

LC-MS/MS 测定家兔胆汁中淫羊藿次苷 II

张 依¹, 姚志红^{1,2}, 秦子飞¹, 李凯宇¹, 戴 毅^{1,2}, 姚新生^{1,2}

(1. 暨南大学 药学院 中药及天然药物研究所 广东 广州 510632;

2. 中药药效物质基础及创新药物研究广东省高校重点实验室 广东 广州 510632)

[摘 要] 建立能定量分析家兔胆汁中淫羊藿次苷 II 的液相色谱-串联质谱联用法(LC-MS/MS). 以水饱和乙酸乙酯萃取为家兔胆汁样本前处理方法, 采用 OSD 柱(150 × 4.6 mm, i. d. , 5 μm), 以乙腈-水(各含 0.1% 的甲酸)为流动相进行梯度洗脱, 采用电喷雾离子源(ESI) 二级质谱全扫描, 负离子方式下检测. 方法学考察结果显示, 该方法专属性良好; 日内精密性(RSD) 不大于 10.6%, 日间精密性(RSD) 不大于 8.3%, 准确度(RE) 在 -4.4% ~ +5.0% 范围以内; 胆汁样本稳定性良好; 基质效应对测定影响可以忽略不计且提取率较高并稳定. 该方法快速而灵敏, 可用于家兔灌胃给以淫羊藿总黄酮后胆汁中的活性代谢物淫羊藿次苷 II 的动态变化研究.

[关键词] 淫羊藿次苷 II; 液相色谱-串联质谱联用法; 定量分析; 活性代谢物; 淫羊藿总黄酮; 家兔胆汁
[中图分类号] O174.52 [文献标志码] A [文章编号] 1000-9965(2012)03-0305-06

Quantitative analysis of icariside II in rabbit bile by LC-MS/MS

ZHANG Yi¹, YAO Zhi-hong^{1,2}, QIN Zi-fei¹, LI Kai-yu¹, DAI Yi^{1,2}, YAO Xin-sheng^{1,2}

(1. Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Guangdong Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of TCM and New Drugs Research, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] A liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed for quantitative analysis of icariside II in rabbit bile. Water-saturated ethyl acetate extraction was used for pretreatment of bile sample. The separation was achieved on ODS column(150 × 4.6 mm, i. d. , 5 μm) by gradient elution with acetonitrile-water (including 0.1% formic acid respectively) as mobile phase. The ion acquisition was performed by full scan MS/MS in negative ion mode. The method was specific, accurate, precise and reproducible with intra-day RSD less than 10.6%, inter-day RSD less than 8.3% and relative error between -4.4% and 5.0%. Moreover, the samples exhibited good stability and high recovery. The matrix effect can be neglected. Taken together, this method can be applied to the dynamic analysis of icariside II, an active metabolite in bile after intragastric administration of Epimedium Flavonoids (EF) to rabbits.

[Key words] icariside II; LC-MS/MS; quantitative analysis; bioactive metabolite; epimedium flavonoids; rabbit bile

淫羊藿(herba epimedii)为小檗科多年生草本植物,为我国传统补肾壮骨中药^[1].李时珍在《本草

纲目》中称其有“益精气,坚筋骨,补腰膝,强心力”之功效^[2].淫羊藿和以淫羊藿苷为指标成分的中药

[收稿日期] 2012-02-29

[基金项目] 国家自然科学基金中港基金资助项目(30831160510)

[作者简介] 张 依(1988-),女,研究方向:中药质量控制方法、药物代谢及动力学等
通信作者:姚志红,副教授,硕士研究生导师

制剂在临床上多经口服给药^[3-4]。据报道,口服淫羊藿总黄酮(epimedium flavonoids, EF)提取物能够预防家兔激素关联性骨坏死的发生^[5],但EF的体外活性评价却未表现出相关作用^[6],提示其可能通过在家兔体内的活性代谢产物发挥药效。

