

UPLC-MS/MS法同时测定人血浆中黄芩苷和绿原酸

居文政*, 刘芳, 吴婷, 夏小燕, 谈恒山, 王醒, 熊宁宁

(南京中医药大学 附属江苏省中医院临床药理科, 江苏 南京 210029)

摘要: 建立 UPLC-MS/MS法同时测定人血浆中黄芩苷和绿原酸的浓度, 研究注射用银黄在健康人体的药代动力学。色谱柱为 BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm ID, 1.7 μm); 流动相: A(水, 0.1%甲酸), B(甲醇, 0.1%甲酸), 梯度洗脱; 流速: 0.35 mL·min⁻¹。电喷雾离子源, 多反应监测。黄芩苷: [M+H]⁺, m/z 447→271; 绿原酸: [M-H]⁻, m/z 353→191; 山柰素: [M+H]⁺, m/z 287→287。结果表明, 黄芩苷和绿原酸血药浓度的线性范围分别为 9.6~1540 和 7.5~1200 ng·mL⁻¹, 日内、日间精密度均小于 10.2%。志愿者静脉滴注注射用银黄后, 黄芩苷和绿原酸的药时曲线分别符合二房室和三房室模型。该法简便、灵敏、特异, 适用于血浆中黄芩苷和绿原酸浓度的测定。

关键词: 注射用银黄; 黄芩苷; 绿原酸; 超高效液相色谱-串联质谱法; 药代动力学

中图分类号: R969.11 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2007)10-1074-04

Simultaneous determination of baicalin and chlorogenic acid in human plasma by UPLC-MS/MS

JU Wen-zheng*, LIU Fang, WU Ting, XIA Xiao-yan, TAN Heng-shan,
WANG Xing, XIONG Ning-ning

(Department of Clinical Pharmacology, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine,
Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

Abstract: To develop and validate an ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometric (UPLC-MS/MS) method for the simultaneous quantification of baicalin and chlorogenic acid in human plasma after iv infusion of Yinhuang injection, the analytes were isolated from plasma by protein precipitation with methanol. Then they were chromatographed on an Acquity UPLC BEH C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm ID, 1.7 μm) at 40 °C. The mobile phase A consisted of water and 0.1% formic acid. The mobile phase B consisted of methanol and 0.1% formic acid. The analytes were eluted from the column with a linear gradient from 5% B to 80% B in 5 min, then hold for 0.5 min before returning to initial condition. The flow rate was 0.35 mL·min⁻¹. A tandem mass spectrometer equipped with electrospray ionization source was used as detector. Multiple reaction monitoring (MRM) using the precursor to product ion pairs of m/z 447→271 (for baicalin), m/z 353→191 (for chlorogenic acid) and m/z 287→287 (for internal standard) were used to quantification. The linear concentration ranges of the calibration curves for baicalin and chlorogenic acid ranged from 9.6 to 1540 ng·mL⁻¹ and from 7.5 to 1200 ng·mL⁻¹, respectively. The intra- and inter-day relative standard deviation (RSD) across three validations run over the entire concentration range was less than 10.2% for both baicalin and chlorogenic acid. After iv infusion of Yinhuang injection to the volunteers, the concentration-time curves of baicalin and chlorogenic acid fitted the two-compartment and three-compartment model. T_{1/2α} were (4.47 ± 0.89) and (7.65 ± 4.42) min, T_{1/2β} were (46.22 ± 10.03) and (34.40 ± 19.16) min, respectively. The method was proved to be highly sensitive, selective, and suitable for pharmacokinetic investigations of both baicalin

收稿日期: 2007-02-01.

基金项目: 科技部“临床试验关键技术及平台研究”资助项目(2004AA2Z3766).

* 通讯作者 Tel: 86-25-86617141-80518, Fax: 86-25-86555033, E-mail: njwz1008@jlonline.com

and chlorogenic acid.

