

· 药物动力学研究 ·

LC-MS/MS 法同时测定大鼠尿中 4 种淫羊藿黄酮苷

余捷婧¹, 刘奕君², 许舜军³, 孙 帅³, 许艺鐸³, 杨 柳¹. 广州中医药大学附属广东省中医院, 广东省中医药科学院, 广东 广州 510120; 2. 暨南大学药学院, 广东 广州 510632; 3. 广州万正药业有限公司, 广东 广州 510663)

摘要: **目的** 应用高效液相色谱-串联质谱联用(LC-MS/MS)法建立大鼠尿液中朝藿定 A、B、C 及淫羊藿苷的同时测定方法, 初步探讨淫羊藿提取物在大鼠体内的排泄规律。**方法** 以人参皂苷 Rg1 为内标, 选用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 乙酸水(30:70); 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 柱温: 40 ℃; 采用电喷雾离子源(ESI)负离子多反应检测(MRM)模式测定。**结果** 朝藿定 A、B、C 以及淫羊藿苷在 1~500 ng·mL⁻¹ 浓度范围内线性关系良好, 日内精密度(RSD)均 < 7.4 %, 日间精密度(RSD)均 < 12.7 %。大鼠口服灌胃给予淫羊藿提取物 36 h 后朝藿定 A、B、C 及淫羊藿苷的平均尿累积排泄量/给药量比值不超过 0.266 ‰, 0.198 ‰, 0.297 ‰和 0.425 ‰。**结论** 本研究建立的 LC-MS/MS 方法简便灵敏快速, 适用于尿液中朝藿定 A、B、C 以及淫羊藿苷的同时测定及淫羊藿提取物尿排泄动力学研究的应用, 研究结果显示淫羊藿提取物原形药物基本不经尿液排泄, 提示肾排泄可能不是其主要消除途径。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱联用法; 淫羊藿提取物; 淫羊藿黄酮; 尿药浓度; 尿排泄

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2016)04-

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783. 2016. 04

Simultaneous quantitative determination of four epimedium flavonoids in rat urine by LC-MS/MS

YU Jie-jing¹, LIU Yi-jun², Xu Shun-jun³, SUN Shuai³, XU Yi-juan³, YANG Liu¹ ? (1. Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, P. R. China; 2. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. ImVin Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510663, P. R. China)

Abstract: **Objective** To establish a liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the simultaneous analysis of epimedin A, epimedin B, epimedin C and icariin in rat urine. **Method** Ginsenoside Rg1 was used as the internal standard (IS). Chromatographic separation was carried out on an Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column (2.1 mm × 150 mm, 5 μm) by isocratic elution with 32% acetonitrile and 68% water containing 0.1% acetic acid at a flow rate of 0.3 mL·min⁻¹. The quantification of the analytes was performed by mass spectrometry with electrospray ionization (ESI) inlet and negative ion multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results** The calibration curves of epimedin A, epimedin B, epimedin C and icariin were linear in the range of 1~500 ng·mL⁻¹. The intra-day precision of this method was less than 7.4 %, and the inter-day precision was less than 12.7 %. The cumulative excretion of analytes in 36 h were 896.69, 848.72, 12545.78, 5085.46 ng, and the cumulative excretion of unchanged analytes in urine within 36 h of the dose were less than 0.266‰, 0.198‰, 0.297‰ and 0.425‰, . **Conclusion** The established assay method is simple and convenient, which is suitable for the measurement of urine epimedin A, epimedin B, epimedin C and icariin concentration in rats. And the unchanged analytes are hardly eliminated through urine within 36 h in rats.

