

精氨酸双糖苷检测方法的建立及药动学研究

毕筱婷¹, 王长远², 李珂珂¹, 霍晓奎², 刘克辛², 弓晓杰^{3*}

1. 大连大学 医学院, 辽宁 大连 116622

2. 大连医科大学 药学院临床药理教研室, 辽宁 大连 116044

3. 大连民族大学 生命科学院, 辽宁 大连 116600

摘要: 目的 建立快速、灵敏、高效的精氨酸双糖苷的测定方法并研究精氨酸双糖苷在大鼠体内的药动学。方法 以乌苯美司作为内标, 采用LC-MS/MS检测方法测定血浆中精氨酸双糖苷浓度, 利用DAS2.0软件计算药动学相关参数, 并分析方法的可靠性。结果 空白血浆对检测物质不产生干扰, 在20~20 000 ng/mL符合线性关系, 方法学中RSD以及RE值均小于15%。结论 采用LC-MS/MS方法检测精氨酸双糖苷方法合理可靠, 精氨酸双糖苷的绝对生物利用度为(4.50±3.75)%。

关键词: 精氨酸双糖苷; 精密度; 准确度; 药动学; 方法学

中图分类号: R969 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2019) 06-1141-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.06.015

Establishment of a method for detecting Arginyl-fructosyl-glucose and pharmacokinetic study

BI Xiaoting¹, WANG Changyuan², LI keke¹, HUO Xiaokui², LIU Kexin², GONG Xiaojie³

1. Medical college of Dalian University, Dalian 116622, China

2. Department of Clinical Pharmacology, College of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116044, China

3. College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China

Abstract: Objective To develop a quick, specific and high performance method for determination of Arginyl-fructosyl-glucose (AFG) and to investigate pharmacokinetics of AFG in rats *in vivo*. **Methods** Bestatin is used as an internal standard, the concentration of AFG in plasma was determined by LC-MS/MS. The DAS 2.0 software was adopted to calculate bioavailability of AFG. **Results** Blank plasma does not interfere with the test substance, there is a significant correlation in the range of 20 ng/mL to 20 000 ng/mL, and the RSD and RE values are less than 15% in the method. **Conclusion** The average relative bioavailability of AFG was (4.50 ± 3.75)%, The measured method of AFG by LC-MS/MS is reasonable and reliable.

Key words: Arginyl-fructosyl-glucose; relative standard deviation; relative error; pharmacokinetic; methodology

精氨酸双糖苷是从红参中发现的精氨酸与麦芽糖发生美拉德反应的产物^[1]。精氨酸双糖苷具有增强机体免疫、抗炎^[2]、抗疲劳^[3]、抗氧化、改善糖尿病肾病^[4]等活性。精氨酸双糖苷是精氨酸的衍生物,因其极性较大,已有的异硫氰酸苯脂柱前衍生检测方法在衍生化过程中存在衍生化不完全的情况。采用高效液相色谱法联合蒸发光检测器检测^[5],因在检测过程中需要进行雾化以及蒸发等过程,重复性较差。本研究以乌苯美司作为内标,建

立了快速、高效的LC-MS/MS检测方法测定精氨酸双糖苷血药浓度,并通过测定大鼠的血药浓度,计算了精氨酸双糖苷的绝对生物利用度。

1 材料

1.1 实验仪器

Agilent HP 1200液相系统(美国Agilent公司); API3200型三重四级杆质谱仪(美国Applied Biosystems公司);XH-C型涡旋混合器(中国江苏省金坛市医疗仪器厂);FCR2002-UF型纯水机(德国

收稿日期: 2019-02-14

基金项目: 辽宁省高等学校创新团队支持计划(LT2016017);大连市科技创新基金(2018J12SN062)

第一作者: 毕筱婷(1993—),女,吉林白山,硕士在读,研究方向为药动学。Tel:18742582736 E-mail:bxiaoting9323@163.com

*通信作者: 弓晓杰,男,博士,硕士生导师,主要从事天然药物化学研究。Tel:13998561227 E-mail:gxjclr@163.com

FLOM公司);ST-16R型高速离心机(德国Thermo公司)。

1.2 药品与主要试剂

精氨酸双糖苷(纯度>98.0%,本实验室自制);乌苯美司(纯度>99.0%,深圳万乐药业);乙腈(色谱纯,美国Tedia公司);三蒸水(本实验室自制)。

1.3 实验动物

SPF级Wistar大鼠,体质量180~220 g,雄性,购自大连医科大学,生产许可证号SCXK(辽)2008-0002。

2 实验方法及结果

2.1 色谱条件

采用Ultimate HILIC silica(5 μm, 150 mm×4.6 mm, 月旭科技(上海)股份有限公司)色谱柱,进样量为4 μL,体积流量为0.8 mL/min;柱温30°C;流动相采用60%乙腈-水体系。

