

· 药物动力学研究 ·

LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中芫花素的浓度及药物动力学研究

徐美丽, 刘昌辉, 吕渭升, 宓穗卿, 王宁生(广州中医药大学临床药理研究所, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 建立 LC-MS/MS 方法测定芫花素在大鼠体内的血药浓度, 并研究其药物动力学。**方法** 大鼠灌胃芫花提取物, 眼眶采血, 离心, 以蛋白沉淀法处理血浆样品, 芒柄花素为内标, 电喷雾离子化, 多反应检测方式进行负离子检测, 检测离子质荷比(m/z)分别为 283.2/267.9, 267.0/251.9。使用 Phenomenex Gemini 110 C₁₈ 色谱柱(50 mm × 2.0 mm, 5 μ L); 以甲醇-0.1%甲酸水(85:15)为流动相, 等度洗脱; 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流速: 0.3 mL·min⁻¹。**结果** 大鼠灌胃芫花提取物后的药-时曲线符合二房室模型, 芫花素血药浓度在 5~1000 ng·mL⁻¹ 范围内线性关系良好($r^2=0.998$), 最低检测限(LOQ)为 0.5 ng·mL⁻¹, 日内及日间精密性(RSD)为 2.42%~10.71%, 日内及日间准确度为 95.67%~112.15%, 血浆中无内源性基质干扰, 稳定性良好。**结论** 本研究所建立的方法简便、灵敏、重复性好、分析速度快, 可用于血浆样品中芫花素的血药浓度测定和大鼠体内药物动力学研究。

关键词: 芫花素; 液相色谱-串联质谱法; 药物动力学

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014) 01-0051-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.01.014

Determination of Genkwanin in Rat Plasma by Using LC-MS/MS and Pharmacokinetic Study of Genkwanin

XU Meili, LIU Changhui, LV Weisheng, MI Suiqing, WANG Ningsheng (Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To develop a simple, sensitive and rapid method for determining the concentrations of genkwanin in rat plasma by using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and to study the pharmacokinetics of genkwanin. **Methods** Rats were given Flos Genkwa extract and then the rat blood was sampled from the eye sockets for the preparation of plasma by protein precipitation method. Formononetin was used for the internal standard, and the detection of genkwanin was performed by negative ion electrospray ionization (ESI) in multiple reactions monitoring (MRM) mode with m/z being 283.2/267.9. The method included a chromatographic run for 3 min by using a Gemini C₁₈ column (50 mm × 2.0 mm, 5 μ m, Phenomenex, USA), and the mobile phase consisted of 0.1% formic acid water solution (solvent C) and methanol (solvent B) as mobile phase by isocratic elution. The flow rate was set at 0.3 mL·min⁻¹ with split ratio of 15:85. The column temperature was maintained at 40 $^{\circ}$ C using a column heater. **Results** The calibration curve was linear in the genkwanin concentration range of 5~1000 ng·mL⁻¹ with a correlation coefficient ($r^2=0.998$) of 0.996 or better and the lowest limit of quantification was 0.5 ng·mL⁻¹. The intra- and inter-day assay precision ranged from 2.42%~10.71%, and intra- and inter-day assay accuracy was between 95.67%~112.15%. The method had good stability, without any endogenous interference. **Conclusion** The data indicate that our LC-MS/MS assay is an effective method for the pharmacokinetic study of genkwanin in rat plasma.

Keywords: Genkwanin; LC-MS/MS; Pharmacokinetics

收稿日期: 2013-09-17

作者简介: 徐美丽, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药有效性与安全性评价及中药药代动力学。Email: 121959741@qq.com。通讯作者: 刘昌辉, 副研究员, 研究方向: 中药有效性与安全性评价及中药药代动力学。Email: realliuch@gmail.com。

基金项目: 广东省“211工程”三期重点学科建设项目“药物警戒系统中的中药安全性再评价研究”专项基金(粤发改社(2009)972号)。

芫花为瑞香科植物芫花(*Daphne genk-wa* Sieb. et Zucc)的干燥花蕾,始载于《神农本草经》,列为下品,具有泻水逐饮、解毒杀虫的功效,传统用于治疗水肿胀满、痰饮积聚和气逆喘咳等症^[1]。药理研究表明,芫花具有镇咳祛痰^[2-3]、抗惊厥、镇静镇痛^[4]、杀虫^[5-6]、抗炎、抗肿瘤^[7-9]、引产抗生育和利尿泻下^[2,10]等作用。芫花素是芫花中主要的黄酮类成分之一,也是镇咳祛痰^[11]和杀虫^[3]的有效成分。芫花素的含量测定在国内已有相关的报道^[12-14],但采用LC-MS/MS进行定量以及测定大鼠灌服芫花提取物后芫花素的药物动力学研究尚未见报道。本文首次建立了高效、灵敏的LC-MS/MS方法测定芫花素的含量,并应用于芫花提取物灌服大鼠后芫花素的药物动力学研究。

