

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.06.017

大鼠体内白前苷 B 药物代谢动力学研究

李竹青, 蒋磊[△]

(安徽省第二人民医院, 安徽 合肥 230041)

摘要:目的 探讨白前苷 B 在大鼠体内的药物代谢动力学。方法 采用超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法, 色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 柱(50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.2% 醋酸水溶液-甲醇(梯度洗脱), 流速为 0.3 mL/min, 柱温为 25 ℃, 进样量为 1 μL; 以槲皮素为内标, 电喷雾离子源, 多反应监测模式, 正负离子模式检测。用二甲基亚砜沉淀血浆样品蛋白。将大鼠分为 3 组, 分别予单剂量尾静脉注射低(50 mg/kg)、中(100 mg/kg)、高(200 mg/kg)质量浓度的白前苷 B 后, 不同时间点于眼眶取血, 测定大鼠血浆中白前苷 B 的血药浓度, 对其血药浓度-时间进行拟合, 计算药物代谢动力学参数。结果 大鼠血浆中白前苷 B 质量浓度在 5~10 000 ng/mL 范围内与白前苷 B 和内标物离子强度的比值线性关系良好($r=0.999\ 6, n=8$), 定量限和检测限分别为 0.05 ng/mL 和 0.01 ng/mL; 日内精密性试验结果的 RSD 分别为 6.73%, 8.96%, 7.21% ($n=6$), 日间精密性试验结果的 RSD 分别为 5.64%, 7.38%, 6.53% ($n=4$); 3 次冻融循环、室温放置 12 h、-20 ℃冷冻 30 d 的稳定性试验结果的 RSD 分别为 17.51%, 9.25%, 5.74%; 13.85%, 8.86%, 6.46%; 17.12%, 10.97%, 5.95% ($n=6$); 提取回收率分别为 92.72%, 85.67%, 94.73%, 基质效应分别为 105.73%, 96.62%, 107.86%。在大鼠体内, 50, 100, 200 mg/kg 白前苷 B 的消除相半衰期($t_{1/2\beta}$)分别为 (3.67 ± 0.28) h、 (3.34 ± 0.16) h、 (3.27 ± 0.37) h, 血浆清除率(CL)分别为 (0.03 ± 0.012) L/(h·g)、 (0.03 ± 0.003) L/(h·g)、 (0.03 ± 0.002) L/(h·g), AUC_{0-1} 分别为 $(3\ 186.76 \pm 1\ 034.29)$ ng·h/mL、 $(5\ 984.67 \pm 1\ 594.27)$ ng·h/mL、 $(12\ 367.38 \pm 2\ 372.19)$ ng·h/mL, 与低剂量组比较, 中、高剂量组的 C_{max} , $AUC_{0-\infty}$, AUC_{0-1} 均显著升高($P<0.05$); 代谢过程符合二室模型; 给药剂量与 AUC 线性关系良好。结论 该方法简单、快捷, 可用于测定大鼠体内白前苷 B 血药浓度及进行相关药物代谢动力学研究。

关键词: 白前苷 B; 槲皮素; 超高效液相色谱串联质谱法; 血药浓度; 药物代谢动力学

中图分类号: R932; R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)06-0069-04

Pharmacokinetic Study of Vincetoxicose B in Rats

LI Zhuqing, JIANG Lei

(Anhui No. 2 Provincial People's Hospital, Hefei, Anhui, China 230041)