Keywords: LC-MS/MS; Epimedium extract; Epimedium flavonoids; urine concentration; excretion

收稿日期: 2015-12-04

作者简介: 余捷婧, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药组分与药代动力学, E-mail: jiejing_yu@163.com。通信作者: 杨柳, 研究员, 主要从事中药活性成分与质量标准研究。E-mail: yangliu979@hotmail.com。

淫羊藿(*Herba Epimedium*)为中医临床常用药材,来源于小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim.、箭叶淫羊藿 *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.、柔毛淫羊藿 *Epimedium pubescens* Maxim.或朝鲜淫羊藿 *Epimedium koreanum* Nakai.的干燥叶,具有补肾阳,强筋骨,祛风湿的作用^[1]。现代研究表明,淫羊藿黄酮是淫羊藿的主要活性成分,具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗肿瘤、调节免疫及骨代谢等作用,能够增加心脑血管血流量^[2-5]。而在已经鉴定的60多种黄酮中,朝藿定A、B、C以及淫羊藿苷是其主要生物活性成分^[6]。近期研究表明,朝藿定B、C和淫羊藿苷能够促进成骨细胞样细胞增殖的潜能,具有防治骨质疏松的作用^[7];朝藿定A、C和淫羊藿苷能够抗肿瘤和调节免疫功能^[8-10]。随着对淫羊藿黄酮类成分关注度的增加,关于其体内过程的研究也日渐增多,但是迄今尚未见应用高效液相色谱-串联质谱联用(LC-MS/MS)同时检测尿中朝藿定A、B、C和淫羊藿苷,以及口服给予淫羊藿提取物后该4种黄酮苷在大鼠体内尿排泄动力学研究的报道。本文旨在建立LC-MS/MS法同时测定尿液中朝藿定A、B、C以及淫羊藿苷浓度的方法,研究这4种黄酮类成分在大鼠体内的尿排泄过程,为阐述淫羊藿黄酮的尿排泄动力学规律提供方法依据。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂及药品 API 4000+液相色谱-三重四极杆质谱联用仪(LC-MS/MS),配有ESI源及Analyst 1.6数据处理系统,美国AB公司;SHIMADZU LC-20A型高效液相色谱仪,日本岛津公司;Microfuge 16台式微量离心机,美国贝克曼仪器公司;IKA MS3型涡旋混匀器,德国IKA公司;N-EVAP型氮气吹干仪,美国Organomation公司。朝藿定A对照品(纯度>98%,批号:121106)、朝藿定B对照品(纯度>98%,批号:121109),上海融禾医药科技有限公司;朝藿定C对照品(纯度>99%,批号:111780-200801)、淫羊藿苷(纯度>98%,批号:0737-9910),人参皂苷Rg1对照品(纯度>98%,批号0703-200119),中国药品生物制品检定所;淫羊藿标准提取物由广州万正药业有限公司提供。甲醇、乙腈,为色谱纯,美国Fisher公司;其他试剂为分析纯,广州化学试剂厂;超纯水由Milli-Q系统制备。

1.2 动物 雄性Sprague Dawley(SD)大鼠6只,体质量(250±20)g,由广东省医学实验动物中心提供,合

格证号:(粤)44007200021141。饲养于室温为22-26℃,湿度为40%~70%,12h昼夜更替的动物室内,实验前适应性喂养1周,受试前禁食12h,全程不禁水。

1.3 测定条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱为Agilent Eclipse XDB-C₁₈柱(2.1 mm×150 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%乙酸水(30:70);流速:0.3 mL·min⁻¹;柱温:40℃;进样量:5 μL。

1.3.2 质谱条件 电喷雾离子源;采用多反应离子监测(MRM)方式负离子检测,喷雾电压(IS):-4500 V;雾化温度:350℃;碰撞气(CAD):12 psi;气帘气(CUR):45 psi;雾化气(GAS 1):50 psi;辅助气(GAS 2):50 psi。

1.4 溶液配制 对照品溶液:取朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C和淫羊藿苷对照品各约5.0 mg,精密称定,分置于5 mL量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,制得对照品储备液,分别含朝藿定A 1.012 mg·mL⁻¹、朝藿定B 1.016 mg·mL⁻¹、朝藿定C 0.984 mg·mL⁻¹、淫羊藿苷 0.904 mg·mL⁻¹,4℃冰箱保存,临用时用甲醇逐级稀释,制备系列工作液。

