

## UHPLC-MS/MS 同时测定大鼠血浆中裸花紫珠 3 个酚苷类成分及其药动学研究

郑东昆<sup>1,2</sup>, 陈伟康<sup>1</sup>, 马双成<sup>3</sup>, 邵军<sup>1,2</sup>, 王杰<sup>1,2</sup>, 罗跃华<sup>1,2\*</sup>

1. 江西省药品检验检测研究院/江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心, 江西 南昌 330029

2. 南昌大学药学院, 江西 南昌 330006

3. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

**摘要:** **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法(UHPLC-MS/MS)同时测定大鼠血浆中毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷及连翘酯苷 B 的水平, 并计算 3 个酚苷类成分在大鼠体内的药动学参数。**方法** 大鼠 ig 给予裸花紫珠提取物(5 g/kg)后不同时间取血浆, 血浆样品经盐酸处理, 乙腈沉淀蛋白后, 以乙腈-0.005%甲酸为流动相, 通过 Phenomenex<sup>®</sup> Kinetex C<sub>18</sub> 柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)梯度洗脱; 采用电喷雾离子化源(ESI)三重四极杆串联质谱, 以多反应监测模式(MRM)负离子测定血浆中毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、连翘酯苷 B。**结果** 毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、连翘酯苷 B 分别在 7.77~3 880.00 ng/mL ( $r^2=0.9955$ )、5.04~2 520.00 ng/mL ( $r^2=0.9949$ )、1.78~890.00 ng/mL ( $r^2=0.9951$ ) 呈良好的线性关系, 各成分的提取回收率在 75.2%~89.9%, 日内、日间精密度的 RSD 均小于 8.8%。大鼠 ig 给予裸花紫珠提取物后, 毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷及连翘酯苷 B 均在 30 min 左右达到最大血药浓度, AUC<sub>0-t</sub> 分别为 (93 881.65±18 326.65)、(29 204.97±8 499.88)、(15 027.05±3 763.82) ng·min/mL, C<sub>max</sub> 分别为 (2 179.00±355.60)、(737.57±210.31)、(227.30±48.38) ng/mL, t<sub>1/2z</sub> 分别为 (235.41±117.90)、(151.56±49.23)、(161.68±63.92) min。**结论** 建立的 UHPLC-MS/MS 方法简便、快速、专属性强, 可用于大鼠血浆中毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、连翘酯苷 B 的同时测定及其药动学研究。

**关键词:** 裸花紫珠; 毛蕊花糖苷; 异毛蕊花糖苷; 连翘酯苷 B; 超高效液相色谱-串联质谱法; 药动学

**中图分类号:** R285.51 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)23-3533-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.23.015

Simultaneous determination of three phenolic glycosides in *Callicarpa nudiflora* by UHPLC-MS methods and analysis of their pharmacokinetics in plasma of ratsZHENG Dong-kun<sup>1,2</sup>, CHEN Wei-kang<sup>1</sup>, MA Shuang-cheng<sup>3</sup>, SHAO-Jun<sup>1,2</sup>, WANG-Jie<sup>1,2</sup>, LUO Yue-hua<sup>1,2</sup>

1. Jiangxi Provincial Research Institute for Drug Control/Jiangxi Provincial Engineering Research Center for Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029, China

