HPLC-MS/MS法同时测定大鼠血浆中水飞蓟宾 A和水飞蓟宾 B及其药代动力学研究

罗学军[1,2], 李伟[2], 韩建平[2], 褚杨[2], 黄艳萍[1*]

(1. 天津医科大学药学院, 天津 300070; 2. 天津天士力集团研究院, 天津 300410)

摘要　目的: 建立大鼠血浆中水飞蓟宾 A和水飞蓟宾 B的测定法, 并用于大鼠体内的药代动力学研究。方法: 采用静脉给药方式, 蛋白沉淀法快速制备样品; 分析柱为 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C_{18} (150 mm × 2.1 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1%的甲酸溶液 (48:52); 质谱条件为 ESI(-)电离方式, 扫描方式为选择性反应监测 (SRM), 范围 m/z 481.1→300.9(水飞蓟宾 A和 B)和 m/z 579.2→271.1(内标)。结果: 分析方法的线性范围水飞蓟宾 A和 B均为 20~50000 ng·mL^{-1}, 样品的检出限均为 20 ng·mL^{-1}, 日内和日间精密度均≤9.1%, 准确度在 ±5.8%之内, 方法的回收率均在 90%以上。药代动力学研究结果表明水飞蓟宾 A和 B在大鼠体内的动力学过程均符合二室模型。对参数计算结果进行非参数检验, 显示其在水飞蓟宾 A和 B间均无显著性差异, 表明二者在大鼠体内有相似的药代动力学行为。结论: 本方法简单、灵敏、稳定可靠, 适合于水飞蓟宾、水飞蓟素及其制剂的药代动力学研究。

关键词: 水飞蓟宾 A; 水飞蓟宾 B; 液-质联用; 药代动力学

中图分类号: R917　　文献标识码: A　　文章编号: 0254-1793(2009)12-2002-05

HPLC-MS/MS study on pharmacokinetics of silybin A and silybin B in rat plasma

LUO Xue-jun[1,2], LI Wei[2], HAN Jian-ping[2], CHU Yang[2], HUANG Yan-ping[*1]

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China;

2. Tasly R&D Institute, Tianjin Tasly Group Co., Ltd, Tianjin 300410, China)

Abstract　**Objective**: To establish an LC-MS/MS method for determination of silybin A and silybin B to study their pharmacokinetics in rat plasma. **Method**: Intravenous administration was used and a simplified protein precipitation with acetonitrile was employed for the rapid sample preparation; The separation was achieved on a Zorbax Eclipse XDB-C_{18} column (150 mm × 2.1 mm, 5 μm), using methanol-water containing 0.1% formic acid (48:52) as the mobile phase. With negative electrospray ionization; The mass spectrometer was operated in selected reaction monitoring (SRM) mode using the transition m/z 481.1→300.9 for both silybin A and silybin B and m/z 579.2→271.1 for naringin, respectively. **Result**: Linear calibration curves were obtained in the concentration range of 20-50000 ng·mL^{-1} with a lower limit of quantitation of 20 ng·mL^{-1} for both silybin A and silybin B, respectively; The intra- and inter-day precision values were below 9.1% and accuracy was within ±5.8% at all three quality control levels, and the recovery of assay were above 90% for both silybin A and silybin B, respectively; Mean plasma concentration-time curves of both silybin A and silybin B were best fitted to two-compartment models in rat. The pharmacokinetic parameters between silybin A and B were no significant difference. It shows that there is a similar pharmacokinetic behavior between silybin A and B in rats plasma. **Conclusion**: The validated method is simple, sensitive, selective and reproducible for the study of the pharmaeokineties of silybin, silymarin or their preparations.

Key words: silybin A; silybin B; LC-MS/MS; pharmacokinetic

* 通讯作者　Tel: (022) 86342611; E-mail: huangyp100@163.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

水飞蓟素(silymarin)是从菊科植物水飞蓟(*Silybum marianum* L. Gaertn)中分离提取的黄酮类化合物[1]。水飞蓟宾(silybin)是水飞蓟素中具生物活性的主要有效成分[2],它是2个非对映体水飞蓟宾A和水飞蓟宾B的混合物(其中A和B的比例约为1∶1)[3]。药理研究表明,水飞蓟素和水飞蓟宾及其制剂对毒性物质所致急性肝损伤都具有显著的预防和治疗作用[4]。

