

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定小鼠血浆中芍药内酯苷含量

LCMSMS-142

摘要: 建立一种测定小鼠血浆中的芍药内酯苷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小鼠芍药内酯苷药代动力学情况。样品经处理后, 用超高效液相色谱 LC-30A 快速分离芍药内酯苷, 三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行定量分析。使用内标法在 1 ng/mL~200 ng/mL 浓度范围内绘制校准曲线, 线性良好, 相关系数为 0.9902。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 12.68 以下, 符合 SFDA 报批要求。

关键词: 芍药内酯苷; 药物代谢动力学; 超高效液相色谱串联质谱法

传统中医中药理论研究表明白芍 (毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的根) 味苦、酸, 性微寒, 归肝、脾经。酸性收敛, 有补血敛阴, 柔肝缓急之功, 因而白芍既能养肝血, 又能柔肝体, 最能顺应肝之特性, 为养血柔肝的代表。白芍的主要成分之一芍药内酯苷 (albiflorin, AF) 经现代药理研究表明具有抗癫痫, 镇痛, 戒毒, 止眩晕, 治疗类风湿性关节炎, 治疗细菌性痢疾及肠炎, 治疗病毒性肝炎, 老年性疾病, 抗硫酸钡絮凝和溶解粘液的作用。目前 SFDA 对芍药内酯苷的申报尚属空白, 鉴于此利用高效液相色谱-三重四极杆质谱 (LC-MS/MS) 联用技术, 建立了一种准确、快速、灵敏的芍药内酯苷定量方法以用于该品种的申报。

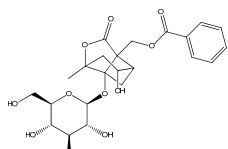


图1 芍药内酯苷结构式

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%, 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 5 mg 芍药内酯苷对照品, 置于 50 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解定容, 配制成 100 μ g/mL 的对照品储备液, 以 20% 甲醇定容后倍比稀释得到一系列不同浓度的对照品溶液 10, 20, 100, 200, 1000, 1800, 2000 ng/mL; 另精密称取栀子苷, 以 20% 甲醇配制成 1500 ng/mL 的内标溶液。

2.2 标准曲线与质控样品的配制

取小鼠血浆 100 μ L, 加入芍药内酯苷系列溶液 10 μ L, 加入内标 10 μ L, 配制成相当于血浆浓度为 1, 2, 10, 20, 100, 200 ng/mL, 按“生物样品处理”项下操作, 记录芍药内酯苷与内标的峰面积, 以浓度为横坐标, 峰面积比值为纵坐标, 绘制标准曲线。

2.3 生物样品处理方法

取小鼠血浆 100 μ L, 加入 10 μ L 内标, 加入 300 μ L 甲醇沉淀蛋白, 14800 rpm 离心 15 min, 取上清 5 μ L 进行 LC-MS/MS 分析。

实验部分

1.1 仪器

芍药内酯苷购自 J&K Scientific Ltd, 内标栀子苷购自中国食品药品检定研究院, 纯度均大于 98%。

1.2 动物

icr 雄性小鼠 (SPF 级), 20 g, 购买于北京大学医学部, 合格证号 SCXK (京) 2011-0012; 实验前小鼠 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 \times 2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.53

2.4 色谱条件

色谱柱采用岛津 Shim-pack XR-ODSII 75 mm×2 mm, 2.2 μm。色谱条件为流动相：甲醇-水 (0.005% 氨水)；梯度：0 min, 20:80；1.01 min, 40:60；3 min, 80:20；3.01 min, 20:80；5 min, 20:80；流速：0.4 mL/min；柱温：40℃；进样量：5 μL；

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

DL 温度：300℃

加热模块温度：450℃

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：30 ms

延迟时间：2 ms

MRM 参数：见表 1

2.5 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

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)
芍药内酯苷	503.00	341.00*	-24.0	-29.0	-22.0
		133.15	-24.0	-46.0	-23.0
I.S.	411.00	216.95*	-20.0	-24.0	-22.0
		202.95	-20.0	-23.0	-19.0