2. School of Pharmacy, Nanchang University, Nanchang 330006, China

3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

**Abstract: Objective** An UHPLC-MS/MS method was developed for the simultaneous determination of acteoside, isoacteoside, and forsythoside B in plasma of rats and the pharmacokinetic parameters for three phenolic glycosides were calculated as well. **Methods** Samples of plasma of rats were obtained at different time after rats were administrated with *Callicarpa nudiflora* extract (5 g/kg). After the addition of acidification (hydrochloric acid, 0.25 mol/L) and deproteinization by acetonitrile, plasma samples were separated on a Phenomenex<sup>®</sup> Kinetex C<sub>18</sub> column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) with gradient elution using acetonitrile-0.005% formic acid as mobile phase. Mass spectrometric detection was carried out by multiple reaction monitoring (MRM) using electrospray ionization in negative ion mode. **Results** A good linearity of acteoside, isoacteoside, and forsythoside B was shown in the ranges of 7.77 – 3 880.00 ng/mL ( $r^2 = 0.9955$ ), 5.04 – 2 520.00 ng/mL ( $r^2 = 0.9949$ ), and 1.78 – 890.00 ng/mL ( $r^2 = 0.9951$ ), respectively. The mean extraction recoveries of analytes were in the range of 75.2% – 89.9%, and the intra- and inter-day RSD values were less than 8.8%. The t<sub>max</sub> of acteoside, isoacteoside, and forsythoside B was about 30 min, AUC<sub>0-t</sub> were (93 881.65 ± 18 326.65), (29 204.97 ± 8 499.88), and (15 027.05 ± 3 763.82) ng·min/mL, C<sub>max</sub> were (2 179.00 ± 355.60), (737.57 ± 210.31), and (227.30 ± 48.38) ng/mL, t<sub>1/2z</sub> were (235.41 ± 117.90), (151.56 ± 49.23), and (161.68 ± 63.92) min, respectively. **Conclusion** The method is proved to be simple, rapid, and specific, and to be suitable for the simultaneous

收稿日期: 2015-06-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81373955); 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金课题(2013WA9); 江西省自然科学基金资助项目(20142BAB205085)

作者简介: 郑东昆(1987—), 硕士研究生, 从事药物分析研究。Tel: 18146622300 E-mail: 329747454@qq.com

\*通信作者 罗跃华, 主任中药师, 硕士研究生导师, 从事药物分析研究。Tel: (0791)88158689 E-mail: emailuo@sohu.com

determination of acteoside, isoacteoside, and forsythoside B in plasma of rats and the pharmacokinetic study.

**Key words:** *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn.; acteoside; isoacteoside; forsythoside B; UHPLC-MS/MS; pharmacokinetics

裸花紫珠 *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn. 为马鞭草科 (Verbenaceae) 紫珠属 *Callicarpa* L. 植物, 为海南省道地药材<sup>[1]</sup>, 具有抗菌止血、消炎解毒、散瘀消肿、祛风祛湿功效, 主治各种炎症、外伤出血、跌打肿痛、风湿肿痛、肺结核咳血、胃肠出血等症<sup>[2-3]</sup>。裸花紫珠中的化学成分主要有黄酮类、萜类、酚类(含酚苷类)及挥发油类<sup>[4]</sup>。据文献报道, 酚苷类成分可能是裸花紫珠止血作用的主要活性成分<sup>[5]</sup>, 苷元咖啡酸与羟基酪醇具有抗炎、抗菌及抗氧化活性<sup>[6-7]</sup>。动物实验结果显示毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷具有抗氧化和抗溶血、血管紧张素转换酶抑制、抗高血压活性<sup>[8-9]</sup>; 而体外研究表明连翘酯苷 B 具有抗炎、抗菌作用<sup>[10-11]</sup>, 且三者裸花紫珠中的量较高<sup>[12-13]</sup>。目前关于裸花紫珠的研究大部分集中在其药理活性方面, 而对其活性成分的药理学研究很少关注, 且缺乏详尽的药理学参数。本研究建立了超高效液相色谱-串联质谱法 (UHPLC-MS/MS) 同时测定大鼠血浆中毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和连翘酯苷 B 的方法, 研究裸花紫珠提取物 ig 给药后, 3 个酚苷类成分在大鼠体内的药理学过程, 为裸花紫珠的临床应用和开发提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

BSA124S-CW、BT25S 型电子天平, 德国 Sartorius; BUG 25-06 型 (25 kHz, 250 W) 超声仪, 上海必能信超声仪器有限公司; Vortex XW-80A 型漩涡混合器, 上海精科实业有限公司; pico 高速离心机, 德国 SORVALL; Finnpiptette 移液枪 (100~1 000  $\mu$ L), 美国 Thermo; Tripette 移液枪 (20~200  $\mu$ L), 德国 BRAND; 有机针筒过滤器 (0.22  $\mu$ m), 美国 Waters; Agilent 1290 超高效液相色谱仪 (在线脱气机、二元超高压梯度泵、控温自动进样器、柱温箱), 美国安捷伦; API 4000 三重串联四极杆质谱仪、Analyst<sup>®</sup> 工作站, 美国 Applied Biosystem; Phenomenex<sup>®</sup> Kinetex C<sub>18</sub> 色谱柱, 广州菲罗门科学仪器有限公司; Millipore Synergy<sup>®</sup>UV 纯水机, Millipore。