淫羊藿黄酮类化合物的药代动力学试验动物多为大鼠^[7-9],也有比格犬^[10]。虽然家兔被用作激素性骨坏死的体内评价模型已得到国际认可^[11],但相关药代动力学研究未见报道。胆汁排泄是药物代谢物消除的一个重要途径^[12]。本课题组前期研究发现,家兔灌胃给以EF后胆汁中主要代谢物为淫羊藿次苷II,且具有预防激素性骨坏死的体外活性。

本研究采用专属而灵敏的液相-质谱联用技术,建立家兔胆汁中淫羊藿次苷II的定量分析方法,首次对家兔灌胃给以EF后胆汁中的活性代谢物淫羊藿次苷II的动态变化开展研究,可能有助于诠释EF在家兔体内发挥预防激素性骨坏死作用的物质基础。

1 仪器与材料

美国Finnigan公司LCQ Advantage型液相色谱-质谱联用仪,配有SCM1000真空脱气机,P2000二元泵,AS3000自动进样器,UV6000LP DVD检测器,电喷雾离子化源(ESI)以及Xcalibur 1.3数据处理系统。色谱柱为美国Ultimate公司XB-C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm);预柱为美国Phenomenex-C18(4 mm×0.3 mm)。Sartorius BP211D电子天平,TGL-16G-A高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),LAIHENG L428氮吹浓缩仪,华利达WH-951微型旋涡混合仪。

淫羊藿总黄酮提取物(含7种母核相同的黄酮类成分,其中含淫羊藿苷≥83%,其他成分均≤4.1%,北京同仁堂健康药业股份有限公司);淫羊藿次苷II(纯度大于99%,上海融禾医药科技发展有限公司),乙腈(Dikma公司),甲醇(山东禹王)均为色谱纯,实验用水为屈臣氏蒸馏水(北京屈臣氏蒸馏水有限公司),其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 胆汁中淫羊藿次苷II的分析方法

(1)淫羊藿次苷II对照品溶液的配制 精密称取淫羊藿次苷II对照品2.07 mg,置于50 mL的容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配制成质量浓度为41.4 μg·mL⁻¹的淫羊藿次苷II对照品溶液。

(2)胆汁中淫羊藿次苷II标准溶液的配制 精密移取淫羊藿次苷II对照品溶液,标准加入到空白家兔胆汁中,配制成相当于淫羊藿次苷II的胆汁质量浓度分别是0.051 75、0.103 5、0.258 8、0.517 5、1.035、1.552和2.070 μg·mL⁻¹的系列标准溶液。

(3)空白胆汁样本的收集 雄性新西兰长耳白兔3 kg,购自广东省实验动物中心,于温度为(23±2)℃和湿度为(55±10)%的动物房内饲养,每天接受12 h的光照和自由饮食。待适应环境后,家兔耳缘静脉注射质量分数3%戊巴比妥钠(1 mL·kg⁻¹),对家兔进行胆管插管,收集空白胆汁,同时耳缘静脉定时补充等量生理盐水。

(4)胆汁样本的前处理 500 μL家兔空白胆汁中,加入100 μL淫羊藿次苷II对照品溶液,混匀,加入1 mL水饱和的乙酸乙酯萃取,涡旋1 min,10 000 r/min离心1 min,同法操作3次,合并3次上清液,室温下氮气吹干,残渣用150 μL甲醇复溶,涡旋振荡1 min,10 000 r/min离心1 min,取上清液按“下面(5)节色谱条件和质谱条件”条件进行LC-MS/MS分析。

(5)色谱条件和质谱条件 色谱条件:色谱柱为Ultimate XB-C18柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm, Serial Number: 210801780);预柱为Phenomenex-C18保护柱;流动相:水(A)-乙腈(B),各含体积分数0.1%甲酸;梯度洗脱程序:0 min-40% B, 9 min-95% B, 11 min-100% B, 13 min-100% B, 14 min-40% B, 17 min-40% B;流速:0.8 mL·min⁻¹;柱温:35℃;检测波长:335 nm;进样量:10 μL。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),负离子方式检测,二级质谱全扫描方式扫描;加热毛细管温度275℃,毛细管电压-13 V;离子源喷射电压4.6 kV;管透镜电压55 V;鞘气(N₂)流速35 arb;辅助气(N₂)流速10 arb。淫羊藿次苷II(准分子离子峰:m/z 513)的二级碎片离子为m/z 366,二级碎裂能量为38%。