*为定量离子对

2.6 方法学考察

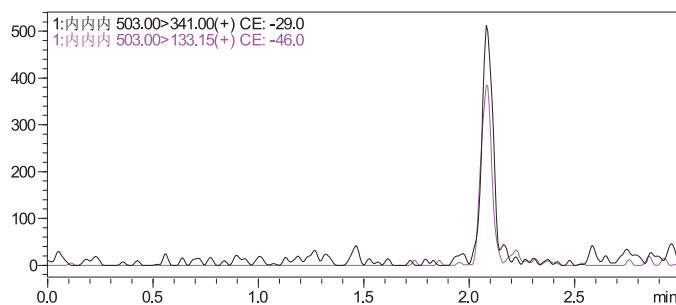


图2 小鼠血浆1 ng/mL色谱图

2.6.1 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“2.3 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

基质	回归方程	r	范围
血浆	$y = 1.7406x + 0.0141$	$r = 0.9902$	1 ng/mL ~200 ng/mL

2.6.2 准确度及精密度

按血浆样品“标准曲线制备”项下方法配置芍药内酯苷的低、中、高浓度的 QC 样品 2, 20, 180 ng/mL。每个浓度进行 5 样本分析，连续测定三批，根据标准曲线，计算 QC 样品的测定浓度，与配制浓度做比，求得准确度及精密度，结果如表 3。

表3 精密度及准确度结果

基质	加入量 (ng/mL)	批内精密度 (x±s, n=5)	RSD (%)	批间精密度 (x±s, n=5)	RSD (%)	准确度 (%)
血浆	2	1.96±0.242	12.35	1.87±0.216	11.55	93.45
	20	20.44±1.89	9.25	20.74±2.63	12.68	103.70
	180	167.37±7.64	4.56	180.13±14.10	7.83	100.07

2.6.3 回收率

取 100 μ L 小鼠血浆，按“标准曲线制备”项下方法配制芍药内酯苷浓度为 2, 20, 180 ng/mL 的样品，每个浓度进行 5 样本分析。同时另取小鼠鼠空白血浆样品，除不加系列标准溶液和内标外，按“标准曲线制备”项下操作，用离心后的上清液制备浓度为 2, 20, 180 ng/mL 的样品，每个浓度 5 样本分析。以前者处理后样品测得峰面积与后者未经处理的样品测得的峰面积相比，考察样品提取回收率，结果如下表。结果表明，芍药内酯苷在小鼠血浆回收率良好。

表4 提取回收率结果

芍药内酯苷 (ng/mL)	2	20	180
提取回收率(%)	95.180	87.240	90.830

2.6.4 稳定性

对芍药内酯苷血浆样品室温放置 24 h 和 4 $^{\circ}$ C 放置 24 h，按标“标准曲线制备”项下制备芍药内酯苷浓度为 2, 20, 180 ng/mL 的样品，进行 5 样本分析；同时制备 QC 样品。通过与内标峰面积比值计算稳定性，结果如下表。结果表明，芍药内酯苷在血浆样品中室温放置 24 h 和 4 $^{\circ}$ C 放置 24 h 条件下稳定性良好。

表4 小鼠血浆中芍药内酯苷的稳定性 (n=5)

芍药内酯苷浓度 (ng/mL)	2	20	180
室温放置 24 h (%)	95.79	89.21	84.61
4 $^{\circ}$ C 放置 24 h (%)	103.97	115.0	99.81

2.6.5 基质效应

小鼠血浆空白样品，除不加系列标准溶液和内标外，按“标准曲线制备”项下操作，用离心后的上清液制备浓度为 2, 20, 180 ng/mL 的样品，每个浓度 5 样本分析。另以水代替血浆配制浓度为 2, 20, 180 ng/mL 的样品，每个浓度 5 样本分析。以前者样品测得的浓度与后者以水代替血浆配制样品测得的峰面积相比，考察样品的基质效应，结果如下表。芍药内酯苷在小鼠血浆中不受基质干扰。

