

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

LCMSMS-078

摘要: 建立一种同时测定大鼠粪便中的人参皂苷 Rg1 及其主要代谢物 Rh1、Ppt 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、Ppt, 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、26 ng/mL~10400 ng/mL、25.5 ng/mL~10200 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、批次间精密度考察, RSD% 在 14.7% 以下, 符合要求。灌胃给予大鼠 Rg1 后, 有 85.2% 的原型药和代谢产物通过粪便排出体外。

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 在尿液粪便的代谢及排泄情况, 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 大鼠粪便样品样品处理方法

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，接取尿液粪便并随时移走粪便，粪便干燥 24 h 后称重，研磨均匀，加入 1:20 倍量体积的甲醇浸泡并超声 15 min，13000 r/min-1 离心 10 min 后取上清备用。

吸取粪便上清 50 μ L，依次加入流动相溶液 100 μ L、内标溶液 10 μ L、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 $^{\circ}$ C 氮气流下吹干，残渣用 100 μ L 流动相复溶，13000 r/min-1 离心取上清，待分析。

2.3 色谱条件

色谱柱：岛津 Shim-pPack XR-ODS II (75 mm \times 2 mm, 2.23 μ m)；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 $^{\circ}$ C；进样量：5 μ L；

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：氦气
DL 温度：250 $^{\circ}$ C
加热模块温度：400 $^{\circ}$ 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	441.4*	-30	-10	-30
		203.3	-30	-25	-21
Ppt	441.2*	123.2*	-21	-23	-21
	423.4	109.15	-20	-30	-18
I.S.	345.1	97.1*	-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、内标的保留时间分别为 1.5 min、6.8 min。典型色谱图如图 1。

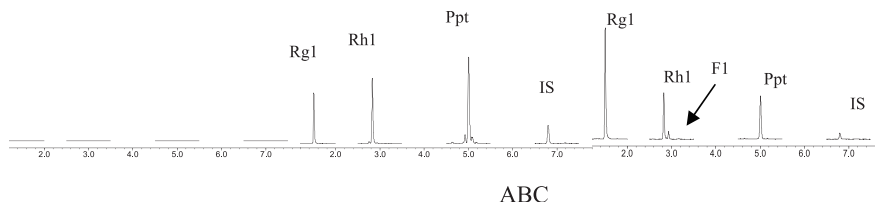


图 1 大鼠粪便尿液色谱图

A: 空白粪便尿液 B: 加标粪便尿液 C: 给药后实际粪便尿液

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	$y=0.0027x+0.1228$	0.9999	48.75 ng/mL ~9750 ng/mL
Rh1	$y=0.025x+1.0344$	0.9999	26 ng/mL ~10400 ng/mL
Ppt	$y=0.009x+0.4697$	0.9997	25.5 ng/mL ~10200 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、Ppt 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

成分	加入量 (ng·mL ⁻¹)	批内精密度 ($\bar{x}\pm s, n=5$)	RSD (%)	批间精密度 ($\bar{x}\pm s, n=3$)	RSD (%)	回收率 ($\bar{x}\pm s, n=5$)	RSD (%)
Rg1	97.5	106.81±4.09	3.81	92.22±12.64	13.70	109.54±4.20	3.81
	487.5	508.80±46.10	9.12	526.99±40.88	7.76	104.37±9.46	9.12
	1950	1983.15±227.20	11.45	1929.45±159.42	8.26	101.70±11.66	11.45
Rh1	52	46.90±6.16	13.13	47.48±6.98	14.68	90.19±11.85	13.13
	520	539.95±66.50	12.31	522.35±62.77	12.02	103.84±12.79	12.31
	2080	2040.75±189.53	9.29	2065.73±199.41	9.65	98.11±9.12	9.29
Ppt	51	58.27±5.61	9.61	51.93±7.46	14.36	114.25±11.00	9.61
	510	539.57±46.72	8.66	536.35±50.80	9.47	105.80±9.16	8.66
	2040	2100.37±141.46	6.74	2072.44±141.72	6.84	102.95±6.94	6.74

2.6 排泄物测定结果

大鼠以 25 mg/kg 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 及其代谢产物在大鼠粪便中的排泄结果 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

时间(h)	Rg1		Rh1		Ppt	
	累积排泄量 (μg)	占总药量 (%)	累积排泄量 (μg)	占总药量 (%)	累积排泄量 (μg)	占总药量 (%)
0-10	-	-	-	-	-	-
10-24	1519.15±696.71	27.43±12.94	491.77±246.63	8.87±4.02	83.26±107.82	4.25±3.06
24-36	754.54±258.70	15.35±1.91	629.36±280.42	11.23±4.34	287.35±292.91	10.56±6.10
36-48	22.36±45.92	0.68±1.06	2.51±2.66	101.48±118.19	6.82±6.31	
48-54	ND	ND	8.14±10.38	0.15±0.16	12.15±7.04	0.79±0.84
54-60	ND	ND	ND	ND	5.00±3.55	0.26±0.24
60-72	ND	ND	ND	ND	3.01±2.39	0.31±0.43
总计	2231.03±684.40	40.11±12.74	1236.36±349.55	22.19±5.80	489.22±363.36	22.88±7.00

■ 结论

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 联用测定大鼠粪便中 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。共有 85.2% 的药物以原型或代谢产物 (Rg1 为 40.11%、Rh1 为 22.19%、Ppt 为 22.88%) 的形式通过粪便排出体外，由胆汁途径排泄的原型或代谢产物占给药量的 6.97% (Rg1 为 6.88%、Rh1 为 0.085%)，仅 0.038% 的药物通过尿液尿液排出体外。