

液相色谱串联质谱法测定大鼠血浆中知母皂苷 A - III 质量浓度及其药物代谢动力学研究*

(广东省中医院珠海医院,广东 珠海 519015)

关键词: 知母皂苷 A-III; 液相色谱串联质谱法; 药物代谢动力学; 血浆; 大鼠

文章编号:1006-4931(2023)01-0027-05

CHEN Baoting, CHEN Juliang, ZHAN Yakun, ZHANG Sufang

(Zhuhai Hospital of Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhuhai, Guangdong, China 519015)

Methods The chromatographic column was Agilent XDB - C₈ column (150 mm × 2.1 mm, 5 μm), the mobile phase was

*基金项目:广东省省级科技计划项目[2014A020221115];广东省中医院中医证候临床研究重点实验室专项课题[2017B030314166]。

第一作者:陈宝婷,女,硕士研究生,主管中药师,研究方向为中药临床药理学与药物代谢动力学,(电子信箱)chenbaoting3@163.com。

- [7] 李连新,吴海燕.SHEL模式用于门诊药房调配差错原因分析的效果[J]. 中国药业,2014,23(20):77-78.
- [8] 曾繁强,韦平原,韦超河,等. 我院静脉用药调配中心差错分析与防范措施[J]. 海峡药学,2020,32(9):221-223.
- [9] 李杏翠,张凡,焦蕾,等. 静脉药物配置中心差错分析及防范措施[J]. 临床药物治疗杂志,2021,19(5):89-92.
- [10] 汪洋,项陈,王媛媛,等. 我院静脉用药集中调配中心差错分析及防范措施[J]. 中国现代医药杂志,2020,22(9):77-79.
- [11] 杨文月,李晓利,李倩,等. 应用 Wichens 认知模型分析住院药房调剂差错与改进[J]. 中国药业,2019,28(19):89-91.
- [12] 温正旺,董佳宁,杨秀岭,等. 基于 Wichens 认知模型降低住院药房调配门内差错的多中心研究[J]. 中国药师,2019,22(2):383-385.
- [13] 苏卉,张桂芬,陈欢,等. 某院静脉用药集中调配中心2174件内部差错分析及防范措施[J]. 海峡药学,2021,33(11):193-196.
- [14] 安龙,周宇,商永光,等. 静脉药物配置中心分拣中的差错分析及改进措施[J]. 中日友好医院学报,2020,34(3):185.
- [15] 刘永红,段美博,于荣. 我院静脉用药调配中心常见差错分析与防范措施[J]. 中国药物与临床,2019,19(18):3222-3224.

(收稿日期:2022-04-06;修回日期:2022-09-11)

acetonitrile - 2 mmol / L ammonium acetate (55 : 45, V / V), the flow rate was 250 μ L / min, the column temperature was 35 $^{\circ}$ C, and the injection volume was 5 μ L. The detection was performed with the electrospray ionization (ESI) and negative ion - multiple reaction monitoring mode. Twelve rats were randomly divided into the Anemarrhenae Rhizoma decoction group and the Anemarrhenae Rhizoma - Phellodendri Chinensis Cortex (1 : 1, m / m) decoction group, with six rats in each group. The established LC - MS / MS method was used to determine the drug concentration of TA - III in the two groups with ginsenoside Rg₂ as the internal standard. **Results** The linear range of TA - III was 0.3 - 3 000 ng / mL, and the lower limit of quantitation was 0.3 ng / mL. The results of precision, accuracy, extraction recovery, matrix effect, residual effect and stability tests all met the requirements of methodology. Compared with the those in the Anemarrhenae Rhizoma decoction group, the area under the curve of TA - III in the Anemarrhenae Rhizoma - Phellodendri Chinensis Cortex (1 : 1, m / m) decoction group increased, and its mean residence time at $0 - \infty$ ($MRT_{0-\infty}$) and half life ($t_{1/2}$) significantly lengthened ($P < 0.01$). **Conclusion** The method is simple, accurate and reliable, which can be used for the determination of the drug concentration of TA - III in rats. The Anemarrhenae Rhizoma - Phellodendri Chinensis Cortex (1 : 1, m / m) decoction can promote the absorption of TA - III and the lengthening of its $MRT_{0-\infty}$ and $t_{1/2}$.

