

LC-MS法测定大鼠血浆中银杏内酯 B 的浓度

葛莹莹^{1,2}, 任伟超¹, 陈西敬^{*}, 王悦¹, 俞巧玲¹, 姚自力¹, 赵娣¹, 宋婕¹

(1. 中国药科大学药物代谢动力学研究中心, 南京 210009 2. 信阳市中心医院, 信阳 464000)

摘要 目的: 建立测定大鼠血浆中银杏内酯 B 浓度的 LC-MS 方法。方法: 取大鼠血浆 50 μ L, 加 2.5 mol \cdot L⁻¹ 盐酸 10 μ L 酸化后, 加入内标格列本脲, 以 1 mL 乙醚萃取后取上清液挥干, 用 50% 甲醇 1 mL 溶解, 取 10 μ L 进行 LC-MS 测定。色谱条件: 色谱柱为 Hypersil ODS 2 柱 (5 μ m, 4.6 mm \times 150 mm), 流动相: 甲醇-0.01% 氨水 (52: 48); 流速: 1.0 mL \cdot min⁻¹; 质谱条件: 电喷雾离子化 (ESI) 方式, 以选择性负离子方式检测, 银杏内酯 B 和内标格列本脲的选择检测离子荷质比分别为 m/z 423.1 ($[M-H]^-$) 和 m/z 492.1 ($[M-H]^-$)。结果: 银杏内酯 B 的线性范围为 0.05~10.0 μ g \cdot mL⁻¹, 最低定量限 (LOQ) 为 0.05 μ g \cdot mL⁻¹。准确度、精密度以及稳定性均符合有关要求。结论: 本方法专属性强, 灵敏度高, 线性关系良好, 操作简便, 适用于药代动力学研究。

关键词: 银杏内酯 B; LC-MS 法; 血药浓度

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)01-0048-05

LC-MS determination of ginkgolide B in rat plasma

GE Ying-ying^{1,2}, REN Wei-chao¹, CHEN Xi-jing^{*}, WANG Yue¹,
YU Qiao-ling¹, YAO Zi-li¹, ZHAO Di¹, SONG Jie¹

(1. Center of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. Xinyang Central Hospital, Xinyang 464000, China)

Abstract Objective To develop an LC-MS method for the determination of ginkgolide B in rat plasma. **Methods** The internal standard (glibenclamide) 10 μ L was added to 50 μ L rat plasma acidified by adding 10 μ L 2.5 mol \cdot L⁻¹ hydrochloric acid, then extracted with 1 mL diethyl ether. After transferred and evaporated, the residue was dissolved with 1 mL 50% methanol and determined by injecting 10 μ L to LC-MS system. The analyte was separated on a Hypersil ODS 2 analytical column (5 μ m, 4.6 mm \times 150 mm) with methanol-0.01% ammonium hydroxide (52: 48) as the mobile phase. Analysis was performed at a flow rate of 1.0 mL \cdot min⁻¹. MS determination was in electrospray ionization (ESI) negative mode and in the selected ion monitoring mode (SIM). Ginkgolide B was monitored at m/z 423.1 and internal standard at m/z 492.1. **Results** The assay had a calibration range from 0.05 to 10.0 μ g \cdot mL⁻¹ and the lowest limit of quantification (LOQ) of 0.05 μ g \cdot mL⁻¹ for ginkgolide B. The accuracy, precision (intra-day and inter-day), sensitivity, specificity and stability (in ambient temperature, freeze/thaw, freeze storage) of the method fulfilled the guideline of the analytical validation criteria. **Conclusion** This method is proved to be convenient, sensitive and suitable for pharmacokinetic study of ginkgolide B in rats.

