

LC/MS/MS 法测定大鼠血浆中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯及药动学研究*

□廖琼峰** 姚 媛 张 蕾 (广州中医药大学中药学院 广州 510006)
魏存芳 (广州市医药工业研究所 广州 510240)
谢智勇 (中山大学药学院 广州 510080)

摘 要:目的:建立测定血浆中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的 LC/MS/MS 法,研究单体穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的药代动力学。方法:测定大鼠血浆中的穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯时,血浆样品经沉淀蛋白处理后,以甲醇-水(85:15)为流动相,采用 Lichrospher C₁₈ 柱分离。选用电喷雾离子源,选择反应监测方式扫描,负离子方式检测。结果:穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯在该条件下分离良好,保留时间分别为 3.57min 和 4.51min。穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的线性范围均为 0.02~10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。定量下限均为 0.02 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,最低检出量为 0.003ng。结论:该方法简便、灵敏、专属性强,适合于穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯在大鼠体内的药代动力学研究。

关键词:穿心莲内酯 脱水穿心莲内酯 LC/MS/MS 药代动力学

穿心莲(Herba Andrographitis)为爵床科(Acanthaceae)植物穿心莲 Andrographis paniculata (Burm.f.) Nees 的干燥地上部分,主产于广东、广西,具有清热解毒、凉血消肿、燥湿的功效,可用于外感风热、咽喉肿痛、湿热泻痢等症^[1]。其主要活性成分为穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和新穿心莲内酯等。目前,穿心莲药材及其制剂的药代动力学研究多采用血药浓度法对其穿心莲内酯或脱水穿心莲内酯进行测定即中药效应成分药代动力学研究^[2-4],药物未经过提取分离直接给药;而穿心莲二萜内酯类单体化合物的药

代动力学即中药化学成分的药代动力学研究较少,仅见两篇关于穿心莲内酯单体的药代动力学研究的报道^[5-6],未见脱水穿心莲内酯单体药代动力学的报道。研究发现^[7],新鲜穿心莲药材中穿心莲内酯的含量高,脱水穿心莲内酯含量低。药材久置后,穿心莲内酯含量降低,脱水穿心莲内酯含量升高。可见,穿心莲内酯在药材贮存和制药过程中会受温度、pH 值等因素的影响,部分转化为脱水穿心莲内酯^[8]。而体内环境更为复杂,其在体内是否会发生转化值得研究。本文建立了测定穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的 LC/MS/MS 法,对穿心莲内酯单体和脱水穿心莲内酯单体在大鼠体内的药代动力学和相互转化情况进

收稿日期:2009-07-07

修回日期:2009-07-22

* 国家自然科学基金面上项目(30600823):中药穿心莲二萜内酯类活性成分的跨膜转运机理及药物代谢动力学研究,负责人:廖琼峰;国家自然科学基金面上项目(30600818):黄连配伍吴茱萸复方活性成分的药代动力学及其配伍机制研究,负责人:谢智勇。

** 联系人:廖琼峰,副教授,主要研究方向:中药药效物质基础和药物代谢动力学研究,Tel:020-39358081,E-mail:liaoqf2075@yahoo.com。

行了研究。

一、材 料

1. 药品与试剂

试验用药:穿心莲内酯(南京替斯艾么中药研究所,批号:TCM005-070826,纯度大于99%),脱水穿心莲内酯(南京替斯艾么中药研究所,批号:TCM006-0808314,纯度大于99%);对照品:穿心莲内酯(中国药品生物制品鉴定所,批号:110797),脱水穿心莲内酯(中国药品生物制品鉴定所,批号:110854);内标:环戊噻嗪(中国药品生物制品鉴定所,批号:110754-200320);甲醇和乙腈(Tedia Company Inc.公司,色谱纯),其它试剂均为市售分析纯。