采用上述液相-质谱条件得到的淫羊藿次苷II对照品溶液的分析结果如图1和图2所示。

2.2 胆汁中淫羊藿次苷II分析方法的确定

(1)方法的专属性考察 取家兔空白胆汁、淫羊藿次苷II对照品溶液加入家兔空白胆汁以及单次灌胃给以EF后的家兔胆汁样本,分别按“2.1中的(4)节胆汁样本的前处理”同法操作,按“2.1(5)节色谱条件和质谱条件”进行分析,考察方法的专属性。

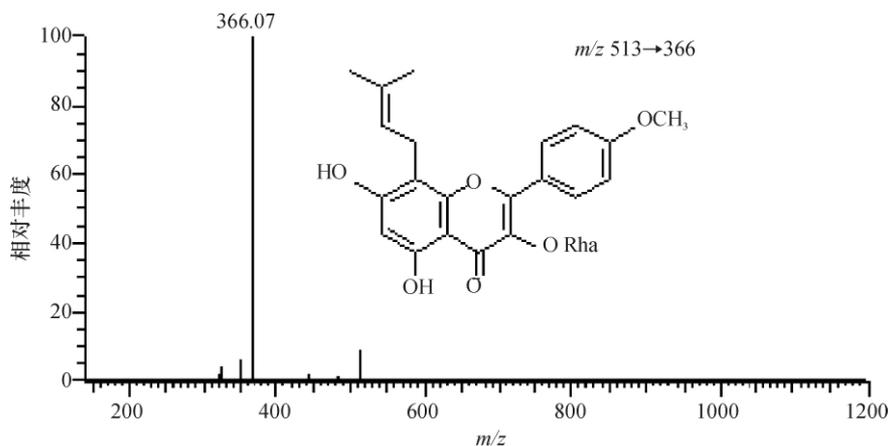


图1 淫羊藿次苷 II 对照品溶液的 LC-MS/MS 质谱图

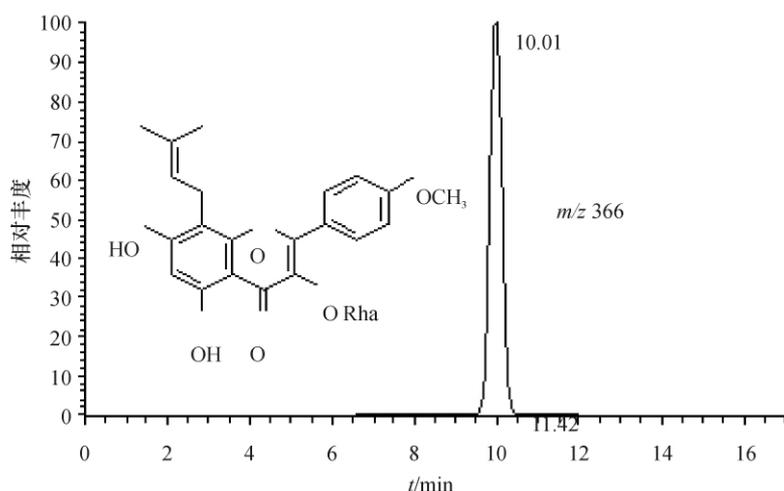


图2 淫羊藿次苷 II 对照品溶液的 LC-MS/MS 质量色谱图

(2) 线性与范围考察 配制一系列淫羊藿次苷 II 对照品溶液标准加入家兔空白胆汁中,“2.1(4) 节胆汁样本前处理”同法操作,按照“2.1(5) 节色谱条件和质谱条件”进行 LC-MS/MS 分析. 分别以淫羊藿次苷 II 在空白胆汁中的质量浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,测得的淫羊藿次苷 II 峰面积为纵坐标,采用加权最小二乘法($W = 1/X^2$)进行线性回归运算,求得直线方程,即为胆汁标准曲线.

