功效^[1],《中国药典》以白花前胡为正品。但由于物种分布地域不同等因素,有50余种伞形科植物在中国、日本、韩国、朝鲜等作为前胡应用^[2]。少毛北前胡 *Recedunum harry smithii* var *subgla brum* 是甘肃地产前胡的主要品种,为前胡的地方习用品种^[3]。蝉翼素在少毛北前胡中含量最高^[4]并作为其生物活性成分之一^[5],具有解痉、抗凝血等药理作用^[6-7]。最新的研究结果表明蝉翼素具有抗肿瘤及抗免疫缺陷病毒的功能,提示有望成为新的肿瘤与艾滋病的预防和治疗药物^[8-9]。本文建立了快速、简便、准确的LC-MS-MS联用技术测定大鼠血浆中蝉翼素的浓度和体内药代动力学,鉴定了蝉翼素代谢物2-甲基丁酸,揭示了蝉翼素在大鼠体内的变化规律。

1 材料

蝉翼素(HPLC测定纯度97%,本实验室自制)经NMR,MS检测确定结构,2-甲基丁酸(纯度98%,购于Alfa Aesar公司);甲醇(色谱纯,德国Merck公司);其他试剂为分析纯;水为纯净水。健康清洁级SD大鼠,雄性,体重(280±20)g,兰州大学动物实验中心提供[合格证号SYXK(甘)2009-2005]。

Waters Alliance 2487HPLC,API 200三重四极杆串联质谱系统(美国Waters);MIKRO22高速离心机(德国Hettich公司)。

2 方法

2.1 色谱条件 Hypersil ODS色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),大连依利特公司,流动相甲醇-水(70:30),流速1 mL·min⁻¹,检测波长323 nm,进样量5 μL,柱温30℃。

2.2 质谱检测条件 ESI正离子模式,干燥气流速8 mL·min⁻¹,温度400℃,雾化气压力20 Psi,毛细管压力5 000 Pa。

2.3 血浆样品的制备 取SD大鼠8只,实验前12 h禁食,自由饮水。灌胃给药,给药剂量为80 mg·kg⁻¹,于给药前及给药后10,30,45 min,1,2,3,4,5,6,8,10,12,24 h分别眼眶静脉丛取血0.5 mL。离心管肝素抗凝,6 000 r·min⁻¹离心20 min。制成血浆,-20℃保存备用。同法取未给药大鼠血制成空白血浆。

2.4 样品预处理 分别精密量取血浆样品500 μL置1.5 mL高速离心管中,加入甲醇1 mL使蛋白质充分沉淀,用超声波(400 W,25 kHz)超声10 min,使

与血浆结合的蝉翼素因蛋白变性而释放出来。涡流混合1 min,离心10 min(6 000 r·min⁻¹),取上清液10 μL进样分析。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性试验 分别进样大鼠空白血浆、蝉翼素对照品和灌胃蝉翼素后大鼠血浆样品,观察大鼠空白血浆样品在蝉翼素出峰位置是否存在干扰。

2.5.2 标准曲线制备 分别各配制不同浓度蝉翼素、对照品血浆混标溶液,使终浓度为0.132 5,2.65,3.975,13.25,53.00 μg·L⁻¹,按照2.3方法处理后,LC-MS-MS检测。

2.5.3 精密度的试验 在标准曲线范围内以大鼠空白血浆各配制蝉翼素高、中、低3个不同质量浓度的样品,按2.3项下血浆样品处理方法处理,在1 d内分别测定5份样品,计算日内精密度;每天各测定1份样品,连续5 d计算日间精密度。

2.5.4 提取回收率 取空白血浆样品0.2 mL,分别各加入蝉翼素(低、中、高浓度)对照液200 μL,各5份,按照2.3方法操作。每份测3次,计算回收率。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 专属性考察 结果表明,在蝉翼素色谱峰处内源性杂质无干扰。见图1。

3.1.2 标准曲线 以峰面积(A)为纵坐标,样品质量浓度(μg·L⁻¹)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 664.5X - 0.992$ ($r = 0.999 2$)。表明蝉翼素在0.132 5~53.00 μg·L⁻¹线性良好,最低定量浓度为0.132 5 μg·L⁻¹。

3.1.3 检测限和定量限的测定 以信噪比(S/N)为3和10时的蝉翼素对照品浓度分别为本LC分析方法的检测限和定量限,该方法的最低检测限为0.053 μg·L⁻¹,最低定量限为0.132 5 μg·L⁻¹。

