

· 药物分析 ·

LC-MS/MS 测定大鼠血浆中虎杖苷浓度

丁雪鹰¹, 侯晓丽², 孙铭学², 肖 凯² (1. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433; 2. 第二军医大学海医系毒物药物研究室, 上海 200433)

[摘要] 目的 建立测定大鼠血浆中虎杖苷浓度的 LC-MS/MS 方法。方法 采用 LC-MS/MS 测定大鼠血浆中虎杖苷的浓度, 以二苯乙烯苷为内标, 血浆样品用乙腈沉淀蛋白, 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 3.5 μm), 流动相为甲醇-乙腈-0.1% 甲酸水溶液 (18: 15: 67), 流速 0.3 ml/min, 柱温 30 °C。结果 虎杖苷的线性范围为 1.0 ~ 5 000.0 ng/ml ($r = 0.998 4$), 最低定量检测浓度为 1.0 ng/ml (S/N > 10), 提取回收率 > 78%, 日内和日间 RSD < 15%。结论 本法操作简单, 选择性好, 灵敏度高, 费时少, 适用于虎杖苷在大鼠体内的药代动力学研究。

[关键词] 虎杖苷; LC-MS/MS; 血药浓度

[中图分类号] R284.1; R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)01-0045-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.01.012

Determination of polydatin in rats plasma by LC-MS/MS

DING Xue-ying¹, HOU Xiao-li², SUN Ming-xue², XIAO Kai² (1. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Laboratory of Toxicology & Pharmacology, Faculty of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To establish a LC-MS/MS method for determination of polydatin concentration in rats plasma. **Methods** The plasma concentration of polydatin was determined by LC-MS/MS. Using stilbene glucoside as internal standard, after precipitation of the plasma proteins with methanol, the analytes were separated on an agilent zorbax SB-C₁₈ reversed-phase column with methanol-acetonitrile-0.1% formic acid (18: 15: 67, v/v) and detected by electrospray ionization (ESI) mass spectrometry in negative multiple reaction monitoring (MRM) mode. The flow rate was 0.3 ml/min. Column temperature was maintained at 30 °C. **Results** The calibration curves with good linearity ($r = 0.998 4$ for plasma sample) were obtained in the range of 1.0 ~ 5000.0 ng/ml for polydatin. The lower limit of quantification (LLOQ) was 1.0 ng/ml. Recoveries were around 78% for the extraction from rats plasma, and good precision and accuracy were achieved. The intra-day and inter-day RSD were both less than 15.0%. This method was feasible for the evaluation of pharmacokinetic profiles of polydatin in rats. **Conclusion** This method was simple, selective and sensitive. It's suitable for the pharmacokinetic research of polydatin in rats plasma.

[Key words] polydatin; LC-MS/MS; plasma drug concentration

虎杖苷 (polydatin, PD) 是从蓼科蓼属——虎杖 (*Polygonum Cuspidatum Sieb. et Zucc*) 的干燥根茎中提取一种单体, 又可称为白藜芦醇苷^[1]。PD 在植物中分布广, 含量高, 具有较强的生物活性。现代药理学研究表明, PD 对心肌细胞、血管平滑肌细胞、抗血小板聚集、改善微循环等有显著作用, 此外还能减轻多种因素造成的组织器官损伤, 具有保护肝细胞, 降血脂及抗脂质过氧化等作用^[2-4]。关于虎杖苷的分析测定方法, 文献报道较

少, 近年来有 HPLC-UV 的文献报道, 但操作过程繁琐, 灵敏度低, 且内源性杂质干扰较大, 很难找到合适的内标^[5-8]。考虑到临床生物样本量大、稳定性差、浓度低、专属性要求高等特点, 本文建立了快速测定大鼠血浆中虎杖苷的 LC-MS/MS 方法, 较文献^[9]样品处理和分析时间显著缩短, 一个样品的测定时间仅需 2.5 min, 一天能测定 500 多个样品, 能快速而简便地分析大量的血浆样品, 为临床试验提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 仪器和药品 Agilent 1200 液相色谱-Agilent 6410 型三重四极杆串联质谱仪 (美国 Agilent 公司); Agilent 6410 B. 01. 03 定量处理软件; 飞鸽牌

