

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定大鼠胆汁中人参皂苷 Rg1 及其代谢物

LCMSMS-077

摘要: 建立一种同时测定大鼠胆汁中的人参皂苷 Rg1 及其主要代谢物 Rh1 的超高效液相色谱串联质谱法 (UHPLC-MS/MS) 并用于考察灌胃给予大鼠人参皂苷 Rg1 后代谢及排泄情况。样品经处理后, 用超高效液相色谱 LC-30A 快速分离人参皂苷 Rg1 及其主要代谢物 Rh1, 三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行定量分析。使用内标法在 48.75 ng/mL~39000 ng/mL、20.8 ng/mL~2080 ng/mL 浓度范围内绘制校准曲线, 线性良好, 相关系数为 0.996 以上。对高、中、低三浓度生物样品进行批次内、批次间精密度考察, RSD% 在 13.6 以下, 符合要求。灌胃给予大鼠 Rg1 后, 有 6.97% 的药物以原型或代谢产物的形式通过胆汁排出体外。

关键词: 人参皂苷 Rg1; 药物代谢; 药物排泄; 超高效液相色谱串联质谱法

人参皂苷 Rg1 属于原人参三醇型皂苷, 主要存在于五加科植物人参和三七中, 是其皂苷活性成分之一, 具有多种药理作用。该成分可在肠道内发生脱糖基化过程, 在人肠道内的转化途径为 Rg1 → Rh1 → Ppt, 在大鼠肠道内的代谢途径为 Rg1 → Rh1(F1) → Ppt, 其中 Rh1 和 F1 互为同分异构体。Rg1 的活性显著, 但其口服吸收差, 生物利用度较低, 所以有必要建立合适的检测方法来考察 Rg1 口服后的体内代谢及排泄情况。目前已报道的检测方法有薄层色谱法和高效液相色谱法, 但因为人

参三醇型皂苷紫外吸收很弱, 导致以上方法的灵敏度偏低。同时由于生物样本基质复杂, 使得内源性干扰严重, 这给 Rg1 及其代谢物在体内的准确测定造成了一定困难。为解决上述问题, 本研究建立了快速、灵敏且有效, 能够同时测定大鼠胆汁中的人参皂苷 Rg1 及其主要代谢物 Rh1 的 UHPLC-MS/MS 方法, 并用于定量研究大鼠灌胃给予 Rg1 溶液后 Rg1 在胆汁中的代谢及排泄情况, 为人参皂苷 Rg1 的进一步研究提供了参考。

实验部分

1.1 药物

人参皂苷 Rg1 对照品 (批号 110703-201027), 内标丙酸睾酮 (批号 100008-200505) 购自中国药品生物制品检定所。人参皂苷 Rh1 对照品 (批号 200612), 原人参三醇 (Ppt) 对照品 (批号 200612) 由吉林大学提供, 纯度均大于 95%。

1.2 动物

SD 雄性大鼠 (SPF 级), 250~290 g, 购买于中国食品药品检定研究院实验动物资源中心, 合格证号 SCXK (京) 2009-0017; 实验前大鼠 12 h 禁食, 但自由饮水。

1.3 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD × 2 输液泵, DGU-20A5 在线脱气机, SIL-30AC

自动进样器, CTO-30AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.51 色谱工作站; AG-135 电子天平 (瑞士 Mettler 公司); XW-80A 型微型漩涡混合仪 (金坛市盛蓝仪器制造有限公司); TH2-100 型恒温培养摇床 (上海一恒科技有限公司); 氮气吹扫仪 MD200-2 (杭州奥盛仪器有限公司); Heraeus Pico 21 离心机 (Thermo Scientific, 德国)。

1.4 试剂

乙腈购自美国 Fisher 公司 (Fairlawn, NJ, USA); 实验用水由 Milli-Q Plus 水净化系统 (Millipore, Ltd.) 经去离子与二次净化制得; 甲酸 (纯度 99%, LCMS 级, Wako, Japan); 其余试剂均为分析纯, 购自北京化学试剂公司。

