

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

LCMSMS-076

摘要：建立一种同时测定大鼠尿液中的人参皂苷 Rg1 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 ~9750 ng/mL 浓度范围内绘制校准曲线, 线性良好, 相关系数为 0.999 以上。对高、中、低三浓度生物样品进行批次内、批次间精密考察, RSD% 在 13.2 以下, 符合要求。灌胃给予大鼠 Rg1 后, 0.038% 的原药通过尿液排出体外。

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, 能够同时测定大鼠尿液中的人参皂苷 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 在尿液的代谢及排泄情况, 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 大鼠尿液样品处理方法

将大鼠放入代谢笼中，以 25 mg/kg 剂量灌胃 Rg1 水溶液，给药毕，将大鼠置代谢笼中，接取尿液并随时移走粪便，尿液用 13000 r/min 离心 10 min 后吸取上清备用。

吸取尿液上清 100 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*	-30.0	-20.0	-28.0
		109.1	-30.0	-39.0	-19.0
I.S.	345.1	97.10*	-16.0	-23.0	-17.0
		109.2	-16.0	-25.0	-18.0

*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，得到相应谱图；以及大鼠给药后的实际样品谱图，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、内标的保留时间分别为 1.5 min、6.8 min。典型色谱图如图 1。

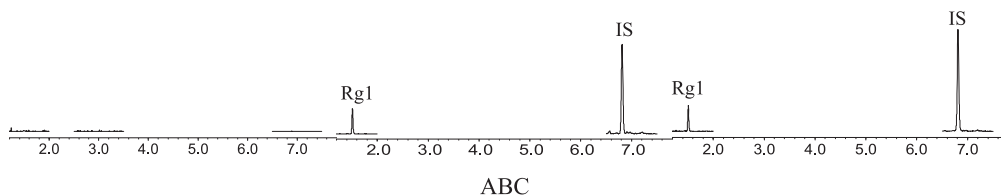


图 1 大鼠尿液色谱图

A: 空白尿液 B: 加标尿液 C: 给药后实际尿液

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，配置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 2 所示。

表 2 线性结果

成分	回归方程	r	范围
Rg1	$y=0.0003x-0.0068$	0.9955	48.75 ng/mL~39000 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 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 3，结果表明，方法的回收率、批内及批间精密度符合要求。

表 3 精密度及回收率结果

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 (%)
尿液	Rg1	121.875	123.35±16.31	13.22	110.08±11.73	10.64	101.21±13.39	13.22
		975	1068.12±88.92	8.32	1073.99±106.17	9.89	109.55±9.12	8.32
		9750	9727.11±974.82	10.02	9997.60±830.22	8.30	99.77±9.99	10.02

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 4。

表 4 Rg1 在大鼠尿液中的排泄结果 (x±s,n=5)

时间 (h)	Rg1	
	累积排泄量(μg)	占总药量(%)
0-4	1.30±0.56	0.023±0.011
4-8	0.42±0.36	0.008±0.007
8-12	0.41±0.44	0.007±0.008
总计	2.13±1.09	0.038±0.021

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 联用测定大鼠尿液中 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，在尿中仅可检验出原药 Rg1，其排泄量在 0 ~ 4 h 最高，在 4 h 以后逐渐减少，在 12 h 内排泄完全。