### 1.2 实验动物

SD 大鼠, 雄性, 体质量 (200 $\pm$ 20) g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号 SCXK [湘] 2009-0004, 动物房温度 (22 $\pm$ 2)  $^{\circ}$ C, 湿度 (55 $\pm$ 10) %, 每日光照时间 12 h; 动物饲料

购自北京科澳协力饲料有限公司。

### 1.3 药品与试剂

裸花紫珠药材 2012 年采集于海南五指山, 经江西省药品检验检测研究院袁桂平主任中药师鉴定为裸花紫珠 *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn. 的地上部分。对照品毛蕊花糖苷 (批号 1530-200202, 质量分数 93.3%)、连翘酯苷 B (批号 111811-201102, 质量分数 93.9%)、甘草苷 (内标, 批号 111610-200604, 质量分数 100%) 均购于中国食品药品检定研究院; 异毛蕊花糖苷对照品由江西省药品检验检测研究院从裸花紫珠中分离制备得到, 由 MS、<sup>1</sup>H-NMR 和 <sup>13</sup>C-NMR 鉴定结构, 通过面积归一化法计算质量分数在 98% 以上; 水为 Millipore 纯水机制备的超纯水; 乙腈为色谱纯, 美国 Sigma 公司; 其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Phenomenex<sup>®</sup> Kinetex C<sub>18</sub> 色谱柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7  $\mu$ m); 在线过滤器 (0.5  $\mu$ m, Upchurch Scientific Ltd); 流动相为乙腈 (A)-0.005% 甲酸水溶液 (B); 梯度洗脱程序: 0~6.9 min, 10%~43% A; 7.0~7.1 min, 43%~95% A; 7.2~9.0 min, 95% A; 并以 95% A 运行 2 min。柱温 40  $^{\circ}$ C; 体积流量 0.45 mL/min; 进样体积 1  $\mu$ L。

### 2.2 质谱条件

采用电喷雾离子源 (ESI); 负离子方式检测; 多重反应监测 (MRM) 模式下扫描; 气帘气 (N<sub>2</sub>): 172.4 kPa (25 psi); 离子源 GS1 (N<sub>2</sub>): 413.7 kPa (60 psi), GS2 (N<sub>2</sub>): 379.2 kPa (55 psi); 源内温度 500  $^{\circ}$ C; 喷雾电压 -4 500 V; 入口电压 (EP) -10 V; 出口电压 (CXP) -13 V; 母离子、子离子的 *m/z*, 解簇电压 (DP)、碰撞能量 (CE) 见表 1。

### 2.3 裸花紫珠提取物的制备

取裸花紫珠药材 1 kg, 加入 80% 乙醇回流 2 h, 提取 3 次, 提取液合并, 减压浓缩, 得裸花紫珠提取物 (干浸膏) 180 g。采用外标法按上述色谱条件检测, 得出毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、连翘酯苷 B 质量分数分别为 27.57、10.85、4.34 mg/g。精密称取裸花紫珠提取物 10 g, 加入 0.5% 的羧甲基纤维素钠超声溶解配制成 0.5 g/mL 的药液。

表 1 优化后的 3 个酚苷类成分和内标 MRM 参数

Table 1 Optimized multiple reaction monitoring (MRM) parameters for three phenolic glycosides and internal standard

成分	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP/V	CE/eV	t <sub>R</sub> /min
毛蕊花糖苷	623.3	161.0	-65	-48	5.65
异毛蕊花糖苷	623.3	161.0	-65	-48	5.98
连翘酯苷 B	755.2	160.7	-60	-56	5.18
甘草苷 (内标)	417.2	254.7	-53	-35	5.83