由于水飞蓟宾A和水飞蓟宾B的分离极其困难,水飞蓟宾的药代动力学研究主要以水飞蓟宾为对照品,以HPLC-UV法测定血浆中的水飞蓟宾,但UV法灵敏度较低,且不能真实反映水飞蓟宾A和B各自的药代动力学特征[5~9]。本试验制备了水飞蓟宾A和水飞蓟宾B的对照品,建立了能快速测定大鼠血浆中水飞蓟宾A和B的液-质联用方法,并成功用于大鼠体内水飞蓟宾A和B的药代动力学研究,为水飞蓟宾及其制剂的更为严格的质量控制以及新剂型的研究提供技术支持。

1 仪器、试剂与材料

液-质联用仪(美国Thermo Electron公司),包括:Finnigan Surveyor液相泵,Finnigan Surveyor自动进样器,Finngan Tsq Quantum DiscoveryMAX质谱仪;AG135分析天平(瑞士Mettler Toledo公司);试验大鼠为SD大鼠,购于北京维通利华实验动物技术有限公司;水飞蓟宾由天津天士力制药股份有限公司提供(含量:99.1%,其中含水飞蓟宾A 47.0%的水飞蓟宾B 52.1%,批号20060405);水飞蓟宾A和水飞蓟宾B对照品为实验室自制(含量均大于98.5%),柚皮苷对照品(内标,批号0807-9702)购于中国药品生物制品检定所;甲醇、乙腈为色谱纯(美国Merck公司),水由Mili-Q水纯化系统制备,其他试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 内标溶液、对照品溶液及药液的配制

精密称取柚皮苷对照品10.0 mg,用乙腈配成1 mg·mL^{-1}的内标储备液,取储备液适量用乙腈稀释成200 ng·mL^{-1}的内标溶液。

精密称取水飞蓟宾A对照品,用乙腈配制成浓度为200 μg·mL^{-1}的水飞蓟宾A储备液;取储备液用乙腈稀释成浓度分别为20,50,500,2000,20000,50000 ng·mL^{-1}的水飞蓟宾A的系列对照品溶液。同法配制相同浓度梯度的水飞蓟宾B的系列对照品溶液。

精密称取水飞蓟宾140 mg溶于25 mL混合溶剂[聚乙二醇400-40%的乙醇溶液(1∶1,*v*/*v*)]中,即得水飞蓟宾浓度为5.6 mg·mL^{-1}的注射液(相当于水飞蓟宾A和水飞蓟宾B的浓度分别为2.66 mg·mL^{-1}和2.94 mg·mL^{-1})。

2.2 色谱-质谱分析条件

分析柱为Agilent Zorbax Eclipse XDB-C_{18}(150 mm×2.1 mm,5 μm),预柱为C_{18}保护柱(4 mm×3.0 mm),流动相为甲醇-0.1%的甲酸溶液(48∶52,*v*/*v*),流速为0.25 mL·min^{-1},柱温为30 ℃。质谱条件为ESI(-)电离方式,喷雾电压为3.8 kV,鞘气(N_2)压力为172.4 Pa,辅助气(N_2)压力为20.7 Pa,碰撞气(Ar)压力为22.2 Pa,毛细管温度为390 ℃,扫描方式为选择性反应监测(MRM),碰撞能量(CE)分别为20 eV(水飞蓟宾A和B)和34 eV(内标,柚皮苷),扫描范围*m*/*z* 481.1→300.9(水飞蓟宾A和B)和*m*/*z* 579.2→271.1(内标)。

2.3 样品采集与处理

将水飞蓟宾注射液按28 mg·kg^{-1}的剂量经大鼠尾静脉注射后,于给药前(0 h)和给药后0.17,0.33,0.67,1.0,1.5,2.0,3.0,4.0,6.0,8.0,12.0 h,经大鼠眼球后静脉丛采集静脉血约0.3 mL,置肝素化试管中,于4000 r·min^{-1}离心10 min,分离血浆。取血浆样品100 μL置于1 mL具塞离心管中,依次加入乙腈100 μL,内标溶液100 μL,漩涡振荡1 min,然后于13000 r·min^{-1}离心3 min,取上清液5 μL进行HPLC-MS/MS分析。

3 结果

3.1 分析方法的选择

水飞蓟宾和内标的分子离子峰$[M-H]^-$分别为*m*/*z* 481.1和579.2,并且分别在*m*/*z* 300.9和271.1的子离子峰强度最大,见图1,故分别选择跃迁*m*/*z* 481.1→z 300.9和*m*/*z* 579.2→271.1检测水飞蓟宾和内标。以水飞蓟宾的跃迁*m*/*z* 481.1→300.9,用自动优化方式对质谱参数进行选择和优化。