Key words ginkgolide B; LC-MS; drug plasma concentration

银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 是银杏科银杏属唯一生存种, 是我国特有的古树种之一。银杏叶提取物在治疗心脑血管疾病、神经系统疾病及早老年性痴呆等具有显著疗效。银杏叶主要有效成分为黄酮苷和萜类内酯化合物^[1]。近年来, 作为一种具有高度专

属性的血小板激活因子拮抗剂, 银杏内酯受到国内外许多研究人员的关注, 并进行了深入的研究。其中银杏内酯 B 的生理活性最强, 有很高的药用价值^[2], 具有抗炎、抗过敏、抗休克等广泛的生物学作用, 对缺血、缺氧等多种因素引起的心肌损伤有保护

* 通讯作者 Tel: (025) 83271286 Fax: (025) 83969357; E-mail: chenx@jhu.cn

作用^[3]。随着银杏叶提取物制剂在临床上的应用越来越多,对其定性定量分析的研究越来越深入^[4]。

虽然国内外对原料药中银杏内酯含量测定的文献报道较多,包括 HPLC - UV^[5,6] 和 HPLC - ELSD^[7]等。但是由于用药后体内银杏内酯 B 的含量较低,目前对于银杏内酯 B 的血浆浓度测定方法较少^[8]。也有关于犬体内银杏内酯 B 药动学研究^[9],采用梯度洗脱的方法比较耗时,于是本试验在此基础上进一步研究,通过改变色谱条件使测试时间大大缩短,提高了分析工作的效率。本试验研究旨在建立一种专属、灵敏和快速的 LC - MS 法测定大鼠血浆中银杏内酯 B 的药物浓度,为非临床药代动力学研究提供测定方法。

1 仪器与试剂

岛津 LC/MS - 2010EV 液相质谱联用仪,岛津 LC - 20AD,岛津 CBM - 20A,岛津 CTO - 20A。具有二元梯度泵、在线真空脱气机、自动进样器、恒温柱箱、四级杆检测器、电喷雾 (ESI) 接口、MSD 检测器、岛津质谱工作站。XW - 80A 旋涡混合器、1612 - 1 型高速离心机。

银杏内酯 B,南京康琅制药有限公司提供,批号: 051117,含量: 99.73%; 格列本脲 (内标),中国药科大学药化实验室,含量 99.6%。乙腈、甲醇为色谱纯,美国 Tedia 公司产品;其他试剂为分析纯。

系列浓度银杏内酯 B 对照品溶液的配制:精密称量银杏内酯 B 对照品 20 mg 置于 100 mL 量瓶内,加入少许甲醇将其溶解,继续加甲醇至刻度线,摇匀后即得 200 μg · mL⁻¹ 储备液,置冰箱冷藏,待用时将其以 50% 甲醇稀释至所需浓度。

格列本脲内标液的配制:精密称量格列本脲原料药 10 mg 置于 100 mL 量瓶内,加入少许甲醇将其溶解,继续加甲醇至刻度线,摇匀后即得 100 μg · mL⁻¹ 储备液,置冰箱冷藏,待用时将其以 50% 甲醇稀释至所需浓度。

2 色谱条件及质谱条件

色谱条件:采用 Hypersil ODS 2(5 μm, 4.6 mm × 150 mm) 色谱柱,大连依利特科学仪器有限公司;流动相为甲醇 - 0.01% 氨水 (52:48),流速:1.0 mL · min⁻¹。

质谱条件:氮气流量 1.5 L · min⁻¹; CDL 温度 250 °C; 检测器电压 1.6 kV; 银杏内酯 B 检测离子 *m/z* 423.10 内标格列本脲检测离子 *m/z* 492.10 见图 1。

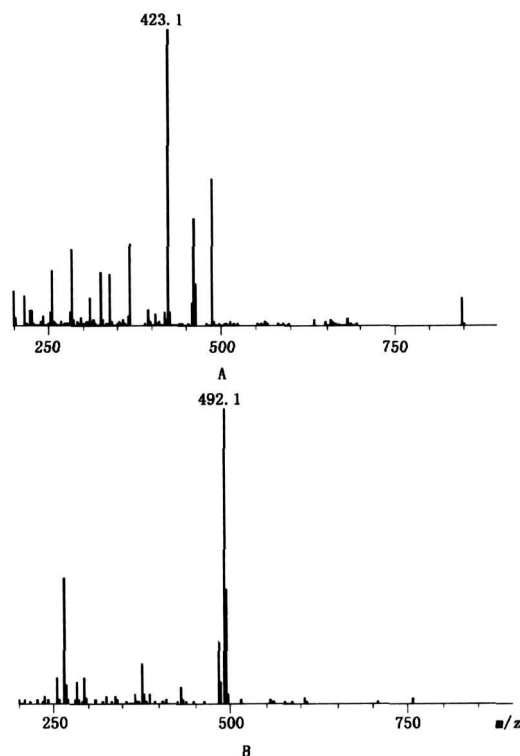


图 1 银杏内酯 B(A)和格列本脲(B)的负离子扫描质谱图
Fig 1 Negative ion mass spectra of ginkgolide B(A) and glibenclamide (B)