2. 仪 器

Finnigan™ TSQ Quantum Access MAX™ 液质联用系统,配有电喷雾离子源(ESI源)以及Xcalibur 2.0系统软件,Lcquan 2.5定量处理软件和Surveyor As自动进样器(美国热电Finnigan公司)。

3. 实验动物

Wistar大鼠12只(体重200g左右,由广州中医药大学实验动物中心提供。合格证号:0021056),分为两组,每组6只,雌雄各半。

二、方 法

1. 色谱和质谱条件

色谱条件:Hypersil Gold C₁₈保护柱(3μm,4mm×2.1mm I.D.,美国热电公司),分析柱Lichrospher C₁₈柱(5μm,150mm×4.6mm I.D.,江苏汉邦科技有限公司),流动相为甲醇-水(85:15),流速0.5mL·min⁻¹。

质谱条件:质谱检测器,电喷雾离子源(ESI源),喷雾电压3500V,鞘气压力30psi,加热毛细管温度350℃;辅助气(N₂)压力10psi;负离子方式检测;扫描方式为选择反应监测(SRM);用于定量分析的离子穿心莲内酯[M-H₂O-H]⁻和脱水穿心莲内酯[M-H]⁻均为m/z 331.1,内标环戊噻嗪[M-H]⁻的定量分析离子为m/z 378.09。

2. 血浆样品的处理

取大鼠血浆50μL,依次精密加入1.0μg·mL⁻¹内标溶液50μL,甲醇50μL,涡流混合1min,离心15min(14000rpm),取上清液2μL进样分析。

3. 专属性

取大鼠空白血50μL,除50μL甲醇代替内标溶

液外,其它按“血浆样品的处理”项下操作,进样2μL,得色谱图A;将一定浓度的标准溶液和内标溶液加入空白血浆中,依同法操作,得色谱图B。分别取大鼠灌胃给予穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的血浆样品,依“血浆样品处理”项下同法操作,得色谱图C和D。实验中使用了Divert功能,只使待测的穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和内标成分进入质谱仪,其它大多数的血浆成分排入了废液。这样有效的降低了基质效应对测定结果的影响,也保护了质谱仪。结果表明,空白血浆中的内源性物质不干扰穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯的测定,结果见图1。

4. 标准曲线的制备及最低定量限的测定

取空白血浆50μL,加标准系列溶液50μL,配制相当于穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯血浆浓度均为0.02、0.04、0.1、1.0、5.0、8.5、10.0μg·mL⁻¹的样品,除不加入甲醇外,其余按“血浆样品处理”项下依同法操作,每一浓度进行3样本分析,进样2μL;用加权(W=1/x²)最小二乘法进行回归,得穿心莲内酯的标准曲线为Y=-2.3928×10⁻³+8.948×10⁻⁴X(r=0.9928),脱水穿心莲内酯的标准曲线为Y=5.3531×10⁻³+3.0537×10⁻⁴X(r=0.9931)。

依同法配制穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的血浆浓度均为0.02μg·mL⁻¹的样品,该样品进行6样本分析。求得穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的日内精密度分别为3.71%、7.85%,表明其定量下限均为0.02μg·mL⁻¹,最低检出量为0.003ng。

5. 精密度试验

取空白血浆50μL,按“标准曲线和定量下限”项下的方法配制低、中、高3个浓度(血浆浓度分别为0.04、1.0、8.5μg·mL⁻¹的穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯)的质量控制样品,每一浓度进行6样本分析,测定3天。计算日内变异和日间变异,结果符合要求,数据见表1和表2,说明方法准确度良好。

6. 回收率实验

取空白血浆50μL,按“标准曲线”项下的方法配制浓度均为0.04、1.0、8.5μg·mL⁻¹穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的标准样品,加入100μL甲醇,涡流混合,每一浓度进行3样本分析。同时另取空白血浆50μL,加入100μL甲醇沉淀蛋白后,离心,分离出上清液,在上清液中精密加入相应浓度的标准溶液50μL和内标溶液50μL,涡流混合,每一浓度进行3样本分析。以每一浓度两种处理方法的峰