3.1.4 精密度的试验 结果表明精密度良好,符合药代方法学的要求,见表1。

3.1.5 加样回收率 结果表明回收率试验符合要求,见表1。

3.1.6 稳定性试验 以大鼠空白血浆各配制蝉翼素高、中、低3个不同质量浓度(0.132 5,3.975,53.00 μg·L⁻¹)的样品,各5份,按照2.3项下血浆样品处理方法处理,分别室温放置、冻融2次,发现蝉翼素血浆样品在-20℃,冰箱内冷冻保存,7 d内样品稳定。血浆样品在室温下24 h内稳定。血浆

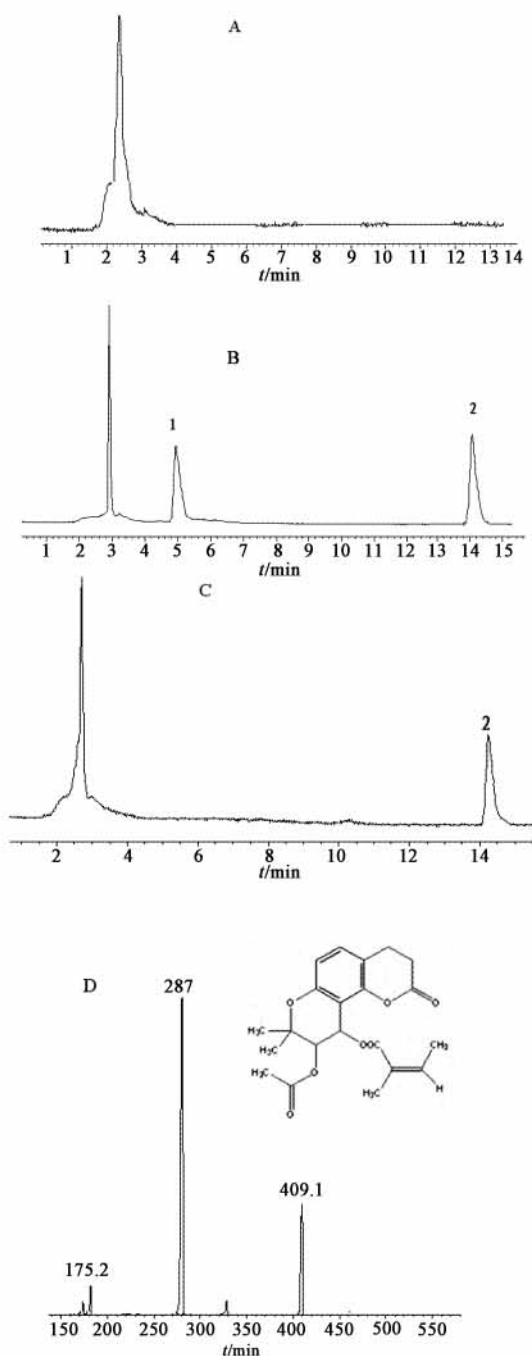


图 1 大鼠空白血浆、含药血浆及对照品液相色谱及质谱

A. 空白血浆; B. 2 h 含药血浆; C. 空白加对照品;
D. 蝉翼素 $[M + Na]^+$ 质谱; 1. 代谢物; 2. 蝉翼素

样品反复冻融 2 次后测定蝉翼素的浓度无明显降低 (RSD < 10%), 结果稳定。

3.2 代谢物的鉴定 在测定不同时间点采集的血样时发现, 蝉翼素峰前有一峰随采血时间不同而有规律变化, 对其作 Q1 扫描, 准分子离子峰 m/z 为 102.1, 再对其做子离子扫描发现, 发现主要碎片离子峰 m/z 为 57.9。同时对蝉翼素的准分子离子

表 1 蝉翼素血浆样品精密度 ($n = 5$) %

加入量 / μg	回收率		日内精密度		日间精密度	
	平均值	RSD	平均值	RSD	平均值	RSD
0.132 5	83.24	8.31	0.14	3.71	0.15	8.31
3.975	85.46	7.17	3.46	5.36	4.17	7.17
53.00	91.27	2.34	51.27	3.82	51.54	2.34

峰的 m/z 为 386, 该化合物准分子离子峰的 m/z 为 102.1 为蝉翼素 10 位断裂的碎片, 推测其为 2-甲基丁酸碎片离子, 同时做了 2-甲基丁酸对照品的质谱图, 结果该代谢物的相对分子质量和主要碎片离子与 2-甲基丁酸相符, 因而确定其为 2-甲基丁酸。

3.3 药代动力学的研究 大鼠灌服蝉翼素在不同时间点采血并按所建立的方法测定其血药浓度, 所得数据经 DAS 2.0 程序拟合药代动力学模型, 计算药代动力学参数, 以理论血药浓度与实测血药浓度相关系数最大且 AIC 值最小为原则, 最终确定蝉翼素在大鼠体内药代动力学符合二室模型, 由图可见, 灌胃 30 min 即可在血中检测到蝉翼素的存在, 大约 2 h 血药浓度达到峰值, 然后下降, 8 h 后就检测不到了。蝉翼素的代谢产物 2-甲基丁酸大约在给药 1 h 可检测到, 并在给药 4 h 达到浓度峰值。其代谢产物在给药 24 h 仍可在血中检出。主要药动学参数见表 2, 平均血药浓度-时间曲线见图 2。