内标溶液:取人参皂苷Rg1对照品10.0 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,制得浓度为1 mg·mL⁻¹的人参皂苷Rg1对照品母液,4℃冰箱保存。

1.5 样品制备及处理

1.5.1 标准曲线尿样、质控尿样制备及处理 精密移取100 μL大鼠空白尿液,加入内标工作液(1 μL·mL⁻¹)20 μL,并加入按2.2项下配制的系列工作液100 μL,涡旋1 min混匀后,14800 r·min⁻¹离心10 min,将上清液转移至0.2 μm滤膜离心,取续滤液进行分析,进样量5 μL。

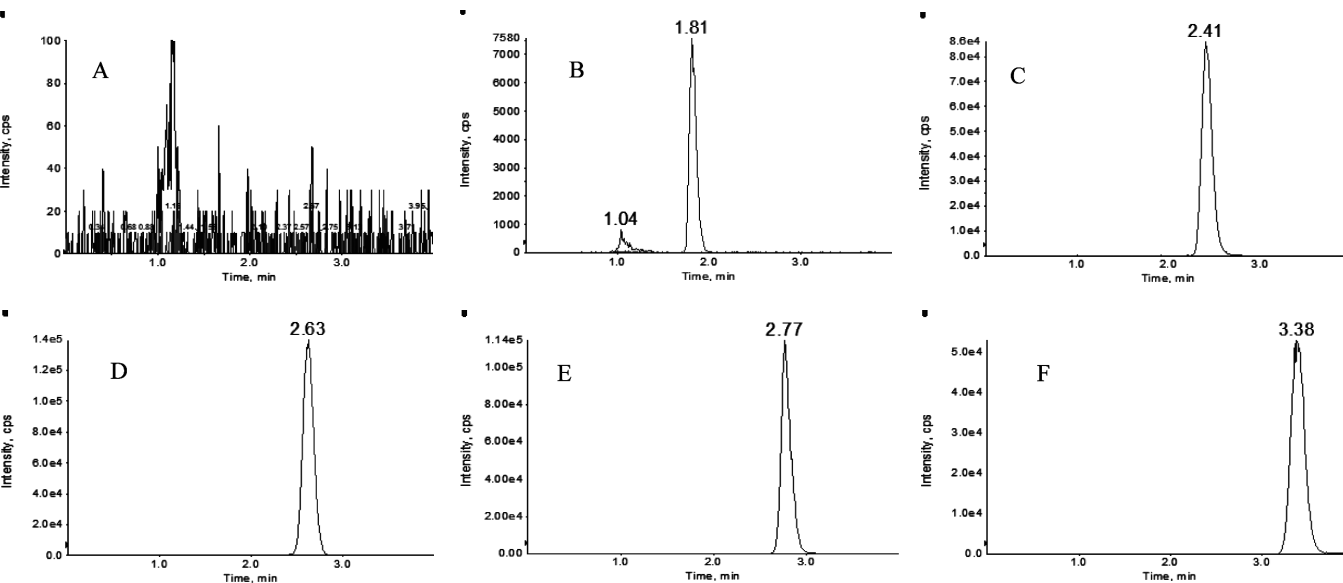
1.5.2 大鼠给药后的尿样处理 精密移取100 μL大鼠给药后尿液样品,加入内标工作液(1 μL·mL⁻¹)20 μL和100 μL甲醇溶液,涡旋1 min混匀后,14800 r·min⁻¹离心10 min,将上清液转移至0.2 μm滤膜离心,取滤液进行分析,进样量5 μL。

1.6 动物实验方案 受试大鼠置于代谢笼,口服灌胃给予淫羊藿标准提取物(相当于朝藿定A 12 mg·kg⁻¹,朝藿定B 15 mg·kg⁻¹,朝藿定C 149 mg·kg⁻¹,淫羊藿苷 42 mg·kg⁻¹),分别于给药前和给药后(0~4 h、4~8 h、8~12 h、12~24 h、24~36 h)收集尿液样品,记录各时间段尿液体积,置于-80℃冷冻保存。