Key words: Yinhuang injection; baicalin; chlorogenic acid; UPLC-MS/MS; pharmacokinetics

注射用银黄是由金银花和黄芩制成的中药制剂,具有清热、解毒、消炎等功效,临床用于治疗上呼吸道感染、急性扁桃体炎、咽炎、流行性腮腺炎、眼科疾病、烧伤感染等。黄芩苷和绿原酸是注射用银黄中的两种主要有效成分^[1]。银黄制剂中同时研究黄芩苷和绿原酸的人体药代动力学目前尚未见报道。本研究在建立同时测定黄芩苷和绿原酸血药浓度 UPLC-MS/MS法的基础上,对健康志愿者静脉滴注注射用银黄后黄芩苷和绿原酸的药代动力学进行研究,为临床合理用药和该制剂的内在质量评价提供依据。

材料与方 法

药品与试剂 注射用银黄,由上海大陆药业有限公司生产,330 mg/瓶(含绿原酸 8.5 mg与黄芩苷 42 mg),批号 060401;黄芩苷(baicalin)、绿原酸(chlorogenic acid)和山柰素(kaempferol)对照品,均购自中国药品生物制品检定所,批号分别为:110715-200514、110753-200413和 0861-200002。

仪器 美国 Waters 公司 UPLC Quattro Primer 液质联用仪,配有电喷雾离子源及 Masslynx 4.1 数据处理软件。

色谱与质谱条件 色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm ID, 1.7 μm);流动相: A (水, 0.1% 甲酸), B (甲醇, 0.1% 甲酸) 梯度洗脱 (0 → 5 min, A: 95% → 20%; B: 5% → 80%);流速: 0.35 mL · min⁻¹。电喷雾离子源,多反应监测 (MRM),正负离子同时检测。黄芩苷: [M + H]⁺, *m/z* 447 → 271; 绿原酸: [M - H]⁻, *m/z* 353 → 191; 山柰素: [M + H]⁺, *m/z* 287 → 287。喷雾电压: 黄芩苷、山柰素, 3.0 kV; 绿原酸, -2.0 kV; 雾化气流量: 600 L · h⁻¹; 碰撞能量: 18 eV; 碰撞气流量: 0.16 mL · min⁻¹; 脱溶剂温度: 400 °C; 离子源温度: 120 °C。

血浆样品处理 在离心管中先加入 5% Na₂S₂O₅ 10 μL,精密加入血浆 200 μL,不同浓度黄芩苷、绿原酸对照溶液各 20 μL,精密加入内标山柰素溶液 (1.388 μg · mL⁻¹) 25 μL,涡旋 30 s,加入甲醇 755 μL,涡旋 3 min,于 12 000 g · min⁻¹ 离心 10 min,吸取上清液 150 μL,进行 UPLC-MS/MS 分析,进样量 2.5 μL。

数据处理 将实验所得的血药浓度时间数据采用 DAS(2.0)软件进行模型拟合,以 AIC 值和 *F* 检验结果确定最佳房室模型,并计算各药代动力学参数。其中 AUC 采用梯形法计算, *T*_{1/2β} 用药时曲线末端相计算。

结果

1 方法的特异性

在本实验条件下,黄芩苷保留时间为 3.33 min,绿原酸保留时间为 1.45 min,内标山柰素保留时间为 3.95 min。黄芩苷、绿原酸和内标山柰素峰形良好,无杂峰干扰测定,基线平稳,见图 1。

2 介质效应考察

按“血浆样品处理”项操作,加入对照溶液,配制含黄芩苷 962 ng · mL⁻¹和绿原酸 872 ng · mL⁻¹的血浆样品,进样分析,记录峰面积。另取离心管数支,以水代替空白血浆,同法处理,记录峰面积,被测化合物以血浆为介质的峰面积为 *A_b*,以水为介质的峰面积为 *A_w*,代入介质效应计算公式 (*A_b* / *A_w* × 100%) 得黄芩苷、绿原酸和内标山柰素在血浆中的介质效应分别为 86.8%、90.5% 和 83.4%。