(3) 基质效应考察 取家兔空白胆汁 500 μL ,经水饱和乙酸乙酯 3 次萃取后,上清液加入相应的低、中、高质量浓度的淫羊藿次苷 II 对照品溶液获得的峰面积(A_1)与相同进样质量浓度的对照品溶液(A_2)直接进样获得的平均峰面积之比,评价基质效应(A_1/A_2). 各质量浓度的样本平行制备 6 份.

(4) 提取回收率考察 率 I 取家兔空白胆汁 500 μL ,按“2.1(4) 节胆汁样本前处理”项下同法操作,配制成相当于淫羊藿次苷 II 胆汁质量浓度分别为 0.103 5、0.517 5、1.552 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品,所得相应峰面积(A_3). 同时另取空白胆汁 500 μL ,经水

饱和乙酸乙酯 3 次萃取后,加入相应质量浓度的淫羊藿次苷 II 对照品溶液获得的峰面积(A_1),以两种处理方法的峰面积比值计算,求得提取回收率(A_3/A_1). 各质量浓度的样本平行制备 6 份.

(5) 方法的精密度与准确度考察 取空白胆汁 500 μL ,按“2.1(4) 节胆汁样本前处理”同法操作,配制成相当于淫羊藿次苷 II 的胆汁质量浓度分别是 0.103 5、0.517 5、1.552 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的低、中、高 3 个的质量控制样本(QC),各质量浓度的样本平行制备 6 份,按“2.1(5) 节色谱条件和质谱条件”进行 LC-MS/MS 分析,连续测定 3 d,同时随行当天的标准曲线,计算 QC 样本的质量浓度,求得方法的准确度(用 RE 表示)与日内、日间精密度(用 RSD 表示).

(6) 稳定性考察 取空白胆汁 500 μL ,按“2.1.4 胆汁样本前处理”项下同法操作,配制成相当于淫羊藿次苷 II 的胆汁质量浓度分别为 0.103 5、1.552 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品,各质量浓度的样本平行制备 3 份,按照“2.1(5) 节色谱条件和质谱条件”进行 LC-MS/MS 分析.

2.3 灌胃给以 EF 后实际胆汁样本的收集和分析

应用上述方法,对家兔灌胃给以 EF 后胆汁样本中活性代谢物淫羊藿次苷 II 的动态变化进行测定.对正常家兔进行胆管插管实验,按 80 mg/kg 灌胃给予淫羊藿总黄酮苷,收集 0-10 h 各时间段的胆汁样本.按“2.1(4)节胆汁样本前处理”同法操作处理各时间段的胆汁样本,按照“2.1(5)节色谱条件和质谱条件”进行 LC-MS/MS 分析,同时随行当天标准曲线和 QC 样本,得出各时间段的胆汁中淫

羊藿次苷 II 的质量浓度,并计算出其排泄量.

3 结果

3.1 分析方法的确证结果

(1) 方法专属性考察结果 在上述液质条件下,方法专属性考察结果如图 3 所示.结果表明,空白胆汁中的内源性物质不干扰淫羊藿次苷 II 的测定,该方法专属性良好.