2 结果

2.1 专属性考察 将给药后尿样按 1.5 项下进行处理, 依照前述分析条件进样检测。用于定量分析的离子对为 m/z 897.4→645.4(朝藿定 A), m/z 867.4→645.4(朝藿定 B), m/z 881.5→659.4(朝藿定 C), m/z 735.5→513.6(淫羊藿苷), 内标: m/z 859.8→799.6(人参皂苷 Rg1)。

在该检测条件下, 朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷和内标的保留时间分别为 2.41, 2.63, 2.77, 3.38, 1.81 min, 待测物峰形良好, 尿样中内源性物质不干扰 4 种淫羊藿黄酮的测定。空白尿液样品、空白尿液加 4 种淫羊藿黄酮对照品以及内标的 MRM 色谱图, 见图 1。



A. 空白尿液; B. 内标(人参皂苷 Rg1); C. 朝藿定 A; D. 朝藿定 B; E. 朝藿定 C; F. 淫羊藿苷

图 1 朝藿定 A、B、C 及淫羊藿苷和内标 MRM 色谱图

Figure 1 Representative MRM chromatograms of (A) blank rat urine, (B) blank rat urine spiked with IS(ginsenoside Rg1), (C) epimedin A, (D) epimedin B, (E) epimedin C, (F) icariin

2.2 标准曲线与定量下限 精密移取淫羊藿黄酮混合对照品溶液适量, 加空白尿液(来源于 6 只大鼠), 逐级稀释, 依次配制成浓度为 500, 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列标准尿样。按 1.5 项下操作, 以待测物与内标峰面积比值(Y)对尿药浓度(X)作加权线性回归(权重 $1/X^2$), 得到标准曲线方程, 各成分的回归方程、相关系数(r)、线性范围和定量下限(LOD)见表 1。朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的定量下限 (LOQ) 均为 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其准确度分别为 97.1 %、95.1 %、101 %、96.6 %, 均符合方法学要求。

2.3 精密度与准确度及回收率试验 配制低、中、高 3 个浓度(2, 20, 400 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)的质控样品, 每个浓度各 5 份, 按 1.5 项下操作, 连续测定 3 d。根据当天的标准曲线测定质控样品浓度, 以日内和日间相对标准差(RSD)考察方法精密度及准确度, 以实测浓度与真实浓度相比得到相对回收率, 见表 2。淫羊藿 4

表 1 朝藿定 A、B、C 及淫羊藿苷的线性回归方程和 LOD

Table 1 Linear regression data and LOD of investigated compounds

化学成分	回归方程	r	线性范围 $/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	最低定量限 $/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
朝藿定 A	$Y=0.0374X+0.00395$	0.9994	1.00~500	1.00
朝藿定 B	$Y=0.0655X+0.00422$	0.9987	1.00~500	1.00
朝藿定 C	$Y=0.0475X+0.00886$	0.9993	1.00~500	1.00
淫羊藿苷	$Y=0.0306X+0.00514$	0.9994	1.00~500	1.00

种黄酮成分朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和、淫羊藿苷的日内精密度 $\text{RSD} < 7.4 \%$, 准确度介于 85.4 %~106.0 %; 日间精密度 $\text{RSD} < 12.7 \%$, 准确度介于 85.0 %~109.0 %; 相对回收率分别介于 96.4 %~100.8 %, $\text{RSD} < 7.4 \%$; 94.2 %~99.8 %, $\text{RSD} < 3.2 \%$; 87.9 %~97.3 %, $\text{RSD} < 5.2 \%$ 和 89.3 %~98.4 %, $\text{RSD} < 4.6 \%$ 。