3 血样处理与测定

取经 2.5 mol · L⁻¹ 盐酸 10 μL 酸化的大鼠血浆样品 50 μL,加入 2.5 μg · mL⁻¹ 格列本脲内标液 10 μL,待混匀后分别加入乙醚 1 mL 涡旋振荡 5 min,于 12000 r · min⁻¹ 条件下离心 10 min,取上清液 800 μL 移至试管中,50 °C 水浴吹干后加入 50% 甲醇 1 mL 溶解,取 10 μL 进样测定。

4 方法专属性

取空白大鼠血浆、空白血浆加对照品及内标、大鼠给药后的血浆样品各 50 μL,分别按“3”项下方法操作,进样 10 μL,得色谱图 2。测定结果显示:本试验所建立的 LC - MS 法测定银杏内酯 B 及内标峰形良好,无杂质峰干扰,基线平稳。银杏内酯 B 的出峰时间约为 2.7 min,内标的出峰时间约为 2.1 min 见图 2。

5 线性关系及最低定量限

取空白鼠血浆 50 μL 共 10 份,加入 2.5 mol · L⁻¹ 盐酸溶液 10 μL,再分别加入系列浓度银杏内酯 B 对照品溶液 10 μL,制备成浓度为 0.05 0.10 0.20 0.50 1.0 2.0 5.0 10.0 20.0 μg · mL⁻¹ 的对照品血浆,混匀,按“3”项下方法操作,以银杏内酯 B 与格列本脲峰面积比 *Y* 为纵坐标,银杏内酯 B 浓度 *X* (μg · mL⁻¹) 为横坐标进行线性回归,得回归方程:

表 1 大鼠血浆中银杏内酯 B 测定的精密度、准确度及绝对回收率试验结果 ($n = 5$)

Tab 1 Determination results of precision, accuracy and recovery experiments of ginkgolide B in rat plasma

加入值 (added) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	日内 (intra-day) RSD %	日间 (inter-day) RSD %	相对回收率 (relative recovery) $\pm \text{SD} \%$	绝对回收率 (absolute recovery) $\pm \text{SD} \%$
0.1	2.1	10.0	109.8 \pm 2.33	88.97 \pm 5.03
1.0	3.5	3.9	99.63 \pm 3.46	84.21 \pm 3.11
10.0	3.7	0.96	96.35 \pm 3.59	98.57 \pm 9.15

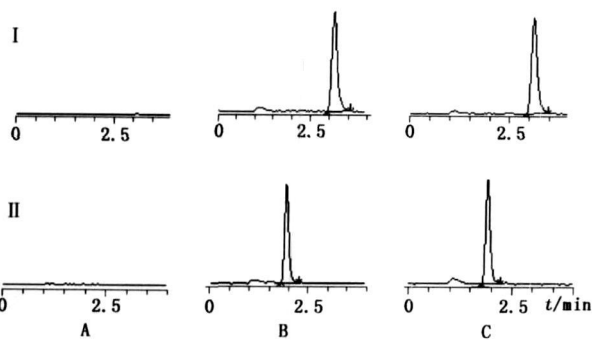


图 2 空白血浆 (A)、空白血浆中加入银杏内酯 B 对照品 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及内标 (B)、大鼠单剂量给药 $10 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后 30 min 血浆样品 (C) LC-MS 色谱图

Fig 2 LC-MS chromatograms of blank rat plasma (A), blank rat plasma spiked with ginkgolide B $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and internal standard (B) and rat plasma sample 240 min after an intravenous dose of $10 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ginkgolide B (C)

I. 银杏内酯 B (ginkgolide B, m/z 423.1) II. 内标格列本脲 (glibenclamide, internal standard m/z 492.1)

$$Y = 2.010X - 0.0204 \quad r = 0.9998$$

银杏内酯 B 的线性范围为 $0.05 \sim 10.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 最低定量限为 $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 见图 3。

