

UPLC-MS/MS法测定比格犬血浆中五味子醇甲的血药浓度

王旭光, 杨俊凤, 李彬瑶, 贾长虹, 黄莹*

天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

摘要: 目的 建立UPLC-MS/MS测定比格犬血浆中的五味子醇甲血药浓度分析方法。方法 采用ACQUITY UPLC® BEH C₁₈色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为0.1%乙酸水-甲醇梯度洗脱, 体积流量为0.4 mL/min。柱温40 °C, 进样量5 μL。采用电喷雾(ESI)正离子模式进行多反应(MRM)监测, 五味子醇甲和利伐沙班(内标)的定量离子对分别为 m/z 433.20→384.30、437.19→145.13。结果 五味子醇甲在0.2~100 ng/mL线性关系良好($r=0.999\ 6$), 最低定量限为0.2 ng/mL, 批内、批间精密度分别为2.04%~7.62%、3.72%~8.29%; 基质效应及提取回收率分别为95.7%~103%、81.2%~106%; 稳定性结果均符合生物样品检测指导原则。结论 建立的UPLC-MS/MS方法快速、简单、灵敏度高, 能满足五味子醇甲血药浓度测定及其药动学研究。

关键词: 五味子醇甲; 比格犬; 血药浓度; UPLC-MS/MS

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2020)01-0087-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.01.015

Determination the concentration of schisandrin in Beagle dog plasma by UPLC-MS/MS method

WANG Xuguang, YANG Junfeng, LI Binyao, JIA Changhong, HUANG Ying

Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Assessment Co. Ltd, Tianjin 300301, China

Abstract: Objective To establish UPLC-MS/MS method for determination of schisandrin in plasma of Beagle dogs. **Methods** The determination was carried out on ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm). The mobile phase consisted of 0.1% acetic acid water-methanol with gradient elution at a flow rate of 0.4 mL/min. The column temperature was set at 40 °C, and the injection volume was 5 μL. Electrospray positive ion mode was used for multi reaction monitoring, the quantitative ions of schisandrin and rivaroxaban (IS) were m/z 433.20→384.30 and 437.19→145.13, respectively. **Results** Schisandrin had good linearity in the ranges of 0.2 — 100 ng/mL ($r=0.999\ 6$). The minimum quantitative limit was 0.2 ng/mL, the intra and inter-day precision were 2.04% — 7.62% and 3.72% — 8.29%, respectively. The matrix effect and the recovery of extraction in the low, medium and high concentration were 95.7% — 103% and 81.2% — 106%, respectively. The results of stability accorded with the guiding principles of biological sample detection. **Conclusion** The UPLC-MS/MS method is rapid, simple and sensitive, and can be used for the determination of schisandrin A in blood and its pharmacokinetics.

Key words: schisandrin; Beagle dogs; plasma concentration; UPLC-MS/MS

五味子是木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实, 始载于东汉《神农本草经》, 性温, 味甘酸, 具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心之功效。五味子中主要化学成分为木脂素、挥发油及有机酸, 其中木脂素是发挥补益强壮的主要活性成分, 其主要有五味子醇甲、五

味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素。五味子在临床上最早应用于保肝护肝, 研究表明, 五味子提取物可诱导肝再生, 并且改善乙酰胺基酚诱发的肝损伤^[1]; 五味子醇甲对中枢神经系统有镇静、催眠、抗抑郁的作用^[2-3]。

中医临床用药多以方剂为主, 通过配伍组方达

收稿日期: 2019-05-14

基金项目: 国家科技重大专项(2015ZX09501004)

第一作者: 王旭光(1988—), 女, 黑龙江人, 理学硕士, 研究方向为非临床药代动力学、毒代动力学。Tel: 15802239982 E-mail: wangxg@tjipr.com

*通信作者: 黄莹, 女, 副研究员。Tel: 13820118868 E-mail: huangy@tjipr.com

到增效、减毒的目的。现有文献通过研究传统方剂中配伍变化对主要活性成分的药动学行为的影响解释中药配伍的合理性^[4-6]。张丽等^[7]通过枣仁安神方配伍变化对五味子醇甲及五味子甲素药动学的研究表明,复方显著减缓活性成分五味子醇甲和五味子甲素的消除,延长作用时间。目前文献中多采用 HPLC-MS/MS 法测定五味子醇甲的血药浓度^[8-9],但检测限较高,且药物配伍可能对血药浓度产生较大影响。因此,本研究建立了快速、灵敏的 UPLC-MS/MS 方法测定比格犬血浆中五味子醇甲的血药浓度。

