

LC - MS测定大鼠血浆中的薯蓣皂苷元丁二酸单酯

王 凌^{1,2}, 祁 伟^{1,2}, 蒋学华^{1*}, 余洪玲², 及元乔², 刘忠荣²

(1. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041; 2. 地奥制药集团有限公司, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 采用 LC - MS测定大鼠血浆中的薯蓣皂苷元丁二酸单酯 (DSAE)。方法 采用 Zorbax SBC₁₈色谱柱 (150 mm × 2.1 mm, 3.5 μm); 流动相为甲醇 - 0.1% 三氟醋酸水溶液 (97:3); 采用质谱电喷雾法选择离子检测。结果 薯蓣皂苷元丁二酸单酯的线性范围为 0.01 ~ 50.06 μg·mL⁻¹ ($r=0.9983$, $n=7$), RSD 均小于 15%。结论 所建方法灵敏、专属、快速, 适用于薯蓣皂苷元丁二酸单酯的药物动力学研究。

关键词: 薯蓣皂苷元丁二酸单酯; 液相色谱 - 质谱联用; 血药浓度

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1006 - 0103(2008)01 - 0066 - 02

Determination of Diosgenin succinic acid ester in rat plasma by LC - MS

WANG Ling^{1,2}, QI Wei^{1,2}, JIANG Xue - hua^{1*}, YU Hong - ling², JI Yuan - qiao², LIU Zhong - rong²

(1. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. DIAO Pharmaceutical Group Co., Ltd, Chengdu 610041, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To develop an LC - MS method for the determination of Diosgenin succinic acid ester (DSAE) in rat plasma. **METHODS** The mobile phase was consisted of methanol - water including 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) (97:3). Electro-spray ionization (ESI) and selected ion mass (SM) were used. The plasma samples were extracted with ethyl acetate. **RESULTS** The linear range of DSAE was 0.01 to 50.06 μg·mL⁻¹ ($r=0.9983$, $n=7$). The intra and inter day variances were less than 15%. **CONCLUSION** This method is sensitive, specific and rapid. Therefore, it can be used for pharmacokinetic study of DSAE.

Key words: Diosgenin succinic acid ester; HPLC - MS; Concentration in plasma

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006 - 0103(2008)01 - 0066 - 02

薯蓣皂苷元丁二酸单酯 (DSAE)用大鼠心肌缺血所致心肌梗死模型进行的实验表明, DSAE能明显减轻心肌梗死程度, 减少梗死面积, 降低梗死区重量和梗死区占心室及心脏的百分比^[1]。测定大鼠血浆中 DSAE的方法未见报道, 特采用 LC - MS测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1100 - 1946B 液质联用仪包括二元泵、电喷雾电离源 (ESI)、ChemStation Rev. A. 10.02 工作站 (美国 Agilent)。薯蓣皂苷元丁二酸单酯对照品 (DSAE, 自制, 纯度为 99.8%); 丹参酮_A (内标, 中国药品生物制品检定所); 甲醇, 乙酸乙酯为色谱纯; 其余试剂为分析纯; 水为双蒸水。

1.2 方法与结果

1.2.1 检测条件 色谱柱为 Zorbax SBC₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 3.5 μm); 流动相为水 (0.1% 三氟醋酸) - 甲醇 (3:97), 流速 0.2 mL·min⁻¹。质谱条件为电喷雾电离源 (ESI)、电离源电压 30 psi 喷雾气 (N₂) 流速为 8.0 L·min⁻¹、温度为 300 °C、毛细管电

压 3 kV。SM 检测 DSAE m/z 515.2 [M + H], 丹参酮_A m/z 295.2 [M + H]。

1.2.2 溶液的配制 精密称取 10 mg DSAE 对照品, 置 100 mL 量瓶中, 甲醇定容, 得对照品溶液, 4 °C 冰箱中备用。临用时配制所需浓度的溶液。

1.2.3 血浆样品的处理 取 0.5 mL 血浆样品, 加入 100 μL 150 ng·mL⁻¹ 丹参酮_A 内标甲醇溶液、0.5 mL 水、100 μL 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液、5 mL 水饱和乙酸乙酯, 漩涡混合 20 s, 震荡 20 min, 静置 5 min, 取上清液吹干, 用 100 μL 流动相溶解。

1.2.4 方法的专属性 大鼠空白血浆、对照溶液、空白血浆加对照品及大鼠给药后采集的血浆样品所对应的液 - 质分析总离子流图 (图 1A ~ 1D)。在选定的质谱条件下, 测得 DSAE 及内标的质谱图见图 1E、1F。结果表明, 空白血浆中内源性物质和相应的代谢产物、降解产物均不干扰薯蓣皂苷元丁二酸单酯和内标的测定。

1.2.5 线性范围和定量限 现配系列浓度的 DSAE 对照品溶液。取 0.5 mL 空白血浆, 加入 100 μL 各浓度系列的溶液, 配成 0.010、0.050、0.101、

作者简介: 王凌 (1978 -), 女, 成都地奥制药集团有限公司博士后流动站, 从事中药药物动力学研究。

* 通讯作者 (Correspondent author), E - mail: jxh1013@vip.163.com

1.010、5.025、25.125、50.250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品血浆。按“1.2.3 项方法处理,进样分析,建立标准曲线。以血浆中待测物的浓度为横座标,待测物与内标物的峰面积比为纵坐标,进行线性回归,回归方程为: $Y=3.73C+1.01$ ($r=0.9983, n=7$)。线性范围为 0.01~50.06 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,定量下限为 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.2.6 方法精密度 取 0.5 ml 空白血浆,精密加