[基金项目] 上海市科委中药现代化项目 (08DZ1971504); 国家自然科学基金 (20872179, 30472141)。

[作者简介] 丁雪鹰 (1973-), 女, 博士, 讲师。E-mail: dingxueying@126.com。

[通讯作者] 肖 凯。Tel: (021) 81871129, E-mail: kaixiaoen@gmail.com。

TGL-16G 高速离心机(上海安亭科学仪器厂);旋涡振荡混和器 WL-901 Vortex(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。虎杖苷对照品(含量 99%, 111575-200502);二苯乙烯苷对照品(内标,中国药品生物制品检定所,批号);甲醇、乙腈和甲酸为色谱纯试剂(德国 Merck 公司);水为纯净水。

1.2 色谱分离条件 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈(100×2.1 mm, 3.5 μm),流动相为甲醇-乙腈-0.1% 甲酸水溶液(18: 15: 67),流速为 0.3 ml/min,柱温为 30 ℃。

1.3 质谱分离条件 采用 ESI 离子源,负离子检测,选择 MRM 工作方式进行一/二级质谱分析。用于定量分析的检测离子为:虎杖苷 [M-H]⁻m/z389.3→m/z227.1,内标二苯乙烯苷[M-H]⁻m/z405.1→m/z243.2(见图 1),干燥气流速为 10 L/min,干燥气温度为 350 ℃,雾化气压力为 40 psi,毛细管电压为 4 000 V。

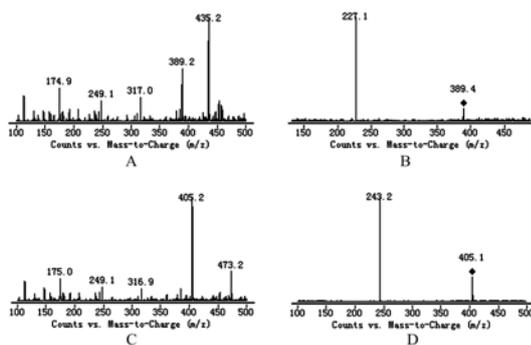


图 1 虎杖苷和内标的 ESI-MS 质谱图

A-虎杖苷全扫描质谱图;B-虎杖苷产物离子质谱图;
C-内标全扫描质谱图;D-内标产物离子质谱图

1.4 血浆样品预处理 取血浆 100 μl 置于 1.5 ml 塑料离心管中,加入 300 μl 甲醇(含内标二苯乙烯苷 100 ng/ml),涡旋振荡 1 min,于 12 000 r/min 高速离心 10 min,取上清液 200 μl 加入 200 μl 流动相,涡旋混匀后取 10 μl 进样,峰面积内标法定量分析。

1.5 体内分析方法学评价 用空白大鼠血浆精密配制成 1.0、2.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0、500.0、1 000.0、2 000.0 和 5 000.0 ng/ml 浓度的虎杖苷标准血浆样品,按 1.4 项下方法操作,制备血浆标准曲线。配制 2.0、20.0、200.0 和 2 000.0 ng/ml 四种不同浓度的虎杖苷血浆质控样品,按 1.4 项下方法操作,进行回收率及日内、日间精密考察。

2 结果

2.1 方法专属性 在上述色谱条件下,虎杖苷和二苯乙烯苷峰形良好,虎杖苷和二苯乙烯苷的保留时间分别为 1.7 min 和 1.8 min(图 2)。血浆中内源

性杂质均不干扰药物的测定。

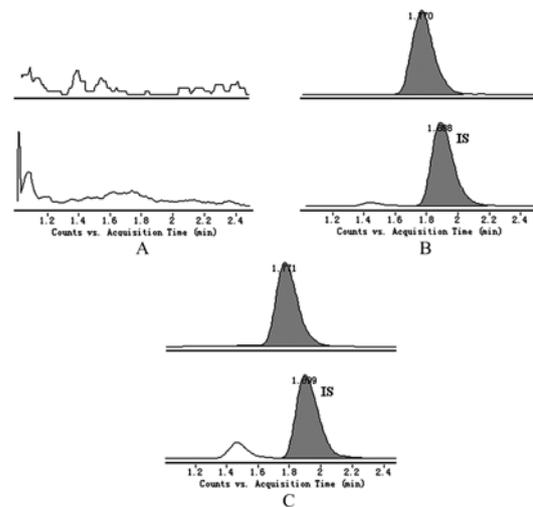


图 2 虎杖苷血浆样品 MRM 色谱图

A-空白血浆样品;B-空白血浆样品添加虎杖苷;C-实测血浆样品

2.2 标准曲线及最低定量限测定 在空白血浆中加入虎杖苷对照品,分别配制浓度为 1.0、2.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0、500.0、1 000.0、2 000.0 和 5 000.0 ng/ml。以对照品峰面积与内标峰面积的比值对浓度作标准曲线,结果表明虎杖苷在 1.0~5 000.0 ng/ml 浓度范围内线性关系良好(采用 1/2 加权),回归方程为 $A = 0.0023c + 0.0892$ ($r = 0.9984$, $n = 11$)。按以上条件得到虎杖苷在血浆中最低定量限为 1.0 ng/ml ($S/N > 10$), RSD 为 13.02%。

