

高效液相色谱-串联质谱法测定大鼠血浆中淫羊藿素

刘海培^{1,2}, 孟繁华¹, 郭继芬^{1*}, 司端运³, 朱晓薇², 赵毅民¹

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 天津中医药大学, 天津 300193; 3. 天津药物研究院, 天津 300193)

摘要: 建立高效液相色谱-串联质谱法测定大鼠血浆中淫羊藿素 (ICT)。血浆样品经乙腈沉淀蛋白后, 以乙腈-水-乙酸 (72 : 28 : 1.5, v/v/v) 为流动相, 通过 Dikma C₁₈ 柱分离, 采用电喷雾离子化四极杆串联质谱, 以多反应监测 (MRM) 方式进行检测。用于定量分析的二级碎片离子分别为 m/z 387 $\rightarrow$ m/z 313 (ICT) 和 m/z 331 $\rightarrow$ m/z 315 (麦黄酮, 内标)。ICT 血浆浓度测定方法的线性范围为 2.5~1 000 ng·mL⁻¹, 定量限为 2.5 ng·mL⁻¹。日内、日间精密度 (RSD) 均小于 9.63%, 准确度 (RE) 在 $\pm$ 7.42% 之内。本方法专属性强, 灵敏度高, 血浆用量少, 适用于临床前药代动力学研究。

关键词: 淫羊藿素; 高效液相色谱-串联质谱法; 浓度测定

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 10-1140-05

Determination of icaritin in rat plasma by HPLC-MS/MS

LIU Hai-pei^{1,2}, MENG Fan-hua¹, GUO Ji-fen^{1*}, SI Duan-yun³, ZHU Xiao-wei², ZHAO Yi-min¹

(1. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Abstract: The paper is to report the development of a high-performance liquid chromatographic/tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for the determination of icaritin (ICT) in rat plasma. After precipitated with acetonitrile from the plasma, ICT was isolated chromatographically on a Dikma C₁₈ column. The mobile phase consisted of acetonitrile-water-acetic acid (72 : 28 : 1.5, v/v/v). Electrospray ionization (ESI) source was applied and operated in the positive ion mode. Multiple reaction monitoring (MRM) mode with the transitions of m/z 387 $\rightarrow$ m/z 313 and m/z 331 $\rightarrow$ m/z 315 were used to quantify ICT and the internal standard, respectively. The linear calibration curve was obtained in the concentration range of 2.5-1 000 ng·mL⁻¹. The lower limit of quantification was 2.5 ng·mL⁻¹. The inter- and intra-day precision (RSD) were less than 9.63%, and the accuracy (relative error) was within $\pm$ 7.42%. The method was proved to be suitable for the pharmacokinetics of ICT, which offers advantages of high sensitivity and selectivity.

Key words: icaritin; HPLC-MS/MS; concentration determination

中药淫羊藿是小檗科 (Berberidaceae) 淫羊藿属 (*Epimedium*) 植物的干燥地上部分, 有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效, 用于治疗阳痿遗精、筋骨痿软、更年期高血压等, 主要活性成分是黄酮类化合物。现代药理研究表明, 其活性成分淫羊藿苷还有免疫调节、激素调节、抗肿瘤及改善心脑血管功能等方面的

作用。淫羊藿素 (icaritin, ICT) 是淫羊藿苷 (icariin, ICA) 的一种水解产物, 能明显降低黑色素的浓度^[1]。目前, 文献^[2-7]报道的淫羊藿中淫羊藿苷的分析测定方法较多, 如 HPLC-UV、HPLC-MS/MS 法等, 而对于生物样品中 ICT 的测定方法尚未见报道。本文建立了大鼠血浆中 ICT 浓度测定的高效液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS) 法, 并应用该法完成了 ICT 在大鼠体内的药动学研究。

收稿日期: 2009-05-05.