2.2 质谱条件

离子源为电喷雾电离源(ESI),检测方式为正离子;气帘气(N₂)体积流量35 L/h;电喷雾电压(IS)5 500 V;气化温度(TEM)500 °C;MRM方式扫描;离子通道:精氨酸双糖苷 m/z 499.2~481.2;碰撞能29 eV;乌苯美司 m/z 309.1~120.5;碰撞能30 eV。参数设置、数据采集和分析采用Analyst 1.6.3软件。质谱图见图1。

2.3 标准曲线和质控样品制备

2.3.1 储备液和工作液 精密称取精氨酸双糖苷10.0 mg,三蒸水将其准确定容至10 mL量瓶中,混合均匀,得到1 mg/mL储备液,用水稀释,得到系列浓度工作液,备用。

精密称取乌苯美司标准品10.0 mg,乙腈将其定容至10 mL量瓶中,混合均匀,乙腈稀释配制终浓度

为0.25 μg/mL的内标溶液,备用。

2.3.2 标准曲线和质控样本 精密取50 μL工作液,加入50 μL空白血浆,得到精氨酸双糖苷血浆标准曲线,终浓度为20、80、200、800、2 000、8 000、20 000 ng/mL。

重新称取精氨酸双糖苷10.0 mg,按照以上方法,配制低、中、高3个浓度的质控样本(QC),浓度为50、1 000、14 000 ng/mL。

2.4 生物样品制备

取含药血浆样品50 μL,加入50 μL乌苯美司内标溶液,加入100 μL乙腈溶液,加入50 μL三蒸水,涡旋混匀后离心(15 000×g, 15 min),取上清液200 μL,LC-MS/MS检测。

2.5 方法学验证

2.5.1 专属性 取6只大鼠的空白血浆,按“2.3”项下方法,配制精氨酸双糖苷和乌苯美司不含血浆样品及含血浆样品,考察空白血浆中的成分是否对精氨酸双糖苷以及乌苯美司存在干扰。精氨酸双糖苷的保留时间为4.45 min,乌苯美司保留时间为2.62 min(2.43~2.82 min以及4.03~4.82 min两个时间段采集质谱数据)。色谱图如图2所示,结果表明未有内源性物质对精氨酸双糖苷以及乌苯美司产生干扰。

2.5.2 定量下限 按“2.3”项下方法,制备20 ng/mL精氨酸双糖苷血浆样品溶液,进行6样本分析。根据标准曲线,求出在20 ng/mL浓度下的精密度(RSD)和准确度(RE)。精密度的精密度为2.10%,准确度为0.83%,该方法的定量下限为20 ng/mL。