Abstract: Objective To investigate the pharmacokinetics of vincetoxicose B in rats. **Methods** Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was adopted, the chromatographic column was Agilent Eclipse Plus C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), the mobile phase was 0.2% acetic acid solution-methanol (gradient elution), the flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 25 ℃, and the injection volume was 1 μL. Taking Quercetin as internal standard, electrospray ion (ESI) source was adopted for detection with multi-reaction monitoring (MRM) mode and positive and negative ion mode. The plasma samples' protein was precipitated with dimethyl sulfoxide (DMSO). Rats were divided into three groups. After a single dose of low (50 mg/kg), medium (100 mg/kg) and high (200 mg/kg) mass concentration of vincetoxicose B was injected into the tail vein, the blood was taken from the orbit at different time points, the plasma concentration of vincetoxicose B was measured, the plasma concentration-time was fitted, and the pharmacokinetic parameters were calculated. **Results** The mass concentration of vincetoxicose B in rat plasma showed a good linear relationship with the ratio of vincetoxicose B to ionic strength of internal standard in the range of 5-10 000 ng/mL ($r=0.999\ 6, n=8$). The limit of quantitation and the limit of detection were 0.05 and 0.01 ng/mL, respectively. The RSDs of intra-day precision test were 6.73%, 8.96% and 7.21% ($n=6$), respectively, the RSDs of inter-day precision test were 5.64%, 7.38% and 6.53% ($n=4$), respectively. The RSDs of the stability tests of three freeze-thaw cycles, place at room temperature for 12 h and freeze at -20 ℃ for 30 d were 17.51%, 9.25%, 5.74%, 13.85%, 8.86%, 6.46%, 17.12%, 10.97% and 5.95%, respectively. The extraction recoveries were 92.72%, 85.67% and 94.73%, respectively, and the matrix effects were 105.73%, 96.62% and 107.86%, respectively. The half-life periods of elimination phase ($t_{1/2\beta}$) of 50, 100, 200 mg/kg of vincetoxicose B in rats were (3.67 ± 0.28) h, (3.34 ± 0.16) h and (3.27 ± 0.37) h, respectively. The plasma clearances (CL) were (0.03 ± 0.012) L/(h·g), (0.03 ± 0.003) L/(h·g), (0.03 ± 0.002) L/(h·g), AUC_{0-1} were $(3\ 186.76 \pm 1\ 034.29)$ ng·h/mL, $(5\ 984.67 \pm 1\ 594.27)$ ng·h/mL, $(12\ 367.38 \pm 2\ 372.19)$ ng·h/mL, respectively. Compared with those in the low-dose group, the C_{max} , $AUC_{0-\infty}$ and AUC_{0-1} in the medium- and high-dose groups increased significantly ($P<0.05$). The metabolic process conformed to the two compartment model. There was a good linear

第一作者: 李竹青, 女, 硕士研究生, 药师, 研究方向为内分泌药理学, (电子信箱) 18133621870@163.com。

[△]通信作者: 蒋磊, 男, 博士研究生, 副主任药师, 研究方向为药剂学与医院药学, (电子信箱) 435045881@qq.com。

relationship between dosage and AUC. **Conclusion** The method is simple and rapid, which can be used to determine the plasma concentration of vincetoxicoside B in rats and study the related pharmacokinetics.

Key words: vincetoxicoside B; quercetin; UPLC - MS / MS; plasma concentration; pharmacokinetics

白前苷($C_{21}H_{20}O_{11}$),又名田基黄苷,槲皮素-7-鼠李糖苷等,在藤黄科植物田基黄 *Hypericum japonicum* Thunb. 的全草及萝藦科植物药用白前 *Vincetoxicum officinale* Moench 的叶中含量丰富^[1-2]。现代药理学研究表明,白前苷B具有抗肿瘤、免疫调节、抗病毒等作用。其对人舌癌细胞有明显的杀伤作用,且与药物浓度呈正相关^[3],机制为促进T淋巴细胞的分化与成熟,从而增强机体的特异性细胞免疫和免疫调节作用。其对单钠尿酸盐(MSU)所致大鼠足爪肿胀有较好的抑制作用,能减轻MSU所致家兔急性关节炎的炎症程度,降低高尿酸血症模型小鼠的血尿酸值^[4]。目前研究多集中于中药植物化学成分的识别和药理学研究,对药物代谢动力学关注较少^[5]。本研究中建立了测定大鼠血浆中白前苷B的超高效液相色谱串联质谱(UPLC - MS / MS)法,并阐明其药物代谢动力学行为^[6]。现报道如下。

1 仪器、试剂与动物

仪器:Agilent 1290型超高效液相色谱(UPLC)仪、Agilent 6460型质谱(MS)仪(美国Agilent公司);VORTEX 4型涡旋混合器(上海达姆实业有限公司);Milli-Q型超纯水器(美国Millipore公司);Sorvall ST8型高速离心机(赛默飞世尔科技<中国>有限公司);MS-TS型电子天平(梅特勒-托利多国际贸易<上海>有限公司)。