2.3 精密性 配制高中低四个不同浓度标准血浆样品,按“1.4”项下操作,测定日间和日内精密性,结果见表 1。

表 1 血浆中虎杖苷的精密性测定 ($n = 5$)

浓度 (ng/ml)	日内		日间	
	$\bar{x} \pm s$	RSD (%)	$\bar{x} \pm s$	RSD (%)
2.0	2.00 ± 0.24	12.23	1.95 ± 0.27	14.06
20.0	19.98 ± 0.73	3.65	19.90 ± 1.56	7.86
200.0	199.53 ± 7.87	3.95	196.17 ± 10.93	5.57
2 000.0	1 979.08 ± 47.96	2.42	1 975.20 ± 42.60	2.16

2.4 提取回收率 配制低、中、高 4 种浓度的标准血样,按“1.4”项下操作。另取虎杖苷标准液,不经提取,进相同量的虎杖苷,记录峰面积,计算提取回收率。结果见表 2。

2.5 方法回收率 配制低、中、高四种浓度的标准血样,按“1.4”项下操作。将测得的浓度与样品配制的浓度相比,得到的结果即为方法回收率。结果见表 3。

表2 血浆中虎杖苷的提取回收率 ($n=5$)

浓度 (ng/ml)	回收率 ($\bar{x} \pm s$)	RSD (%)
2.0	81.09 \pm 4.29	5.41
20.0	78.88 \pm 3.95	3.98
200.0	82.73 \pm 3.74	3.64
2 000.0	81.55 \pm 2.62	2.12

表3 血浆中虎杖苷的相对回收率 ($n=5$)

浓度 (ng/ml)	回收率 ($\bar{x} \pm s$)	RSD (%)
2.0	100.10 \pm 12.24	12.23
20.0	99.88 \pm 3.65	3.65
200.0	99.77 \pm 3.94	3.95
2 000.0	98.95 \pm 2.40	2.42

2.6 稳定性考察

2.6.1 样品在存放期间的稳定性 取大鼠空白血浆数份,分别加入虎杖苷标准溶液,使血浆中虎杖苷的浓度分别为2.0,20.0,200.0和2 000.0 ng/ml,放置在-18℃的冰箱中,分别于第0 d和第30 d取样分析,考察其在存放期间的稳定性,结果见表4。

表4 样品在存放期间稳定性 ($n=3$)

浓度 (ng/ml)	第0 d测得浓度	第30 d测得浓度	RSD (%)
2.0	2.05 \pm 0.23	1.95 \pm 0.31	8.27
20.0	19.92 \pm 0.74	19.96 \pm 1.56	4.65
200.0	199.93 \pm 7.57	195.97 \pm 10.25	3.76
2 000.0	1 978.88 \pm 48.01	1 975.17 \pm 43.60	2.36

以上数据说明该生物样品在-18℃的冰箱中至少能保存30 d。

2.6.2 样品冻融稳定性 取大鼠空白血浆数份,分别加入虎杖苷标准溶液,使血浆中虎杖苷的浓度分别为2.0,20.0,200.0和2 000.0 ng/ml,放置在-18℃冰箱中,然后反复冻融3次测定其浓度,考察其冻融稳定性,结果见表5。

表5 样品反复冻融稳定性 ($n=3$)

浓度 (ng/ml)	未冻融测得浓度 (ng/ml)	第3次冻融测得浓度 (ng/ml)	RSD (%)
2.0	2.02 \pm 0.18	1.96 \pm 0.19	9.61
20.0	19.89 \pm 0.77	18.90 \pm 1.67	9.95
200.0	199.23 \pm 7.35	186.44 \pm 10.93	8.65
2 000.0	19 81.08 \pm 47.67	1 955.33 \pm 42.69	7.12