3.2 分析方法的确证

3.2.1 方法的专属性 在所选的色谱条件下,水飞蓟宾A和B以及内标柚皮苷的色谱图见图2,由图可知,空白血浆中的内源性物质不干扰其测定,说明该方法具有良好的专属性。

3.2.2 标准曲线、线性范围及定量限 以血浆中待测物浓度为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标,用加权($W=1/C^2$)最小二乘法回归,求得血浆中水飞蓟宾A和B的标准曲线,结果见表1,定量限亦归于表1。

3.2.3 方法精密度与准确度 用空白血浆配制水

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

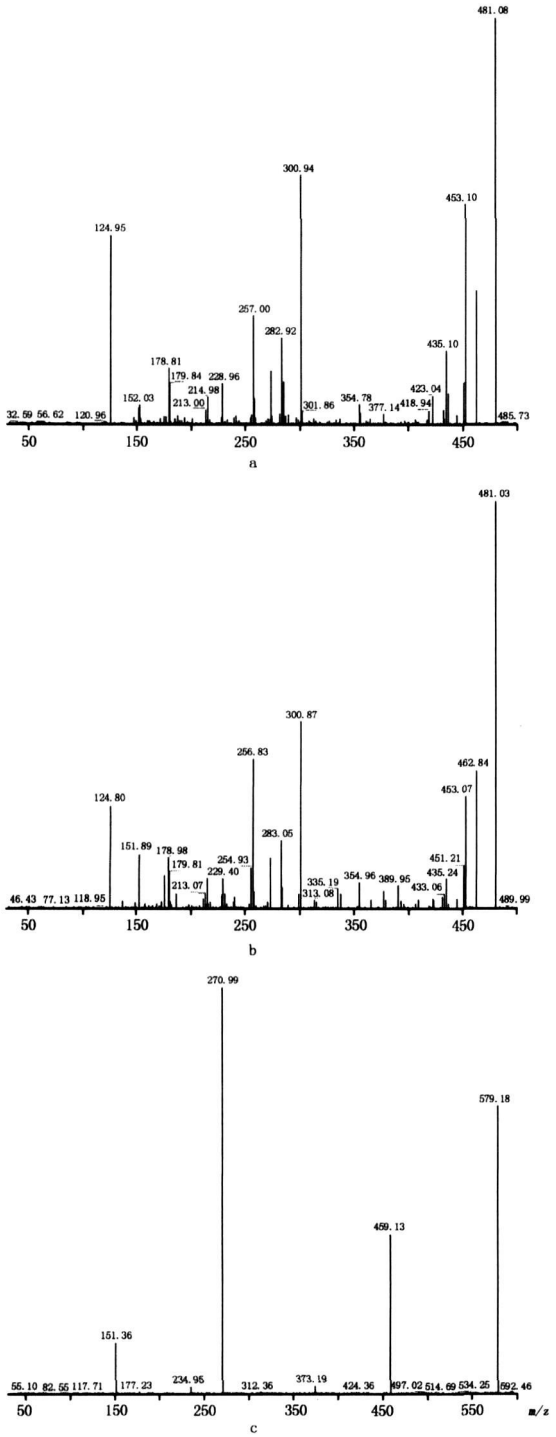

图 1　水飞蓟宾 A(a)、水飞蓟宾 B(b)和内标柚皮苷(c)的分子离子峰

Fig 1　Production mass spectra of [M－H]⁻ ions of silybin A (a), silybin B (b) and naringin (c)

飞蓟宾 A 和 B 低、中、高 3 个浓度(均为 20, 500, 20000 ng·mL⁻¹)的质量控制样品, 每一浓度进行 6 样本分析, 连续测定 3 d, 结果表明水飞蓟宾 A 的日内和日间精密度均≤8.3%, 准确度在 ±5.6%之内, 水飞蓟宾 B 的日内和日间精密度均≤9.1%, 准确