*通讯作者 Tel: 86-10-66931614, E-mail: guojifen@sohu.com

材料与方法

仪器 美国 ABI 公司 API 3000 液相色谱-质谱-质谱联用仪, 配有 Turbo Ionspray 离子化源及 Analyst 1.1 数据处理系统; 美国安捷伦公司 Agilent 1100 四元梯度泵和自动进样器。

药品与试剂 淫羊藿素对照品 (99.9%), 天津药物研究院提供; 淫羊藿素供试品, 天津药物研究院提供; 麦黄酮 (tricin, 内标), 军事医学科学院毒物药物研究所提供; β -葡萄糖苷酸水解酶 (β -glucuronidase, EC 3.2.1.31, Type H-1), 购自美国 Sigma 公司; 抗坏血酸为分析纯, 购自北京化学试剂公司; 乙腈为色谱纯, 购自美国 Sigma 公司。

色谱条件 Dikma C₁₈ 柱 (200 mm $\times$ 4.6 mm ID, 5 μ m), 美国 Dikma 公司; C₁₈ 保护柱 (4 mm $\times$ 3.0 mm ID) 美国 Phenomenex 公司; 流动相为乙腈-水-乙酸 (72 : 28 : 1.5); 流速为 0.6 mL $\cdot$ min⁻¹; 进样量为 50 μ L; 柱温为 25 $^{\circ}$ C。

质谱条件 离子源为电喷雾离子源 (Turbo Ionspray); 正离子方式检测; 喷射电压为 4 kV; 源温度为 300 $^{\circ}$ C; 雾化气 (NEB) 为 6; 卷帘气 (CUR) 为 11; 碰撞气 (CAD) 为 7; 扫描方式为多反应监测 (MRM), 用于定量分析的离子反应分别为 m/z 387 $\rightarrow$ m/z 313 (ICT) 和 m/z 331 $\rightarrow$ m/z 315 (麦黄酮); 扫描时间为 200 ms。

血浆样品处理 取血浆样品 100 μ L, 加入抗坏血酸溶液 (2.5 mg $\cdot$ mL⁻¹) 50 μ L, 加入 β -葡萄糖苷酸水解酶溶液 (1 000 U $\cdot$ mL⁻¹, 溶剂为 pH 3.99 磷酸二氢铵缓冲液) 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温孵 1 h 后, 加入内标溶液 (100 ng $\cdot$ mL⁻¹ 麦黄酮, 溶剂为 70% 乙腈) 50 μ L, 加入流动相 50 μ L, 混匀, 加入乙腈 300 μ L, 涡流 3 min, 离心 10 min (9 500 r $\cdot$ min⁻¹), 取上清液 50 μ L 进行 HPLC-MS/MS 分析。

给药方案 Wistar 大鼠 8 只, 雌雄各半, 灌胃给予 ICT, 剂量为 80 mg $\cdot$ kg⁻¹, 分别于给药前和给药后 0.17、0.33、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、12.0、24.0、35.0 和 48.0 h 于大鼠眼底静脉丛采血 0.5 mL; 每只鼠静脉给药剂量为 20 mg $\cdot$ kg⁻¹, 分别于给药前和给药后 0.08、0.17、0.33、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 和 12.0 h 于眼底静脉丛采血 0.5 mL。采血后离心 10 min (3 000 r $\cdot$ min⁻¹), 分离出血浆, 于 -4 $^{\circ}$ C 冷冻保存待测。

结果

1 质谱分析

本方法用正离子方式检测, 在一级全扫描质谱图中获得 ICT 的准分子离子 $[M+H]^+$ 峰 m/z 387, 选择性对 m/z 387 进行二级质谱分析 (图 1A), 准分子离子脱去 2-羟基-2-甲基丙基, 生成主要碎片离子 m/z 313, 用于定量分析。图 1B 为内标麦黄酮的准分子离子峰 m/z 331 的二级全扫描质谱图, 准分子离子脱去一分子甲烷, 生成主要碎片离子 m/z 315 用于定量分析。

2 方法的专属性

取空白大鼠血浆 100 μ L, 除不加标准溶液外, 其余按“血浆样品处理”项下依法操作, 进样 50 μ L, 得色谱图, 如图 2A; 将一定浓度的 ICT 标准溶液加入空白血浆中, 除不加流动相外, 依同法操作, 得色谱图, 如图 2B 和 2C, ICT 的保留时间为 6.72 min, 内标物的保留时间为 4.35 min; 取给药后收集的血浆样品, 按“血浆样品处理”项下依法操作, 得色谱图, 如图 2D。结果表明, 空白血浆中内源性物质不干扰 ICT 及内标物的测定。

