

## LC-MS/MS 法同时测定大鼠血浆中黄芩素及黄芩苷浓度

柳文媛<sup>1,2</sup>, 余成霞<sup>1</sup>, 冯 锋<sup>3\*</sup>(中国药科大学<sup>1</sup>药物分析教研室;<sup>2</sup>药物质量与安全预警教育部重点实验室;<sup>3</sup>天然药物化学教研室, 南京 210009)

**摘要** 目的:建立 LC-MS/MS 法同时测定大鼠血浆中黄芩素及其代谢物黄芩苷浓度。方法:色谱分离采用 C<sub>18</sub> 色谱柱,流动相为甲醇-0.2%甲酸(74:26),流速 1 mL/min。血浆中加入内标木犀草素,甲醇沉淀蛋白,离心后上清液进行 LC-MS/MS 分析。检测离子:黄芩素 [M+H]<sup>+</sup> 270.9 122.8,黄芩苷 [M+H]<sup>+</sup> 447.0 271.3,内标 [M+H]<sup>+</sup> 286.9 153.0。结果:黄芩苷、黄芩素在 10~2 000 ng/mL 范围内,线性关系良好,平均回收率大于 75%,日内和日间的 RSD 小于 15%。结论:建立的 LC-MS/MS 法符合生物样品分析的要求,可用于研究大鼠静注黄芩素后,血浆中黄芩素、黄芩苷的同时测定。

**关键词** 黄芩素;黄芩苷;LC-MS/MS;血药浓度

中图分类号 R927.2 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2007)02-0129-04

## Simultaneous determination of baicalein and baicalin in rat s plasma by LC-MS/MS

LIU Wei-yuan<sup>1,2</sup>, YU Cheng-xia<sup>1</sup>, FENG Feng<sup>3</sup><sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Analysis; <sup>2</sup>Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education;<sup>3</sup>Department of Natural Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** Aim: To develop a rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the simultaneous determination of baicalein and baicalin in the rat s plasma. Methods: Plasma samples, into which luteolin was added as internal standard, were deproteinized by methanol and centrifuged for sample clear-up. The yielded supernatant was then evaporated to dryness, and the residue was reconstituted in 100  $\mu$ L of mobile phase and centrifuged. An aliquot of 20  $\mu$ L was injected into HPLC column. Chromatographic separation was achieved on a C<sub>18</sub> column and the mobile phase consisted of methanol and 0.2% formic acid (74:26) pumped at a flow rate of 1.0 mL/min. The mass spectrometer was performed in the selected reaction monitoring (SRM) mode and the transitions selected for quantitation were [M+H]<sup>+</sup> 270.9 122.8 for baicalein, [M+H]<sup>+</sup> 447.0 271.3 for baicalin and [M+H]<sup>+</sup> 286.9 153.0 for luteolin, respectively. Results: A liner calibration curve for the assay of baicalein and baicalin in the rat s plasma was validated in the range of 10~2 000 ng/mL with the recoveries of at least 75% and intra-day and inter-day RSD of 15%. Conclusion: The method can be used for the simultaneous determination of baicalein and baicalin in the rat s plasma.

**Key words** baicalein; baicalin; LC-MS/MS; plasma-drug concentration

This study was supported by the New Drug Research and Development Foundation of Jiangsu Province (No. 06060)

黄芩苷 (baicalin) 及其苷元黄芩素 (baicalein) 是中药黄芩 (*Radix Scutellariae*) 的重要成分,具有抗菌、抗病毒、保肝、利胆、利尿等多种药理作用。文献报道<sup>[1]</sup>,黄芩苷在肠内菌群作用下转化为黄芩素而被吸收,然后再于体内转化为黄芩苷。大鼠口服黄芩

素后,在血中迅速转化为黄芩苷及其代谢物,注射给予黄芩素后,75.7%在血浆中以黄芩苷以及其他代谢物形式存在<sup>[2]</sup>。但口服黄芩苷吸收较差,黄芩素在各部位的吸收程度优于黄芩苷<sup>[3]</sup>。

有关黄芩素及黄芩苷体内分析方法的研究,文

\* 收稿日期 2006-10-19 \* 通讯作者 Tel: 025-83271038 E-mail: fengfeng@cpu.edu.cn  
基金项目 江苏新药创制发展基金资助项目 (No. 06060)