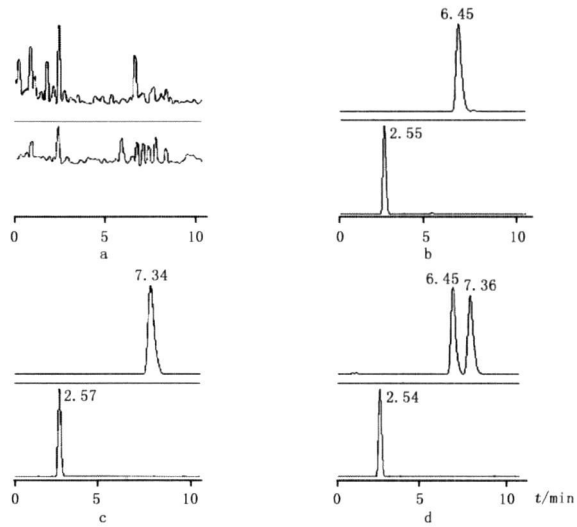

图 2　大鼠血浆中水飞蓟宾 A (6.4 min)、水飞蓟宾 B (7.3 min)和内标 (2.5 min)的选择性反应监测色谱图

Fig 2　SRM chromatograms for silybin A (6.4 min), silybin B (7.3 min) and IS (2.5 min) in rat plasma

a 空白血浆(blank plasma) b 空白血浆加 100 ng·mL⁻¹的水飞蓟宾 A 对照品溶液和内标溶液(blank plasma spiked with 100 ng·mL⁻¹ silybin A and 100 ng·mL⁻¹ IS) c 空白血浆加 100 ng·mL⁻¹的水飞蓟宾 B 对照品溶液和内标溶液. (blank plasma spiked with 100 ng·mL⁻¹ silybin B and 100 ng·mL⁻¹ IS) d. 按 28 mg·kg⁻¹单剂量注射水飞蓟宾(含水飞蓟宾 A 13.3 mg·kg⁻¹和水飞蓟宾 B 14.7 mg·kg⁻¹) 1 h后的样品[a plasma sample 1 h after a single dose of intravenous administration of silybin solution (equivalent to 28 mg·kg⁻¹ silybin, including 13.3 mg·kg⁻¹ silybin A and 14.7 mg·kg⁻¹ silybin B)]

度在 ±5.8%之内。

表 1　水飞蓟宾 A 和 B 的标准曲线及定量限

Tab 1　Linearity, limit of quantitation of silybin A and silybin B

水飞蓟宾 (silybin)	线性关系 (linearity)	r	线性范围 (linear range) /ng·mL⁻¹	LOQ /ng·mL⁻¹
水飞蓟宾 A (silybin A)	$Y = 1.253\times10^{-3}C + 6.32\times10^{-4}$	0.9981	20～50000	20
水飞蓟宾 B (silybin B)	$Y = 1.22\times10^{-3}C + 9.6\times10^{-4}$	0.9959	20～50000	20

3.2.4　方法的回收率　同"3.2.3"项下操作, 配制水飞蓟宾 A 和 B 低、中、高 3 个血浆浓度的质量控制样品(均为 20, 500, 20000 ng·mL⁻¹), 同时用水配制相应浓度的回收率 100%样品。每一浓度均进行 5 样本分析, 按血浆样品和回收率 100%样品中相应物质的峰面积比值计算得到水飞蓟宾 A 和 B 在低浓度 20 ng·mL⁻¹时的平均回收率分别为(95.2±2.2)%, (94.3±5.1)%; 在中浓度 500 ng

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

· mL^{-1}时的平均回收率分别为(93.2±1.7)%,(94.7±4.1)%;在高浓度 20000 ng· mL^{-1}时的平均回收率分别为(95.4±4.5)%,(96.1±1.9)%;内标的平均回收率为(93.8±5.4)%。

3.2.5 样品的稳定性考察 取大鼠空白血浆 100 μL,同"3.2.3"项下配制水飞蓟宾 A和 B低、中、高 3个浓度的质量控制样品(均为 20, 500, 20000 ng· mL^{-1}),考察稳定性,每一稳定性考察进行 6样本分析。结果表明水飞蓟宾 A和 B的血浆样品经历 3次冷冻解冻循环后稳定(RE均在 ±6.2%之内);血浆样品 -20 ℃冷冻放置 20 d稳定(RE均在 ±7.4%之内);血浆样品室温放置 2 h稳定(RE均在 ±2.9%之内);处理后 24 h稳定(RE均在 ±4.8%之内)。