3 标准曲线的制备

取空白大鼠血浆 100 μ L, 加入 ICT 对照系列溶液 50 μ L, 配制相当于 ICT 浓度为 2.5、5、10、25、

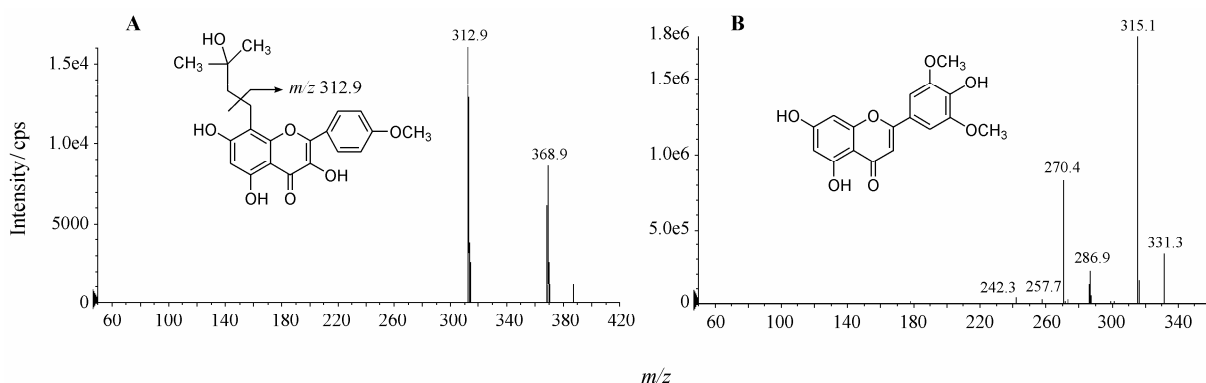


Figure 1 Production mass spectra of $[M+H]^+$ ions of icaritin (ICT, A) and triclin (IS, B)