1 材料

1.1 主要仪器

Waters UPLC Xevo-TQS,美国 Waters 公司超高效液相色谱串联四级杆质谱仪;ACQUITY I-Class,二元高压梯度混合泵;ACQUITY SM-FTN,自动进样器并配有高通量样品组织管理器;Xevo TQ-S,三重四极杆串联质谱仪;UNIFI 数据处理软件;低速大容量离心机, LXJ-IIB;低温高速台式离心机, Thermo 17R。

1.2 药品与主要试剂

五味子醇甲(对照品),质量分数 99.9%,批号 110757-201513,中国食品药品检定研究院;利伐沙班(对照品,内标),质量分数 99.56%,批号 LFSB-150030,天津药物研究院有限公司药物创新研究中心;乙酸(分析纯),批号 201603202,天津市风船化学试剂科技有限公司;甲醇(色谱纯),批号 I844007630,Merck 产品;醋酸乙酯(色谱纯),批号 160829,天津市康科德科技有限公司;比格犬空白血浆取自天津药物研究院新药安全评价有限公司实验动物中心未给药比格犬。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm),流动相为 0.1% 乙酸水-甲醇,梯度洗脱条件见表 1。体积流量为 0.4 mL/min,柱温 40 °C,进样体积 5 μL。

2.2 质谱条件

离子源为 ESI 源,正离子检测,采用 MRM 扫描模式。锥孔电压 20 V;离子源温度为 150 °C;去溶剂温度为 400 °C;毛细管电压 3.0 kV;锥孔气体积流量为 150 L/h;去溶剂气体积流量为 900 L/h;取样锥孔(sample cone)为 60 V。用于定量分析的离子反应及质谱参数见表 2。

表 1 梯度洗脱条件

Table 1 Program of gradient elution

时间/min	A 相/%	B 相/%
0.0	15	85
0.2	15	85
0.7	65	35
1.7	65	35
2.0	95	5
2.5	95	5
3.0	15	85
4.0	15	85

表 2 待测物及内标的质谱参数

Table 2 MS/MS parameters of analyte and internal standard

化合物	定量离子对	碰撞能量/eV
五味子醇甲	<i>m/z</i> 433.20→ <i>m/z</i> 384.30	18
利伐沙班(IS)	<i>m/z</i> 437.19→ <i>m/z</i> 145.13	22

2.3 溶液配制

2.3.1 复溶液 80% 甲醇水溶液,量取 400 mL 甲醇与 100 mL 去离子水混合均匀。

2.3.2 五味子醇甲标准系列溶液及质控溶液配制 精密称取适量五味子醇甲对照品,甲醇溶解并稀释成质量浓度为 1 000、600、300、100、50、10、2 ng/mL 的五味子醇甲标准系列溶液和质量浓度为 800、50、5 ng/mL 的质控溶液,2~8 °C 条件下放置。

2.3.3 利伐沙班(IS)溶液配制 精密称取利伐沙班对照品适量,甲醇溶解稀释成质量浓度为 150 ng/mL 的内标溶液,2~8 °C 条件下放置。

2.4 系列标准血浆样品配制

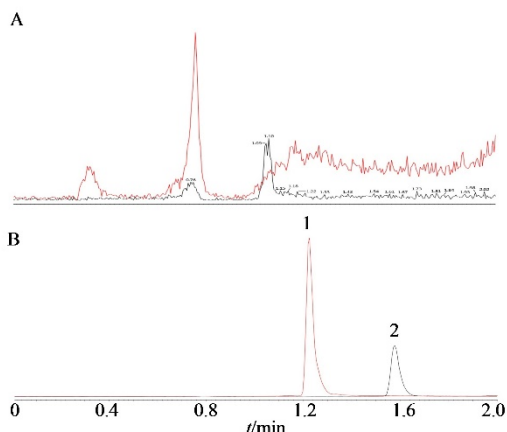
取各浓度五味子醇甲标准系列溶液及质控溶液 20 μL,加入空白犬血浆 180 μL,混匀。