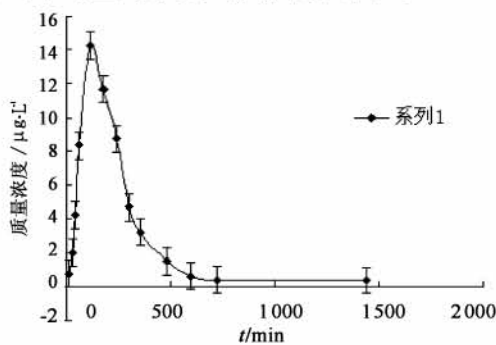


图 2 蝉翼素的药-时曲线

4 讨论

比较了乙腈、甲醇等多种溶剂与水按不同比例混合配制成流动相的分离效果, 结果表明选用甲醇-水溶液 (70:30) 为流动相可以有效分离蝉翼素, 且蝉翼素的保留时间恰当, 分离效果良好, 血浆内源性物质及其他杂质不干扰样品的分离测定。本研究还比较了紫外检测器与荧光检测器测定蝉翼素的差异, 结果表明由于蝉翼素对荧光的吸收较弱, 用荧光检测器检测蝉翼素的灵敏度相对较低, 故选用紫外检测器并用

表2 蝉翼素主要药动力学参数

参数	单位	数值
C_{max}	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	14.278
T_{max}	h	2.000
AUC_{0-t}	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	4 527.477
$AUC_{0-\infty}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	4 527.251
MRT_{0-t}	h	6.685
$MRT_{0-\infty}$	h	36.566
$T_{1/2}$	h	1.012
CL-F	$\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	2 618.832

蝉翼素的最大吸收波长 323 nm 作为检测波长。

比较了乙腈,甲醇,氯仿等溶剂的萃取效果,发现甲醇效果最好,蝉翼素峰型较好,色谱图杂质峰干扰少,且回收率较高(均大于 83%),故选用甲醇对血浆中的蝉翼素进行萃取。

少毛北前胡是甘肃地产前胡的主要品种,当地作为前胡的代用品在当地使用。其中重要的成分是蝉翼素,含量最高达到 0.8% ~ 1.4%^[4]。蝉翼素的药理活性明确,然而未见蝉翼素的药代动力学研究。

血浆样品杂质干扰大,易产生误差,LC-MS-MS 检测灵敏度高,专属性强,需用血浆量较少,利于大鼠连续取血,得到的数据准确,为蝉翼素的临床前研究提供了科学稳定的检测手段。本文使用直接沉淀蛋白法去除血浆杂质,简便快速,重现性好,同时提取回收率也令人满意。

蝉翼素溶解性很小,药液浓度较高时易产生沉淀,影响试验结果。故先采用医用乙醇制成高浓度

再加水稀释,按 $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的量灌胃后不会对大鼠造成伤害。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2000:217.
 [2] 孔令义,裴月期,于荣敏,等.中药前胡的化学和药理研究概况[J].国外医药·植物药分册,1991,6(6):243.
 [3] 宋平顺,丁永辉,张伯崇.甘肃地产前胡的商品调查和原植物鉴定[J].中药材,1994,17(7):13.
 [4] 陈二林,刘小花,李文,等.高效液相色谱法同时测定少毛北前胡中6种香豆素[J].分析化学,2009,37(8):1227.
 [5] 陈二林,封士兰,胡芳弟,等.少毛北前胡的化学成分研究[J].中草药,2009,40(4):525.
 [6] Chen I S, Chang C T, W S Sheen, et al. Coumarins and antiplatelet aggregation constituents from formosan *Pecedanum japonicum*[J]. Phytochemistry, 1996, 41: 525.
 [7] Willette R E, T O Soine, Coumarins I. Isolation, purification, and structure determination of pteryxin and suksdorfins[J]. J Pharm Sci,1962,51(2):149.
 [8] K H Lee. Antitumor agents 231 and Anti-AIDS agents 59. Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product leads[J]. J Nat Prod,2004,67:273.
 [9] Zhang Q, Chen Y, Xia P, et al. Anti-AIDS agents. part 62: anti-HIV activity of 2'-substituted 4-methyl-3',4'-di-O(-)-camphanoyl-(+)-cis-khellautone (4-methyl DCK) analogs[J]. Bioorg Med Chem Lett,2004,14:5855.

[责任编辑 邹晓翠]