1 实验材料

1.1 仪器 API4000 质谱仪,美国 Applied Biosystem 公司; Agilent 1200 系列高效液相色谱仪(G1311A 泵、G1322A 脱气机、G1316A DAD 检测器),美国 Agilent 公司; N-EVAP112 型恒温水浴氮气吹干仪;美国 Organomation 公司; Unique-R20 超纯水系统,上海 Research 公司; VORTEX-2 GENIE 涡旋器,上海 Scinentific Industries 公司。

1.2 药品与试剂 芫花素标准对照品(genkwanin,纯度 $\geq 98\%$)、芒柄花素标准对照品(formnonetin,纯度 $\geq 98\%$),成都瑞芬思生物科技有限公司;芫花药材,江西乐康中药饮片公司,批号:20120522,经广州中医药大学中药鉴定室黄海波教授鉴定为正品;甲酸为色谱纯,德国 CNW 公司;甲醇为色谱纯,德国 Merk 公司;其他试剂均为分析纯。

1.3 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 280~300 g,广东省医学实验动物中心,许可证号: SCKX(粤)2008-0002,试验前实验室适应性饲养 1 周,温度 24~26℃,湿度 60%~70%。

1.3 芫花提取物制备 称取 1 kg 芫花药材,加入 10 倍体积的 60%乙醇,加热回流 3 h,提取 2 次,过滤并合并滤液,减压浓缩至 200 mL,微波干燥成粉末状样品,提取率约为 9.5%。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件 色谱柱为 Phenomenex Gemini C₁₈110 column(50 mm×2.0 mm, 5 μm);保护柱为 Phenomenex-C₁₈;流动相:甲醇:0.1%甲酸水(85:15);柱温:40℃;流速:0.3 mL·min⁻¹;进样量为 5 μL;整个分析流程用时 3 min。质谱离子源为电喷

雾离子源(Electrospray Ionization, ESI);喷雾电压: -4500 V;气帘气: 25 psi;去簇电压: -68.1 V;干燥气温度: 400℃;检测方式为负离子模式多离子反应监测(Multiple Reaction Monitoring, MRM);用于定量分析的芫花素和芒柄花素的质荷比(m/z)分别为 283.2/267.9([M-CH₃]⁻)、267.0/251.9([M-CH₃]⁻),见图 1。

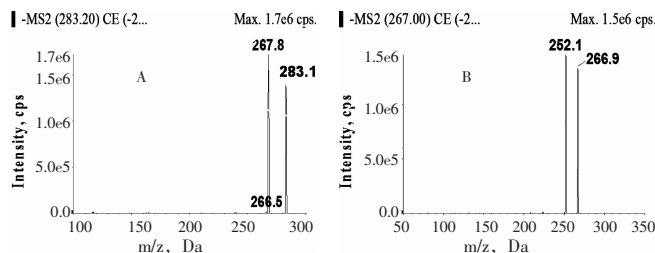


图1 芫花素(A)和芒柄花素(B)的质谱图

Figure 1 MS/MS spectra of genkwanin(A) and formnonetin(B)

2.2 标准溶液配置 分别精密称取芫花素和芒柄花素标准品各 5 mg 置于 5 mL 的容量瓶中,加甲醇定容,制得芫花素和芒柄花素储备液,浓度均为 1 mg·mL⁻¹,再用甲醇稀释依次制备浓度为 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000 ng·mL⁻¹ 的芫花素标准品工作液和 1 μg·mL⁻¹ 芒柄花素标准品工作液。

2.3 生物样品采集 取大鼠 8 只,按照 10 mg·kg⁻¹ 的剂量灌胃给予芫花提取物。实验前禁食不禁水,于给药前,给药后 0.0833, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 由眼眶后静脉丛采血 0.25 mL,收集于肝素化的离心管内,3000 ×g 离心 10 min,取血浆 100 μL,置于 -80℃ 冰箱冻存待测。