Key words: timosaponin A - III; LC - MS / MS; pharmacokinetics; plasma; rats

知母具有清热泻火、生津润燥功效,临床用于高热烦渴、骨蒸潮热、虚烦不眠等症,常与黄柏以药对形式配伍应用,经典方剂有滋肾通关丸、知柏地黄丸、大补阴丸等。知母总皂苷是知母中主要的有效甾体皂苷,知母皂苷 A - III (TA - III) 又称西陵皂苷 A - III, 是知母总皂苷的主要活性成分,抗癌、抗衰老、抗血管生成、抗氧化、降血糖、抗抑郁、抗血小板聚集、扩张血管、改善记忆力等作用显著^[1-9]。目前,关于测定生物基质中 TA - III 的方法有液相色谱串联质谱 (LC - MS / MS) 法^[10]和高效液相色谱串联质谱 (HPLC - MS / MS) 法^[11], 但存在血浆用量大、离子抑制效应严重、选择性和灵敏度低、线性范围窄、运行时间长等不足。为此, 本研究中建立了测定大鼠血浆中 TA - III 的 LC - MS / MS 法, 并考察其药物代谢动力学 (PK) 特征, 为其临床合理应用提供参考。现报道如下。

1 仪器、试药与动物

1.1 仪器

API4000⁺ 型液相色谱 - 三重四极杆质谱联用仪 (美国 Applied Biosystems 公司), 配有 Turbo Ionspray 离子源及 Analyst 1.6 数据处理系统; LC - 20AD 型高效液相色谱系统 (日本 Shimadzu 公司), 配有 DGU - 20A₃ 型在线真空脱气机, LC - 20AD 型泵, SIL - 20AC 型自动进样器, CBM - 20A 型控制器, CTO - 20A 型色谱柱柱温箱; Microfuge 16 型台式微量离心机 (美国贝克曼库尔特公司); Milli - Q 型超纯水机 (美国 Millipore 公司)。

1.2 试药

TA - III 对照品 (天津中新药业中药现代化技术工程中心, 批号为 MUST - 15020108, 纯度 > 99%); 人参皂苷 Rg₂ 对照品 (内标, 中国食品药品检定研究院, 批号为 110406, 纯度 > 99%); 知母 (批号为 110501), 黄柏 (批号为 120104991), 均购自广州致信中药饮片有限公司; 乙腈和乙酸铵均为色谱纯, 水为超纯水。

1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠 12 只, 雄性, 体质量 230 ~ 270 g, 购自广东省医学实验动物中心, 动物合格证号为 (粤) 0100527, 实验动物使用许可证号为 SYXK (粤) 2018 - 0094。所有大鼠均饲养于温度为 20 ~ 25 $^{\circ}$ C、相对湿度为 40% ~ 70% 的房间内, 自然明暗循环 1 周。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

1) 色谱条件。色谱柱: Agilent XDB - C₈ 柱 (150 mm $\times$ 2.1 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈 - 2 mmol / L 乙酸铵 (55:45, V / V); 流速: 250 μ L / min; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 进样量: 5 μ L。

2) 质谱条件。离子源: 电喷雾离子源; 喷雾电压: 4 500 V; 雾化温度: 500 $^{\circ}$ C; 雾化气: 60 psi; 加热辅助气: 40 psi; 气帘气: 20 psi; 碰撞气: 12 psi; 检测方式: 负离子多离子反应监测; 用于定量分析的离子质荷比 (m/z): 739.5 $\rightarrow$ 577.4 (TA - III), 783.5 $\rightarrow$ 475.2 (内标)。

2.2 溶液制备

取 TA - III 对照品 1.50 mg, 精密称定, 加 55% 乙腈配制成质量浓度为 150 μ g / mL 的 TA - III 贮备液, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 备用。

