

衍生化液质联用法测定大鼠血浆中丹皮酚的浓度

李 迎 阮金秀 张振清

[摘要] 目的 建立灵敏、可靠的衍生化液质联用法测定大鼠血浆中丹皮酚的浓度。方法 血浆样品前处理包括蛋白沉淀和对甲苯磺酰肼为衍生化试剂的衍生化反应,测定采用液质联用法。通过电喷雾电离源以选择离子监测方式进行正离子检测,用于定量分析的离子反应分别为 m/z 335(丹皮酚衍生物)和 m/z 479(内标孕二烯酮衍生物)。色谱分离采用 ZORBAX RX-C₈ 柱(2.1 mm × 150 mm 5 μm),以乙腈-水-甲酸(55:45:0.1)为流动相,流速:0.2 ml/min。结果 测定丹皮酚的线性范围为 2 ~ 2000 ng/ml, r^2 为 0.9993,定量下限为 2 ng/ml,批内 RSD 为 3.2%,准确度控制在 89.7% ~ 115.1% 以内。结论 该法通过衍生化反应,使丹皮酚保留时间增加,基质抑制降低并使检测灵敏度提高,成功地应用于大鼠血浆中丹皮酚的药代动力学研究。

[关键词] 衍生化;液质联用;大鼠血浆;丹皮酚;药代动力学

[中图分类号] R969.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9926(2011)06-0493-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1008-9926.2011.06.07

Quantification of Paeonol in Rat Plasma by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Employing Precolumn Derivatization and Its Application in Pharmacokinetics

LI Ying, RUAN Jin-xiu, ZHANG Zhen-qing

Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

[Abstract] **Objective** To develop a liquid chromatography/mass spectrometry employing precolumn derivatization method for determination of paeonol in rat plasma. **Methods** The sample preparation consisted of a protein precipitation extraction followed by derivatization with toluene sulfonyl hydrazine and was determined by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. The positive ion SIM mode was performed and the detective ions m/z 335 and 479 were used to measure the derivative of paeonol and gestodene (I. S.). Chromatographic separation was achieved using a ZORBAX RX-C₈ (2.1 mm × 150 mm × 5 μm) analytical column with an isocratic mobile phase composed of acetonitrile-water-formic acid (55:45:0.1). The flow rate was 0.2 ml/min. **Results** The method was linear over a concentration range of 2–2000 ng/ml. The LLOQ was 2 ng/ml. The average inter-day precision value averaged 3.2% while the accuracy value was in 89.7%–115.1%. **Conclusion** Using this method, the retention time was greatly improved, and the matrix effect was decreased by chemical derivatization. This method has been successfully applied to the pharmacokinetics of paeonol in rat plasma.

[Key words] derivatization; liquid chromatography/mass spectrometry; paeonol; rat plasma; pharmacokinetics

丹皮酚具有镇静、催眠、解热、镇痛、抗炎、抗菌、抗氧化及抗高血压病、抗心律失常、抗缺血再灌注性损伤、抗动脉粥样硬化等药理作用^[1-3],是六味地黄丸、金匱肾气丸等中成药的主要物质基础之一。文献报道丹皮酚体内测定方法多应用高效液相色谱法

和荧光法^[4,5],由于灵敏度低,常需使用较大血样量,并提取浓缩才能测定。近年来,液质联用成为该药体内测定的主要方法,但是直接应用液质联用法测定,也存在灵敏度低的问题。因此,本文进行了系统的衍生化液质联用法定量测定生物样品中丹皮酚的研究。该法通过衍生化结构修饰,在丹皮酚结构中引入易电离的基团,从而实现提高药物检测灵敏度的目的,也为提高结构类似物检测灵敏度提供了思路。

基金项目:“国家重大新药创制”科技重大专项综合性新药研究开发技术大平台, No. 2009ZX09301-002,“国家重大新药创制”科技重大专项综合性新药研究开发技术单元平台, No. 2009ZX09304-004;国家自然科学基金资助项目, No. 81102498

作者简介:李迎,博士,助理研究员。研究方向:药物代谢与药代动力学。Tel: (010) 66930633; E-mail: liying.sky@126.com

作者单位: 100850 北京,军事医学科学院毒物药物研究所

通讯作者: 张振清, E-mail: zqzhang55@yahoo.com

1 材料

1.1 试药 丹皮酚对照品(中国药品生物制品检

定所);孕二烯酮对照品(内标,含量>99%,北京紫竹药业公司,批号:20050504);对甲苯磺酰肼(衍生化试剂,含量:99%,Sigma-Aldrich公司,批号:14017MD-057);水为去离子水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他均为分析纯。