3 标准曲线和线性范围

按“血浆样品处理”项操作,加入对照溶液,配成含黄芩苷的质量浓度分别为 9.6、19.2、38.5、77、154、385、770 和 1 540 ng · mL⁻¹,含绿原酸的质量浓度分别为 7.5、15、30、60、120、300、600 和 1 200 ng · mL⁻¹的血浆。记录色谱图,计算黄芩苷峰面积 *A₁*、绿原酸峰面积 *A₂* 和内标峰面积 *A_{IS}* 的比值 *Y* (黄芩苷: *Y_{hqg}* = *A₁* / *A_{IS}*; 绿原酸: *Y_{lys}* = *A₂* / *A_{IS}*), 以 *Y* 对血药浓度 *X* 作回归计算,得回归方程: 黄芩苷: *Y_{hqg}* = 0.011 034 4*X* + 0.042 670 5, *r* = 0.997 4, *W* = 1 / *X*²; 绿原酸: *Y_{lys}* = 0.002 295 13*X* - 0.000 739 4, *r* = 0.999 4, *W* = 1 / *X*²。按该方法测得的黄芩苷血药浓度的最低定量限为: 9.6 ng · mL⁻¹; 绿原酸血药浓度的最低定量限为: 7.5 ng · mL⁻¹。

4 精密度与准确度

按“血浆样品处理”项操作,加入对照溶液,配成含黄芩苷的质量浓度分别为 962、240.5 和 24.05 ng · mL⁻¹,含绿原酸的质量浓度分别为 872、218 和 21.8 ng · mL⁻¹ 的样品 (高、中、低浓度),按“血浆样

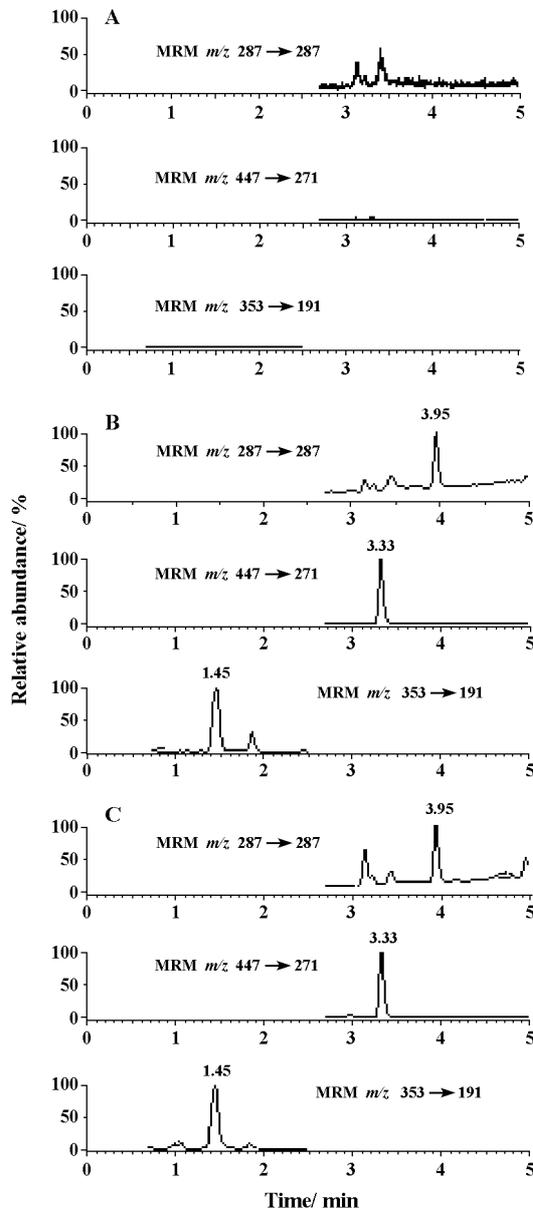


Figure 1 MRM chromatograms of baicalin (m/z 447→271), chlorogenic acid (m/z 353→191) and internal standard (kaempferol, m/z 287→287). A: Blank plasma sample; B: Blank plasma spiked with 240.5 ng·mL⁻¹ baicalin and 218 ng·mL⁻¹ chlorogenic acid; C: Plasma sample 40 min from volunteer after iv infusion of Yinhuang injection

品的处理”项下操作。每天做一批质量控制(QC)样品及随行标准曲线,连续3d,共3批,每批每个浓度做6份样品,记录色谱图,计算黄芩苷、绿原酸峰面积 A_2 和内标峰面积 A_1 的比值 γ ,代入当天的标准曲线中求得实测浓度,由实测浓度计算批内与批间精密度,结果见表1。

Table 1 Precision and accuracy for the analysis of baicalin and chlorogenic acid in human plasma ($n = 18$)