2.5.3 线性和灵敏度 按“2.3”项下方法,制备精氨酸双糖苷标准曲线,横坐标为精氨酸双糖苷浓

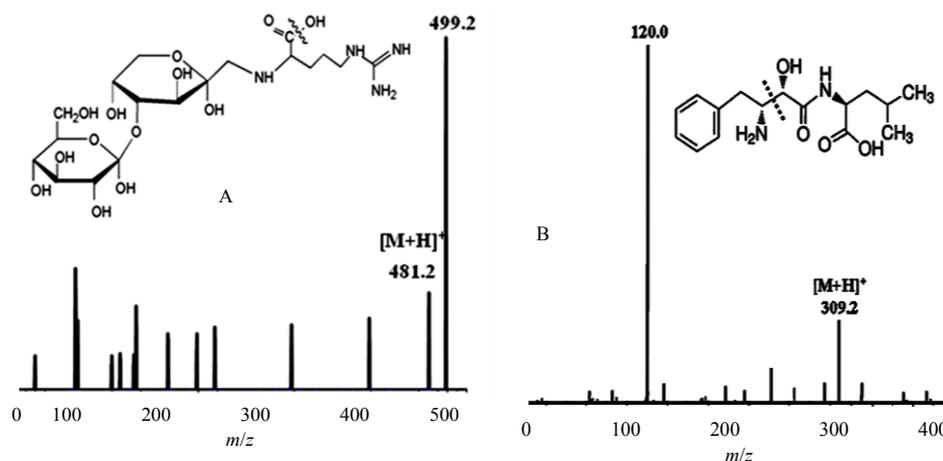
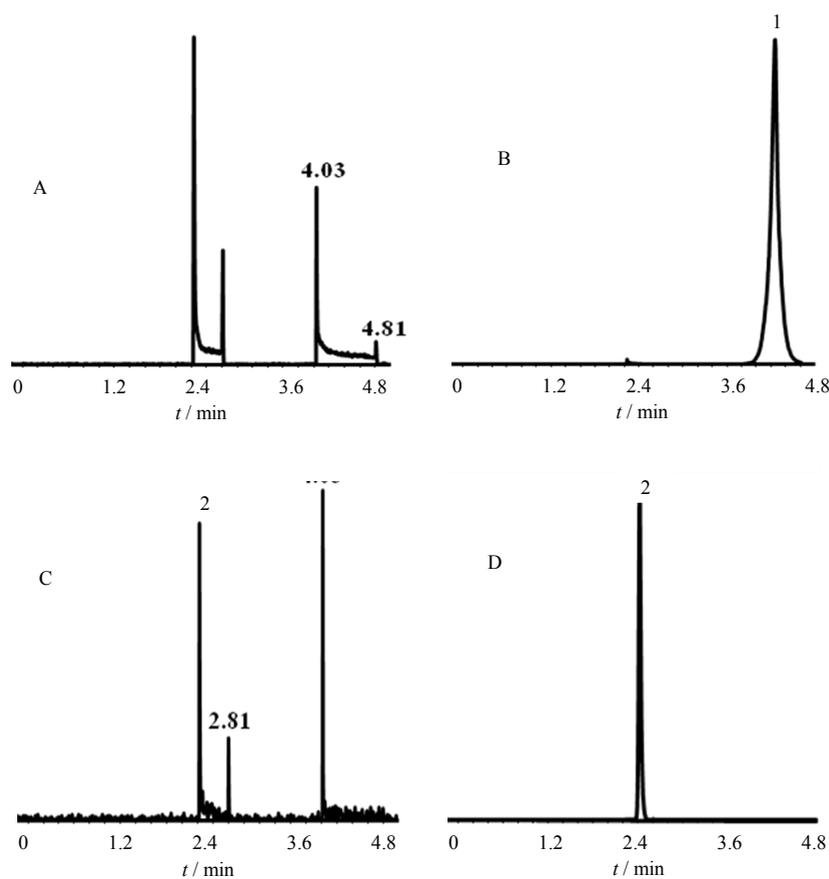


图1 精氨酸双糖苷(A)以及乌苯美司(B)化学结构以及 $[M+H]^+$ 质谱图

Fig. 1 The estimated chemical structures and product ion spectra of $[M+H]^+$ of AFG(A) and bestatin (B)



1-精氨酸双糖苷; 2-乌苯美司

1-arginyl-fructosyl-glucose; 2-bestatin

图2 精氨酸双糖苷样品(A)、精氨酸双糖苷血浆样品(B)、乌苯美司样品(C)和乌苯美司血浆样品(D)色谱图

Fig. 2 Chromatogram of AFG sample (A), AFG plasma (B), Bestatin sample (C), and Bestatin plasma sample (D)

度(X), 纵坐标为精氨酸双糖苷与乌苯美司峰面积比值(Y)。进行回归运算, 绘制出精氨酸双糖苷的标准曲线, 计算回归系数 r^2 , 得到标准曲线 $Y=0.000\ 645\ X+0.002\ 84$, $r^2=0.998\ 4$ 。精氨酸双糖苷的线性范围为20~20 000 ng/mL。

2.5.4 精密度和准确度 按照“2.3”项下方法, 制备低、中、高3个剂量的质控样本(QC), 同一天内对同批次3个剂量的质控样本进行6样本分析, 并且需要连续检测3 d, 根据标准曲线, 计算质控样本的浓度。并根据所求数据, 计算出日内精密度以及日间

精密度以及准确度, 通过连续检测3 d精氨酸双糖苷的QC(50、1 000、14 000 ng/mL)样本, 日内精密度与日间精密度的RSD与RE值均小于15%, 该方法的日内精密度和准确度以及日间精密度和准确度如表1所示。