试剂:白前苷B(成都普菲德生物技术有限公司,批号为20180216,含量99%);槲皮素(天津希恩思生化科技有限公司,批号为20180322,含量96%);二甲基亚砜(DMSO,上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号为202101013);甲醇、乙腈均为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

动物:健康清洁级SD大鼠18只,体质量(250 ± 20)g,雌雄各半,均购自安徽医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号为SCXK(皖)2019-013。饲养环境温度(23 ± 2)℃、相对湿度(50 ± 15)%,12 h / 12 h明暗交替,在空调房内自由进食和饮水7 d。

2 方法与结果

2.1 试验条件

1) 色谱条件。色谱柱:Agilent Eclipse Plus C_{18} 柱($50\text{ mm} \times 2.1\text{ mm}$, $1.8\text{ }\mu\text{m}$);流动相:0.2%醋酸水溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~6 min时10%B→18%B,6~7 min时18%B→52%B,7~9 min时52%B→56%B,9~10 min时56%B→68%B,10~11 min时68%B→

80%B,11~12 min时80%B→100%B,12~15 min时100%B→10%B,15~17 min时10%B);流速:0.3 mL/min;柱温:25℃;进样量:1 μL 。

2) 质谱条件。电喷雾离子(ESI)源,正、负电离模式,高纯度氮气。采集模式:多反应监测模式(MRM);毛细管电压为4 000 V(ESI^+),3 000 V(ESI^-);喷雾电压为4 000 V;雾化器气体(氮气)压力: $2.8 \times 10^5\text{ Pa}$;脱溶气温度:300℃;流速:10 L/min。

2.2 溶液制备

取白前苷B 10 mg,精密称定,以DMSO溶解并制成质量浓度为1 mg/mL的供试品溶液。取槲皮素对照品1.5 mg,精密称定,以DMSO溶解并制成150 $\mu\text{g/mL}$ 的内标溶液。

2.3 血浆样品处理

取大鼠血浆100 μL ,加入质量浓度为1.5 $\mu\text{g/mL}$ 的内标溶液10 μL ,涡旋振荡30 s,加入DMSO 200 μL ,涡旋振荡5 min,沉淀蛋白。4℃下3 000 r/min离心10 min,精密吸取上清液125 μL ,10 000 r/min离心10 min,取上清液100 μL ,用氮气挥干,所得残渣以100 μL DMSO复溶,涡旋振荡5 min,4℃下10 000 r/min离心10 min,分离,取上清液,即得血浆样品溶液。

2.4 方法学考察

专属性试验:分别按2.3项下方法处理空白血浆、空白血浆加白前苷B及内标溶液、给药后血浆,按2.1项下试验条件进样测定,记录色谱图。结果白前苷B与槲皮素分离良好,且血浆内源性杂质不干扰白前苷B的测定。详见图1。

线性关系考察:制备白前苷B质量浓度分别为5,20,50,250,500,2 000,5 000,10 000 ng/mL的系列血浆供试品,按2.3项下方法处理,按2.1项下试验条件进样测定,记录离子强度。采用加权最小二乘法线性回归模型,以白前苷B质量浓度(X , ng/mL)为横坐标、白前苷B离子强度和槲皮素离子强度比值(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.001\ 3X + 0.047\ 6$ ($r = 0.999\ 6$, $n = 8$)。结果表明,白前苷B质量浓度在5~10 000 ng/mL范围内与白前苷B离子强度和内标物离子强度比值线性关系良好。

定量限与检测限考察:分别精密量取100 μL 空白血浆,加入稀释后的供试品溶液,按2.3项下方法处理,按2.1项下试验条件连续进样测定6次,以信噪比为10:1和3:1时的质量浓度为定量限和检测限。结果白前苷B