Compound	C/ng·mL ⁻¹		RSD/%		Dev
	Added	Found	Inter-day	Intra-day	/%
Baicalin	24	24.5	6.5	9.9	2.1
	240.5	246.3	5.9	6.5	2.4
	962	1 007.4	4.6	10.2	4.7
Chlorogenic acid	21.8	22.5	4.1	9.2	3.2
	218	213.0	5.8	7.4	- 2.3
	872	835.4	4.2	5.5	- 4.2

5 回收率

分别取含黄芩苷和绿原酸高、中、低浓度的样品,每个浓度进行6样本分析。同时另取相应对照溶液和内标溶液,以空白血浆经甲醇沉淀蛋白处理后的上清液稀释至相应浓度,涡旋混合后进样分析,以每个浓度两种处理方法的峰面积比值计算回收率。黄芩苷3种浓度下样品的回收率分别为97.1%,97.5%和96.3%,绿原酸3种浓度下样品的回收率分别为98.3%,99.1%和97.7%,内标溶液经同样处理,回收率为97.6%。

6 样品稳定性

取空白血浆200 μL,配制低、高两个浓度(黄芩苷血浆质量浓度为24和962 ng·mL⁻¹,绿原酸血浆质量浓度为21.8和872 ng·mL⁻¹)的样品,考察黄芩苷和绿原酸血浆样品经历3次冷冻解冻循环、-75℃放置2周、室温放置4h以及经沉淀蛋白处理后的血浆样品室温放置6h的稳定性,测得值与新配置的QC样品值进行比较,浓度变化在85%~115%,结果表明黄芩苷和绿原酸在上述条件下均稳定。

7 人体药代动力学

志愿者10名,男女各半,体重(53.9±6.3)kg,年龄(22±1.7)岁,经体检合格后,签署知情同意书,并经南京中医药大学附属医院伦理委员会审批同意。受试者在试验前日进入I期临床病房,晚上进统一标准餐,禁食10h以上,不禁水。次日早餐后,匀速静脉滴注注射用银黄2瓶(用5%葡萄糖注射液稀释成250 mL),滴注时间为1h。试验期间受试者均应在监护室内,进统一标准餐,适量饮水,避免剧烈运动,禁服含茶、咖啡和醇类饮料。对受试者实施必要的医疗监护,观察并记录用药后可能发生的不良反应。于滴注前、滴注10和40 min,滴注结束后0, 5, 10, 40 min, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8和12 h,自滴注另侧手臂肘静脉采血约4 mL,血样置

肝素化试管,避光。离心($3\ 000\ r \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min)分取血浆,置 $-75\ ^\circ\text{C}$ 保存待测。

10名健康志愿者静脉滴注注射用银黄后,测得的黄芩苷和绿原酸平均血药浓度-时间曲线见图2。将测得的血药浓度-时间数据采用DAS(2.0)软件处理得到各主要药代动力学参数,结果见表2。黄芩苷和绿原酸分布半衰期 $T_{1/2\alpha}$ 分别为4.5和7.6 min,表明静注后二者在体内快速分布,消除半衰期 $T_{1/2\beta}$ 分别为46.2和34.4 min,提示黄芩苷和绿原酸在体内消除较快。健康受试者静脉滴注银黄后,黄芩苷的血药浓度经时变化符合二房室模型,绿原酸的血药浓度经时变化符合三房室模型(权重均为 $1/C^2$)。