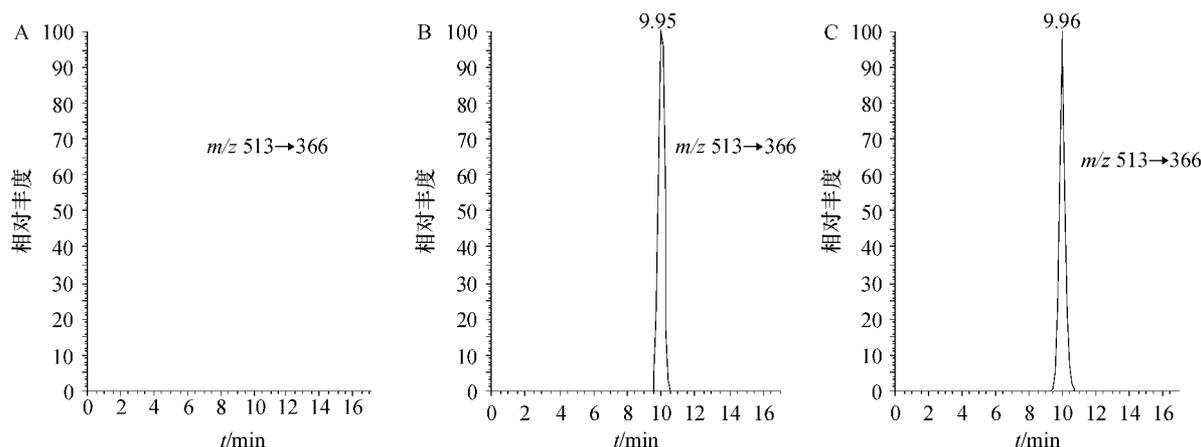


图 3 分析 3 种家兔胆汁样本中淫羊藿次苷 II 的 LC-MS/MS 质量色谱图

(2) 线性与范围的考察结果 胆汁中淫羊藿次苷 II 的峰面积与相应质量浓度进行线性回归,取权重因子为 $1/X^2$ 结果如表 1 所示.3 个分析批的标准曲线在 $0.05175 \sim 2.070 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好.

(3) 基质效应考察结果 淫羊藿次苷 II 在 0.1035 、 0.5175 和 $1.552 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3 个质量浓度下的胆汁样品中的基质效应结果见表 2.结果表明,各质量浓度下淫羊藿次苷 II 的基质效应均在

$88.1\% \sim 89.7\%$,且 RSD 小于 4.6% ,说明胆汁中基质效应对淫羊藿次苷 II 测定的没有影响.

表 1 胆汁中淫羊藿次苷 II 的标准曲线

分析批	n	回归方程	r
1	7	$Y = 7961.43X + 8204.05$	0.9966
2	7	$Y = 7648.08X + 80996.8$	0.9928
3	7	$Y = 8035.20X - 14810.8$	0.9944

表 2 LC-MS/MS 方法测定家兔胆汁中淫羊藿次苷 II 基质效应结果

$\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	n	1	2	3	4	5	6	Mean	RSD/%
0.1035	6	94.6	90.5	83.5	88.9	86.4	84.9	88.1	4.6
0.5175	6	89.7	88.8	88.5	88.3	88.8	87.4	88.6	0.9
1.552	6	89.7	88.6	90.6	88.6	88.7	91.9	89.7	1.5

(4) 提取回收率考察结果 提取回收率结果如表 3 所示.淫羊藿次苷 II 质量浓度分别为 0.1035 、 0.5175 、 $1.552 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的胆汁样品的平均提取回

收率分别为 104.7% 、 111% 、 100.5% ,RSD 小于 5.2% ,说明提取回收率高且较定.

表 3 LC-MS/MS 方法测定家兔胆汁中淫羊藿次苷 II 的提取回收率结果

$\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	n	1	2	3	4	5	6	Mean	RSD/%
0.1035	6	99.7	99.0	104.8	111.9	102.4	110.3	104.7	5.2
0.5175	6	109.8	108.1	114.6	114.8	108.0	111.0	111.0	2.7
1.552	6	101.3	101.1	98.7	101.3	100.7	99.8	100.5	1.0

(5) 方法的精密度与准确度考察结果 方法的精密度与准确度考察结果如表 4 所示,日内 RSD 不大于 10.6%, 日间 RSD 不大于 8.3%, RE 在 -