2.5.5 回收率和基质效应 按照“2.3”项下方法, 制备低、中、高3个浓度的QC血浆样本, 进行6样本分析, 通过LC-MS/MS检测, 为样本I。

取6只大鼠空白血浆样本, 先用乙腈沉淀蛋白, 按照“2.3”项下方法处理样品, 使样品最终浓度为50、

表1 精氨酸双糖苷在大鼠血浆中测定的精密度和准确度(n=6)

Table 1 Precision and accuracy for AFG in rat plasma(n=6)

成分	加入量/(ng·mL ⁻¹)	日内			日间		
		实测值/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%	RE/%	实测值/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%	RE/%
精氨酸双糖苷	50	52.22±0.65	1.25	4.43	49.70±2.46	4.95	-0.60
	1 000	1 003.00±17.85	1.78	0.30	1 012.47±42.59	4.21	1.25
	14 000	13 880.00±235.97	1.70	-0.86	14 039.40±733.99	5.23	0.28

1 000、14 000 ng/mL,通过LC-MS/MS检测,为样本II。

直接配制 50、1 000、14 000 ng/mL 含内标的工作液,通过LC-MS/MS检测,为样本III。回收率=样本I/样本II,基质效应=样本II/样本III,计算回收率以及基质效应,低、中、高浓度的平均回收率为105.38%、104.67%、97.93%,基质效应分别为82.53%、83.04%、80.53%,结果见表2。

2.5.6 稳定性 按照“2.3”项下方法,考察精氨酸双糖苷分析方法的稳定性,分别将精氨酸双糖苷样品于4℃放置2 h,样品处理后室温放置24 h,精氨酸双糖苷血浆样品经过3次冷冻-解冻循环,以及样品放

表2 精氨酸双糖苷回收率和基质效应($n=6$)
Table 2 Absolute relative recovery and matrix effect for AFG ($n=6$)

成分	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	回收率/%	基质效应/%
精氨	50	105.38±3.74	82.53±3.06
酸双	1 000	104.67±3.33	83.04±4.10
糖苷	14 000	97.93±3.26	80.53±3.89

置于-20℃冰箱中冷冻保存15 d,4种方式考察稳定性,分析结果显示,精氨酸双糖苷的RSD以及RE均小于15%,未存在显著性差异,符合稳定性要求。结果见表3。

表3 精氨酸双糖苷在大鼠血浆中的稳定性($n=3$)

Table 3 Stability of AFG in rat plasma under various storage conditions($n=3$)

放置条件	加入量/(ng·mL ⁻¹)	实测值/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%	RE/%
4℃放置2 h	50	51.26±1.17	2.28	2.53
	1 000	1020±20	1.96	2.00
	14 000	14 000±346.41	2.47	0.00
室温放置24 h	50	50.53±1.03	2.03	1.07
	1 000	961±31.19	3.25	-3.90
	14 000	13 533.33±152.75	1.13	-3.33
3次冷冻-解冻循环	50	48.57±4.92	10.13	-2.87
	1 000	942.33±12.10	1.28	-5.77
	14 000	13 800±264.58	1.92	-1.43
-20℃冰箱中冷冻保存15 d	50	47.97±2.70	5.63	-4.07
	1 000	988±27.87	2.82	-1.20
	14 000	14 133.33±602.77	4.26	0.95

2.6 药动学实验

此分析方法用于检测精氨酸双糖苷在大鼠血浆中的浓度($n=6$),Wistar大鼠禁食24 h,自由饮水,分别于颈静脉iv以及ig给予精氨酸双糖苷10 mg/kg,给药后1、5、10、30、60、90、120、150、180、240、360、

480、600 min取血液样本200 μL,4℃下4 500×g离心10 min。取血浆,按“2.4”项下方法处理样品,LC-MS/MS检测。血药浓度-时间曲线见图3,将实验数据用DAS 2.0软件进行分析,计算得出精氨酸双糖苷的绝对生物利用度 [$F(\%)=(AUC_{ig}/AUC_{iv})\times 100$]