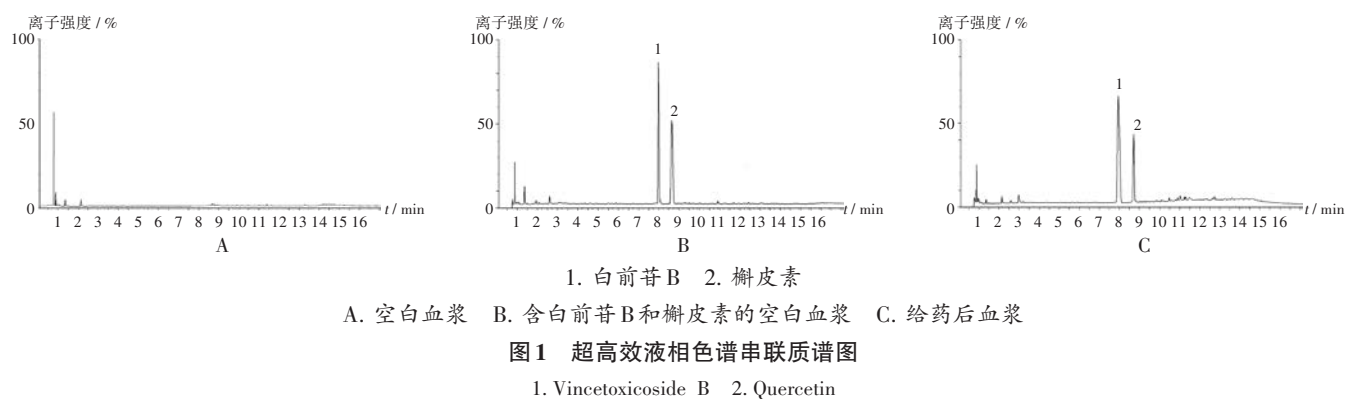


Fig. 1 UPLC-MS/MS spectrograms

的定量限和检测限分别为0.05 ng/mL和0.01 ng/mL。

精密度与准确度试验:分别制备低、中、高质量浓度(200, 1 600, 8 000 ng/mL)的白前苷B血浆样品,按2.3项下方法处理,按2.1项下试验条件连续进样测定6次,记录离子强度,并计算日内精密度;依法连续4 d(每天6次)进样测定,记录离子强度,计算日间精密度及准确度。结果日内精密度的RSD分别为6.73%, 8.96%, 7.21% ($n = 6$), 日间精密度的RSD分别为5.64%, 7.38%, 6.53% ($n = 4$), 表明该方法精密度良好。

稳定性试验:分别制备低、中、高质量浓度(200, 1 600, 8 000 ng/mL)的白前苷B血浆样品,按2.3项下方法处理,分别在3次冻融循环、室温下12 h、-20℃冷冻30 d条件下,按2.1项下试验条件连续进样测定6次,记录离子强度。结果的RSD分别为17.51%, 9.25%, 5.74%; 13.85%, 8.86%, 6.46%; 17.12%, 10.97%, 5.95% ($n = 6$)。表明样品在不同条件下均较稳定。

提取回收试验与基质效应考察:取稳定性试验项下低、中、高质量浓度(200, 1 600, 8 000 ng/mL)的白前苷B血浆样品,按2.3项下方法处理,按2.1项下试验条件连续进样测定6次,记录离子强度 $A_s(H)$,并计算各质量浓度下 $A_s(H)$ 的平均值;另分别取供试品溶液适量,加入DMSO制备成白前苷B质量浓度分别为200, 1 600, 8 000 ng/mL的白前苷B标准品,按2.1项下试验条件连续进样测定6次,记录离子强度 $A_s(D)$,并计算各质量浓度下离子强度 A_s 的平均值。回收率(%) = $A_s(H) / A_s(D) \times 100\%$ 。结果白前苷B低、中、高质量浓度的提取回收率分别为92.72%, 85.67%, 94.73%, RSD分别为6.13%, 5.37%, 6.95%; 低、中、高质量浓度的基质效应分别为105.73%, 96.62%, 107.86%, RSD分别为7.76%, 5.81%, 4.93%, 表明该方法符合生物样品回收率提取要求(>85%),无明显的血浆离子抑制或增强现象。