献报道有 LC-UV 法<sup>[4]</sup>、LC-电化学法(ECD)<sup>[5]</sup>及 LC-MS 法<sup>[6]</sup>。LC-UV 法灵敏度低(定量限 50 ng/mL), 干扰大,且分析时间长。LC-ECD 法灵敏度高,但应用不普遍,已有的 LC-MS 法则是两者分别测定。本文以活性较强,吸收较快的黄芩素为研究对象,建立了 LC-MS/MS 法同时测定大鼠静脉单剂量(10 mg/kg)注射黄芩素后,血浆中黄芩素及其主要代谢物黄芩苷的浓度。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

黄芩素注射剂(供实验用,中国药科大学药剂学教研室,20 mg/支);黄芩素、黄芩苷对照品(中国药科大学天然药物化学教研室,纯度均大于 99.0%);木犀草素(内标,美国 Sigma 公司)。甲醇(色谱纯,美国 Merck 公司);磷酸二氢铵、甲酸均为

市售分析纯;水为纯净水。

### 1.2 动物

SD 大鼠,体重 180~220 g,由东南大学医学院实验动物中心提供,许可证号:SYXK(苏)2002-0012。

### 1.3 仪器及测试条件

Finnigan Surveyor LC-TSQ Quantum Ultra AM 液相色谱-三级串联四极杆质谱(LC-MS/MS)系统(Thermo Finnigan)。

色谱-质谱条件:采用 Shimadzu C<sub>18</sub>(150 mm ×4.6 mm,5 μm)色谱柱,甲醇-0.2%甲酸(74:26)为流动相,流速 1 mL/min。柱温 30℃,分流比 3:1。电喷雾离子化,正离子 SRM 检测;用于定量的 SRM 检测离子为:黄芩素[M+H]<sup>+</sup> 270.9 → 122.8,黄芩苷为[M+H]<sup>+</sup> 447.0 → 271.3,木犀草素[M+H]<sup>+</sup> 286.9 → 153.0。见图 1。

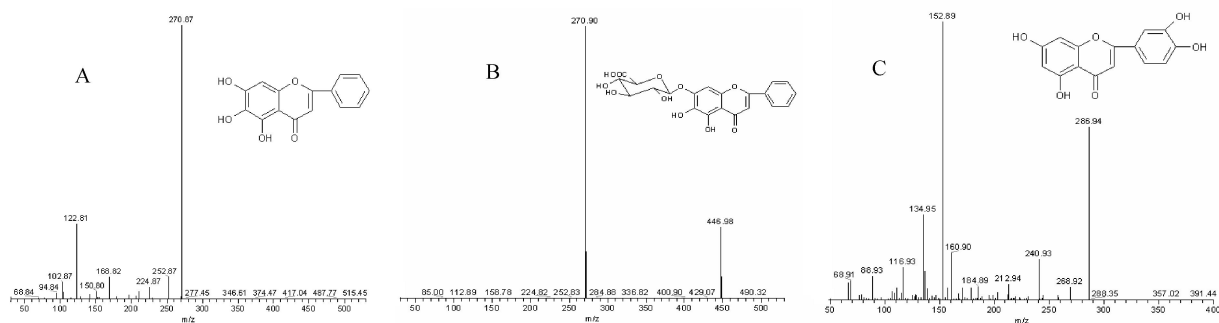


Fig. 1 Full scan Q1 MS spectra of baicalein (A), baicalin (B) and luteolin (C)

## 2 实验方法

### 2.1 溶液的制备

**黄芩素、黄芩苷工作溶液** 取黄芩素和黄芩苷对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,制成每毫升含黄芩素和黄芩苷分别为 1 mg 的溶液,再用甲醇-pH 2.5 磷酸盐缓冲液(含 1%维生素 C)(50:50)稀释成黄芩素、黄芩苷浓度各为 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 μg/mL 的系列工作溶液。

**内标溶液** 取木犀草素适量,精密称定,加甲醇溶解,制成每毫升含 1 μg 的溶液。

### 2.2 血浆样品处理

取大鼠肝素抗凝血浆 100 μL 置 1.5 mL 离心管中,精密加入内标溶液 20 μL 和甲醇 300 μL,涡旋混合 3 min,离心(10 000 r/min) 5 min,分取全部上清液,40℃水浴中氮气流吹干,以流动相 100 μL 溶