2.4 给药与样品采集

取 6 只 SD 大鼠，禁食 12 h，自由饮水，按裸花紫珠提取物 (0.5 g/mL) 5 g/kg ig 给药，分别于给药后 5、10、20、30、45、60、90、120、180、300、420 min 经眼底静脉丛取血 0.4 mL，置于肝素化离心试管中，立即 4 °C、3 000 r/min 离心 5 min，取上层血浆，置于 -20 °C 冰箱保存。

2.5 溶液的制备

2.5.1 对照品溶液的制备 精密称取毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、连翘酯苷 B 对照品适量，加甲醇溶解并稀释至刻度，制成质量浓度分别为 38.84、25.20、8.90 μg/mL 对照品溶液。

2.5.2 内标溶液的制备 精密称取甘草苷对照品适量，加甲醇溶解并稀释至刻度，制成质量浓度为 100 μg/mL 的内标母液，精密吸取一定量的母液至量瓶中，加甲醇稀释至刻度，得质量浓度为 250 ng/mL 的内标溶液，放置冰箱内避光冷藏。

2.6 血浆样品的处理

室温下融化血浆，涡旋混匀，精密吸取大鼠血浆 100 μL，依次加入 10 μL 内标、50 μL 盐酸 (0.25 mol/L)、10 μL 甲醇，涡旋混匀 1 min，加入乙腈 300 μL，涡旋 2 min 灭活蛋白。13 000 r/min 离心 10 min，取上清液于 40 °C 水浴下氮气吹干，残渣加 50% 乙腈 100 μL 复溶，涡旋混匀后 13 000 r/min 离心 10 min，取上清液 1 μL 进样。

2.7 方法学考察

2.7.1 专属性考察 取大鼠空白血浆 (不加内标溶液，用等体积甲醇代替)，其余按“2.6”项方法操作；将毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和连翘酯苷 B 对照品溶液加入空白血浆中，取大鼠给药后 20 min 的血浆样品，均按“2.6”项方法操作。上述 3 种样品进行 UHPLC-MS/MS 分析，得空白血浆、空白血浆+对照品、给药后 20 min 的血浆样品色谱图，结果见图 1。3 个酚苷类成分及内标峰形良好，大鼠空白血浆中