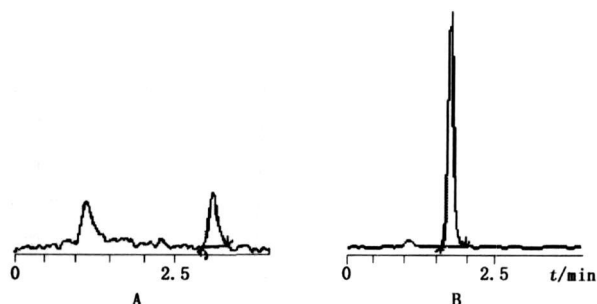


图 3 在最低定量限 $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时银杏内酯 B 的 LC-MS 图

Fig 3 LC-MS chromatograms of ginkgolide B at LOQ = $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

A. 银杏内酯 B (ginkgolide B, m/z 423.1) B. 内标格列本脲 (glibenclamide, internal standard m/z 492.1)

6 精密度、准确度及绝对回收率

取空白血浆 $50 \mu\text{L}$, 加入 $2.5 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 $10 \mu\text{L}$ 后, 精密加入不同量的银杏内酯 B 对照品溶液, 使其浓度分别为 $0.1, 1.0, 10.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 各 5 份, 按“3”项下操作, 分别于 1 d 内不同时间测定, 计算得日内精密度以及相对回收率 (将测量值与理论值比较), 不同浓度的对照品血浆在不同天 (每天测定 1 次, 连续 5 d) 内测定计算日间精密度, 结果见表 1。分别计算 $0.1, 1.0, 10.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品血浆测得值与相应浓度对照品溶液测得值之比, 得绝对回收率, 结果见表 1。

7 稳定性试验

按“6”项下方法配制 $0.1, 1.0, 10.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品血浆, 分别进行室温稳定性试验 (分别于室温条件下放置 0, 2, 4, 8 h)、冷冻稳定性试验 (低、中、高浓度对照品血浆于 -20°C 分别冷冻放置 0, 3, 7, 14 d)、冻融稳定性试验 (低、中、高浓度对照品血浆分别经过以下处理: 第 1 份对照品血浆配制后立即处理测定, 即冻融 0 次; 第 2 份样品于 -20°C 冷冻放置 3 d 后取出冻融处理并测定, 即冻融 1 次; 第 3 份同第 2 份放置, 于第 3 d 取出融化后继续冷冻放置至第 7 d, 然后取出冻融处理并测定, 即冻融 2 次), 然后按照“3”项下方法操作, 测定峰面积。将银杏内酯 B 与格列本脲的峰面积比值代入标准曲线方程, 计算各份对照品血浆实测值之间的相对差异来评估样品的室温、冷冻及冻融稳定性, 得 RSD 分别为 $2.0\% \sim 4.8\%$ 、 $5.3\% \sim 15.5\%$ 、 $3.4\% \sim 12.3\%$, 试验证明银杏内酯 B 在酸性条件下稳定。

8 药动学研究

Sprague-Dawley 大鼠, 体重 $180 \sim 220 \text{g}$ 雌、雄各半, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 静脉注射给药前禁食 12 h。取大鼠 6 只 (雌、雄各半), 按 $10 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量静脉给药。取空白鼠血浆, 次日给药后于 2.5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 min 眼底静脉取血 $100 \mu\text{L}$, 尽快将血样以 $10000 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 分取血浆 $50 \mu\text{L}$ 加入预先加入 $10 \mu\text{L} 2.5 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液的 1.5mL 离心管内, 于 -20°C 保存供测试。测定时, 血浆样品化冻混匀后取 $50 \mu\text{L}$, 按“3”项方法操作, 以随行的标准曲线方程计算各时间点的血药浓度, 测得的药时曲线见图 4 并经 3p87 药动学程序拟合进一步证明静脉给药后银杏内酯 B 在大鼠体内的药动学过程符合二房室模型, 结果见表 2。