解残渣,离心(10 000 r/min) 5 min,取 20 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

### 2.3 方法专属性

取大鼠的空白血浆、空白血浆添加黄芩素、黄芩苷,给药鼠血浆样品各 100 μL 按上述相应的方法进行处理,测定结果如图 2。黄芩苷的保留时间约为 3.5 min,内标保留时间约为 4.0 min,黄芩素的保留时间约为 5.6 min,内源性物质不干扰黄芩素、黄芩苷色谱峰和内标色谱峰。

### 2.4 标准曲线和线性范围

取大鼠空白血浆 100 μL,分别加入系列黄芩素、黄芩苷的工作溶液 10 μL,制成含黄芩素、黄芩苷浓度各为 10, 50, 100, 200, 500, 1 000, 2 000 ng/mL 的血浆样本,再按“2.2”项下方法操作。以血浆中黄芩素、黄芩苷浓度(ng/mL)为横坐标,黄芩素、黄芩苷与内标物峰面积之比( $R_i$ )为纵坐标进行回归,

结果表明,黄芩素、黄芩苷在 10~2 000 ng/mL 范围  
线性关系良好,平均回归方程分别为  $R_i = 0.146 4c$

$+ 0.020 35$ ,  $r = 0.996 2$  和  $R_i = 0.072 6c + 0.020 1$ ,  
 $r = 0.992 6$ 。

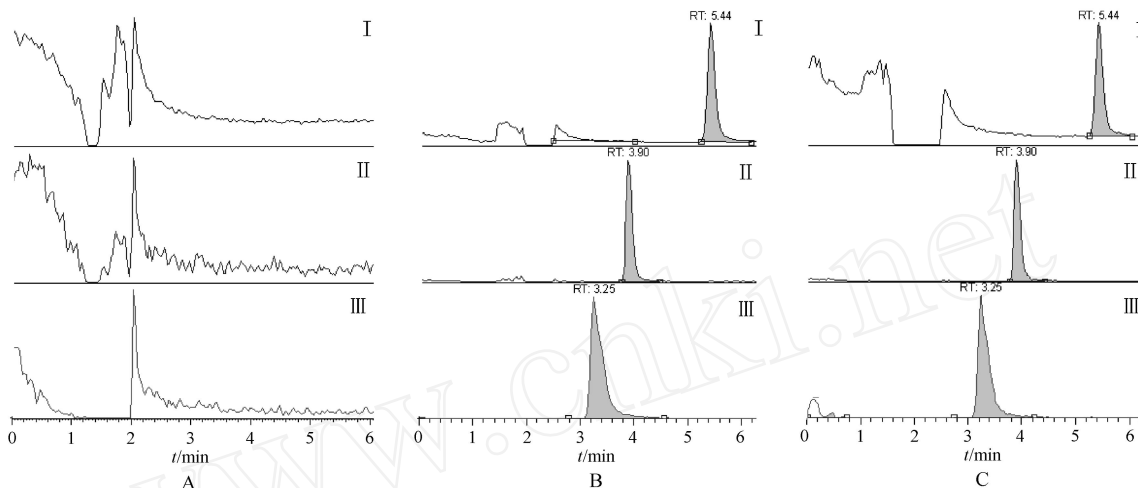


Fig. 2 Typical LC-MS/MS chromatograms for determination of baicalein and baicalin in rat plasma

(A) :Blank plasma; (B) :Blank plasma spiked with baicalein and baicalin at each concentration of 0.1 µg/mL; (C) :Plasma obtained after intravenous administration of baicalein. :baicalein; :luteolin; :baicalin

### 2.5 回收率试验

取 5 支洁净离心管,加入系列黄芩素、黄芩苷工作溶液 10 µL,加甲醇制成黄芩素、黄芩苷浓度各为 10,100,1 000 ng/mL 的样本,加 1 µg/mL 内标 20 µL,40 °C 水浴中以氮气流吹干,加流动相 100 µL 溶解残渣,离心(10 000 r/min) 5 min,吸取 20 µL 进行 LC-MS/MS 分析。记录样品/内标峰面积比  $R_s$ 。