面积比值计算提取回收率。结果见表 3 和表 4,符合相关规定。

7. 稳定性

本实验考察了穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和内标环戊噻嗪标准溶液室温放置 6h 的稳定性,储备液 -20℃ 储存 7d 的稳定性。结果表明在上述储存条件下,穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和内标均稳定 (RE < 7.1%)。

三、药动力学

1. 动物实验

大鼠实验前禁食 12h,不禁水。次日 I 组以 $84.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃给予穿心莲内酯的 0.5% CMC-Na 混悬药液; II 组以 $209 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃给予脱水穿心莲内酯的 0.5% CMC-Na 混悬药液。给药 5min、15min、30min、50min、70min、90min、120min、4h、8h、12h 后,从眼眦静脉丛取血 0.5mL 置于预先肝素

化的试管中,样品按血浆样品预处理方法处理后,进样 $2\mu\text{L}$ 进行 LC/MS/MS 分析。

2. 结果

采用 LC/MS/MS 法分别对大鼠口服穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯后的血浆样品进行测定,未能检测到穿心莲内酯,推测穿心莲内酯以这种方式给药可能吸收很差或者吸收后在体内很快发生了转化,具体原因还有待于进一步探讨。所不同的是脱水穿心莲内酯在大鼠体内有吸收,其血药浓度时间曲线见图 2,主要药代动力学参数经 3p97 程序非室模型处理得结果,见表 5。

四、讨论

本实验中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的给药剂量,是根据穿心莲片药代动力学研究的给药剂量和其在实验用穿心莲片中的含量换算得来的^[9]。