1.2 仪器 1100 液相色谱/质谱联用仪,包括二元梯度泵、在线真空脱气机、自动进样器、电喷雾接口、质谱检测器、Agilent 化学工作站(美国 Agilent 公司)。离心浓缩仪(美国 LABCONCO 公司);TLL-C 台式高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司);XW-80A 涡旋混和仪(上海青浦沪西仪器厂)。

1.3 动物 Wistar 大鼠,3 只,♂,体质量 160~200 g,清洁级动物(由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物合格证号:SCXK(京 2002-0003))。室温:20~25℃,湿度:45%~60%,12 h 明暗交替,自由摄食、饮水,给药前禁食 12 h。

2 方法与结果

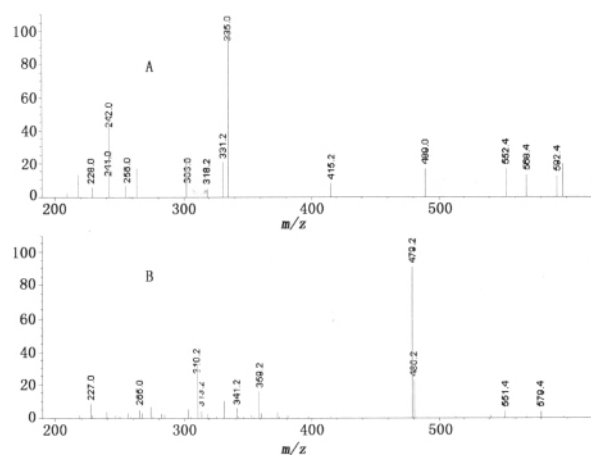
2.1 分析条件 (1) 色谱条件: ZORBAX RX-C₈ 柱(2.1 mm × 150 mm, 5 μm);流动相: 乙腈-水-甲酸(55:45:0.1),流速: 0.2 ml/min;柱温: 40℃;进样量: 10 μl。(2) 质谱条件: 电喷雾离子化(ESI)方式,选择离子检测(SIM)法,检测离子为正离子,喷雾压力 40 psi,干燥气体(N₂),流速: 10 L/min,干燥气体温度 340℃,毛细管电压 4000 V,裂解电压 100 eV。丹皮酚和内标衍生物检测 m/z 分别为 335、479。

2.2 血浆样品处理及衍生化 50 μl 血浆中加入 50 μl 内标溶液并混匀后,再加入 200 μl 蛋白沉淀剂甲醇-乙腈(50:50),涡旋混合 1 min 后 14 000 g 离心 5 min。取 200 μl 上清液在 40℃ 旋转蒸发仪下蒸干,残留物加入 100 μl 1 mg/ml 对甲苯磺酰肼和 50 μl 2% 的三氟乙酸充分涡旋,混匀,在 40℃ 反应 1 h 后,旋转蒸发仪中 40℃ 蒸干,100 μl 流动相复溶后,12 000 r/min 高速离心,取上清液进样 10 μl,进行 LC-ESI-MS 分析。

2.3 数据处理 采用 WinNonlin 5.0.1 软件按房室模型处理药动学参数数据,药代动力学参数由 Win-Nonlin 5.0.1 软件按非房室模型处理。

2.4 质谱分析 在(+) ESI 源的一级全扫描质谱图中,丹皮酚衍生物的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 的 m/z 为 335。孕二烯酮为内标,其衍生物准分子离子峰 $[M+H]^+$ 的 m/z 为 479,将以上离子作为定量分析时监测的离子,见图 1。