另取试管加空白大鼠血浆 100 µL,加入系列黄芩素、黄芩苷工作溶液 10 µL,制成黄芩素、黄芩苷浓度各为 10,100,1 000 ng/mL 的血浆样本,加甲醇 300 µL,涡旋混合 3 min,离心(10 000 r/min) 5 min,分取全部上清液,加 1 µg/mL 内标 20 µL,40 °C 水浴中以氮气流吹干,加流动相 100 µL 溶解残渣,离心(10 000 r/min) 5 min,取 20 µL 进行 LC-MS/MS 分析。记录样品/内标峰面积比  $R_i$ 。计算回收率  $R$  (%) =  $R_i / R_s \times 100\%$ 。结果 3 个浓度水平下黄芩素回收率大于 75%,黄芩苷回收率大于 80%。结果见表 1。

Tab. 1 Recovery of baicalin and baicalein in rat plasma (n = 5)

	Added (µg/mL)	Found		Recovery	
		(%)	(%)	(%)	(%)
Baicalin	0.01	81.3	79.8	84.7	79.8 78.9 80.9 ±2.29
	0.1	91.6	84.3	83.9	79.8 85.9 85.1 ±4.28
	1	90.6	88.2	85.0	92.5 81.8 87.6 ±4.30
Baicalein	0.01	76.4	75.8	80.6	75.4 79.4 77.5 ±2.33
	0.1	80.2	82.4	77.4	79.5 75.6 79.0 ±2.61
	1	89.7	78.8	86.7	80.3 82.3 83.6 ±4.53

### 2.6 精密度试验

另取试管加空白大鼠血浆 100 µL,分别加入系列黄芩素、黄芩苷工作溶液 10 µL,制成黄芩素、黄芩苷浓度各为 10,100,1 000 ng/mL 的血浆样本,同“2.2”项处理,用样品/内标峰面积比  $R_i$  代入同一条工作曲线,计算得到相应的浓度,考察日内和 5 日间的变异情况,结果见表 2,3。

Tab. 2 Precision of baicalin in rat plasma (n = 5)

$c$ (µg/mL)	Intra-day		Inter-day	
	$\bar{x} \pm s$	RSD	$\bar{x} \pm s$	RSD
	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)
0.01	0.010 2 ±0.000 9	8.80	0.010 1 ±0.000 9	9.21
0.1	0.107 2 ±0.008 3	7.79	0.100 4 ±0.008 5	8.44
1	1.019 6 ±0.065 5	6.43	1.042 1 ±0.054 4	5.22

Tab. 3 Precision of baicalein in rat plasma (n = 5)

$c$ (µg/mL)	Intra-day		Inter-day	
	$\bar{x} \pm s$	RSD	$\bar{x} \pm s$	RSD
	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)
0.01	0.010 5 ±0.001 0	9.23	0.010 6 ±0.001 0	9.88
0.1	0.103 6 ±0.009 5	9.15	0.099 0 ±0.008 9	9.00
1	1.041 6 ±0.67 4	6.47	1.003 6 ±0.086 1	8.58

### 2.7 血浆样品稳定性

另取试管加空白大鼠血浆 100 µL,分别加入系列的黄芩素、黄芩苷工作溶液 10 µL,制成黄芩素、黄芩苷浓度各为 10,100,1 000 ng/mL 的血浆样本,分别经不同次数冻融后进行测定。结果表明,3 次反复冻融后黄芩苷稳定,黄芩素浓度降低小于

5%。上述血浆样品分别在室温(10℃)、-20℃冰箱中放置不同时间后进行测定,室温下黄芩素血浆样品浓度 10 h 内降低小于 5.0%,表明血浆样品室温下相对稳定,测定操作应快速完成。-20℃冰箱中放置,血浆样品在 7 d 内稳定。故血浆样品应置低温冰箱保存,并尽快测定。

### 2.8 动物实验

取大鼠 6 只,雌雄各半,实验前 12 h 禁食不禁水,尾静脉给药,剂量为 10 mg/kg,于给药前 0 min 及给药后 5, 15, 30, 60 min, 2, 4, 6, 8 h 由眼眶后静脉丛取血约 0.4 mL,置肝素化离心管中,立即离心分取血浆,于 -20℃冰冻保存。

## 3 结果

### 3.1 方法学评价

建立的血浆样品中黄芩素和黄芩苷的 LC-MS/MS 测定法,血浆中内源性杂质不干扰测定。血浆中回收率大于 75%,日内、日间变异系数均小于 15%。方法定量限为 10 ng/mL,在相应的生物样品中标准曲线的相关系数  $r$  大于 0.99,质控样本及冻融试验均符合要求。