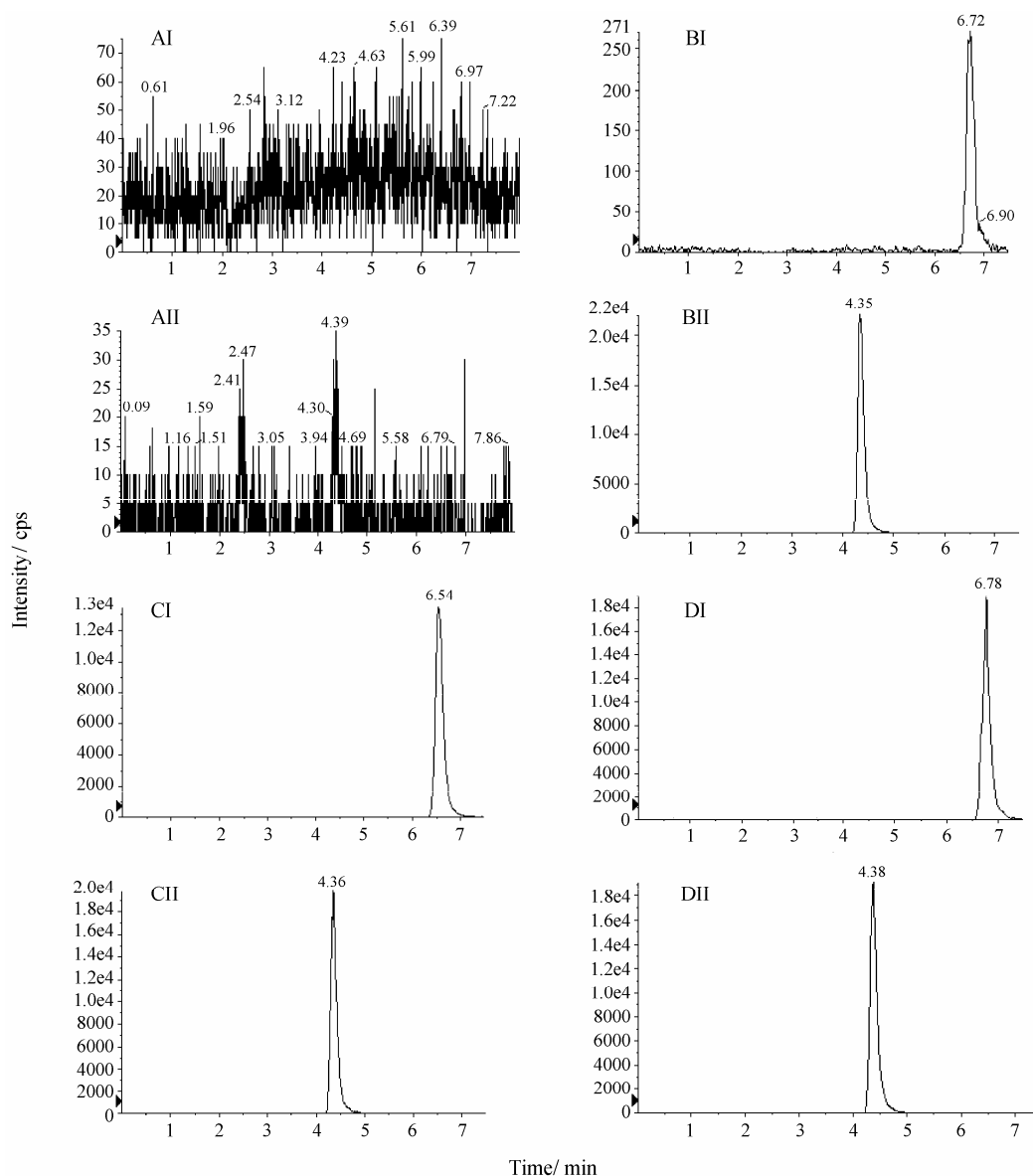


Figure 2 MRM chromatograms for drug-free plasma (A), plasma (100 μL) spiked with 2.5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (LLOD) of ICT and 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ IS (B), plasma (100 μL) spiked with 100.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of ICT and 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ IS (C), and plasma sample 3.0 h after oral administration of 80 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ICT to a rat (D). Peak I: ICT; Peak II: IS

50、100、250、500 和 1 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆样品, 除不加入流动相、 β -葡萄糖苷酸水解酶溶液和不温孵外, 加入磷酸二氢铵缓冲液 (pH 3.99) 100 μL , 按“血浆样品处理”项下操作, 建立标准曲线。以待测物浓度 (x) 为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值 (y) 为纵坐标, 用加权 ($W=1/x^2$) 最小二乘法进行回归运算, 求得的直线回归方程即为标准曲线^[8]。典型回归方程为 $y = 1.07 \times 10^{-2}x - 8.11 \times 10^{-5}$, $r = 0.996\ 9$ 。在浓度 2.5~1 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 样品和内标的峰面积比与样品浓度具有良好的线性关系, 定量限为 2.5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

4 精密度与准确度

按“标准曲线的制备”项下操作, 制备 ICT 低、

中、高 3 个浓度 (2.5、50 和 1 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的质量控制 (QC) 样品, 每个浓度进行 6 样本分析, 连续测定 3 d, 并与标准曲线同时进行, 以当日的标准曲线计算 QC 样品的测得浓度, 并进行方差分析, 求算本法的准确度与精密度, 数据见表 1。

Table 1 Precision and accuracy for the analysis of ICT in rat plasma ($n = 18$, $\bar{x} \pm s$)

Concentration/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$		Relative error /%	RSD /%	
Added	Found		Inter-day	Intra-day
2.50	2.41 ± 0.13	-3.09	5.91	1.37
50.0	46.9 ± 2.7	-7.42	5.53	7.41
1 000	969 ± 71	-3.42	6.91	9.63

5 提取回收率和稳定性考察

取空白血浆 100 μL , 按“标准曲线的制备”项下操作, 制备低、中、高 3 个浓度的样品溶液, 取 50 μL 进行分析, 获得相应峰面积; 另取空白血浆 100 μL , 除不加系列对照溶液和内标外, 按“标准曲线的制备”项下操作, 上清液中加入相应浓度的对照溶液和内标, 涡流混合, 取 50 μL 进行分析, 获得相应峰面积。提取后的峰面积与之相比计算提取回收率。3 个浓度下的提取回收率分别为 96.7%、104.3% 和 103.9%, 类似方法测得内标的提取回收率为 91.8%。

本研究考察了 ICT 在不同保存条件下的稳定性。结果表明提取后的 ICT 样品溶液在室温存放 24 h 内稳定 (RSD 在 $\pm 6.9\%$ 之内), 血浆样品冷冻-解冻 3 次循环之后稳定 (RSD 在 $\pm 5.5\%$ 之内), 血浆样品冷冻 28 d 后稳定 (RSD 在 $\pm 6.7\%$ 之内)。

6 基质效应考察

取 6 只大鼠的空白血浆 100 μL , 除不加对照溶液外, 按“标准曲线的制备”项下操作, 向吹干后的残留物中加入低、中、高 3 个浓度的对照溶液 100 μL , 进行 HPLC-MS/MS 分析, 获得相应峰面积; 另取相应浓度的对照溶液 100 μL , 进行 HPLC-MS/MS 分析, 获得相应峰面积, 提取后的峰面积与之相比计算基质效应。结果比值均在 85%~115%, 表明不存在显著基质效应。