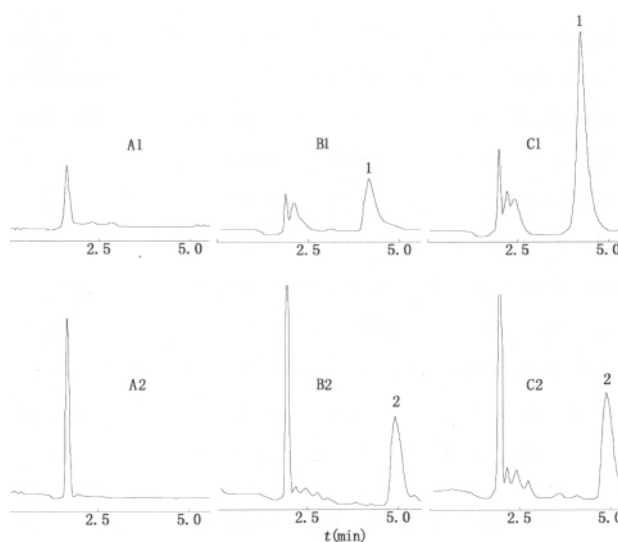
2.5 专属性试验 分别取 3 只大鼠的空白血浆



A: 丹皮酚; B: 内标孕二烯酮

图 1 衍生物的 LC-ESI-MS 离子全扫描质谱图

50 μl, 除不加内标外,按 2.2 项下操作,进样 10 μl,得图 2A;将一定浓度的标准溶液和内标溶液加入空白血浆中,依法操作,得图 2B;取受试大鼠服药后的血浆样品,依法操作,得图 2C。结果表明,大鼠空白血浆对分离检测均无干扰,丹皮酚和内标衍生物的保留时间分别为 4.2 和 4.9 min。



A1、A2: 空白血浆; B1、B2: 血浆外 + 丹皮酚 + 内标;

C1、C2: 血浆样品; 1: 丹皮酚; 2: 内标孕二烯酮

图 2 大鼠血浆样品中衍生物的选择离子监测色谱图

2.6 标准曲线和定量下限 取 50 μl 大鼠空白血浆中分别加入 50 μl 浓度为 0、2、5、20、50、200、500 和 2 000 ng/ml 的丹皮酚标准溶液和 50 μl 内标溶液(50 ng/ml)并混匀后,按照 2.2 项下操作,进样 10 μl,LC-MS 测定($n=3$)。以待测物和内标浓度比(C_i/C_s)为横坐标(X),峰面积比值(A_i/A_s)为纵坐标(Y)(权重: 1/X),得直线回归方程。线性范围为 2~2000 ng/ml,检测下限为 2 ng/ml。

$$Y = 0.334\ 561\ 7 + 0.419\ 580\ 86X, r^2 = 0.9993$$

2.7 精密度与准确度 在同一批次内分别按照 2.2 项下操作处理测定丹皮酚 2、5、200、2000 ng/ml 血浆样品以考察方法的批内精密度和准确度。结果见表 1。

表 1 丹皮酚在大鼠血浆中的批内精密度和准确度($\bar{x} \pm s, n = 3$)

理论浓度 (ng/ml)	测定浓度 (ng/ml)	批内 RSD (%)	准确度 (%)
2	1.9 ± 0.1	3.6	93.1
5	5.5 ± 0.5	8.4	109.1
200	190.6 ± 0.4	0.2	95.3
2 000	2 025.2 ± 11.7	0.6	101.3

2.8 回收率试验 大鼠空白血浆 50 μl, 外加药制成低、中、高 3 种浓度(5、200、2000 ng/ml) 丹皮酚血浆样品, 同时制备不含血浆的相同浓度标准样品, 除不加内标外, 分别按 2.2 所述进行样品处理, 测定峰面积, 计算回收率($n = 3$)。结果表明, 低、中、高 3 种浓度在大鼠血浆中的回收率分别为(85.0 ± 8.4)%、(91.5 ± 6.1)%和(90.4 ± 2.3)%。同法处理内标, 回收率为(91.1 ± 7.8)%。

2.9 基质效应 取大鼠空白血浆, 按照 1:4 的比例加入蛋白沉淀剂甲醇-乙腈(50:50), 涡流混合 1 min 后 12 000 r/min 离心 5 min。取上清外加药制成低、中、高 3 种浓度(5、200、2000 ng/ml) 丹皮酚基质效应样品; 另取流动相为溶剂, 外加药制成相同浓度的标准样品。分别按 2.2 项下所述进行样品处理, 测定峰面积。比较两种处理方法的峰面积比值, 计算基质效应($n = 3$)。结果表明, 低、中、高 3 种浓度在大鼠血浆中的基质效应分别为(87.0 ± 4.8)%、(88.5 ± 7.9)%和(96.7 ± 5.2)%。同法处理内标, 基质效应为(99.7 ± 3.1)%。