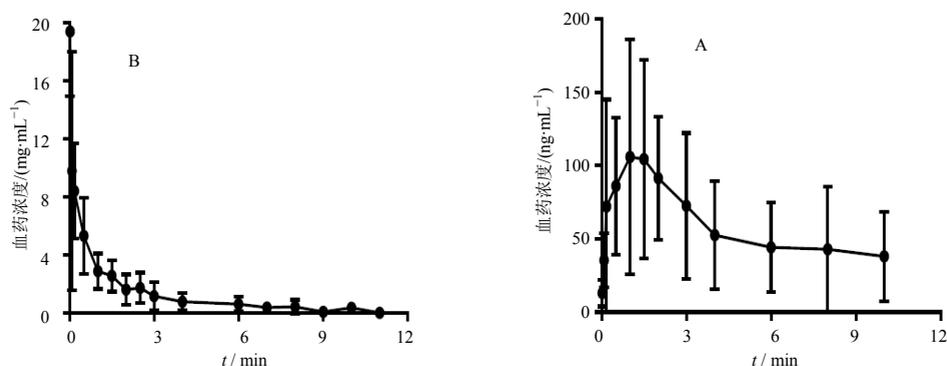


图3 精氨酸双糖苷ig(A)和iv(B)给药后平均血药浓度-时间曲线($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 3 Mean plasma concentration-time curves after ig (A) and iv (B) administration of AFG in rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

为(4.50±3.75)%。

3 讨论

实验采用LC-MS/MS测定血中的精氨酸双糖苷的浓度,以乌苯美司为内标,乌苯美司及精氨酸双糖苷的保留时间分别为2.62 min以及4.45 min。采用该方法分析精氨酸双糖苷简便快速,质谱检测避免了化合物在紫外条件下响应值较低的缺点。通过考察分析该方法的最低下限为20 ng/mL。该方法检测灵敏度较高,线性、回收率和基质效应均符合检测方法要求,精密度和准确度及稳定性,RSD及RE值均小于15%,证实该方法用于检测精氨酸双糖苷合理可靠,并且快速高效。采用Hilic silica类型色谱柱,可以分析氨基酸类化合物及极性较大的化合物,并且可以与基质物质达到良好的分离,同时,LC-MS/MS方法具有普遍适用性。

统计结果发现精氨酸双糖苷的绝对生物利用度较低,但本实验只做了药动学的初步研究,造成

生物利用度低的原因还需进行深入的药动学研究,从而阐明其机制。

参考文献

- [1] Zheng Y N, Han L K, Okuda H, et al. A new amino acid derivative from red ginseng [J]. J Chin Pharm Sci, 1998, 7 (1): 7-10.
- [2] 高铭彤, 王佳奇, 陈凯, 等. 精氨酸双糖苷对脂多糖诱导的巨噬细胞分泌炎症因子的影响 [J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(11): 65-69.
- [3] 黄宝亮, 丁传波, 王佳奇, 等. 红参中精氨酸双糖苷对小鼠的抗疲劳作用 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2017, 43 (5): 897-902.
- [4] 余欣鑫, 高铭彤, 刘兴龙, 等. 精氨酸双糖苷对糖尿病肾病小鼠的治疗作用及基因转化生长因子-β1和胶原蛋白IV相关性研究 [J]. 中国药理学杂志, 2018(19): 1645-1651.
- [5] 邵莹. 人参加工品中精氨酸糖苷新测定方法建立及AFG药理活性研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.
- [14] Sheng M, Kim E. The postsynaptic organization of synapses [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011, 3(12): a005678.
- [15] Yan B C, Park J H, Ahn J H, et al. Postsynaptic density protein (PSD) - 95 expression is markedly decreased in the hippocampal CA1 region after experimental ischemia-reperfusion injury [J]. J Neurol Sci, 2013, 330(1-2): 111-116.
- [16] Gascón S, Sobrado M, Roda J M, et al. Excitotoxicity and focal cerebral ischemia induce truncation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor and cleavage of the scaffolding protein PSD-95 [J]. Mol Psychiatry, 2008, 13 (1): 99-114.
- [17] Hardingham G E, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways [J]. Nat Neurosci, 2002, 5 (5): 405-414.
- [18] Ballarin B, Tymianski M. Discovery and development of NA-1 for the treatment of acute ischemic stroke [J]. Acta Pharmacol Sin, 2018, 39(5): 661-668.
- [19] 于仁雯, 金英, 郭伟英. 银杏叶提取物对大鼠海马缺血再灌注时兴奋性氨基酸释放的影响 [J]. 解放军药理学学报, 2003, 19(1): 24-26, 62.
- [20] Choi D W, Rothman S M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxicischemic neuronal death [J]. Annu Rev Neurosci. 1990, 13: 171-182.

(上接第1114页)