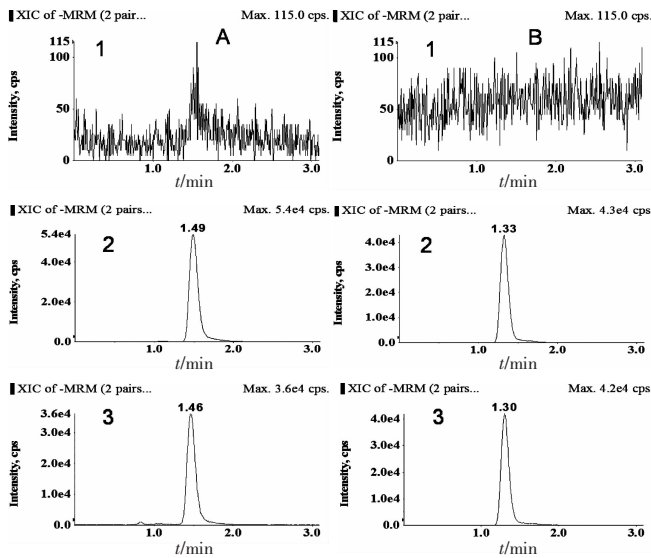
2.4 生物样品处理 取血浆样品 100 μL,加入 1 μg·mL⁻¹ 的芒柄花素内标液 10 μL 和甲醇 790 μL,混合涡旋 10 min 后,12000 ×g 高速离心 10 min,吸取上清液至另一空白离心管中,于 37℃ 水浴中用温和氮气流吹干,残留物用 100 μL 流动相复溶后 12000 ×g 高速离心 10 min,取 5 μL 进样,用样品与内标峰面积比进行定量。

2.5 数据处理方法 数据使用 PK Solution 2.0 药物动力学计算软件(美国 Summit Research Services 公司),以非房室模型计算芫花素的主要药物动力学参数。

2.6 方法学考证

2.6.1 方法专属性 按 2.4 项下方法处理,测定大鼠空白血浆、空白血浆加芫花素标准品(100 ng·mL⁻¹)以及大鼠灌服芫花提取物 30 min 后的血浆样品。结果显示,芫花素和内标芒柄花素能同时被检测到,无

内源性成分干扰，专属性良好，保留时间分别为 1.47，1.32 min，见图 2。



A. 芫花素；B. 芒柄花素；1. 空白血浆；2. 空白血浆+对照品(100 ng·mL⁻¹)；3. 给药后 30 min 血浆样品+内标

图 2 血浆样品中芫花素和芒柄花素的 LC-MS/MS 色谱图

Figure 2 Typical multiple-reaction monitoring (MRM) chromatograms of genkwanin(A) and formnonetin(B, IS)

2.6.2 标准曲线的制备 取空白血浆 100 μL 加入芫花素和芒柄花素标准品混合工作液 10 μL，分别制备成浓度依次为 5，10，25，50，100，250，500，1000 ng·mL⁻¹ 的芫花素的血浆样品，各浓度样品均含 100 ng·mL⁻¹ 的芒柄花素。按 2.4 项下方法处理，记录样品和内标峰面积，以芫花素与内标(芒柄花素)面积的比值为纵坐标(Y)，芫花素的血药浓度为横坐标(X)，进行线性回归，得到回归方程： $Y=0.037X+0.499$ ($n=5$ ， $r^2=0.998$)。芫花素血浆浓度在 5~1000 ng·mL⁻¹ 范围内线性关系良好，最低检测限均为 0.5 ng·mL⁻¹(信噪比 > 3)。

2.6.3 精密度与准确度 取空白血浆 100 μL，加入芫花素和芒柄花素标准品混合工作液 10 μL 配成 5，100，500 ng·mL⁻¹ 低、中、高浓度的血浆样品，各浓度样品均含 100 ng·mL⁻¹ 的芒柄花素。每个浓度平行 5 份，按 2.4 项下方法处理，在 1 d 内测 5 次，计算日内精密度。日间精密度同上制备血浆样品，每天测定 1 次，连续测定 5 d，计算日间精密度，结果见表 1，表明该方法具有较好的精密度和准确性。

2.6.4 提取回收率 取空白血浆 100 μL，加入芫花素标准品溶液 10 μL 配成 5，100，500 ng·mL⁻¹ 低、中、高浓度血浆样品，按 2.4 项下方法处理样品，将

测定的芫花素峰面积记为 A₁；精密吸取 10 μL 芫花素标准品溶液，加入 90 μL 流动相配置成 5，100，500 ng·mL⁻¹ 的样品，测得峰面积记为 A₂，提取回收率= $A_1/A_2 \times 100\%$ ($n=5$)，结果见表 2。