表 2 朝藿定 A、B、C 及淫羊藿苷的日内与日间精密度及相对回收率

Table 2 Precision and recovery of epimedini A, B, C and icariin in rat urine

化学成分	理论浓度 /ng·mL ⁻¹	日内 RSD/%	日间 RSD/%	相对回收率 /%
朝藿定 A	2	5.5	6.5	96.4 ± 7.4
	20	2.7	4.8	100.8 ± 3.2
	400	1.7	5.3	97.1 ± 2.0
朝藿定 B	2	3.6	0.0	97.8 ± 3.3
	20	2.5	3.8	99.8 ± 3.2
	400	2.0	4.4	94.2 ± 2.1
朝藿定 C	2	5.5	9.8	92.1 ± 3.5
	20	4.6	10.1	97.3 ± 5.2
	400	2.6	3.9	87.9 ± 2.5
淫羊藿苷	2	7.4	12.7	89.3 ± 4.6
	20	3.0	1.9	98.4 ± 3.3
	400	2.2	2.6	95.4 ± 2.5

2.4 稳定性试验 取低、中、高 3 个浓度(2, 20, 400 ng·mL⁻¹)的质控样品, 每个浓度各 5 份。分别将尿液样品室温放置 6 h、反复冻融 3 次、样品经预处理后在 4 ℃自动进样器中放置 24 h、样品在 -80 ℃冰箱保存 30 d 后, 按 1.5 项下操作并进样测定, 见表 3。各成分短期稳定性测定准确度介于 88.4 %~100.2 %, RSD < 9.6 %; 桌面稳定性测定准确度介于 93.6 %~102.8 %, RSD < 7.1 %; 长期稳定性测定准确度介于 94.3 %~102.4 %, RSD < 13.2 %; 3 个冷冻-解冻循环稳定性测定准确度介于 92.5 %~108.7 %, RSD < 8.3 %, 结果表明样品稳定性完全可以满足测定要求。

表 3 朝藿定 A、B、C 及淫羊藿苷的稳定性考察

Table 3 Stability test of epimedini A, B, C and icariin in rat urine(n=6)

化学成分	理论浓度 /ng·mL ⁻¹	稳定性 /%			
		室温放置 6 h	4℃放置 24 h	冻融 3 次	-80 ℃保存 30 d
朝藿定 A	2	97.9 ± 4.9	99.5 ± 7.0	100.7 ± 3.8	102.4 ± 13.6
	20	99.7 ± 1.3	101.4 ± 1.9	102.7 ± 2.2	100.6 ± 2.9
	400	95.0 ± 2.7	96.3 ± 2.5	101.1 ± 1.9	95.2 ± 2.8
朝藿定 B	2	98.8 ± 3.8	99.8 ± 2.9	98.9 ± 4.6	101.1 ± 5.7
	20	100.2 ± 2.5	99.8 ± 1.5	103.0 ± 1.7	98.3 ± 3.3
	400	95.2 ± 2.6	96.0 ± 2.3	100.5 ± 1.8	97.4 ± 3.3
朝藿定 C	2	98.4 ± 4.6	100.3 ± 6.9	104.4 ± 8.4	102.3 ± 8.3
	20	94.3 ± 3.4	102.8 ± 2.2	103.3 ± 3.7	96.3 ± 3.4
	400	88.4 ± 2.8	93.6 ± 2.6	92.5 ± 2.3	97.1 ± 2.8
淫羊藿苷	2	98.8 ± 9.5	97.1 ± 6.3	108.7 ± 9.0	96.7 ± 8.4
	20	97.2 ± 1.1	99.0 ± 2.6	104.5 ± 2.2	96.6 ± 2.9
	400	95.6 ± 3.2	97.8 ± 2.4	104.5 ± 2.1	94.3 ± 2.6

2.5 尿排泄动力学 口服灌胃给予淫羊藿提取物后, 4 种淫羊藿黄酮的尿累积排泄-时间曲线见图 2。研究表明, 淫羊藿提取物口服给药后朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷原形药物排泄过程从 0~4 h 开始, 36 h 平均尿累积排泄量分别为 896.69, 848.72, 12545.78, 5085.46 ng, 尿累积排泄量/给药量比值分别不超过 0.27 ‰, 0.20 ‰, 0.30 ‰和 0.43 ‰, 基本不通过尿液排泄。