2.10 稳定性考察 大鼠空白血浆 50 μl, 外加药制成低、中、高 3 种浓度(5、200、2000 ng/ml) 丹皮酚血浆样品, 分别反复冻融 2 次, 在室温放置 12 h、4℃冻存 24 h 和 -20℃冻存 7 d, 考察丹皮酚在血浆样品中的稳定性。同时, 按 2.2 项下方法操作, 得衍生化产物, 并考查其 4℃放置 12 h 的稳定性, 见表 2。说明丹皮酚在上述条件下稳定性较好, 其衍生物在 4℃放置 12 h 后无显著变化。

2.11 药代动力学试验 3 只大鼠给药前禁食 12 h, 按 3.6 mg/kg 灌胃给予丹皮酚水溶液, 每只大鼠完成一条药-时曲线。于给药前及给药后 2、5、10、15、20、30、45 min、1、2 h, 眼眶静脉取血约 0.2 ml, 置含有肝素的抗凝试管中, 5600 r/min 离心 15 min 分

离血浆, 精密量取血浆 50 μl, 置 -20℃冰箱保存备用, 测定大鼠灌胃给药 3.6 mg/kg 丹皮酚的血浆药物浓度。平均血药浓度-时间曲线见图 3。主要药动学参数包括 AUC_{0-1} 为(5587.7 ± 1569.5) min·ng/ml, $AUC_{0-\infty}$ 为(6030.5 ± 1712.3) min·ng/ml, MRT_{0-1} 为(22.7 ± 2.6) min, $MRT_{0-\infty}$ 为(28.0 ± 5.3) min, C_{max} 为(257.1 ± 57.1) ng/ml, T_{max} 为(6.7 ± 2.9) min, CL 为(0.6 ± 0.2) L/min·kg, V_d 为(20.6 ± 4.1) L/kg。

表 2 丹皮酚在大鼠血浆中的稳定性结果($\bar{x} \pm s, n = 3$)

浓度 (ng/ml)	血浆中丹皮酚浓度(ng/ml)				
	冻融 2 次	室温 12h	4℃24h	-20℃7d	衍生物 4℃12h
5	4.9 ± 0.2	4.8 ± 0.3	5.1 ± 0.2	5.2 ± 0.2	5.1 ± 0.3
200	191.7 ± 7.1	189.8 ± 12.7	209.1 ± 13.1	217.3 ± 12.5	185.1 ± 6.7
2000	1943.3 ± 57.2	1885.3 ± 92.5	2062.7 ± 65.8	2084.0 ± 75.5	1895.1 ± 23.6

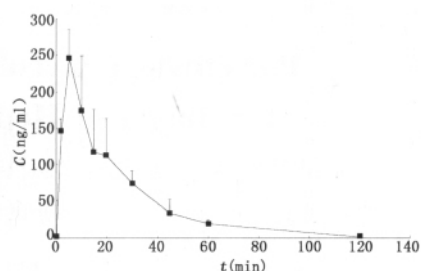


图 3 大鼠灌胃给予丹皮酚的药-时曲线($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论

由于丹皮酚多用于复方制剂中, 且给药剂量较小, 血药浓度较低, 直接沉淀蛋白的前处理样品的方法不能满足体内测定的需要。通过衍生化的方法在分子结构中引入易电离基团, 使药物在液质联用中检测灵敏度大大提高, 可以实现在仅应用 50 μl 血浆的条件下, 完成大鼠体内的药代动力学研究。丹皮酚片剂为 40 mg/片, 按照动物体表面积折算到大鼠约为 3.6 mg/kg, 故给药剂量定为 3.6 mg/kg。

[参考文献]

- [1] 吴晓慧, 吴国荣, 张卫明, 等. 丹皮酚及其磺化物体外抗氧化作用[J]. 南京师大学报(自然科学版) 2005 28(3): 83-85
- [2] 邢国胜, 房德敏, 周咏梅, 等. 丹皮酚的制备及药理作用研究进展[J]. 中草药 2006 37(11): 附 2-附 7
- [3] 孙言才, 沈玉先, 孙国平. 丹皮酚的主要药理活性研究进展[J]. 中药材 2004 26(7): 579-580
- [4] 郭琳, 郭伟英. 丹皮酚制剂不同给药途径在家兔体内的药动学研究[J]. 辽宁医学院学报 2007 28(4): 54-57
- [5] 黄莺, 徐爱良, 余丹辉, 等. 增效荧光法对兔血浆中丹皮酚浓度变化的研究[J]. 湖南中医杂志 1998 5(3): 76-77

(收稿日期: 2011-02-11; 修回日期: 2011-04-28)

(本文编辑 金杨红)