取人参皂苷 Rg₂ 对照品 10 mg, 精密称定, 加 55% 乙腈配制成质量浓度为 1 mg / mL 的内标贮备液, 继续加 55% 乙腈稀释成质量浓度为 20 μ g / mL 的内标工作液, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 备用。

分别称取知母 100 g 和知母 - 黄柏 (1:1, m / m) 200 g, 加适量超纯水浸泡 30 min, 加热回流提取 3 次, 每次 60, 60, 45 min, 3 次加入的超纯水体积比为 5:3:3 (V / V / V), 趁热滤过, 合并滤液, 浓缩得知母单煎液、知母 - 黄柏 (1:1, m / m) 合煎液。采用 LC - MS / MS 法测定各煎液中 TA - III 的质量浓度, 加超纯水稀释, 得 TA - III 质量浓度均为 0.117 mg / mL 的知母供试品溶液和知母 - 黄柏 (1:1, m / m) 供试品溶液。

2.3 样品处理

吸取大鼠血浆样品 50 μL , 加内标工作液 20 μL , 涡旋振荡 30 s, 加乙腈 200 μL , 涡旋振荡 2 min, 离心(转速为 13 000 r/min) 10 min, 吸取上清液 150 μL , 加 90 μL 超纯水, 涡旋振荡 30 s, 离心(转速为 13 000 r/min) 30 s, 0.2 μm 薄膜滤过, 取滤液, 按 2.1 项下试验条件进样测定。

2.4 方法学考察

专属性试验: 取空白血浆、空白血浆 + TA - III + 内标、灌胃 TA - III 血浆样品各适量, 按 2.3 项下方法处理, 按 2.1 项下试验条件进样测定。结果 TA - III 和内标保留时间分别为 3.15 min 和 1.55 min, 色谱峰峰形良好, 分离完全, 无内源性物质与其他物质干扰, 表明方法专属性良好。色谱图见图 1。

标准曲线与定量下限确定: 取 2.2 项下 TA - III 贮备液, 用 55% 乙腈稀释至质量浓度为 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 精密吸取 0.5 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加空白血浆配制成质量浓度为 3 000 ng/mL 的 TA - III 标准血样。加入空白血浆, 稀释得质量浓度分别为 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1 000, 2 500, 3 000 ng/mL 的系列 TA - III 标准血样, 按 2.3 项下方法处理, 按 2.1 项下试验条件进样测定。以 TA - III 和内标峰面积比值为纵坐标(Y)、TA - III 质量浓度为横坐标(X, ng/mL) 进行加权线性回归(权

重为 $1/X^2$), 得回归方程 $Y = 4.88 \times 10^{-4}X + 1.31 \times 10^{-4}$ ($r = 0.999\ 3, n = 10$)。结果表明, TA - III 质量浓度在 0.3 ~ 3 000 ng/mL 范围内与 TA - III 和内标峰面积比值线性关系良好。定量下限为 0.3 ng/mL。

精密度与准确度试验: 取 2.2 项下 TA - III 贮备液, 用 55% 乙腈稀释至质量浓度为 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 精密吸取 0.5 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加空白血浆配制成质量浓度为 3 000 ng/mL 的 TA - III 标准血样。加入空白血浆, 稀释得质量浓度为 1, 1 500, 2 500 ng/mL 的系列 TA - III 质控样品, 各 5 份, 按 2.3 项下方法处理, 按 2.1 项下试验条件进样测定, 于同 1 d 和连续 3 d 测定质控样品中 TA - III 的质量浓度。以日内和日间相对标准偏差(RSD)考察方法的精密度, 以相对回收率(实测浓度与真实浓度的比值)考察准确度。结果见表 1。

表 1 血浆中 TA - III 的精密度与准确度试验结果(%, $n = 5$)
Tab. 1 Results of the precision and accuracy tests of TA - III in plasma(%, $n = 5$)

质量浓度	相对回收率 ($\bar{X} \pm s$)	精密度试验 RSD	
		日内	日间
1 ng/mL	102.83 $\pm$ 6.47	6.61	3.77
1 500 ng/mL	103.46 $\pm$ 5.68	2.54	13.24
2 500 ng/mL	104.07 $\pm$ 4.53	2.02	10.42