2.5 血浆样品处理过程

取模拟血浆 100 μL 置于 10 mL EP 管中,加入 50 μL 内标溶液(150 ng/mL),再加入 2 000 μL 醋酸乙酯,涡旋混合 3 min,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液 1 800 μL 至玻璃管中,40 °C 下氮气吹干,再加入 200 μL 复溶液,涡旋 3 min,4 °C、13 000 r/min 离心 10 min,取上清进样。

2.6 专属性试验

取 6 只比格犬空白血浆,配制犬空白血浆和含五味子醇甲(0.3 μg/mL)和内标(150 ng/mL)模拟血浆样品,测定后得到 UPLC-MS/MS 色谱图,见图 1。结果显示,五味子醇甲保留时间为 1.58 min,内标保留时间为 1.23 min,内源性物质对定量测定干



A- 空白犬血浆样品, B- 含五味子醇甲和内标的模拟血浆样品; 1- 利伐沙班 (IS), 2- 五味子醇甲

A- blank plasma sample; B- plasma sample spiked with schisandrin and internal standard; 1- rivaroxaban (IS); 2- schisandrin

图1 五味子醇甲及内标 UPLC-MS/MS 法色谱图

Fig. 1 UPLC-MS/MS chromatograms of schisandrin and internal standard

扰较小, 可用于生物样品中五味子醇甲含量分析。

2.7 标准曲线及定量下限

取配制好的系列浓度五味子醇甲模拟血浆样品, 按操作进行 UPLC-MS/MS 分析, 使用 UNIFI 数据处理软件对目标峰进行积分, 记录峰面积, 以待测物浓度 (X) 为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标, 用加权最小二乘法 (权重为 $1/X^2$) 进行回归运算, 求得回归方程即为血浆校正曲线。得到回归方程: $Y=0.008\ 115\ X+0.000\ 547$, $r=0.999\ 6$ 。结果表明, 五味子醇甲在 $0.2\sim 100\ \text{ng/mL}$ 线性良好。配制质量浓度为 $0.2\ \text{ng/mL}$ 的五味子醇甲血浆样品, 平行配制 6 份, 按照操作进行 UPLC-MS/MS 分析, 测定质量浓度为 $(0.198\pm 0.01)\ \text{ng/mL}$, 准确度 (RE) 为 -1.11% , RSD 为 7.52% , 说明本方法测定血浆中五味子醇甲的定量下限可达到 $0.2\ \text{ng/mL}$ 。

2.8 精密度及准确度实验

配制浓度为 0.2 、 0.5 、 5 、 $80\ \text{ng/mL}$ 的五味子醇甲模拟血浆样品, 每批每浓度平行配制 6 份, 共 3 批, 进行 UPLC-MS/MS 分析。结果显示, 4 个浓度模拟血浆样品的 RSD 分别为 7.52% 、 5.38% 、 2.61% 、 3.43% ; 批内精密度为 7.62% 、 5.13% 、 2.43% 、 2.04% ; 批间精密度分别为 6.75% 、 6.95% 、 3.72% 、 8.29% ; RE 分别为 -1.11% 、 4.86% 、 5.01% 、 2.05% , 符合生物样品检测标准。

2.9 基质效应

分别取相应浓度的质控工作液 $50\ \mu\text{L}$, 加入到

$450\ \mu\text{L}$ 去离子水中, 配制 C 液, 取 $100\ \mu\text{L}$ C 液加入 $50\ \mu\text{L}$ 浓度为 $150\ \text{ng/mL}$ 的内标溶液, 再加入 $50\ \mu\text{L}$ 去离子水, 混合均匀。每个浓度平行配制 6 份样品。结果显示, 在 3 个质控浓度水平下五味子醇甲的基质效应为 $(95.7\pm 3.88)\%$ 、 $(99.3\pm 3.22)\%$ 、 $(103\pm 4.00)\%$; RSD 分别为 4.06% 、 3.24% 、 3.89% 。

2.10 提取回收率

取空白血浆 $180\ \mu\text{L}$, 加入 $20\ \mu\text{L}$ 甲醇, 混合均匀配制模拟血浆样品, 取模拟血浆样品 $50\ \mu\text{L}$, 加入 $50\ \mu\text{L}$ 甲醇溶液, 再加入 $300\ \mu\text{L}$ 沉淀剂, 涡旋后, 离心 $10\ \text{min}$, 取上清 $100\ \mu\text{L}$, $40\ ^\circ\text{C}$ 下氮气吹干, 取上述无基质溶液 $100\ \mu\text{L}$, 加入 $200\ \mu\text{L}$ 稀释剂, 涡旋后进样测定。每个浓度平行配制 6 份样品。结果表明, 3 个质控浓度水平下五味子醇甲的提取回收率为 $(106\pm 4.79)\%$ 、 $(87.2\pm 4.47)\%$ 、 $(81.2\pm 3.20)\%$; RSD 分别为 4.53% 、 5.12% 、 3.94% 。