以上数据说明该生物样品在冻融3次后仍较稳定。

2.6.3 样品在进样器中的稳定性 取大鼠空白血浆数份,分别加入虎杖苷标准溶液,使血浆中虎杖苷的浓度分别为2.0,20.0,200.0和2 000.0 ng/ml,血样预处理后用重组液重组后作HPLC分析。然后

将溶液放在进样器中24 h后取样测定,从而考察样品在重组液中的稳定性,结果见表6。

表6 样品在进样器中的稳定性 ($n=3$)

浓度 (ng/ml)	第0小时测得浓度 (ng/ml)	第24小时测得浓度 (ng/ml)	RSD (%)
2.0	1.92 \pm 0.24	1.98 \pm 0.16	6.49
20.0	19.82 \pm 0.74	19.90 \pm 1.56	3.11
200.0	198.79 \pm 6.97	199.17 \pm 8.93	2.35
2 000.0	1 979.24 \pm 47.96	1 987.15 \pm 42.43	2.14

以上数据说明该生物样品用重组液重组后在进样器中保存24 h后仍较稳定。

3 讨论

本文采用ESI负离子模式,对所测定的虎杖苷及其内标二苯乙烯苷的电离条件进行优化, [M-H]⁻峰容易生成有规律的碎片,便于MS/MS测定,经过优化电离和裂解条件并提高高能打拿极电压,最终可以满足虎杖苷及其内标二苯乙烯苷血药浓度的测定。本实验建立的虎杖苷大鼠血浆样本LC-MS/MS分析方法,可以选择性地检测选定的离子以及该离子所产生的子离子,因而选择性很高,而对LC的分离要求不高,甚至可以不用LC分离而直接将混合样品进入MS进行测定,故可以实现快速分离,分析时间较文献大大缩短^[9],空白血浆无杂质干扰,最低定量检测浓度可达1.0 ng/ml,完全能满足虎杖苷药动力学研究的要求。

对流动相的选择,笔者先后尝试了甲醇-0.1%甲酸水溶液和乙腈-0.1%甲酸水溶液不同比例的溶液混合,结果虎杖苷的峰形均不理想,改用甲醇-乙腈-0.1%甲酸水溶液(18:15:67)混合比例作为流动相时分离效果最好。虎杖苷和内标二苯乙烯苷峰形良好,保留时间适中,且与血浆中内源性物质分离度较好。在研究初期,曾探讨使用甲醇、乙腈等蛋白沉淀剂处理生物样品,结果使用甲醇提取回收率高一些,但若用上清液直接进液质,峰形又特别难看且响应较低,将上清液用水、流动相、0.1%甲酸、0.3%甲酸、0.5%甲酸分别1:1和1:2稀释,结果发现用流动相1:1稀释,提取回收率最高,达78%左右。本实验所需血浆样品量少,前处理采用蛋白沉淀,操作简便,分析测定时间短,在处理大批量血浆样品时可较文献大大减少工作量和节省时间^[9]。

【参考文献】

[1] 肖凯,宣利江,徐亚明,等.虎杖的化学成分研究[J].中国

药理学杂志, 2003, 38(1): 12.

[2] 高守红, 杨少麟, 范国荣. 虎杖苷的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2005, 23(3): 145.

[3] 李蓟龙, 尹京湘, 张力, 等. 虎杖中白藜芦醇对豚鼠左心室流出道自律组织电活动的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2010, 26(3): 311, 364.

[4] 刘铭, 刘华, 张国平, 等. 虎杖苷对脑出血性损伤大鼠血清白细胞介素-1 β 和脑组织 Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 中草药, 2010, 41(12): 2010.

[5] Gao S, Fan G, Hong Z, *et al.* HPLC determination of polydatin in rat biological matrices: application to pharmacokinetic studies [J]. J Pharmaceut Biomed, 2006, 41(1): 240.

[6] 吕春艳, 张兰桐, 袁志芳, 等. 虎杖苷在大鼠体内的药理学特

点和组织分布研究[J]. 中草药, 2006, 38(2): 235.

[7] 林建海, 李笑宏, 唐跃年, 等. 白藜芦醇苷的 HPLC 法分析及其在苗猪体内的药代动力学研究[J]. 药物分析杂志, 2001, 21(05): 325.

[8] 杨润涛, 周四元, 章翔, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定血浆中白藜芦醇苷及其代谢产物[J]. 分析化学, 2007, 35(9): 1309.

[9] Zhou S, Yang R, Teng Z, *et al.* Dose-dependent absorption and metabolism of trans-polydatin in rats [J]. J Agr Food Chem, 2009, 57(11): 4572.