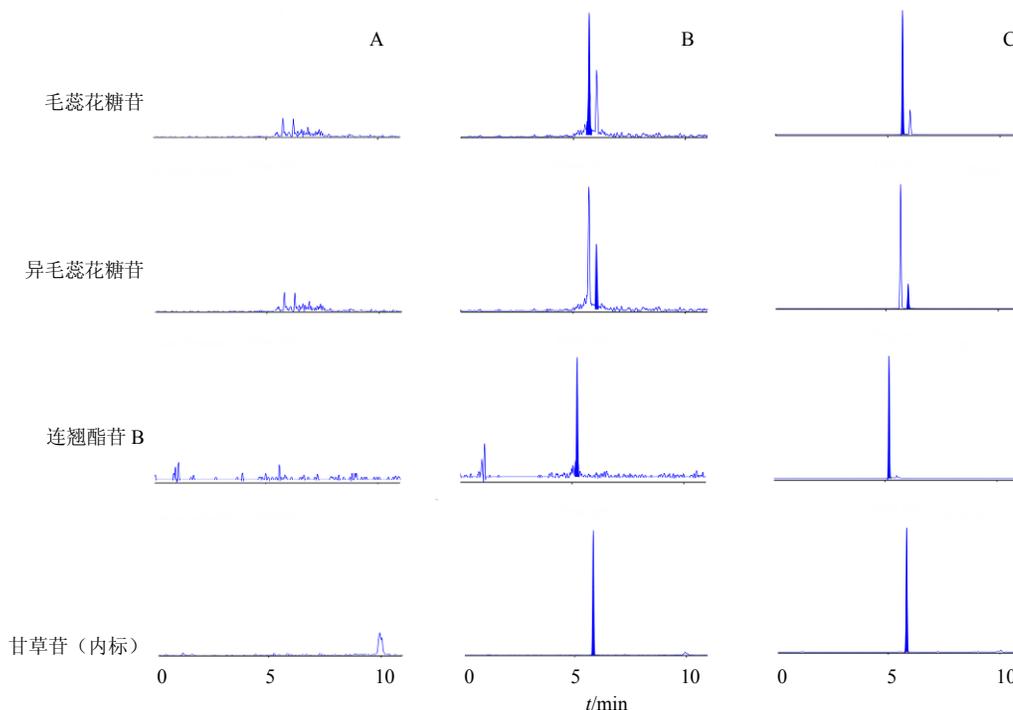


图 1 空白血浆 (A)、空白血浆+对照品 (B) 和给药 20 min 后的血浆样品 (C) UHPLC-MS/MS 色谱图

Fig. 1 UHPLC-MS/MS chromatogram of blank plasma (A), blank plasma + reference substances (B), and plasma samples at 20 min after oral administration of *C. nudiflora* extract (C)

的内源性物质、代谢产物及裸花紫珠提取物中其他成分对测定无干扰，方法专属性良好。

**2.7.2 线性关系考察** 在空白血浆中分别加入不同质量浓度的毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、连翘酯苷 B 系列对照品溶液，配制质量浓度为 7.77、15.54、77.68、388.40、776.80、1 553.60、3 107.20、3 884.00 ng/mL 的毛蕊花糖苷血浆样品；质量浓度为 5.04、10.08、50.40、252.00、504.00、1 008.00、2 016.00、2 520.00 ng/mL 的异毛蕊花糖苷血浆样品；质量浓度为 1.78、3.56、17.80、89.00、178.00、356.00、712.00、890.00 ng/mL 的连翘酯苷 B 血浆样品。按“2.6”项方法操作，进样检测。以各成分与内标峰面积之比 (Y) 对各成分质量浓度 (X)

分别进行线性回归，求得的回归方程即为标准曲线，根据信噪比  $S/N=10$  计算各成分的最低定量限。毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷与连翘酯苷 B 的标准曲线回归方程、相关系数、线性范围及定量下限结果见表 2。

**2.7.3 精密度和准确度试验** 取大鼠空白血浆，配制毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、连翘酯苷 B 的高、中、低 3 个质量浓度的含药血浆，按“2.6”项方法处理，每个质量浓度 6 样本进样分析，以当日标准曲线计算血浆药物浓度、精密度与准确度，准确度以 RE [RE = (测定浓度 - 配制浓度) / 配制浓度表示]。日内、日间精密度 RSD < 8.8%，RE 在 -9.6% ~ 9.8%，符合生物药品分析测试要求。结果见表 3。

表 2 3 个酚苷类成分在大鼠血浆中的标准曲线、相关系数、线性范围、定量下限

Table 2 Standard curves, correlation coefficients, linear ranges, and LLOQs of three phenolic glycosides in plasma of rats

成分	标准曲线	$r^2$	线性范围/(ng·mL <sup>-1</sup> )	定量下限/(ng·mL <sup>-1</sup> )
毛蕊花糖苷	$Y=3.55 \times 10^{-3} X+9.49 \times 10^{-3}$	0.995 5	7.77~3 880.00	3.88
异毛蕊花糖苷	$Y=2.32 \times 10^{-3} X+3.13 \times 10^{-4}$	0.994 9	5.04~2 520.00	2.52
连翘酯苷 B	$Y=1.93 \times 10^{-3} X+6.67 \times 10^{-4}$	0.995 1	1.78~ 890.00	0.89

表 3 大鼠血浆中 3 个酚苷类成分的日内、日间精密度和准确度 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Intra-day and Inter-day precision and accuracy of three phenolic glycosides in plasma of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