大鼠口服穿心莲内酯后,在脱水穿心莲内酯相

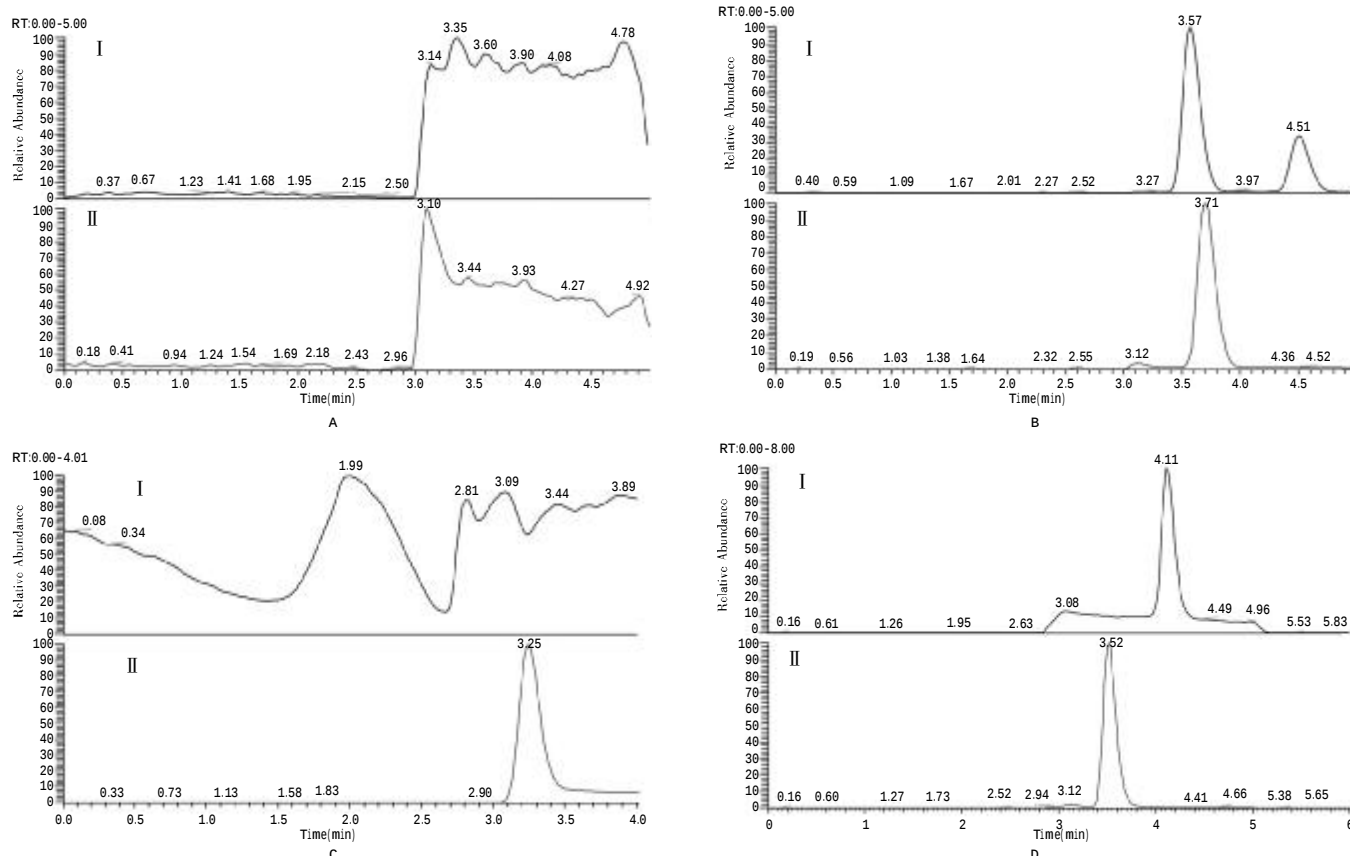


图 1 LC/MS/MS 色谱图

A: 空白血浆; B: 空白血浆加穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和环戊噻嗪; C: 大鼠口服穿心莲内酯; D: 大鼠脱水穿心莲内酯 (通道 I 为穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯; 通道 II 为内标环戊噻嗪; 峰 1、2 和 3 分别为穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和环戊噻嗪)

表1 穿心莲内酯的方法精密性(n=6)

加入浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	日内精密性		日间精密性	
	测定浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD (%)	测定浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD (%)
0.04	0.038	2.74	0.038	13.89
1.00	1.080	0.92	1.080	12.39
8.50	9.293	0.46	9.293	3.90

表2 脱水穿心莲内酯的方法精密性(n=6)

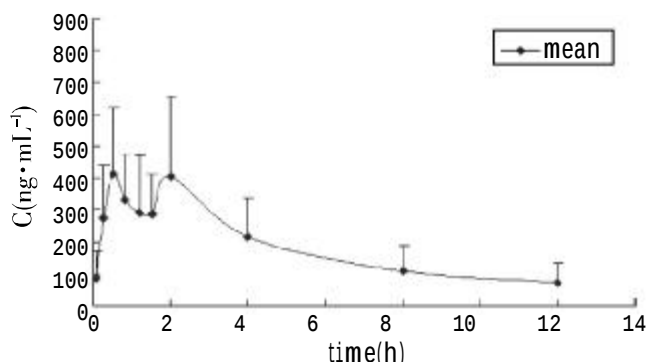
加入浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	日内精密性		日间精密性	
	测定浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD (%)	测定浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD (%)
0.04	0.040	4.44	0.040	10.20
1.00	1.075	1.24	1.075	8.87
8.50	9.530	0.99	9.530	3.27

表3 血浆中穿心莲内酯的提取回收率(n=3)

加入浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	方法回收率(%)			平均回收率 (%)	RSD (%)
0.04	84.94	84.32	88.51	85.92	2.64
1.00	87.60	82.71	83.09	84.48	2.63
8.50	91.47	82.85	88.55	87.62	5.00

表4 血浆中脱水穿心莲内酯的提取回收率(n=3)