方法和结果

2.1 对照品溶液及内标溶液的配制

精密称取约 2.0 mg 人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rh1、原人参三醇 Ppt 的对照品，置于 10 mL 容量瓶中，加甲醇溶解定容，制成 200 μg/mL 的对照品储备液，从中取出适量溶液置 10 mL 容量瓶中，甲醇定容，等比稀释得到一系列不同浓度的对照品溶液；另精密称取丙酸睾酮约 1.0 mg，置于 10 mL 容量瓶中，加甲醇溶解定容，制成 100 μg/mL 的储备液，吸取 100 μL 储备液至 10 mL 容量瓶中，加入甲醇定容，制成 1 μg/mL 的内标溶液。

2.2 大鼠胆汁样品处理方法

乙醚麻醉大鼠，仰卧位腹正中紧靠剑突位置向下做小切口，在肝脏下方深处找到胆管，小心剪小口做胆管插管，并仔细固定好，待动物清醒后，参照前期药效学实验给药剂量，以 25 mg/kg 剂量灌胃给予 Rg1 水溶液，在给药后 0~3, 3~6, 6~12, 12~24, 24~36, 36~48 h 收集胆汁，13000 r/min 离心 10 min 后取上清备用。

吸取胆汁上清 50 μL，依次加入流动相溶液 100 μL、内标溶液 10 μL、萃取剂乙醚 - 二氯甲烷 - 正丁醇 (2:1:1) 混合溶液 1 mL，涡旋混匀 1 min，300 r/min 震荡 30 min，震荡完毕后在 5000 r/min 下离心 5 min，静置分层，吸取上清液在 40°C 氮气流下吹干，残渣用 100 μL 流动相复溶，13000 r/min 离心取上清，待分析。

2.3 色谱条件

色谱柱：岛津 Shim-pack XR-ODS II (75 mm × 2 mm, 2.2 μm)；流动相：0.05% 甲酸水溶液 (A) - 0.05% 甲酸乙腈溶液 (B)；梯度：0 min (22% B) - 7 min (80% B) - 7.01 min (22% B) - 10 min (22% B)；流速：0.5 mL/min；柱温：40 °C；进样量：5 μL；

2.4 质谱条件

离子化模式：ESI(+)
离子喷雾电压：4.5 kV
雾化气：氮气 3.0 L/min
干燥气：氮气 15 L/min
碰撞气：氩气
DL 温度：250°C
加热模块温度：400°C
扫描模式：多反应监测 (MRM)
驻留时间：20 ms
延迟时间：2 ms
MRM 参数：见表 1

表 1 MRM 优化参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
Rg1	621.4	405.5*	-30	-20	-28
		109.1	-30	-39	-19
Rh1	621.4	441.40*	-30	-10	-30
		203.3	-30	-25	-21
I.S.	345.10	97.10*	-16	-23	-17
		109.15	-16	-25	-18

* 为定量离子对

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性试验

取大鼠生物样品，按“2.2 样品处理方法”进行处理，得到空白样品图谱；将一定浓度的 Rg1、Rh1 的标准溶液和内标加入大鼠空白生物基质中，依法操作，得到相应图谱；以及大鼠给药后的实际样品图谱，上述三者相

比较。结果表明，在此分析条件下，生物基质中内源性物质不干扰检测。Rg1、Rh1、内标的保留时间分别为 1.5 min、2.8 min、6.8 min。实验中发现，在某些样品中，在 2.9 min 处有未知物质出峰，推测该物质为 Rh1 的同分异构体 F1。典型色谱图如图 1。