表 1 精密度与准确度试验结果($\bar{x} \pm s$ ， $n=5$)

Table 1 Intra- and inter-day precision and accuracy of LC-MS/MS method for determination of genkwanin in rat plasma

芫花素 /ng·mL ⁻¹	准确度 /%		精密度(RSD)/%	
	日内	日间	日内	日间
10	112.15 ± 15.96	111.23 ± 19.88	8.36 ± 2.33	10.71 ± 1.66
100	103.96 ± 10.52	95.67 ± 12.32	5.44 ± 1.62	2.42 ± 0.35
500	104.65 ± 9.28	106.75 ± 11.62	3.26 ± 0.65	5.63 ± 1.25

表 2 芫花素在大鼠血浆中的提取率($\bar{x} \pm s$ ， $n=5$)

Table 2 The mean extraction recovery of genkwanin in rat plasma

芫花素 /ng·mL ⁻¹	回收率		基质效应	
	准确度 /%	RSD/%	准确度 /%	RSD/%
10	59.66 ± 6.30	10.56	98.51 ± 4.21	4.27
100	65.54 ± 4.23	6.45	112.34 ± 7.66	6.82
500	62.47 ± 5.75	9.20	105.66 ± 4.98	4.71

2.6.5 基质效应 取空白血浆 5 份，分别加入 800 μL 甲醇，按照 2.4 项下方法处理，残留物加入 10 μL 芫花素标准品溶液，再加入 90 μL 流动相复溶，使得终浓度为 5，100，500 ng·mL⁻¹，峰面积为 A₁；另取 10 μL 芫花素标准品溶液，加入 90 μL 流动相，使得终浓度为 5，100，500 ng·mL⁻¹，峰面积为 A₂。如果 $A_1/A_2 < 85\%$ 或 $> 115\%$ ，即表明有基质效应存在，应对色谱条件进行优化。结果见表 2，表明未有明显的基质效应。

2.6.6 稳定性 取空白血浆 100 μL，加入芫花素和芒柄花素标准品混合工作液 10 μL，配成 5，100，500 ng·mL⁻¹ 低、中、高浓度的血浆样品，各浓度样品均含 100 ng·mL⁻¹ 的芒柄花素。分别将制备后的血浆样品储存于 -80 ℃ 冰箱中，14 d 后取出样品测定，考察其长期储存稳定性；于 4 ℃ 冰箱中储存 24 h 后测定，考察其临时储存稳定性；储存于 -80 ℃ 冰箱中，反复冻融 3 次，考察其反复冻融稳定性，血浆样品按 2.4 项下方法处理样品，每个浓度平行 5 份。在稳定性考察的各个环节中均未见样品降解现象，见表 3。

2.7 药物动力学研究 将该方法应用于药物动力学研究，大鼠灌服芫花提取物(10 mg·kg⁻¹)的平均血药浓度-时间曲线见图 3。应用 PK Solution 2.0 药物动力学计算软件，对血药浓度结果采用非房室模型计算芫花素的主要药物动力学参数，结果见表 4。

表 3 芫花素稳定性实验结果($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 3 Stability test result of LC-MS/MS method for determination of genkwanin in rat plasma

芫花素 /ng·mL ⁻¹	长期储存		临时储存		反复冻融	
	测定值	RSD	测定值	RSD	测定值	RSD
	/ng·mL ⁻¹	%	/ng·mL ⁻¹	%	/ng·mL ⁻¹	%
10	12.13 ± 0.76	6.28	10.72 ± 0.51	4.77	8.85 ± 0.63	7.12
100	95.72 ± 7.69	8.04	113.28 ± 6.23	5.52	92.26 ± 4.23	4.58
500	495.61 ± 21.66	4.37	505.94 ± 19.12	3.78	490.31 ± 25.23	5.15

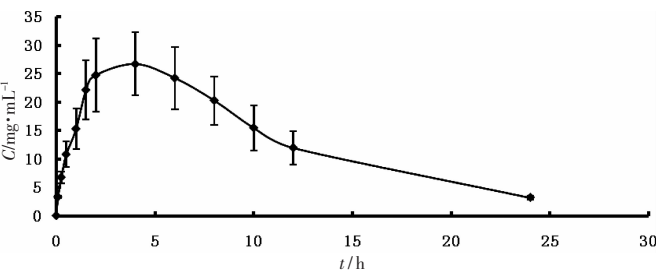


图 3 LC-MS/MS 法检测大鼠灌服芫花提取物后血浆中芫花素的血药浓度-时间曲线

Figure 3 Mean plasma concentration-time profile for genkwanin in rat's plasma by LC-MS/MS after oral Flos Genkwa extract