4.4% ~ +5.0% 结果表明,该方法的精密度与准确度均良好,能满足生物样品分析的要求。

表 4 LC-MS/MS 方法测定家兔胆汁中淫羊藿次苷 II 精密度与准确度结果

$\rho_{\text{加药}} / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	日内 (n=6)			日间 (n=18)		
	$\rho_{\text{测得}} (\text{mean} \pm \text{SD}) / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	精密度 / %	准确度 / %	$\rho_{\text{测得}} (\text{mean} \pm \text{SD}) / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	精密度 / %	准确度 / %
0.103 5	0.099 ± 0.010	10.6	-4.4	0.106 ± 0.009	8.3	2.5
0.517 5	0.543 ± 0.012	2.2	5.0	0.541 ± 0.026	4.9	4.6
1.552	1.569 ± 0.028	1.8	1.1	1.530 ± 0.072	4.8	-1.5

(6) 样品稳定性考察结果 样品稳定性考察结果如表 5 所示,淫羊藿次苷 II 的胆汁样本于 -20 °C 放置 1 周、经历 3 次冻-融循环、经乙酸乙酯萃取后

室温放置 24 h 和室温下放置 4 h 均能保持稳定,说明胆汁样本的稳定性良好,能满足生物样品分析的要求。

表 5 淫羊藿次苷 II 的胆汁样本稳定性结果

稳定性试验	n	$\rho_{\text{标准加入}} / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	RE / %	RSD / %
于 -20 °C 放置一周后的稳定性	3	0.103 5	-7.8	4.0
		1.552	-4.6	1.7
经历 3 次冷冻-解冻循环后稳定性	3	0.103 5	11.0	11.8
		1.552	-11.4	8.1
经萃取后于室温放置 24 h 的稳定性	3	0.103 5	9.6	3.2
		1.552	3.1	1.5
于室温放置 4 h 的稳定性	3	0.103 5	-15.7	13.5
		1.552	-7.2	5.2

3.2 灌胃给以 EF 后实际胆汁样本的分析结果

家兔灌胃给以 EF 后 0 ~ 10 h 各时间段的胆汁样本中活性代谢物淫羊藿次苷 II 的排泄量结果如图 4 所示,淫羊藿次苷 II 在胆汁中的排泄量在 4 h 开始增加,到 7 h 时,排泄量逐渐趋于稳定。

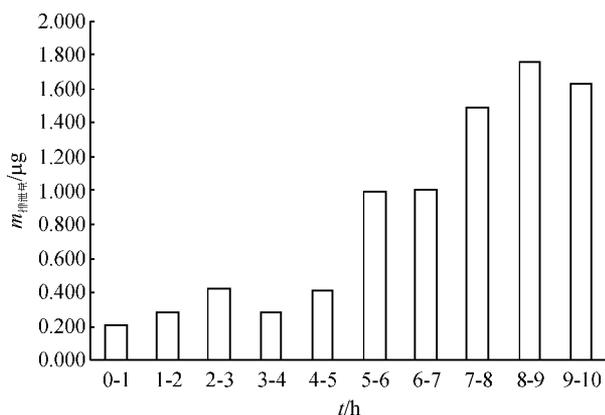


图 4 LC-MS/MS 测定家兔灌胃给 EF 后淫羊藿次苷 II 在各时间段胆汁样本中的排泄量图

4 小结

(1) 中药药代动力学研究大多存在待测成分血药浓度低的难题^[13],这使得药物在生物样本中检出困难,本研究采用灵敏、专属性好且无显著基质效应的 LC-MS/MS 法,首次建立了能测定家兔胆汁淫羊藿次苷 II 含量的方法,可以对研究家兔灌胃给以 EF 后经胆汁排泄的活性代谢物淫羊藿次苷 II 的动态变化过程提供支持。