2.11 稳定性考察

配制浓度为 0.5 、 5.0 、 $80.0\ \text{ng/mL}$ 的五味子醇甲模拟血浆样品, 考察其在室温放置 $4\ \text{h}$ 、 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冻融循环 1 次、 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冻融循环 3 次、经处理后自动进样器放置 $24\ \text{h}$ 的稳定性。试验结果表明, 血浆样品室温放置 $4\ \text{h}$ 、 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冻融循环一次、 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冻融循环 3 次及处理后自动进样器放置 $24\ \text{h}$, 样品测定结果 RE $< 10\%$, 说明在上述条件下样品稳定。

3 讨论

在检测条件摸索阶段, 对流动相种类进行了考察, 乙腈作为有机相时, 化合物响应较好, 但保留时间过小, 不利于化合物与生物基质的分离, 因此选择甲醇作为有机相, 水相加入 0.1% 乙酸对化合物的响应及分离起到改善作用, 参考相关文献, 对洗脱程序进行优化, 最终确定了化合物的检测条件。

本实验考察了多种样品处理方法, 包括用甲醇、乙腈做沉淀剂进行蛋白沉淀, 用醋酸乙酯、正己烷、叔丁基甲醚作为萃取剂进行液液萃取。结果显示, 沉淀蛋白法基质效应大且无法满足较低的检测限需求。正己烷、叔丁基甲醚做萃取剂时提取回收率较低, 醋酸乙酯作为萃取剂时基质效应及提取回收率均在 80% 以上, 满足生物样品分析的检测要求同时获得更低的检测限。因此本研究采用了醋酸乙酯做萃取剂的液-液萃取的方法进行样品提取。在实验中内标利伐沙班稳定可靠, 保留时间合适, 并且在上述样品前处理条件下利伐沙班的基质效应和回收率与待测物的接近并且符合规定。另外, 对复溶剂中甲醇水的不同配比进行了考察, 结果

80% 甲醇-20% 水作为复溶剂时基质效应小且峰形良好。

本方法线性范围为 0.2~100.0 ng/mL, 定量下限为 0.2 ng/mL, 样品分析时间为 2 min, 与已有文献的检测方法进行对比, 本文建立的 UPLC-MS/MS 方法具有更高灵敏度和更快的分析速度, 可以适用于五味子醇甲的临床前药动学研究, 同时为五味子在复方中的作用及复方配伍机制研究提供资料。

参考文献

- [1] Li X, Fan X, Li D, et al. Schisandra sphenanthera extract facilitates liver regeneration after partial hepatectomy in mice [J]. Drug Metab Dispos, 2016, 44(5): 647-652.
- [2] 许方敏, 薛瑞, 叶洪涛, 等. 五味子醇甲对小鼠抑郁样行为的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2017, 31(3): 244-249.
- [3] 赵坚毅, 田立东. 五味子水提取液对叔丁基过氧化氢诱导神经元衰老保护作用 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(1): 55-58.
- [4] 郭文婧, 邵青, 张玉峰, 等. 生脉方主要活性成分配伍对其药代动力学行为的影响 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2012, 41(1): 6-12.
- [5] 王胜春, 赵惠萍, 皇甫孟军, 等. 五味子与丹参配伍对其成分五味子乙素、醇甲的药代动力学影响 [J]. 中成药, 2004, 26(12): 987-991.
- [6] 智炎伟. 人参五味子颗粒与五味子稠膏中五味子醇甲在大鼠体内的药动学研究 [J]. 中国医药科学, 2014, 4(4): 35-38.
- [7] 张丽, 房敏峰. 枣仁安神方配伍变化对五味子醇甲及五味子甲素药动学的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(19): 1636-1640.
- [8] 周渊, 陆兔林. 液-质联用研究五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素在大鼠体内的组织分布 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(7): 1121-1126.
- [9] 安莉萍, 窦志华, 罗琳, 等. 五味子含药血清中药源性成分的 HPLC-DAD 分析 [J]. 现代中药研究与实践, 2013, 27(3): 30-32.