3.2.6 基质效应 取大鼠空白血浆 100 μL,同"3.2.3"项下配制水飞蓟宾 A和 B分别加内标的低、中、高 3个浓度的质量控制样品(均为 20, 500, 20000 ng· mL^{-1}),每一浓度进行 6样本分析。同时用流动相配制水飞蓟宾 A和 B分别加内标的低、中、高 3个浓度的样品(均为 20, 500, 20000 ng· mL^{-1}),每一浓度进行 6样本分析。按相同浓度下血浆样品和无血浆基质样品的峰面积比值计算得到水飞蓟宾 A和 B及内标的基质效应。结果表明,水飞蓟宾 A在低、中、高 3个浓度的基质效应为 88.2% ~ 95.5%,水飞蓟宾 B为 90.4% ~ 98.2%,内标为 102.6% ~ 117.1%。

3.3 药动学研究 大鼠静脉注射水飞蓟宾 28 mg· kg^{-1}(相当于 13.3 mg· kg^{-1}水飞蓟宾 A和 14.7 mg· kg^{-1}水飞蓟宾 B)后水飞蓟宾 A和水飞蓟宾 B的平均血药浓度-时间曲线见图 3,药代动力学参数见表 2。

表 2 大鼠单剂量注射药物后的药代动力学参数(n= 6)

Tab 2 Pharmacokinetic parameters of silybin A and silybin B after a single dose of intravenous administration of silybin solution in rats

参数 (parameters)	水飞蓟宾 A (silybin A)	水飞蓟宾 B (silybin B)
$t_{1/2}$/h	4.07±0.88	2.87±0.39
k_e/h^{-1}	0.18±0.04	0.25±0.03
$AUC_{0\to 12\,h}$/ng· h· mL^{-1}	15892.2±3486.6	22413.2±5198.7
$AUC_{0\to\infty}$/ng· h· mL^{-1}	16078.7±3525.3	22508.0±5217.3
MRT/h	1.05±0.19	1.04±0.20
CL/mL· min^{-1}· kg^{-1}	14.5±3.70	11.46±3.11
V_d/L	5.10±1.64	4.88±0.94

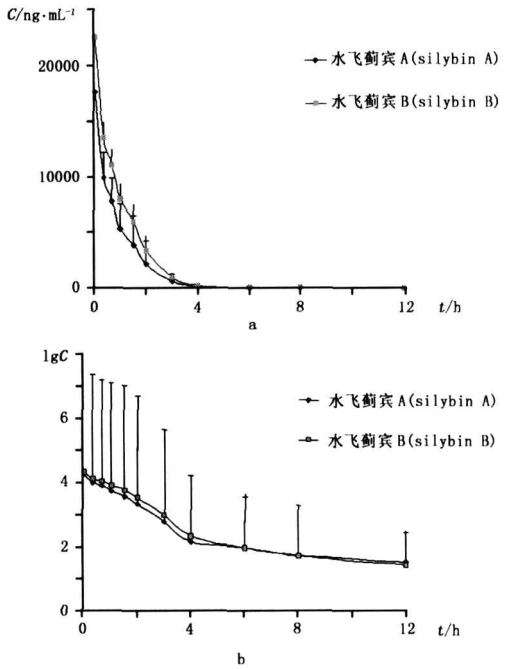

图 3 6只大鼠按 28 mg· kg^{-1}静脉注射水飞蓟宾(含水飞蓟宾 A 13.3 mg· kg^{-1}和水飞蓟宾 B 14.7 mg· kg^{-1})后水飞蓟宾 A和 B的平均药时曲线图(n= 6)

Fig 3 Mean plasma concentration-time profiles of silybin A and silybin B after intravenous administration of silybin solution in rats (equivalent to 28 mg· kg^{-1} silybin, including 13.3 mg· kg^{-1} silybin A and 14.7 mg· kg^{-1} silybin B)

a 正常坐标图(normal coordinates figure) b 半对数坐标图(semilogarithmic coordinates figure)

4 讨论

HPLC-UV法测定生物样本中的水飞蓟宾,由于灵敏度不足,通常要使用烦琐的液-液或液-固萃取方法[5~9],使操作烦琐耗时,且该法仅适用于对水飞蓟宾脂质体等特殊制剂,而对血浆中的水飞蓟宾原料药无法检测[7,8]。本实验采用 HPLC-MS/MS法大大提高了测定的灵敏度,故灵敏度不再是选择样品处理方法的首要因素。实验中采用乙腈作为内标的溶剂,巧妙地运用了有机溶剂蛋白沉淀法,当乙腈与血浆样品为 2∶1时可以沉淀血浆中绝大部分的蛋白,大大节省了分析时间。