成分	质量浓度/ (ng·mL <sup>-1</sup> )	日内			日间		
		测定值/(ng·mL <sup>-1</sup> )	精密度 RSD/%	RE/%	测定值/(ng·mL <sup>-1</sup> )	精密度 RSD/%	RE/%
毛蕊花糖苷	7.77	8.41 ± 0.28	3.3	8.2	7.21 ± 0.48	6.7	-7.2
	776.80	792.69 ± 15.87	2.0	2.0	732.39 ± 21.41	2.9	-5.7
	3 107.20	3	2.2	3.3	3 289.50 ± 185.30	5.6	5.8
异毛蕊花糖苷	5.04	5.34 ± 0.32	6.0	6.0	5.42 ± 0.43	7.9	7.5
	504.00	551.25 ± 25.59	4.6	9.4	551.89 ± 25.59	4.6	9.5
	2 016.00	2	2.8	6.2	1 876.70 ± 132.20	7.0	-7.1
连翘酯苷 B	1.78	1.84 ± 0.16	8.8	3.4	1.61 ± 0.09	5.6	-9.6
	178.00	176.90 ± 2.68	1.5	-0.6	173.23 ± 4.48	2.6	-2.7
	712.00	778.36 ± 19.49	2.5	9.3	781.50 ± 37.23	4.8	9.8

**2.7.4 提取回收率与基质效应试验** 取大鼠空白血浆，操作同“2.7.3”项 (A)；另取 6 份不同来源的空白血浆 (B) 及超纯水 (C)，同法处理，取上清液，加入 3 个酚苷类成分及内标，配制高、中、低 3 个质量浓度的含药样品；每个质量浓度 6 样本分析，记录样品与内标的峰面积，以 B 与 C 的比值计算基质效应，以 A 与 C 的比值计算提取回收率。结果表明本实验条件下 3 个酚苷类成分的提取回收率均良好，血浆基质对其离子化及测定无影响。结果见表 4。

**2.7.5 稳定性试验** 取大鼠空白血浆，操作同“2.7.3”项，每个质量浓度进行 6 样本分析，用于考

察样品经处理后 3 个冻融循环、室温放置 8 h 及 -20 °C 放置 14 d 的长期稳定性。血浆中的毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、连翘酯苷 B 在不同处理条件的稳定性结果见表 5。各成分在血浆中经过 3 次冻融循环、室温放置 8 h、-20 °C 下储存 14 d 均稳定。

**2.8 3 个酚苷类成分的体内药理学**

应用所建立的 UHPLC-MS/MS 方法测定各时间点血药浓度，将所得的 3 个酚类成分的血药浓度-时间数据用 DAS 3.0 药理学软件拟合，计算毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、连翘酯苷 B 在大鼠体内各项药理学参数。药时曲线见图 2，主要药理学参数见表 6。

表 4 3 个酚苷类成分在大鼠血浆中的提取回收率与基质效应 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Recovery and matrix effect of three phenolic glycosides in plasma of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

成分	质量浓度/(ng·mL <sup>-1</sup> )	提取回收率		基质效应	
		平均值/%	RSD/%	平均值/%	RSD/%
毛蕊花糖苷	7.77	84.4	6.7	101.8	5.1
	776.80	77.8	3.3	94.8	4.5
	3 107.20	84.8	7.2	103.3	3.6
异毛蕊花糖苷	5.04	82.5	6.9	91.0	3.6
	504.00	79.5	2.5	96.3	2.2
	2 016.00	89.9	4.7	92.5	2.7
连翘酯苷 B	1.78	77.8	2.4	107.6	4.5
	178.00	75.2	4.6	93.8	2.1
	712.00	86.9	6.1	109.8	4.9

表 5 大鼠血浆中 3 个酚苷类成分的稳定性 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 5 Stability of three phenolic glycosides in plasma of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

成分	质量浓度/(ng·mL <sup>-1</sup> )	冻融实验		8 h 室温		-20 °C 放置 14 d	
		RE/%	RSD/%	RE/%	RSD/%	RE/%	RSD/%
毛蕊花糖苷	7.77	-4.5	2.3	-5.1	1.1	-8.9	8.3
	776.80	-3.4	4.7	-3.1	6.0	-9.1	7.2
	3 107.20	3.4	5.5	-8.8	2.8	5.4	8.7
异毛蕊花糖苷	5.04	-5.6	1.5	-5.8	2.7	-3.8	1.9
	504.00	-4.3	5.3	-2.3	5.8	5.1	7.7
	2 016.00	-3.6	6.8	-6.3	6.5	3.3	9.5
连翘酯苷 B	1.78	-5.1	5.3	-3.4	6.4	-8.2	7.2
	178.00	-2.7	4.2	-5.4	6.3	3.8	7.5
	712.00	-3.3	4.8	-4.0	7.4	-2.8	4.7