2.5 药物代谢动力学研究

取18只SD大鼠,随机分为白前苷B低(50.0 mg/kg)、中(100.0 mg/kg)、高(200.0 mg/kg)剂量组。除自由饮水外,大鼠于实验前12 h开始禁食。尾静脉注射白前苷B,分别于给药前,给药后5, 15, 30 min及1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h眼眶取血0.5 mL, 3 000 r/min离心10 min,分离,得血浆,测定白前苷B的血药浓度。

给药后的平均血浆浓度-时间曲线见图2;与低剂量组比较,中、高剂量组的峰浓度(C_{max})、 $AUC_{0-\infty}$ 及 AUC_{0-t} 均显著升高($P < 0.05$),处理后的药时数据均符合二室模型,以给药剂量(X , mg/kg)为横坐标,以低、中、高3个药时曲线下面积 $AUC_{0-t}(Y)$ 为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 61.579X - 4.595$ ($R^2 = 0.9993$)。药物代谢动力学参数见表1。

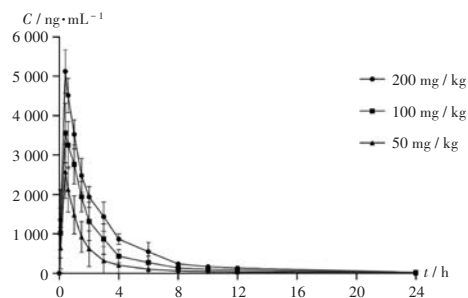


图2 给药后的平均血浆浓度-时间曲线

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curve after administration of drug

3 讨论

白前苷B是含有黄酮醇和吡喃结构的化合物,前期研究表明,白前苷B在吡啶、DMSO等有机溶剂中溶解度较好^[7],故本研究中采用DMSO为溶剂,并以0.2%醋酸水溶液和甲醇为流动相进行液相分离^[8]。方法学考察结果表明,白前苷B和槲皮素间的分离度符合检测要求,其他内源性杂质对其检测无影响,血浆中白前苷B的提取回收率为85.70%~94.70%,基质效应可接受范围为96.60%~107.90%,日内、日间精密度和准确度均

表1 药物代谢动力学参数($\bar{X} \pm s, n=6$)

Tab. 1 Pharmacokinetic parameters ($\bar{X} \pm s, n=6$)

参数	低剂量组	中剂量组	高剂量组
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0.58 ± 0.16	0.63 ± 0.24	0.62 ± 0.13
$t_{1/2\beta}$ (h)	3.67 ± 0.28	3.34 ± 0.16	3.27 ± 0.37
CL [L/(h·g)]	0.03 ± 0.012	0.03 ± 0.003	0.03 ± 0.002
C_{max} (ng/mL)	2 481.74 ± 683.47	3 563.52 ± 759.82*	5 376.54 ± 867.31*
V (L/g)	0.03 ± 0.002	0.03 ± 0.006	0.03 ± 0.005
MRT (h)	3.62 ± 0.38	3.48 ± 0.46	3.52 ± 0.36
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	3 467.49 ± 1 132.53	5 892.85 ± 1 627.14**	12 439.47 ± 2 367.28**
$AUC_{0-\infty}$ (ng·h/mL)	3 186.76 ± 1 034.29	5 984.67 ± 1 594.27**	12 367.38 ± 2 372.19***

注:与低剂量组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

Note: Compared with those in the low - dose group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

符合要求,在血浆中较稳定,损失在可控范围内。

药物代谢动力学主要研究药物在生物体内的吸收、分布、代谢、排泄等过程,通过定量分析,阐明其在体内的代谢动力学过程^[9]。白前苷B是中药有效成分,通过研究其药物代谢动力学,能更好地观察中药在体内的代谢过程。大鼠尾静脉注射低、中、高剂量的白前苷B药物浓度-时间曲线显示,其在15 min时达到最大血药浓度,随着时间的延长,体内药物浓度逐渐降低,24 h后降至最低。结果表明,不同剂量下的半衰期($t_{1/2}$)变化符合线性动力学表达特征,血浆清除率(CL)为0.03 L/(h·g),清除速率较低,其平均滞留时间(MRT)为3.6 h,引起血药浓度和滞留时间差异的因素较多,如体脂百分比,血浆体积,器官血流量,药物代谢酶的表达,与药物结合有关的蛋白质及内源性物质等^[10-13]。药物浓度-时间曲线下面积(AUC)与给药剂量呈良好线性关系,表明药物进入血液循环系统的量与给药剂量的相关性良好^[14-16]。