就水飞蓟宾 A、水飞蓟宾 B和内标柚皮苷的分析,对大气压化学电离(APCI)和电喷雾(ESI)2种电离方式进行了比较,结果显示电喷雾的灵敏度远高于前者;对正离子和负离子 2种电离模式进行了比较,结果显示负离子模式的灵敏度远高于前者,故选用电喷雾和负离子模式。

采用 Topfit 2.0药代动力学软件对水飞蓟宾 A和水飞蓟宾 B的平均血药浓度进行房室模型拟合,

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

静脉给药后水飞蓟宾 A 和水飞蓟宾 B 在大鼠体内的动力学过程均符合二室模型。计算所得的药代动力学参数经非参数检验,显示其在水飞蓟宾 A 和 B 之间均无显著性差异,表明水飞蓟宾 A 和 B 在大鼠体内有相似的药代动力学行为。文献[9]中作者采用静注方法得到水飞蓟宾葡甲胺在犬体内的动力学也符合二室模型,而文献[8, 10]中作者分别以灌胃和口服给药得到水飞蓟宾磷脂复合物和水飞蓟素亚微粒胶囊中的水飞蓟宾在大鼠体内却符合一室模型。可能原因是水飞蓟宾通过被做成磷脂复合物或其他特殊形式后能增大其在体内的吸收,其次,与不同的给药方式以及受试对象间的种属差异也不无关系[11],具体哪一方面是首要因素还需要进行进一步的研究。

4 结论

采用 HPLC-MS/MS联用技术,建立了分别测定大鼠血浆中水飞蓟宾 A 和水飞蓟宾 B 的检测方法,具有快速、灵敏、稳定可靠等特征,适合于水飞蓟宾、水飞蓟素及其制剂的药代动力学以及剂型改进等进一步研究需要。

参考文献

1 LI Wei(李伟), GAO Jun(高钧), DING Ning(丁宁), *et al*. Relative bioavailability of silybin-phosphatidylcholine compound(水飞蓟宾-卵磷脂复合物对水飞蓟素胶囊的相对生物利用度研究). *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2006, 15(10): 817

2 Kvansnicka F, Biba B, Sevcik R. Analysis of the active components of silymarin. *J Chromatogr* A, 2003, 990(2): 239

3 Vladimir K, Daniela W. Silybin and silymarin- new effects and applications. *Biomed Papers*, 2005, 149(1): 29

4 Wellington K, Jarvic BS. A review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *Bio Drugs*, 2001, 41(12): 465

5 Xiao YY, Song YM, Chen ZP, *et al*. Preparation of silymarin proliposome: A new way to increase oral bioavailability of silymarin in beagle dogs. *Int J Pharm*, 2006, 307: 77

6 Wu JW, Lin LC, Hung SC, *et al*. Analysis of silibinin in rat plasma and bile for hepatobiliary excretion and oral bioavailability application. *J Pharma Biomed*, 2007, 45: 635

7 XIAO Ye-yu(肖衍宇), SONG Yun-mei(宋赟梅), CHEN Zhi-peng(陈志鹏), *et al*. Preparation of silymarin proliposomes and its pharmacokinetics in rats(水飞蓟素前体脂质体的制备和大鼠药代动力学的研究). *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2005, 40(8): 758

8 ZHAO Nuan(赵暖), LUAN Li-biao(栾立标). Recent development in pharmacokinetics and pharmacodynamics of silybin-phosphatidylcholine complex(水飞蓟宾-磷脂复合物的药代动力学和药效学研究进展). *Prog Pharm Sci*(药学进展), 2006, 30(7): 295

9 WANG Xiao(王霄), YIN Li-fang(尹莉芳), ZHOU Jian-ping(周建平), *et al*. Determination of silybin meglumine concentration in dog plasma by RP-HPLC(HPLC法测定犬血浆中的水飞蓟宾葡甲胺). *Chin J Nat Med*(中国天然药物), 2006, 4(3): 207

10 ZHANG Zi-ran(张自然), CHEN Man-cang(陈满仓), HE Jun(何军), *et al*. Bioavailability of silymarin-loaded nanoparticles(水飞蓟素亚微粒胶囊体内药代动力学研究). *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2008, 30(3): 337

11 CHEN Win(陈玟), LU Shi-jia(刘史佳), ZHANG Jun(张军), *et al*. Pharmacokinetic study of silybin in beagle plasma(水飞蓟宾片在犬体内的药动学研究). *Jiangsu Pharm Clin Res*(江苏药学与临床研究), 2005, 13(6): 1

(本文于 2009年 8月 14日修改回)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net