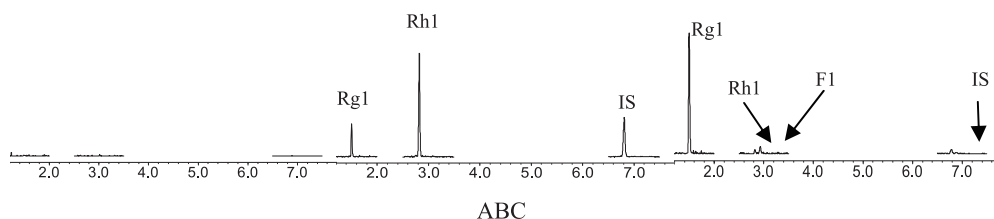


图 1 大鼠胆汁色谱图

A: 空白胆汁 B: 加标胆汁 C: 给药后实际胆汁

2.5.2 线性关系考察

分别取空白生物样品，加入适量的系列浓度标准溶液，配制成系列浓度的模拟生物样品。按“2.2 生物样品处理方法”进行处理后进样。记录各成分与内标的峰面积比值，以浓度与峰面积比值做线性回归绘制标准曲线，结果如表 1 所示。

生物基质	成分	回归方程	r	范围
胆汁	Rg1	$y=0.0003x-0.0068$	0.9955	48.75 ng/mL~39000 ng/mL
	Rh1	$y=0.011x-0.294$	0.9988	20.8 ng/mL ~2080 ng/mL

2.5.3 精密度及回收率试验

分别取空白生物样品，加入适量的对照品标准溶液，配制 Rg1、Rh1 低、中、高三个浓度的 QC 样品，按“2.2 生物样品处理方法”进行处理后进样。每个浓度进行 5 样本分析，连续测定三批，进行回收率和精密度实验，结果见表 2，结果表明，方法的回收率、批内及批间精密度符合要求。

基质	成分	加入量 (ng·mL ⁻¹)	批内精密度 (x±s, n=5)	RSD (%)	批间精密度 (x±s, n=3)	RSD (%)	回收率 (x±s, n=5)	RSD (%)
胆汁	Rg1	97.5	93.44±8.55	9.15	108.30±14.24	13.14	95.84±8.77	9.15
		487.5	455.32±21.22	4.66	484.43±29.62	6.11	93.40±4.36	4.66
		9750	9812.81±579.93	5.91	10649.71±1089.55	10.23	100.64±5.95	5.91
	Rh1	52	52.40±4.95	9.45	61.17±8.35	13.65	100.77±9.52	9.45
		520	534.22±21.34	3.99	527.83±23.49	4.45	102.73±4.11	3.99
		2080	2241.82±149.22	6.66	2239.51±111.24	4.97	107.78±7.18	6.66

2.6 排泄物测定结果

大鼠以 25 mg·kg⁻¹ 剂量灌胃人参皂苷 Rg1 溶液后，测定不同时间段大鼠排泄物中 Rg1 与各代谢产物的含量，并用含量乘以体积后再换算成摩尔量，与总的给药摩尔量相除，得到不同时间段大鼠排泄物中 Rg1 与各代谢产物的排泄比率，结果见表 3~5。

表 4 Rg1 及其代谢产物在大鼠胆汁中的排泄结果 (x±s, n=5)

时间(h)	Rg1		Rh1	
	累积排泄量 (μg)	占总药量 (%)	累积排泄量 (μg)	占总药量 (%)
0-3	138.14±88.07	2.08±1.28	1.29±0.60	0.024±0.012
3-6	56.72±35.53	0.85±0.53	0.77±0.29	0.015±0.006
6-12	57.01±21.83	0.86±0.33	0.50±0.32	0.009±0.006
12-24	125.67±42.70	1.90±0.67	0.97±0.83	0.018±0.015
24-36	71.29±24.28	1.08±0.38	0.69±0.41	0.013±0.008
36-48	7.39±3.34	0.11±0.06	0.34±0.17	0.006±0.003
总计	456.23±173.54	6.88±2.56	4.56±1.15	0.085±0.018

■ 讨论

本文建立使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定大鼠胆汁中 Rg1 及其代谢产物的快速方法，经方法学研究表明满足样品测定要求。大鼠以 25 mg·kg⁻¹ 剂量灌胃 Rg1 后，在胆汁中可检测到原药 Rg1 及其代谢产物 Rh1，所有成分在 48 h 内排泄完全。