(2) 本研究表明,采用水饱和乙酸乙酯萃取法对胆汁样本进行前处理,能够获得较高的提取回收率且方法稳定,符合实验要求。

(3) 本研究发现,与正离子模式相比,在负离子模式下对淫羊藿次苷 II 进行 LC-MS/MS 分析,质谱信号干扰更小;在负离子模式下,有文献报道分别选择 m/z 351 或者 m/z 366 作为检测淫羊藿次苷 II 的二级质谱碎片离子^[14-15],而在本研究中选择 m/z 为 366 作为二级碎片离子进行淫羊藿次苷 II 的检测,

可获得更好的专属性。

(4) 本研究针对正常家兔灌胃给以 EF 后胆汁中的活性代谢物淫羊藿次苷 II 的定量分析结果,可能为后续开展针对模型家兔胆汁中活性代谢物的研究奠定基础。如果进一步结合体内活性评价结果,则有望对阐明 EF 发挥降低家兔激素性骨坏死风险的药效物质基础提供一定依据。

[参考文献]

- [1] 冉先德. 中华药海[M]. 哈尔滨: 哈尔滨出版社出版, 1998: 1714 - 1718.
- [2] 夏国莲, 黄兆铨. 淫羊藿对心血管系统药理作用的研究新进展[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(8): 1676 - 1678.
- [3] 邱峰, 陈英杰, 姚新生, 等. 淫羊藿苷在大鼠体内的代谢[J]. 药学学报, 1999, 34(3): 222 - 226.
- [4] ZHAO Hai-yu, FAN Miao-xuan, FAN Li, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of metabolites in rats after administration of prenylflavonoids from *Epimediums* [J]. Journal of Chromatography B, 2010, 878: 1113 - 1124.
- [5] ZHANG G, QIN L, SHENG H, et al. Epimedium-derived phytoestrogen exert beneficial effect on preventing steroid-associated osteonecrosis in rabbits with inhibition of both thrombosis and lipid-deposition [J]. Bone, 2007, 40: 685 - 692.
- [6] ZHANG Ge, WANG Xin-luan, SHENG Hui, et al. Constitutional flavonoids derived from epimedium dose-dependently reduce incidence of steroid-associated osteonecrosis not via direct action by themselves on potential cellular targets [J]. PLoS ONE, 2009, 4(7): 1 - 11.
- [7] 刘海培, 孟繁华, 郭继芬, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定大鼠血浆中淫羊藿素[J]. 药学学报, 2009, 44(10): 1140 - 1144.
- [8] 刘海培, 孟繁华, 郭继芬, 等. 淫羊藿素在大鼠体内的药动学研究[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(7): 539 - 543.
- [9] 刘子琛, 徐英, 陈世忠. 淫羊藿次苷 I 在大鼠体内的药动学和组织分布研究[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(11): 848 - 851.
- [10] 孟繁华, 郭继芬, 李全胜, 等. 液相色谱-串联质谱法测定比格犬血浆中淫羊藿苷元[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(6): 537 - 540.
- [11] QIN L, ZHANG G, SHENG H, et al. Multiple bioimaging modalities in evaluation of an experimental osteonecrosis induced by a combination of lipopolysaccharide and methylprednisolone [J]. Bone, 2006, 39(4): 863 - 871.
- [12] 李好枝. 体内药物分析[M]. 北京: 中国医药科技出版社
- [13] 洪爱华, 陆大祥, 戚仁斌, 等. HPLC/MS/MS 法同时测定小鼠血浆中人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ [J]. 暨南大学学报: 自然科学版, 2007, 28(5): 491 - 493.
- [14] SHEN Ping, WONG Shih Peng, LI Jun, et al. Simple and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for simultaneous measurement of five *Epimedium* prenylflavonoids in rat sera [J]. Journal of Chromatography B, 2009, 877: 71 - 78.
- [15] 刘明艳, 姚志红, 张依, 等. 两种前处理方法对 LC-MS/MS 测定家兔血清中淫羊藿黄酮类化合物的基质效应的影响[J]. 分析测试学报, 2011, 30(9): 1006 - 1012.

[责任编辑: 黄建军]