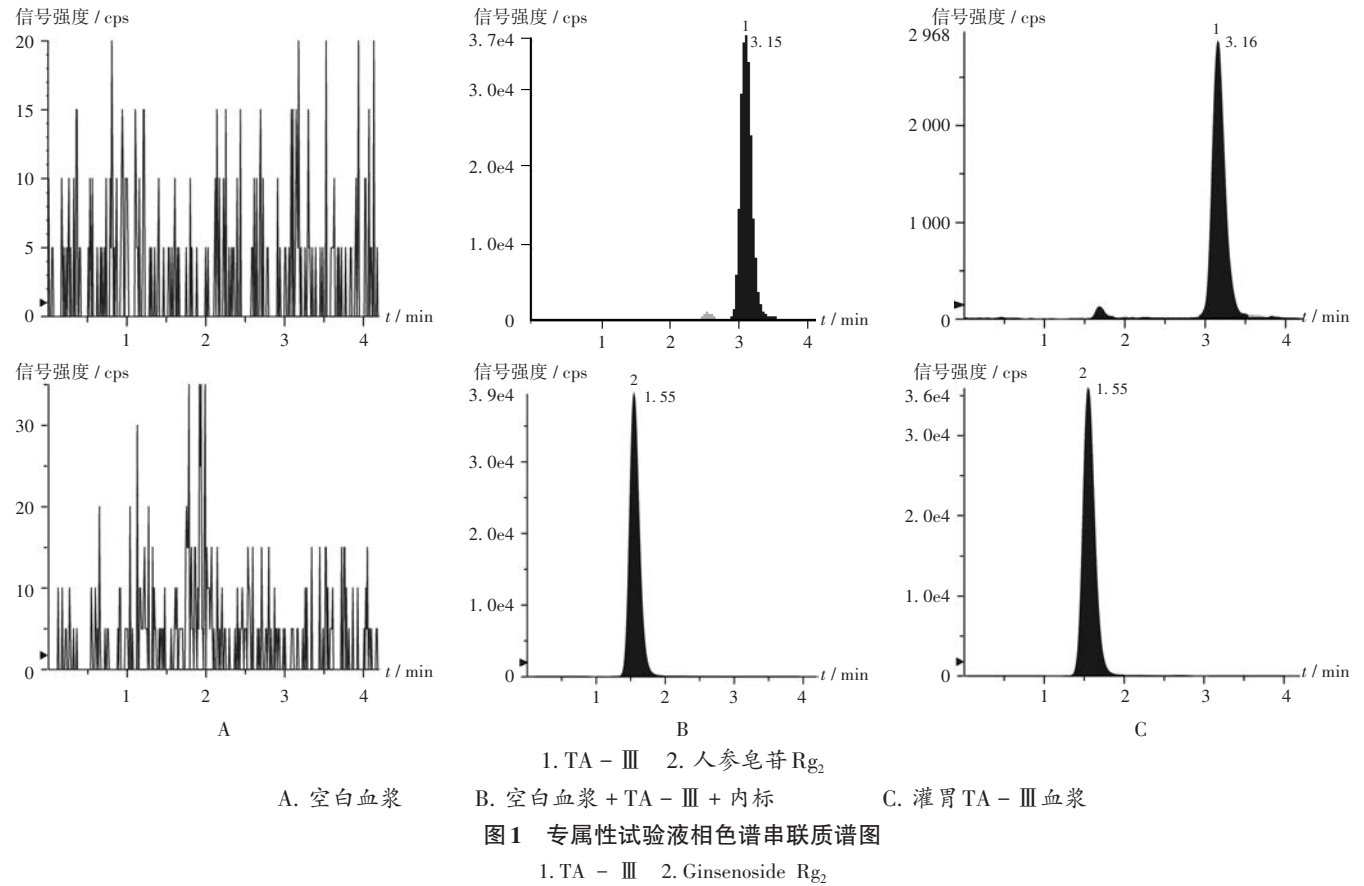


Fig. 1 LC - MS/MS chromatograms of the specificity test

提取回收率与基质效应试验:按精密度与准确度试验项下方法制备质量浓度为 1, 1 500, 2 500 ng / mL 的 TA - Ⅲ质控样品,各 5 份,按 2.3 项下方法处理,按 2.1 项下试验条件进样测定,得峰面积(A_1);取空白血浆,按 2.3 项下方法处理,按 2.1 项下试验条件进样测定,得峰面积(A_2);用乙腈沉淀空白血浆,取上清液 150 μ L,加内标工作液与 TA - Ⅲ贮备液各适量,使 TA - Ⅲ的质量浓度分别为 1, 1 500, 2 500 ng / mL,按 2.3 项下方法处理,按 2.1 项下试验条件进样测定,得峰面积(A_3)。按公式计算基质效应,基质效应(%) = ($A_3 / A_1 \times 100\%$);按公式计算提取回收率,提取回收率(%) = ($A_2 / A_3 \times 100\%$)。结果见表 2。

表 2 血浆中 TA - Ⅲ的提取回收率与基质效应试验结果
($\bar{X} \pm s, \%, n = 5$)

Tab. 2 Results of the extraction recovery and matrix effect tests of TA - Ⅲ in plasma ($\bar{X} \pm s, \%, n = 5$)

质量浓度	提取回收率	基质效应
1 ng / mL	96.03 $\pm$ 3.94	90.63 $\pm$ 6.45
1 500 ng / mL	100.66 $\pm$ 1.68	83.57 $\pm$ 0.26
2 500 ng / mL	102.11 $\pm$ 1.31	88.88 $\pm$ 0.49

残留效应试验:按精密度与准确度试验项下方法制备质量浓度为 2 500 ng / mL 的 TA - Ⅲ质控样品,并取空白血浆样品,按 2.1 项下试验条件分别交替进样分析 6 次,考察 TA - Ⅲ与内标的残留效应。结果高浓度的 TA - Ⅲ进样后几乎无残留,符合方法学要求。