综上所述,本研究中建立了可测定大鼠血浆中白前苷B血药浓度的UPLC-MS/MS法,该方法简单快捷,结果准确可靠,可用于相关药物血药浓度的检测及其药物代谢动力学研究。

参考文献

- [1] 刘 洋,王四旺,唐志书. 白前的现代研究与开发应用前景[J]. 西北药学杂志,2015,30(6):768-770.
- [2] 欧淑芬,谭 沛,徐 冰,等. 田基黄成分及药理应用研究进展[J]. 药学研究,2015,34(5):296-299.

- [3] 黎七雄,孙忠义,陈金和. 田基黄对人喉癌 Hep-2 和人宫颈癌 Hela 细胞株生长的抑制作用[J]. 华西药理学杂志,1993,8(2):93-94.
- [4] 傅 芃,李廷钊,柳润辉,等. 田基黄黄酮类化学成分的研究[J]. 中国天然药物,2004,2(5):30-31.
- [5] 石 佳. 中药单一成分的研究现状与思考[J]. 中西医结合心血管病电子杂志,2020,8(21):146-152.
- [6] 王 璐,皮子凤,刘 舒,等. 现代质谱技术在中药代谢及药代动力学研究中的应用[J]. 药科学报,2016,51(8):1217-1226.
- [7] 宗 蕊,王 翠,郭童林,等. 槲皮素 Pluronic P123/Poloxamer 188 混合胶束体外释放和药代动力学研究[J]. 中国药理学通报,2019,35(2):246-250.
- [8] PANG Q, TIAN YY, MI JP, et al. Simultaneous determination and pharmacokinetic study of eight components in rat plasma by UHPLC-MS/MS after oral administration of *Hypericum japonicum* Thunb extract [J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2015, 118: 228-237.
- [9] DUAN KF, YUAN ZF, GUO W, et al. LC-MS/MS determination and pharmacokinetic study of five flavone components after solvent extraction/acid hydrolysis in rat plasma after oral administration of *Verbena officinalis* L. extract [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 135(2): 201-208.
- [10] ZHANG QH, WANG WB, LI J, et al. Simultaneous determination of catechin, epicatechin and epicatechin gallate in rat plasma by LC-ESI-MS/MS for pharmacokinetic studies after oral administration of *Cynomotium songaricum* extract [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012, 880(1): 168-171.
- [11] LU LL, QIAN DW, YANG J, et al. Identification of isoquercitrin metabolites produced by human intestinal bacteria using UPLC-Q-TOF/MS [J]. Biomed Chromatogr, 2013, 27(4): 509-514.
- [12] 林正锋,任 可,陈思远,等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测大鼠血浆中去氢钩藤碱及其药动力学研究[J]. 中国卫生检验杂志,2020,30(12):1409-1415.
- [13] 李青倩. 超高效液相色谱串联质谱法中药多种成分在大鼠血浆的药代动力学研究[D]. 南宁:广西大学,2018.
- [14] 兰燕宇,向文英,杨 武,等. UPLC-MS/MS同时测定大鼠血浆中杜仲的五个成分及其药代动力学研究[J]. 时珍国医国药,2016,27(4):827-830.
- [15] 田 涛,余敏灵. 以橙皮苷为对照品的内加法测定甘草中甘草苷和甘草酸含量[J]. 中国药业,2021,30(13):67-71.
- [16] 杨巧虹,邓开英,申丽莎. 高效液相色谱法测定射麻口服液中黄芩苷含量[J]. 中国药业,2021,30(15):65-67.

(收稿日期:2021-07-19;修回日期:2021-09-21)

中国科技核心期刊 中国科技论文统计源期刊

《中国药业》杂志 欢迎投稿! 欢迎订阅!

邮发代号:78-130,各地邮局均可订阅;补订、破月订可向本刊办理。电话兼传真:(023) 86592565
网上投稿: <http://www.zhongguoyaoye023.com> 或 中国药业在线投稿系统