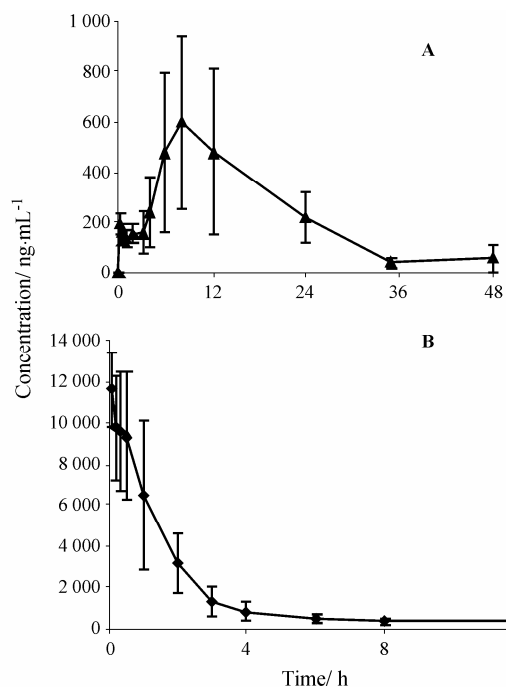


Figure 3 Mean plasma concentration-time profiles of ICT. A: Oral dose of 80 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; B: Intravenous dose of 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (mean $\pm$ SD, $n = 4$)

7 分析方法的应用

大鼠口服和静脉给药后的平均血药浓度-时间曲线见图 3。主要药代动力学参数见表 2。

Table 2 Pharmacokinetic parameters of ICT in rat after an oral dose of 80 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and an intravenous dose of 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ICT ($n = 4$)

Parameter	Oral dose	Intravenous dose
$C_{\max}$ / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	597	11 597
$T_{\max}$ / h	8.00	NA
$T_{1/2}$ / h	10.6	10.1
K_e / h	0.065 4	0.068 8
AUC_{0-t} / $\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	10 406	16 581
$\text{AUC}_{0-\infty}$ / $\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	11 249	23 308
F / %	12.07	

$C_{\max}$ was calculated from C_0 in intravenous dose; NA: Not suitable

讨论

用 LC-MS/MS 方法测定 ICT 的血药浓度研究其药代动力学特性目前尚未见报道。本研究在选取血浆样品处理方法时, 对蛋白沉淀法、固相萃取法、液-液萃取法等提取方法进行了考察, 发现用乙腈沉淀蛋白法处理样品, 能够获得较高且稳定的提取回收率, 符合实验要求。

研究中发现 ICT 不稳定, 加入抗坏血酸后 ICT 稳定性显著增强。文献^[9]报道, 抗坏血酸对土茯苓黄酮能起到很好的稳定作用, 因此推测, ICT 稳定性的增强可能是由于抗坏血酸的抗氧化性, 保护了 ICT 中的邻二酚羟基不被氧化的缘故。

由于 ICT 结构中含有羟基, 在动物体内易形成葡萄糖醛结合物, 因此加入 β -葡萄糖苷酸水解酶溶液 (1 000 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$), 并对酶水解时间 (1、3 和 16 h) 进行考察, 结果表明温孵 1 h 结合物已水解完全。

在选定内标物时, 经过筛选比较, 发现麦黄酮有较好的质谱响应, 提取率高, 稳定性较好。采用多反应监测 (MRM) 方式进行质谱扫描, 方法学确证结果表明, 所建立的测定 ICT 分析方法专属性好、灵敏度高, 适合于 ICT 临床前药代动力学研究。

References

- [1] Park JS, Park HY, Rho HS, et al. Statistically designed enzymatic hydrolysis for optimized production of icaraside II as a novel melanogenesis inhibitor [J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18: 110-117.
- [2] Pozharitskaya ON, Kosman VM, Shikov AN, et al. Comparison between HPLC and HPTLC densitometry for the determination