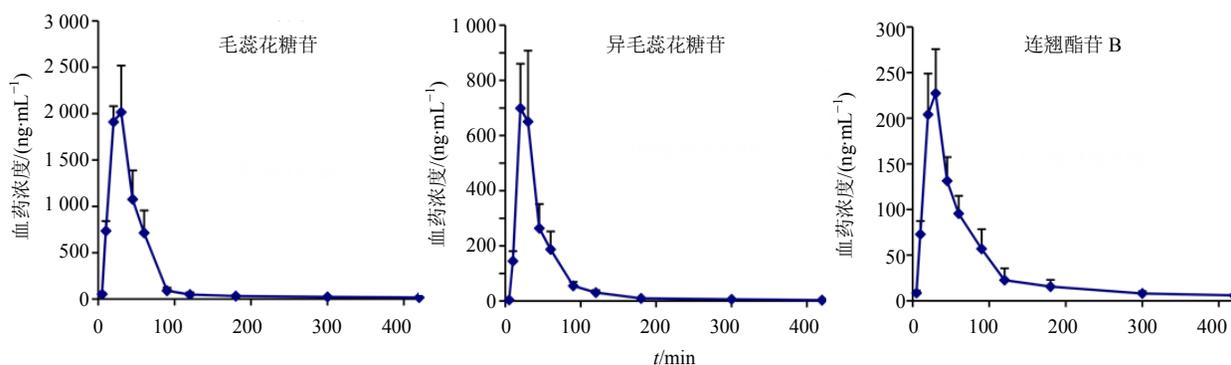


图 2 大鼠 ig 裸花紫珠提取物后 3 个酚苷类成分的药时曲线

Fig. 2 Mean concentration-time profiles for three phenolic glycosides in plasma of rats after ig administration of *C. nudiflora* extract

表 6 大鼠 ig 裸花紫珠提取物后 3 个酚苷类成分的主要药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 6 Main pharmacokinetic parameters of three phenolic glycosides in plasma of rats after ig administration of *C. nudiflora* extract ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

参数	单位	毛蕊花糖苷	异毛蕊花糖苷	连翘酯苷 B
AUC <sub>0-t</sub>	ng·min·mL <sup>-1</sup>	93 881.65 ± 18 326.65	29 204.97 ± 8 499.88	15 027.05 ± 3 763.82
AUC <sub>0-∞</sub>	ng·min·mL <sup>-1</sup>	100 776.25 ± 25 227.72	30 006.63 ± 8 709.22	16 237.88 ± 3 872.06
C <sub>max</sub>	ng·mL <sup>-1</sup>	2 179.00 ± 355.60	737.57 ± 210.31	227.30 ± 48.38
t <sub>1/2z</sub>	min	235.41 ± 117.90	151.56 ± 49.23	161.68 ± 63.92
t <sub>max</sub>	min	23.33 ± 5.16	23.33 ± 5.16	30.00 ± 0.00

### 3 讨论

实验中考察了多种流动相组成, 结果发现“2.1”项下条件时, 各分析物与内标响应较高, 且峰形较好; 同时对比了不同色谱柱 Phenomenex<sup>®</sup> Kinetex C<sub>18</sub> 柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 柱 (100 mm×3.0 mm, 1.8 μm)、Waters ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> 柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 结果表明 Phenomenex<sup>®</sup> Kinetex C<sub>18</sub> 柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 分离效果很好。

固相萃取方法操作较复杂, 且成本相对较高, 因此采取了有机溶剂沉淀蛋白法。实验中比较了不同种常用有机溶剂的提取效果, 结果发现乙腈蛋白沉淀法对生物样品进行前处理, 简便快速、且样品损耗低。此外在蛋白沉淀前加入 0.25 mol/L 盐酸能增强各分析物的响应, 这可能与酸化能促进血浆蛋白中分析物的释放有关。