[收稿日期] 2011-02-10

[修回日期] 2011-12-21

(上接第 44 页)

表 2 SD 大鼠静脉注射川阿格雷 15 mg/kg 后主要药理学参数

药理学参数	参数数值
C ₀ (ng/ml)	35 598.71
t _{1/2} (h)	5.47
MRT (h)	1.14
AUC ₀₋₂₄ (h ng/ml)	14 566.6
AUC _{0-∞} (h ng/ml)	14 847.59
CL (L/h/kg)	1.01
Vd (L/kg)	1.15

3.2 预处理条件的选择与优化 液-液提取法, 其优点在于通过对有机溶剂的优化, 可以选择性的提取目标物, 减少内源性物质的干扰, 且回收率较高。本试验考察了乙酸乙酯, 甲基叔丁基醚, 正己烷(含 2% 正丁醇)等提取溶剂。试验结果表明, 样品经乙酸乙酯和正己烷(含 2% 正丁醇)提取后干扰较多; 甲基叔丁基醚提取回收率较高, 且内源性物质及其他物质不影响样品及内标的测定, 因此选用甲基叔丁基醚为提取溶剂。

3.3 色谱条件的选择与优化 分别考察了川阿格雷在 Diamonsil(2) C₁₈(150 mm × 4.6 mm, 5 μ m)、Diamonsil C₁₈(150 mm × 4.6 mm, 5 μ m)、Ultimate C₁₈(150 mm × 4.6 mm, 5 μ m) 和 Heder ODS-2(150 mm × 4.6 mm, 5 μ m) 等色谱柱上的保留情况, 结果表明, 川阿格雷在 Diamonsil(2) C₁₈ 柱上峰型良好, 样品、内标可以实现较好的分离, 内源性物质不干扰样品的测定。

由于川阿格雷在色谱柱上保留较弱, 出峰较早, 故需要选用水相比例较大的溶剂系统。本试验考察了乙腈: 水(20: 80, 30: 70, 40: 60)等溶剂系统。结果表明乙腈: 水(30: 70)时, 川阿格雷出峰时间较合适, 分离度较好。

同时, 流动相的 pH 值对川阿格雷的分离测定有较大影响, 流动相 pH 值降低, 样品和内标的保留时间缩短, 灵敏度增高。本试验选用醋酸-醋酸铵缓冲盐体系, 醋酸铵浓度为 5 mM, pH 为 4.0。在不损伤色谱柱使用寿命的前提下, 使色谱峰型与灵敏度得到了改善。

3.4 内标的选择 内标法定量可以减小样品前处理过程中产生的误差。本试验考察了亚叶酸、对羟基苯甲酸、布洛芬、丹皮酚、桂皮醛等化合物, 实验结果表明亚叶酸、对羟基苯甲酸、丹皮酚等在甲基叔丁基醚提取下, 回收率较低; 布洛芬、桂皮醛回收率较高; 但布洛芬出峰位置与待测物相重叠, 桂皮醛回收率较高, 且出峰位置不与待测物相干扰, 峰形较好, 故选择桂皮醛为内标。

3.5 川阿格雷是运用现代技术合成的抗凝血新药^[3-5], 目前尚未有文献对川阿格雷进行报道。本实验首次建立了血浆样品中川阿格雷分离测定的方法, 并将之用于其在 SD 大鼠体内的药理学研究, 为后续的研究奠定了基础。

【参考文献】

[1] 潘赞红, 金鑫. 川芎嗪与阿魏酸配伍对大鼠心肌缺血再灌注损伤心肌的保护作用[J]. 天津医药. 2008, 36(10): 796.

[2] 杨家荣, 张密霞, 常亮堂, 等. 川芎嗪、阿魏酸及其配伍对心肌缺血再灌注模型大鼠的保护作用及对黏附分子的影响[J]. 中草药. 2008, 39(7): 1054.

[3] 杜希. 氯吡格雷的药理作用与临床评价[J]. 首都医药. 2002, 7: 44.

[4] 李琳, 张临洪, 徐武平. 氯吡格雷联合奥扎格雷钠治疗后循环脑梗死的临床疗效观察[J]. 中国临床神经外科杂志. 2010, 15(8): 474.

[5] 王茜莎, 潘雪刁, 张德志, 等. 奥扎格雷钠对心肌缺血的保护作用研究[J]. 广东药学院学报. 2010, 26(3): 292.

[收稿日期] 2011-04-08

[修回日期] 2011-11-06