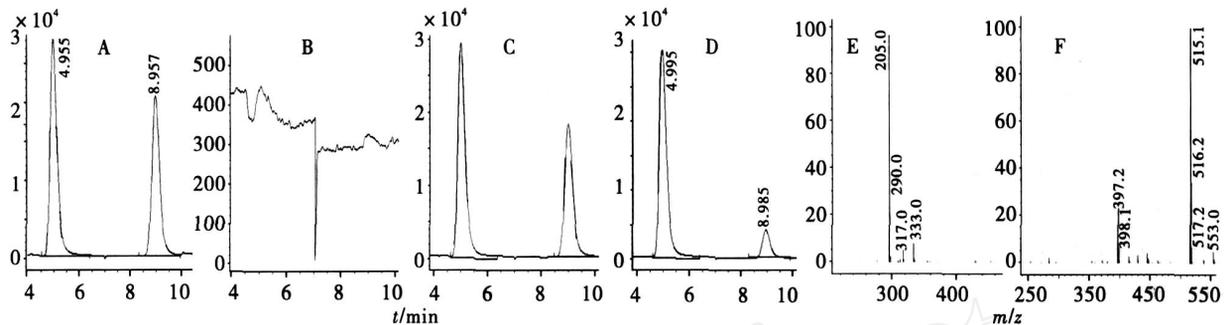


图 1 对照溶液 (A)、空白血浆 (B)、空白血浆 + 对照品 + 内标 (C)、含药血浆样品 (D) 的离子流色谱图及丹参酮 IIA 溶液 (E)、DSA E 溶液 (F) 的质谱图

Fig 1 Iron current chromatograms of control solution (A), blank plasma (B), DSAE and internal standard spiked with blank plasma (C) and samples (D); Mass chromatograms of tanshinone IIA solution (E) and DSAE solution (F)

1.2.7 提取与方法回收率 按“1.2.6 项方法处理,测定。以提取的 DSAE 色谱峰面积与未经提取 DSAE 直接进样的相应浓度的对照品溶液的色谱峰面积之比,考察方法的提取回收率。结果低、中、高浓度的回收率分别为 91.5% \pm 5.0%、82.3% \pm 3.0%、72.4% \pm 1.5%。RSD < 5.5%。按“1.2.6 项方法,配制低、中、高 (0.010、5.025、50.250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 浓度的对照血浆各 5 份,按“1.2.3 项 1.2.1 项条件进行分析,代入线性方程计算浓度。以测得值与加入值的比值计算回收率,得低、中、高浓度的回收率分别为 96.6%、95.8%、94.3%。

1.2.8 样品的稳定性 按“1.2.6 项方法配制低、中、高浓度的对照血浆,分别在室温下放置 0、2、4、6、12 h,按“1.2.3 项方法处理后测定。3 种浓度的 RSD 分别为 5.6%、6.3%、4.5%。峰面积无下降趋势,表明样品在室温放置 12 h 内稳定。取 3 种浓度的对照品血浆各 6 份,置 -20 冰箱中,冻融 3 次,分别测定。结果峰面积无下降趋势, RSD 分别为 7.4%、6.0%、3.9%,表明样品在 3 次冻融过程中稳定。取 3 种浓度的对照血浆, -20 冰箱中放置,分别在 0、3、6、9、12 d 取样测定峰面积,结果峰面积无下降趋势,低、中、高浓度的 RSD 分别为 7.7%、6.5%、3.0%,表明样品在冷冻条件下放置 12 d 内稳定。

1.2.9 血药浓度的测定 实验采用 6 只 SD 大鼠 (200~220 g),每只口服给药剂量 10 mg,按“1.2.3 项方法操作,以当日的标准曲线计算各时

间点的血药浓度,得到血药浓度 - 时间曲线 (图 2)。

间点的血药浓度,得到血药浓度 - 时间曲线 (图 2)。

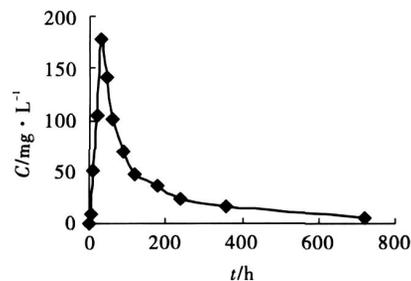


图 2 大鼠给药后的药 - 时曲线图

Fig 2 Plasma concentration - time curve after oral administration of DSAE to rat at doses of 10 mg

2 讨论

薯蓣皂苷元丁二酸单酯 (DSA E) 是在薯蓣皂苷元结构改造中发现的新活性化合物,在物药效和制剂研制中,需进行动物体内的药物动力学研究。该化合物只在低端紫外有吸收,LC-UV 法测定体内血药浓度有一定困难。文中首次建立了大鼠体内 DSA E 血药浓度的测定方法。采用乙酸乙酯萃取法对血浆样品进行前处理,可大大减少 LC-MS 分析过程中的干扰,质谱检测器选择性好,灵敏度高。经方法学研究证明,LC-MS 法能满足药物动力学及生物利用度的研究。

参考文献:

- [1] 王学超,叶仲林,王六堂,等. 薯蓣皂苷元丁二酸单酯衍生物及其制备方法和应用 [P]. CN: 03117182.6, 2004-8-4.

收稿日期: 2006-12