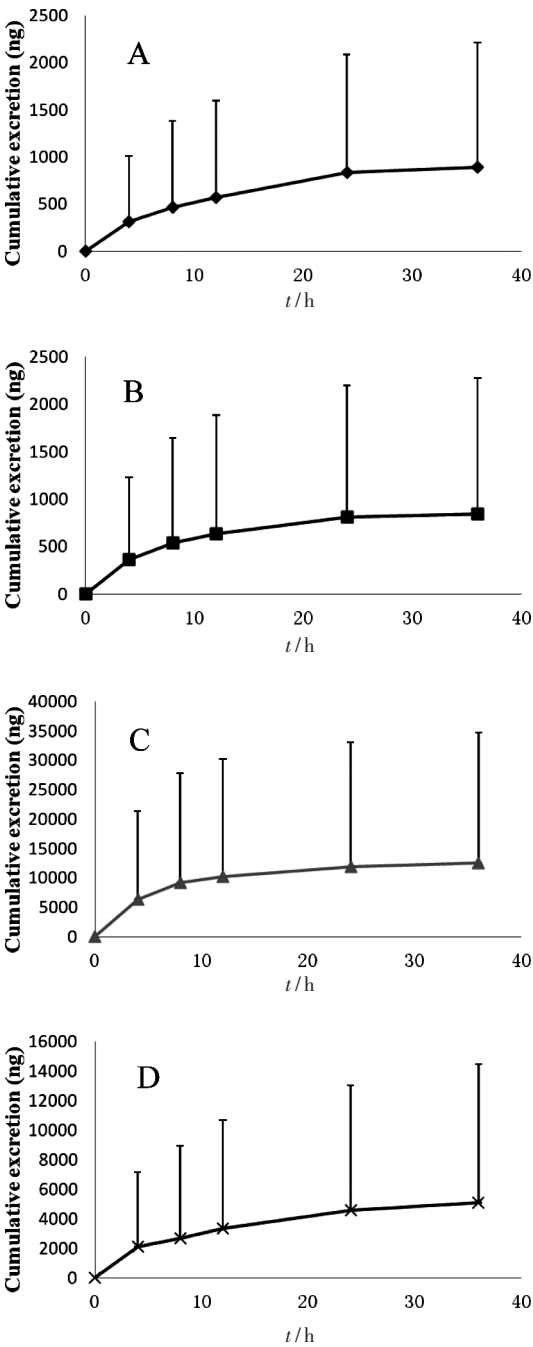


图 2 朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷累积排泄量
Figure 2 Cumulative excretion of epimedini A (A), epimedini B (B), epimedini C (C), and icariin (D) in rat urine after a single oral administration

3 讨论

本研究建立的 LC-MS/MS 法同时测定大鼠尿液中淫羊藿中 4 种黄酮成分的含量,方法简单方便,精密度好。测定结果显示,这 4 种淫羊藿黄酮均有相似的排泄特征,排泄过程从 0~4 h 开始,12~24 h 到达高峰。4 种淫羊藿黄酮苷的尿累积排泄量/给药量比值分别为朝藿定 A 0.27‰;朝藿定 B 0.20‰;朝藿定 C 0.30‰;淫羊藿苷 0.43‰,说明淫羊藿所含化学成分经尿液排泄的量只占给药剂量中很小的比例,提示原形药物经肾脏排泄途径可能不是淫羊藿黄酮的主要消除途径。已有的研究^[1]表明淫羊藿黄酮苷的口服生物利用度非常低,如淫羊藿提取物中朝藿定 C 的口服绝对生物利用度仅 0.13%;Chen Y 等^[12]考察了小肠水解酶对淫羊藿黄酮吸收的影响,发现淫羊藿黄酮在小肠内水解为次级苷后再吸收。这些研究证实淫羊藿黄酮类成分在体内很少以原形药物的形式吸收和消除,这类物质在体内的消除途径主要为代谢消除。

本研究同时对生物样品预处理方法进行了优化,结果表明采用简单的尿样稀释法进行样品前处理,即可满足测定的要求。在内标化合物的选择和优化上,采用人参皂苷 Rg1,而非黄酮类化合物,是由于来源于植物的黄酮类化合物,如染料木黄酮等常存在于大鼠饲料中,易对检测产生干扰。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 19.