表 4 大鼠灌服芫花素提取物后血浆中芫花素的药动学参数($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 4 Pharmacokinetics parameters of genkwanin after oral administration of *Genkwa Flos* extract in rats

参数	数值
AUC ₀₋₄ /ng·h·mL ⁻¹	338.75 ± 24.68
C _{max} /ng·mL ⁻¹	25.71 ± 4.42
T _{max} /h	3.43 ± 0.58
K _a	0.61 ± 0.05
t _{1/2α} /h	1.14 ± 0.23
K _d /h ⁻¹	0.11 ± 0.00
t _{1/2β} /h	6.27 ± 1.34

3 讨论

目前,国内尚未见芫花素药物动力学的相关报道。本研究首次采用 LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中芫花素的血药浓度,结果表明,本方法对芫花素在生物样品中的分析具有简单可靠、准确灵敏、快速高效的优点;生物样品分析方法的重复性高、专属性好;大鼠使用数量少,采血量也较少,符合药物动力学研究中生物样品分析方法及动物伦理学的要求。

提取方法的选择:考察了乙醚、二氯甲烷和乙酸乙酯等液-液萃取法,固相萃取法和甲醇沉淀蛋白法对血浆中芫花素提取率进行研究。结果表明乙醚、二

氯甲烷和水饱和正丁醇都可以提取芫花素,但是乙醚、二氯甲烷等不但毒性较大,而且过程复杂;固相萃取法则价格相对较高;本研究采用的甲醇沉淀蛋白提取方法处理血浆样品,回收率虽然不是特别高,但是价格相对便宜,过程简单且方便操作,有利于大批量样品的检测。

芫花为毒性较强的中药,在药物动力学预实验中按 50 mg·kg⁻¹ 剂量灌服大鼠,给药后 4 h 全部死亡,经摸索后实验用剂量为 10 mg·kg⁻¹ 均能满足在各大鼠体内完整的药物动力学行为。而在此剂量中芫花素的血药峰浓度(25.71 ng·mL⁻¹)是非常的低的,普通高效液相无法达到分析要求,但 LC-MS/MS 法的优势恰好可以实现对在大鼠体内较低含量的芫花素的检测。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(1 部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 148.

[2] 张保献, 原思通, 张静修, 等. 芫花的现代研究概况[J]. 中国中医药信息杂志, 1995, 2(10): 21-24.

[3] 杨小凤, 刘长欣, 王秋芬, 等. 芫花中芫花素的提取工艺与杀虫试验[J]. 化学研究与应用, 2002, 4(5): 601-602.

[4] 王莉, 郑维发, 王建华, 等. 芫花根总黄酮的镇痛作用及其机制研究[J]. 宁夏医学杂志, 2005, 27(1): 21-23.

[5] 莫建初, 刘志茹, 王海, 等. 芫花杀虫活性成分的结构鉴定[J]. 中南林学院学报, 2001, 21(4): 5-10.

[6] 王维德, 陈封政, 王雄清, 等. 芫花提取物对竹象虫的防治研究[J]. 乐山师范学院学报, 2003, 18(4): 35-36.

[7] 石枫, 郑维发. 芫花根醇提物弱极性组分化学成分及抗炎活性研究[J]. 药物生物技术, 2005, 1(1): 46-51.

[8] 魏志文, 高晓雯, 郑维发. 芫花根总黄酮抗肿瘤活性研究[J]. 解放军药学报, 2008, 24(2): 117-120.

[9] 姚晶萍, 倪延群, 王莹威, 等. 芫花根总黄酮抗肿瘤活性的研究[J]. 首都医药, 2011, 14(7): 19-22.

[10] 李时珍. 本草纲目(第 2 册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1979: 121.

[11] 赵一, 原思通, 李爱媛, 等. 炮制对芫花毒性和药效的影响[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(6): 344-347.

[12] 朱永安. 高效液相色谱法测定芫花中芫花素含量[J]. 海峡药学, 2006, 18(4): 103-104.

[13] 宋丽丽, 王丽峰, 郭茂娟. RP-HPLC 法同时测定芫花中芹菜素、羟基芫花素、芫花素的含量[J]. 北京中医药, 2010, 29(6): 461-462.

[14] 张玮, 彭纛, 黄怡, 等. RP-HPLC 法同时测定芫花中 7 种黄酮和 1 种香豆素的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(3): 207-220.

(编辑: 梁进权)