稳定性试验:按精密度与准确度试验项下方法制备质量浓度分别为 1, 1 500, 2 500 ng / mL 的 TA - Ⅲ质控样品,各 5 份,分别将样品于室温下放置 4 h、反复冻融 3 次、4 $^{\circ}$ C 放置 24 h 后,按 2.3 项下方法处理,按 2.1 项下试验条件进样测定。结果见表 3。

表 3 血浆中 TA - Ⅲ的稳定性试验结果($\bar{X} \pm s, \%, n = 5$)

Tab. 3 Results of the stability test of TA - Ⅲ in plasma ($\bar{X} \pm s, \%, n = 5$)

质量浓度	室温(4 h)	反复冻融(3 次)	4 $^{\circ}$ C(24 h)
1 ng / mL	109.25 $\pm$ 8.99	108.00 $\pm$ 9.06	100.24 $\pm$ 12.31
1 500 ng / mL	90.17 $\pm$ 3.82	91.83 $\pm$ 2.52	108.80 $\pm$ 3.69
2 500 ng / mL	91.30 $\pm$ 0.82	91.20 $\pm$ 1.90	106.80 $\pm$ 3.88

2.5 PK 研究

大鼠给药前禁食 16 h,自由饮水。取 12 只大鼠,随机分为知母单煎液组和知母 - 黄柏(1:1, m / m)合煎液组,各 6 只,均灌胃给药 TA - Ⅲ 1.17 mg / kg。分别于给药 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 h 时取眼眶血 0.4 mL,置肝素化离心管中离心(转速为 3 000 r / min)15 min,制备血浆, - 80 $^{\circ}$ C 保存,待测。按 2.3 项下方法处理,按 2.1 项下试验条件进样测定 TA - Ⅲ的血药浓度。采用 DAS 2.1.1 软件,根据非房室模型对血药浓度和时间数据进行分析,并计算 PK 参数(表 4)。