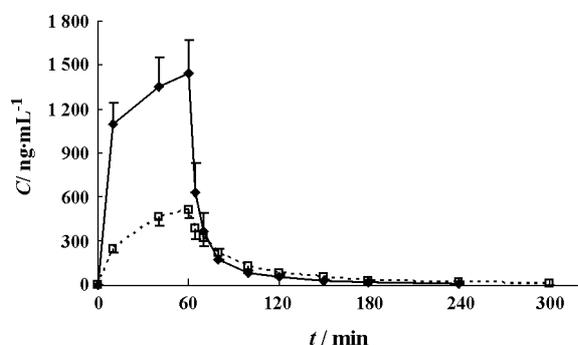


Figure 2 Mean plasma concentration-time curves of baicalin (◆-◆) and chlorogenic acid (□-□) after iv infusion of Yinhuang injection 660 mg in healthy volunteers ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Pharmacokinetic parameters of baicalin and chlorogenic acid after iv infusion of Yinhuang injection 660 mg in healthy volunteers ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Parameter	Baicalin	Chlorogenic acid
k_{10} / min^{-1}	$0.141\ 5 \pm 0.034\ 1$	$0.059\ 1 \pm 0.027\ 3$
$V/L \cdot \text{kg}^{-1}$	1.25 ± 0.31	6.18 ± 8.17
$T_{1/2\alpha} / \text{min}$	4.47 ± 0.89	7.65 ± 4.42
$T_{1/2\beta} / \text{min}$	46.22 ± 10.03	34.40 ± 19.16
$CL/L \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	$0.018\ 9 \pm 0.003\ 9$	$0.007\ 9 \pm 0.001\ 4$
$AUC_{0-t} / \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}$	$84\ 557 \pm 14\ 270$	$38\ 678 \pm 4\ 936$
$AUC_{0-\infty} / \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}$	$85\ 189 \pm 14\ 533$	$41\ 855 \pm 8\ 305$
MRT_{0-t} / min	41.76 ± 2.65	64.91 ± 4.54
$MRT_{0-\infty} / \text{min}$	43.34 ± 3.33	68.91 ± 6.10

讨论

中药药代动力学是目前中药新药研发中的热点和难点,较通常的化学药物的药代动力学研究更为

困难^[2]。液相色谱分析速度快,串联质谱灵敏度高,选择性好,适用于多组分药代动力学研究。由于液相色谱分离效果佳,减小了介质的离子抑制作用。绿原酸、黄芩苷和山柰素的分析时间在2 min内,但在分析给药后人体血浆样品时,发现黄芩苷有代谢物干扰,重新进行了色谱条件优化使其分离,干扰物的母离子和子离子质荷比均与黄芩苷相同,可能为黄芩苷同分异构体,这与黄酮类化合物代谢规律一致^[3,4]。对前处理的方法分别比较了乙酸乙酯萃取法、蛋白沉淀法和固相萃取法,结果表明采用蛋白沉淀的方法重现性好。比较了甲醇和乙腈沉淀的效果,发现采用甲醇沉淀时,黄芩苷和绿原酸色谱图均无干扰,且峰形较好,故选用甲醇沉淀蛋白法。在优化质谱条件时发现,绿原酸负离子信号较强,黄芩苷正离子信号较强,山柰素虽用MRM方式测定,但未产生碎片离子。目前已报道的银黄制剂药代动力学研究,均以动物为研究对象,以黄芩苷为检测对象^[5-7]。本实验首次用UPLC-MS/MS法同时测定血浆中黄芩苷与绿原酸两个成分,并对银黄制剂的人体药代动力学进行了研究。

References

- [1] Chen WW, Liu HG. Advances in the study of quality and pharmacology of Yinhuang preparation [J]. Guangxi J Tradit Chin Med (广西中医药), 2002, 25: 8 - 11.
- [2] Liu CX. Difficulty and hot-points on pharmacokinetics studies of traditional Chinese medicine [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2005, 40: 395 - 401.
- [3] Lu XY, Jiang HD, Zeng S. Advances in the study of metabolism and drug-drug interactions of flavonoids in primary cultured hepatocytes [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2006, 41: 1130 - 1135.
- [4] Ju WZ, Chu JH, Tan RX, et al. Study on metabolites of scutellarin in gastrointestinal tract by HPLC-MS/MS method [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther (中国临床药理学与治疗学), 2006, 11: 292 - 295.
- [5] Zhang ZR, Hu XY, Chen Y, et al. Study on bioavailability of Yinhuang Chongji in rabbits [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 1995, 30: 675 - 678.
- [6] Zhang ZR, Hu XY, Jiang DY, et al. Metabolic kinetic study on baicalin of Yinhuang granules in rabbit body [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 1996, 18: 1 - 3.
- [7] Shi WZ, Yao JC, Liang YG. Pharmacokinetics research on baicalin of Yinhuang granules in rat internal body [J]. Guiding J TCM (中医药导报), 2005, 11: 10 - 12.