- of icariin from *Epimedium koreanum* extracts [J]. J Sep Sci, 2007, 30: 708-712.
- [3] Huang H, Liang M, Zhang X, et al. Simultaneous determination of nine flavonoids and qualitative evaluation of *Herba epimedii* by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection [J]. J Sep Sci, 2007, 30: 3207-3213.
- [4] Li YB, Xiong ZL, Li FM. Determination of epimedin C in rat plasma by reversed-phase high-performance chromatography after oral administration of *Herba epimedii* extract [J]. J Chromatogr B, 2005, 821: 235-239.
- [5] Cheng S, Qiu F, Wang SH, et al. HPLC analysis and pharmacokinetics of icariin in rats [J]. J Sep Sci, 2007, 30: 1307-1312.
- [6] Islam NM, Hye HY, Min WL, et al. Simultaneous quantitation of five flavonoid glycosides in *Herba epimedii* by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Phytochem Anal, 2008, 19: 71-77.
- [7] Qiu F, Chen YJ, Kano YH, et al. Metabolism of orally administered icariin in rats [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1999, 34: 222-226.
- [8] Zhong DF. Some aspects in establishing standard curves in bioanalyses with the weighted least squares method [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 1996, 16: 343-346.
- [9] Tian J, Chi RA, Zhang YF, et al. Solvent extraction of flavone from *Smilax glabra* Roxb Leach Liquor [J]. Pharm J Chin PLA (解放军药学报), 2006, 22: 340-342.

“庆祝《中草药》杂志创刊 40 周年和《中草药》英文版 创刊暨第七届中药新药研究与开发信息交流会”通知

由天津中草药杂志社主办的“庆祝《中草药》杂志创刊 40 周年和《中草药》英文版创刊暨第七届中药新药研究与开发信息交流会”定于 2009 年 10 月 22 日在天津市召开，现将有关会议事宜通知如下。

1 会议日期与地点

日期：2009 年 10 月 21 日～24 日（10 月 21 日全天报到，22～23 日开会，24 日参观考察）。

地点：天津市会宾园大酒店（天津市南开区水上公园路 46 号）

2 会议内容

2.1 特邀专家报告 ① 任德权（国家食品药品监督管理局原副局长、教授）：我国医药工业发展现状与未来；② 肖培根（中国工程院院士、中国医学科学院药用植物研究所名誉所长）：中药资源开发研究的新进展和中药期刊的国际化；③ 张伯礼（中国工程院院士、天津中医药大学校长）：创新药物的研究思路；④ 刘昌孝（中国工程院院士、天津药物研究院名誉院长）：中药代谢组学研究及与中药创新；⑤ 姚新生（中国工程院院士、沈阳药科大学原校长）：中药新药研发的新思路；⑥ 胡 军（国家食品药品监督管理局药品评审中心）：中药新药的审评；⑦ 吴春福（沈阳药科大学校长、教授、博导）：食品药学研究的新进展；⑧ 林瑞超（法国科学院院士、中国药品生物制品检定所研究员、博导）：现代中药质量控制的思考；⑨ 徐宏喜（香港赛马会中药研究院副总裁、教授、博士）：中药配方颗粒之研究；⑩ 孔令义（中国药科大学中药学院院长、教授、博导）：中药化学成分快速分离方法的研究；□ 杨秀伟（北京大学药学院天然药物与仿生药物国家重点实验室教授、博导）：中药新药有效成分研究及其标准制定的科学依据；□ 萧 伟（全国人大代表、国家药典委员会委员、江苏康缘制药有限公司董事长）：中药注射剂的研究现状与思考；□ 曾建国（湖南农业大学教授、湖南省中药提取工程研究中心主任）：植物提取物的国内外研究现状。

2.2 召开《中草药》杂志第 11 届编委会和《中草药》英文版第一届二次会议 当前正值国家新闻体制改革阶段，我国科技期刊的发展正面临全新的挑战和机遇，在此背景下，召开《中草药》杂志第 11 届编委会和《中草药》英文版第一届编委会二次会议，总结工作，集思广益，规划未来，将更有利于刊物质量提高。同时进行编委会调整换届，颁发新一届编委证书。

2.3 组织科研、医疗、教学机构进行中药新药研究成果发布，并与生产企业进行科技合作洽谈。

2.4 参观中国最有潜力、最具活力、最富魅力的天津滨海新区。

其他会议详情及参会事宜请联系天津中草药杂志社

地 址：天津市南开区鞍山西道 308 号

Tel: (022) 27474913 23006821

E-mail: zcyzzbjb@sina.com

邮 编：300193

Fax: (022) 23006821

联系人：陈常青 解学星