其中,药物最大浓度的时间点($t_{\max}$)和最大血药浓度($C_{\max}$)均为实测值,采用梯形法计算血药浓度 - 时间曲线下面积(AUC),并绘制曲线图(图 2)。结果知母单煎液组大鼠 TA - Ⅲ的血药浓度低,药物吸收较慢,灌胃给药 1 h 后才检测到一定浓度的 TA - Ⅲ。与知母单煎液组比较,知母 - 黄柏(1:1, m / m)合煎液组 TA - Ⅲ的血药浓度仍较低,但 AUC 增大,且 0 - ∞ 的平均滞留时间($MRT_{0-\infty}$)和消除半衰期($t_{1/2}$)均显著延长($P < 0.01$)。

表 4 TA - Ⅲ的 PK 参数($\bar{X} \pm s, n = 6$)

Tab. 4 PK parameters of TA - Ⅲ ($\bar{X} \pm s, n = 6$)

PK 参数	知母单煎液组	知母 - 黄柏(1:1, m / m)合煎液组
$AUC_{0-1} [(\mu\text{g}\cdot\text{h}) / \text{L}]$	586.90 $\pm$ 281.50	706.59 $\pm$ 402.34
$AUC_{0-\infty} [(\mu\text{g}\cdot\text{h}) / \text{L}]$	662.59 $\pm$ 241.35	912.57 $\pm$ 540.44
$MRT_{0-1} (\text{h})$	9.23 $\pm$ 1.88	12.39 $\pm$ 3.98
$MRT_{0-\infty} (\text{h})$	12.92 $\pm$ 4.05	22.96 $\pm$ 20.57*
$t_{1/2} (\text{h})$	6.99 $\pm$ 3.00	15.12 $\pm$ 17.93*
$t_{\max} (\text{h})$	6.33 $\pm$ 1.97	7.60 $\pm$ 2.61
$C_{\max} (\mu\text{g} / \text{L})$	48.65 $\pm$ 25.07	51.28 $\pm$ 23.32

注:与知母单煎液组比较,* $P < 0.01$ 。

Note: Compared with those in the Anemarrhenae Rhizoma decoction group,* $P < 0.01$.

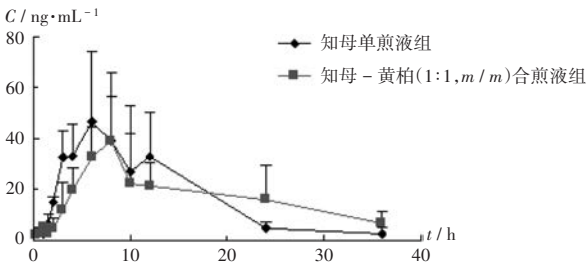


图 2 TA - Ⅲ平均血药浓度 - 时间曲线($n = 6$)

Fig. 2 Mean drug concentration - time curves of TA - Ⅲ ($n = 6$)

3 讨论

为进一步改善液相色谱的分离效能,参考文献[10 - 13],在水相中分别尝试了不同比例的甲酸和乙酸铵溶液,最终确定流动相为乙腈 - 2 mmol / L 乙酸铵(55:45, V / V)。结果色谱峰峰形良好,TA - Ⅲ和内标保留时间分别为 3.15 min 和 1.55 min,分析周期仅 4 min。在实验样品前处理中,仅需血浆样品 50 μ L,是文献[12]报道血浆用量的 1 / 2。用血量的减少有利于实验动物在连续采血的 PK 研究中保持良好的生理状态,更加客观地反映药物的 PK 特征。TA - Ⅲ的定量下限为 0.3 ng / mL,比文献[10]报道的更低,保留时间也缩短,可快速、准确、灵敏地完成 TA - Ⅲ的测定。

在中药复方及临床应用中,知母 - 黄柏药对 2 味药材质量比多为 1:1(m / m),如知柏地黄丸、大补阴丸等。本研究中重点考察了知母 - 黄柏等量配伍后,知母有效成分 TA - Ⅲ的体内 PK 特征,并与知母单独给药进行比较。结果知母单煎液组大鼠 TA - Ⅲ的血药浓度低,