### 3.2 血药浓度-时间曲线

按血浆样品测定方法进行样品处理与测定,按随行标准曲线计算浓度,测得平均血药浓度-时间曲线如图 3。

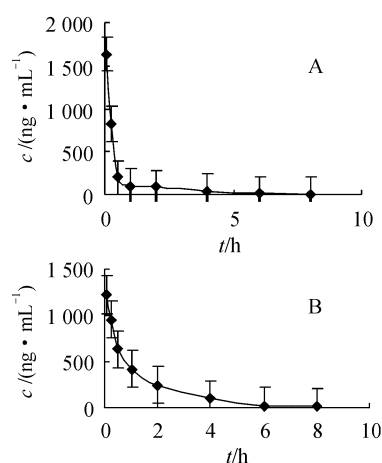


Fig. 3 Plasma concentration-time profiles of baicalin (A) and baicalin (B) after a single intravenous administration of baicalin (10 mg/kg)

图 3 可见,大鼠静脉注射黄芩素后,在大鼠体内快速消除,并迅速代谢为黄芩苷,在第一个时间点(5 min)即可检测到黄芩苷,此与文献[5]报道一

致。但因所用方法不同,本法可测定至给药后 8 h。

## 4 讨论

1) 文献报道<sup>[7]</sup>,黄芩苷稳定,黄芩素受热及 pH 大于 6.8 条件下不稳定,故本试验中黄芩素和黄芩苷工作溶液加入维生素 C 做抗氧化剂,通过对该工作溶液稳定性进行考察,表明工作溶液置 4℃条件下,7 d 内稳定性良好。

2) 本试验对基质效应进行了考察。取 5 只大鼠的空白血浆,不加内标,按“2.2”项下操作,挥干后加入黄芩素和黄芩苷工作溶液,加流动相 100  $\mu$ L 溶解残渣,使终浓度为 10, 100, 1 000 ng/mL,每个浓度进样 5 次,记录峰面积为  $A_1$ ;另取黄芩素和黄芩苷工作溶液,挥干,加流动相 100  $\mu$ L 溶解残渣,使终浓度同上,每个浓度进样 5 次,记录峰面积为  $A_2$ 。内标同法进行考察。结果  $A_1/A_2$  在 85% ~ 115%,表明不受基质效应干扰。

3) 实验中亦对口服给药后大鼠血浆中黄芩素、黄芩苷进行测定,结果普通大鼠口服黄芩素后,在血中迅速地转化为黄芩苷及其代谢物,而黄芩素则低于检测限。此结论与文献[7]报道一致。

### 参考文献

- [1] 贺玉琢(He YZ). 葡糖苷为天然前体药物——以无菌及感染人肠内细菌大鼠模型予以证实[J]. 国外医学·中医中药分册 [ *Foreign Med Sci (Tradit Chin Med)* ], 1999, **21**(3): 14 - 18.
- [2] Lai MY, Hsiu SL, Tsai SY, et al. Comparison of metabolic pharmacokinetics of baicalin and baicalein in rats[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2003, **55**(2): 205 - 209.
- [3] 刘太明(Liu TM), 蒋学华(Jiang XH). 黄芩苷和黄芩素大鼠在体胃、肠的吸收动力学研究[J]. 中国中药杂志( *China J Chin Mater Med* ), 2006, **31**(12): 999 - 1 001.
- [4] Zhang L, Lin G, Zuo Z. High-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of baicalein and baicalin 7-glucuronide in rat plasma[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, **36**(3): 637 - 641.
- [5] Kotani A, Kojima S, Hakamata H, et al. HPLC with electrochemical detection to examine the pharmacokinetics of baicalin and baicalein in rat plasma after oral administration of a Kampo medicine[J]. *Anal Biochem*, 2006, **350**(1): 99 - 104.
- [6] Xin J, Chen XY, Sun YM, et al. Interaction of baicalin 7-glucuronide and baicalein with antibiotics in the gastrointestinal tract[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2005, **57**(6): 743 - 750.
- [7] 姚亚红(Yao YH), 张立伟(Zhang LW). 黄芩素稳定性研究[J]. 光谱实验室( *Chin J Spectrosc Lab* ), 2006, **23**(2): 346 - 348.