加入浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	方法回收率(%)			平均回收率 (%)	RSD (%)
0.04	84.93	85.61	87.68	86.07	1.66
1.00	83.73	86.50	80.35	83.51	3.65
8.50	80.59	80.70	81.00	80.76	0.26

图2 脱水穿心莲内酯平均药物浓度-时间曲线
($\text{mean}\pm\text{SD}$, $n=6$)表5 大鼠口服脱水穿心莲内酯单体后的主要药代动力学参数
(数据采用 3p97 非室模型处理)

药动学参数	脱水穿心莲内酯
C_{max} ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	412.30 ± 208.90
T_{max} (h)	1.6 ± 1.5
MRT(h)	10.73 ± 8.32
K_e (h^{-1})	0.58 ± 0.37
$t_{1/2}$ (h)	1.16 ± 1.28
$AUC_{0\rightarrow t}$ ($\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$)	2527.23 ± 1767.31
$AUC_{0\rightarrow\infty}$ ($\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$)	3852.10 ± 2545.38

应位置没有峰出现;同样,大鼠口服脱水穿心莲内酯后,血浆中也未发现穿心莲内酯,说明两者在大鼠体内不存在相互转化,或者存在微弱的相互转化。

在前期研究中发现,穿心莲片中的穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯在大鼠体内均有吸收,都存在明显的双峰现象;本研究发现穿心莲内酯单体在大鼠体内无吸收,而邹建军^[5]等采用 LC/MS/MS 法研究了穿心莲内酯分散片的药动学,得到了穿心莲内酯单体在人体内的药物动力学参数。这可能是由于穿心莲片和穿心莲内酯片中含有大量的辅料,如淀粉和微晶纤维素等崩解剂,促进了水难溶性药物穿心莲内酯在胃肠中的溶出,从而增加了其吸收,而在本研究中以上述的给药方案给药,用本文所建立的方法无法检测到血浆中的穿心莲内酯,推测原因可能是本文所建立的方法灵敏度还不够,但也间接说明穿心莲内酯以这种方式给药可能吸收很差或者吸收后在体内很快发生了转化,具体原因还有待于进一步研究与探讨。

脱水穿心莲内酯单体在大鼠体内有吸收,但是相同的给药剂量,大鼠口服纯脱水穿心莲内酯单体时, $AUC_{0\rightarrow t}$ 仅为 $2.527\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$,是大鼠口服穿心莲片后其 $AUC_{0\rightarrow t}$ ($34.646\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 7.3%;吸收速度减慢, T_{max} 为 1.6h;代谢消除加快, K_e 为 0.58h^{-1} ,穿心莲片中 K_e 为 0.1h^{-1} 。而且,大鼠口服脱水穿心莲内酯单体后,其药动学特征存在明显的个体差异:达峰时间最长的个体需要 4h,而最快的仅需 0.4h、 $AUC_{0\rightarrow t}$ 最大的为 $4.29\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$,最小的仅为 $0.92\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。总之,脱水穿心莲内酯单体在大鼠体内比穿心莲片中脱水穿心莲内酯的吸收慢,消除更快,生物利用度更低,个体差异大。所以,笔者推测药材或制剂中其他共存成分可能可以适当改善某一指标成分的生物利用度;对于从中药中分离提取主要有效成分用于临床治疗的做法也值得商榷。

参考文献

- 1 高学敏. 中药学. 北京:中国中医药出版社,2002:122~123.
- 2 韩风梅,蔡文涛,夏启松,等. 脱水穿心莲内酯在大鼠的药物动力学. 中华中医药杂志,2005,20(4):206~209.
- 3 蔡文涛,韩风梅,陈勇. 穿心莲片中脱水穿心莲内酯在小鼠血浆中的药物动力. 湖北大学学报(自然科学版),2005,27(4):398~401.
- 4 洪馨,寇德卿,叶少梅,等. 穿心莲胶囊与穿心莲丸生物利用度的比较研究. 中药新药与临床药理,2000,11(1):8~10.
- 5 邹建军,顾小祥,朱余宾,等. 穿心莲内酯分散片的药动学与生物