- [2] 张玉萱, 徐玲玲. 淫羊藿总黄酮的药理作用研究进展[J]. 实用临床医药杂志, 2012, 16(9): 125-128.
- [3] 武敬亮, 苏智先, 田桂香, 等. 淫羊藿研究新进展[J]. 中医学报, 2004, 32(3): 69-72.
- [4] 马慧萍, 贾正平, 葛欣, 等. 淫羊藿总黄酮抗大鼠实验性骨质疏松作用研究[J]. 华西药学杂志, 2002, 17(3): 163-167.
- [5] 蒋凌云, 刘光明, 陈可欣. 淫羊藿苷的提取、分离和抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2011, 26(5): 353-358.
- [6] Zhang HF, Yang TS, Li ZZ, et al. Simultaneous extraction of epimedin A, B, C and icariin from Herba Epimedii by ultrasonic technique[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2008, 15(4): 376-385.
- [7] Meng FH, Li YB, Xiong ZL, et al. Osteoblastic proliferative activity of Epimedium brevicornum Maxim[J]. Phytomedicine, 2005, 12(3): 189-193.
- [8] Zhang X, Li Y, Yang X, et al. Inhibitory effect of Epimedium extract on S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase and biomethylation[J]. Life Sciences, 2005, 78(2): 180-186.
- [9] Zhu D, Qu L, Zhang X, et al. Icariin-mediated modulation of cell cycle and p53 during cardiomyocyte differentiation in embryonic stem cells[J]. European Journal of Pharmacology, 2005, 514(2-3): 99-110.
- [10] Li Y, Xiong Z, Li F. Determination of epimedin C in rat plasma by reversed-phase high-performance chromatography after oral administration of Herba Epimedii extract[J]. Journal of Chromatography B, 2005, 821(2): 235-242.
- [11] Lee CJ, Wu YT, Hsueh TY, et al. Pharmacokinetics and oral bioavailability of epimedin C after oral administration of epimedin C and Herba Epimedii extract in rats [J]. Biomedical Chromatography, 2014, 28(5): 630-636.
- [12] Chen Y, Wang JY, Jia XB, et al. Role of Intestinal Hydrolase in the Absorption of Prenylated Flavonoids Present in Yinyanghuo[J]. Molecules, 2011, 16(2): 1336-1348.

(编辑: 梁进权)

秦皮甲素和秦皮乙素在大鼠体内的药物动力学研究

杨建华^{1,2}, 迪丽拜尔·马木提², 王 梅², 王晓梅², 胡君萍² (1. 新疆医科大学第一附属医院, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 测定秦皮甲素和秦皮乙素在大鼠体内的血药浓度及药代动力学参数。方法 大鼠口服给予秦皮甲素和秦皮乙素各 60 mg·kg⁻¹, 于给药后不同时间点采血, UPLC 法测定血浆秦皮甲素和秦皮乙素含量, 3P87 计算药代动力学参数。结果 秦皮甲素和秦皮乙素的主要药动学参数: T_{max} 分别为 0.164 和 0.0643 h; C_{max} 分别为 4.778 和 3.576 μg·mL⁻¹; AUC₀₋₄ 分别为 5.360 和 5.682 μg·mL⁻¹·h; AUC_{0-∞} 分别为 7.449 和 11.691 μg·mL⁻¹·h;

收稿日期: 201511-17

基金项目: 国家自然科学基金(30960526, 81560688)

作者简介: 杨建华(1971-), 男, 博士, 研究方向: 中药新药研究与开发。E-mail: yjh-yft@163.com。通讯作者: 胡君萍(1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 新疆特色药用资源的开发与利用研究。E-mail: hjp-yft@163.com。