从药时曲线中可看出毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷及连翘酯苷 B 均在 30 min 左右达到最大血药浓度, 说明 3 个成分在大鼠体内可被迅速吸收, 这可能与其相对较大的极性有关。毛蕊花糖苷的药时曲线与文献报道基本一致<sup>[14]</sup>; 而裸花紫珠提取物中连翘酯苷 B 的药动学规律与其他提取物中略有不同<sup>[15-16]</sup>, 其原因可能是裸花紫珠中众多化合物的相互作用所造成的。

此外, 本实验尝试采用 Q1 (100-800) 监测模式, 对各时间点的血浆样品进行扫描, 总离子流图提取中发现了  $m/z$  179 与  $m/z$  158 峰, 这种现象可能是因为裸花紫珠中 3 个酚苷类成分毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷及连翘酯苷 B 在肠道菌的水解作用下转化成相应的苷元所造成的。

本实验建立的 UHPLC-MS/MS 法专属性强、准确度高、基质效应低, 可用于大鼠血浆中毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、连翘酯苷 B 的药动学研究。由药动学参数可知毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、连翘酯苷 B 在大鼠体内可被迅速吸收, 根据这些特征可为裸花紫珠的临床应用提供指导, 为新剂型及新药的开发提供依据。

#### 参考文献

[1] 刘明生. 黎药学概论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.  
[2] 董琳, 张小菁, 刘明生. 裸花紫珠 5-羟基-3,7,3',4'-四甲氧基黄酮抗炎作用研究 [J]. 海南医学院学报, 2014, 20(11): 1460-1462.

[3] 颜冬兰, 张妮瑜, 朱丽, 等. 裸花紫珠中鞣质的含量测定 [J]. 中医药导报, 2014, 20(5): 80-81.  
[4] 蔡金平, 董琳, 关薇薇, 等. 裸花紫珠的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(1): 60-64.  
[5] 张洁, 李宝泉, 冯峰, 等. 裸花紫珠的化学成分及其止血活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(24): 3297-3301.  
[6] 杨九凌, 祝晓玲, 李成文, 等. 咖啡酸及其衍生物咖啡酸苯乙酯药理作用研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(8): 577-582.  
[7] 王红亮, 史慧贤, 姜申德. 羟基酪醇的研究进展 [J]. 化工进展, 2010, 29(6): 1133-1137.  
[8] Chen C H, Lin Y S, Chien M Y, *et al.* Antioxidant and antihypertensive activities of acteoside and its analogs [J]. *Bot Stud*, 2012, 53: 421-429.  
[9] 宋光西, 马玲云, 魏锋, 等. 苯乙醇苷的分布及药理活性研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2011, 7(4): 169-171.  
[10] Georgiev M, Pastore S, Lulli D, *et al.* Verbascum xanthophoeniceum-derived phenylethanoid glycosides are potent inhibitors of inflammatory chemokines in dormant and interferon-gamma-stimulated human keratinocytes [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144(3): 754-760.  
[11] 钟海琴, 张顺, 蔡挺, 等. 连翘酯苷 B 对肺炎克雷伯菌外排泵活性的影响 [J]. 中国新药与临床杂志, 2013, 32(4): 303-306.  
[12] 郑东昆, 陈伟康, 马双成, 等. 裸花紫珠指纹图谱研究及 10 种成分的含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(9): 1776-1782.  
[13] 邵军, 陈伟康, 马双成, 等. UPLC 法同时测定裸花紫珠中 5 种类黄酮类成分 [J]. 中草药, 2014, 45(10): 1473-1476.  
[14] Li Y J, Gan L, Li G Q, *et al.* Pharmacokinetics of plantamajoside and acteoside from *Plantago asiatica* in rats by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 89: 251-256.  
[15] Sun X M, Liao Q F, Liu G H, *et al.* Simultaneous determination of three phenylethanoid glycosides from *Callicarpae Caulis et Folium* in rat plasma by LC-MS/MS and its application to PK study [J]. *Bioanalysis*, 2013, 5(15): 1883-1895.  
[16] Zhou J, Zhang Q, Sun J B, *et al.* Simultaneous separation and determination of four phenylethanoid glycosides in rat plasma sample after oral administration of *Cistanche salsa* extract by microemulsion liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 951: 24-31.