- 等效性.中国医药工业杂志,2007,38(2):506~508.
- 6 杜红,牛欣,冯前进,等.穿心莲内酯口服微乳与穿心莲内酯片在家兔体内生物利用度的比较研究.中药新药与临床药理,2007,18(3):217~219.
 - 7 陈敏武,徐德然,王铮涛,等. RP-HPLC 法测定不同产地及采收期的穿心莲中穿心莲内酯、新穿心莲内酯的含量.中国药科大学学报,1999,30(4):291~294.
 - 8 颜玉贞,谢培山.穿心莲质量控制再评价.中药新药与临床药理,1998,9(4):204~206.
 - 9 魏存芳,姚媛,廖琼峰,等.穿心莲片中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的药代动力学研究.中成药,2009,31(5):724~727.

Simultaneous Determination of Andrographolide and Dehydroandrographolide in Rat Plasma by LC/MS/MS and Its Pharmacokinetics Study

Liao Qiongfeng¹, Yao Yuan¹, Wei Cunfang², Zhang Lei¹, Xie Zhiyong³

(1. College of Chinese Traditional Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

(2. Guangzhou Pharmaceutical Industrial Research Institute, Guangzhou 510240, China)

(3. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: This study aimed to establish a LC/MS/MS method for the simultaneous determination of andrographolide and dehydroandrographolide in rat plasma and to reveal their pharmacokinetics. After a simple protein precipitation using methanol, andrographolide and dehydroandrographolide were chromatographed on a Lichrospher C₁₈ column using methanol-water (85:15) as the mobile phase. The detection was performed by the selected reaction monitoring (SRM) mode via the electrospray ionization source (ESI) operating in the negative ionization mode. The experimental results showed that andrographolide and dehydroandrographolide were completely separated in the chromatographic condition. Both of them had a linear range of 0.02~10 μg·mL⁻¹ and LLOQ of 0.02 μg·mL⁻¹. This method is simple, sensitive and rapid, and is suitable to the pharmacokinetics study of andrographolide and dehydroandrographolide.

Keywords: Andrographolide; Dehydroandrographolide; LC/MS/MS; Pharmacokinetics

(责任编辑:崔建华 李沙沙,责任译审:张立巍)

中医药防治新发突发传染病科研体系初步构建

近日从国家中医药管理局举行的媒体座谈会上获悉,中医药防治新发突发传染病科研体系构建工作进展迅速。目前,全国各省(区、市)都已设有中医药防治传染病重点研究室,国家级的中医药传染病防治中心也即将成立。

临床科研一体化是中医药科研特色。据悉,目前全国 31 个省(区、市)的省会城市传染病医院及西藏自治区藏医院都设立了中医药传染病防治重点研究室或临床基地。通过这一体系的构建,中医药能够在第一时间介入到新发突发传染病的防治,及时开展科学研究。通过科研先行,为临床工作提供科技支撑,达到科学防控、合理运用中医药的目的。借助这一科研体系,中医药防治甲型 H1N1 流感的科研工作正积极推进之中。大规模

随机对照研究即将展开。

记者还了解到,财政部也将投入超过 1 亿元的专项资金开展中医药防治传染病的科研项目。项目内容主要包括中医药在甲型 H1N1 流感、乙脑等重大新发、突发传染病中的运用等。

专家指出,中医药在防治甲型 H1N1 流感中的作用值得进一步探索。相关研究已经证实,中医药治疗轻症甲型 H1N1 流感患者具有良好疗效。而既往研究显示,中医药治疗甲型 H1N1 流感重症患者也具有可能性和可行性。中医药参与治疗,能够减少重症患者向危重症发展,降低病死率,能够减少激素的使用,减少继发病和流感病情的严重程度,也有助于节省卫生资源。

(文 摘)