表5 小鼠血浆中芍药内酯苷的基质效应结果 (RE%, n=5)

芍药内酯苷浓度 (ng/mL)	2	20	180
基质效应 (%)	74.00	89.09	87.34

2.7 血浆测定结果

取小鼠 288 只，雌雄各半。平均分为三组，高、中、低剂量组 (14 mg/kg, 7 mg/kg, 3.5 mg/kg) 灌胃给药，每组 96 只。每个采血时间点 8 只雌雄各半，采血时间点为：5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 45 min, 1 h, 1.5 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h。取出血后 5000 rpm 离心 5 min，按照“生物样品处理”下方法处理。按照有效剂量 (7 mg/kg)，计算药代动力学参数，如下表所示。

表6 小鼠芍药内酯苷血浆排泄结果

参数	单位	Mean	SD	RSD/%
AUC _(0-t)	µg/L *min	8.68 × 10 ³	2.77 × 10 ³	31.97
AUC _(0-∞)	µg/L *min	1.28 × 10 ⁴	4.23 × 10 ³	33.01
AUMC _(0-t)		1.61 × 10 ⁶	4.03 × 10 ⁵	24.94
AUMC _(0-∞)		5.54 × 10 ⁶	3.57 × 10 ⁶	64.52
MRT _(0-t)	min	1.90 × 10 ²	30.77	16.23
MRT _(0-∞)	min	4.06 × 10 ²	1.90 × 10 ²	47.01
VRT _(0-t)	min ²	1.61 × 10 ⁴	5.19 × 10 ³	32.33
VRT _(0-∞)	min ²	1.83 × 10 ⁵	1.60 × 10 ⁵	87.51
t _{1/2Z}	min	2.68 × 10 ²	1.52 × 10 ²	56.62
T _{max}	min	45.00	9.49	21.08
CL _z /F	L/min/kg	0.60	0.21	34.99
V _z /F	L/kg	2.16 × 10 ²	1.27 × 10 ²	58.86
Zeta		4.00 × 10 ⁻³	3.00 × 10 ⁻³	75.00
C _z (尾点回归值)	µg/L	10.21	6.19	60.62
C _{max}	µg/L	58.95	39.57	67.12

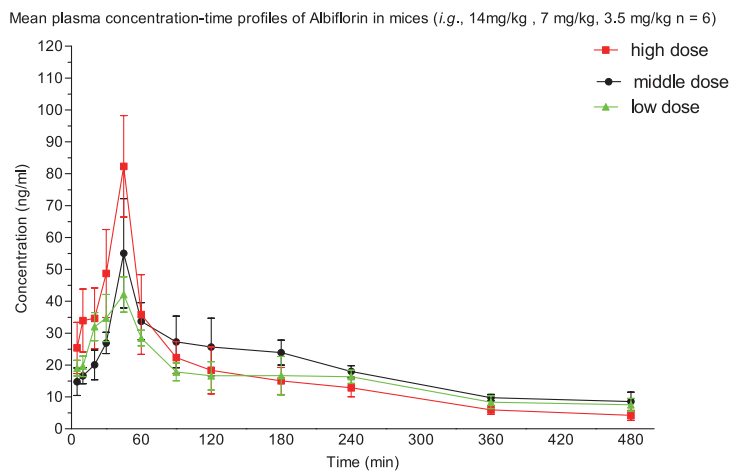


图2 小鼠口服给药后血药浓度图

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 联用测定小鼠血浆中芍药内酯苷的快速方法, 经方法学研究表明线性、精密度、灵敏度均满足样品测定要求。小鼠口服 7 mg/kg 芍药内酯苷, 经 45 分钟达峰, 达峰浓度约为 59 µg/L。