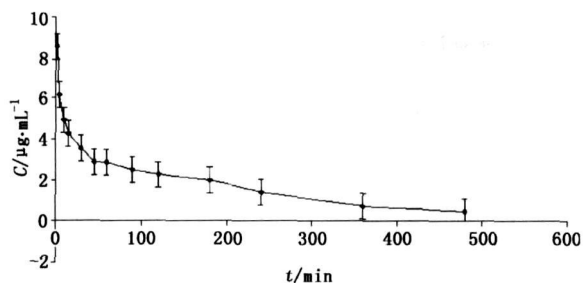


图 4 单剂量静注 10 mg·kg⁻¹银杏内酯 B 后血浆的药时曲线 (n = 6)

Fig 4 Plasma concentration-time curve of ginkgolide B after intravenous injection of 10 mg·kg⁻¹ ginkgolide B (n = 6)

表 2 大鼠静脉注射 10 mg·kg⁻¹银杏内酯 B 后的药动学参数 (n = 6)

Tab 2 Pharmacokinetics parameters of ginkgolide B in rats plasma after intravenous administration of 10 mg·kg⁻¹ ginkgolide B

参数 (parameter)	平均值 (mean)	SD
$t_{1/2\alpha}$ /min	4.9	4.3
$t_{1/2\beta}$ /min	173.2	42.5
V_c /L·kg ⁻¹	0.820	0.412
Cl/L·kg ⁻¹ ·min ⁻¹	0.0106	0.0013
AUC ₀₋₁ /μg·min·mL ⁻¹	814.86	83.78
AUC _{0-∞} /μg·min·mL ⁻¹	937.11	138.64
AUMC ₀₋₁ /μg·min ² ·mL ⁻¹	125037.1	16840.6
AUMC _{0-∞} /μg·min ² ·mL ⁻¹	143730.9	24992.3
MRT /min	153.0	7.9

9 讨论

曾有文献报道^[9]银杏内酯 B 在犬体内的药代动力学研究, 于是参考其色谱条件和样品处理方法, 试图用于大鼠体内药代动力学研究。然而, 在做室温稳定性时发现该药在大鼠血浆中降解较快, 1 h 左右降解将近 50%, 但文献并没有相关报道。于是, 本试验从增加大鼠血浆中银杏内酯 B 的稳定性着手, 曾经尝试过不同浓度的氨水、冰醋酸、磷酸和盐酸, 最终确定 2.5 mol·L⁻¹ 盐酸溶液作为稳定剂能够达到理想效果。因此, 在动物试验设计中, 增加了血样中立即加入稳定剂这一步骤。另外, 考虑到该文献采用梯度洗脱方法的耗时情况, 本试验通过对色谱条件的进一步优化, 使单个样品分析时间缩短为 4 min, 显著提高了工作效率。本试验采用少量血浆, 处理后样品稀释 40 倍后明显降低了基质效应, 相对于文献中犬的采血方法^[9]更适合于微量血样的动物试验药代动力学研究, 方法也更为灵敏、准确。

本试验参照生物利用度和生物等效性试验的指导原则及相关实验方法建立的 LC-MS 方法, 可以准确测定血浆中银杏内酯 B 的含量, 最低定量限为 0.05 μg·mL⁻¹, 绝对回收率 > 90%, 日间日内精密度 RSD < 10%, 银杏内酯 B 及格列本脲均在 5 min 内完成测定, 与文献报道的其他方法^[10]相比高效灵敏, 操作简单。大鼠按剂量 10 mg·kg⁻¹ 静脉注射给药后, 银杏内酯 B 在大鼠体内的处置过程为线性动力学, 其血药浓度的变化特征符合二房室模型, 其中 α 相半衰期为 (4.9 ± 4.3) min, β 相半衰期为 (173.2 ± 42.5) min, 表观分布容积为 (0.820 ± 0.412) L·kg⁻¹。经在药代动力学研究中应用, 验证本法适用于银杏内酯 B 非临床药代动力学研究中血浆样品的测定, 为其药物动力学研究提供了可靠的分析手段。

参考文献

- 1 WANG Xian-rong (王先荣), ZHOU Zheng-hua (周正华), DU An-quan (杜安全), et al. Content of the total terpenic lactones in Ginkgo biloba L. leaves in relation to the various seasons and tree's ages (不同生长季节及生长年限银杏叶总萜内酯含量的相关性研究). *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2000, 31(2): 88
- 2 WANG Hua (王华), HAN Jin-yu (韩金玉), LI Yan (李岩), et al. Preparation of ginkgolides A and B by normal-phase high performance liquid chromatography (正相高效液相色谱法制备银杏内酯 A 和银杏内酯 B). *J Tianjin Univ* (天津大学学报), 2005, 38(11): 955
- 3 YU Li-fang (于力方), LIAO Jie (廖杰), WANG Shan (王珊), et al. Effects of ginkgolide B on cell-cell communication in rat cardiomyocytes (银杏内酯 B 对大鼠心肌细胞间通讯的影响). *Labelled Immunoassay Clin Med* (标记免疫分析与临床), 2006, 13(3): 160
- 4 YOU Qing-hong (游庆红), YIN Xi-lian (尹秀莲), ZHANG Xi (张希). Determination of ginkgolide for Folium Ginkgo by HPLC-ELSD (HPLC-ELSD 法定量分析银杏叶中银杏内酯的研究). *Med World* (医药世界), 2007, 3: 146
- 5 SUN Li-li (孙丽丽), ZHOU Mo (周沫). Determination of total flavonol glycosides and terpenic lactones in Ginkgo leaf tablets (HPLC 测定银杏叶片中总黄酮醇苷和萜类内酯的含量). *West China J Pharm Sci* (华西药学杂志), 2007, 22(2): 201
- 6 LU Ding-qiang (卢定强), OUYANG Ping-kai (欧阳平凯). RP-HPLC determination of terpenic lactones in Ginkgo biloba L. (反相高效液相色谱法测定银杏叶中银杏萜内酯的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2002, 22(1): 70
- 7 YAN Yu-zhen (颜玉贞), XIE Pei-shan (谢培山). Assay of terpenic lactones in Ginkgo biloba leaves by RP-HPLC-ELSD (HPLC-ELSD 法定量测定银杏叶中的 4 种萜类内酯含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2001, 21(3): 173

- 8 ZHAO Zhi- lin(赵志伶), XIA Shi- hai(夏时海), CHEN Hong (陈虹). Progression on clinical and pharmacological study of ginkgolide B(银杏苦内酯 B的临床和药理学研究进展). *Med J Chin PAPF*(武警医学), 2006 17(02): 132
- 9 L Hua Wang Guangji Li Hao *et al*. Sensitive and selective liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry analysis of ginkgolide B in dog plasma *J Pharm Biomed Anal* 2006 40(1): 88
- 10 HUANG Pei- li(黄沛力), QN Ya- ping(秦亚萍), FENG Gao- qian(冯高谦), *et al* GC-MS- SM method for the determination of ginkgolides A and ginkgolides B in dog plasma(GC- MS测定家犬血浆中银杏内酯 A、B的含量). *J Instrum Anal*(分析测试学报), 2004, 23(S1): 46

(本文于 2008年 11月 17日修改回)

全国人大副委员长桑国卫等九位中国工程院院士 被聘为中国药品生物制品检定所高级技术顾问

2008年 12月 7日,中国药品生物制品检定所召开第七届学术委员会成立大会,全国人大副委员长桑国卫院士等九位中国工程院院士被聘为高级技术顾问。桑国卫副委员长出席成立大会并作了热情洋溢的致辞。学术委员会主任委员、党委书记兼所长李云龙为受聘的高级技术顾问、副主任委员、委员颁发了证书并致辞。李连达院士、于德泉院士、陈志南院士、俞永新院士以及学术委员会副主任委员金少鸿、王军志、丽霞和全体委员共 30余人参加了大会。林瑞超研究员代表委员会委员在会上发言。会议讨论并通过了《中国药品生物制品检定所第七届学术委员会章程》。会议由学术委员会秘书长王军志研究员主持。



学术委员会将按照服务于检验检测工作的宗旨,发扬学术民主,保障学术自由,弘扬学术道德,维护学术声誉,把握学术方向,开展学术交流,鼓励学术创新,促进学术发展。为中检所实现“国际一流、国内领先”的发展目标发挥积极的引导和推动作用。

(中国药品生物制品检定所科研处供稿)