

液相色谱-串联质谱法测定大鼠血浆中靛蓝的浓度及药动学研究

孔树佳*,李砚文[#](昆明医科大学第三附属医院/云南省肿瘤医院药剂科,昆明 650118)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)07-0912-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.07.14

摘要 目的:建立测定大鼠血浆中靛蓝浓度的方法,研究靛蓝在大鼠体内的药动学特征。方法:将18只大鼠随机分为低、中、高剂量组,每组6只,分别ig 10、20、40 mg/kg的靛蓝溶液。分别于给药前和给药后0.083、0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、10、12、16、24、48、72 h眼眶采全血0.3 mL,分离血浆,甲醇沉淀后采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定靛蓝的血药浓度。色谱柱为Agilent Poroshell EC-C₁₈,流动相为甲醇-5 mmol/L 乙酸铵溶液(95:5, V/V),流速为0.4 mL/min;以多反应监测(MRM)模式进行定量分析,用于监测的离子对(*m/z*)为263.1~218.8(靛蓝)和237.2~194.1(卡马西平,内标);采用DAS 3.0软件计算药动学参数。结果:靛蓝检测质量浓度的线性范围为0.5~100 ng/mL(*r*=0.999 9),日内、日间RSD均小于9%(*n*=5),低、中、高质量浓度的质控样品的基质效应分别为(98.25±3.71)%、(102.23±2.64)%、(102.29±3.79)%(*n*=5)。靛蓝在低、中、高剂量组大鼠体内的 t_{max} 分别为(8.6±1.1)、(9.2±0.8)、(9.5±0.8) h, c_{max} 分别为(30.9±8.6)、(44.9±10.1)、(96.1±17.4) ng/mL, $t_{1/2}$ 分别为(14.9±2.1)、(16.3±2.9)、(15.3±3.7) h, AUC_{0-72 h}分别为(366.6±83.4)、(694.9±105.8)、(1 223.42±108.7) ng·h/mL。结论:本方法灵敏度高、特异性好,可用于大鼠血浆样品中靛蓝的含量测定;靛蓝在大鼠体内药动学特征符合非房室模型。

关键词 靛蓝;液相色谱-串联质谱法;大鼠;血浆;药动学

Concentration Determination of Indigo in Rats' Plasma by LC-MS/MS and Its Pharmacokinetics Study
KONG Shujia, LI Yanwen (Dept. of Pharmacy, the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University/
Yunnan Provincial Tumor Hospital, Kunming 650118, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the concentration determination of indigo in rats' plasma, and study the pharmacokinetic characteristics in rats *in vivo*. METHODS: 18 rats were randomly divided into low-dose, medium-dose, high-dose

联合肾组织病理学观察的方法,探讨了复方川芎滴丸对DN模型大鼠的影响。结果证明,该药具有抵抗糖尿病肾损伤的作用,但是具体的作用机制有待进一步探索。

参考文献

[1] 范文君,祝菁菁,黄韻宇,等.我国糖尿病肾病的流行现状及其危险因素[J].中国慢性病预防与控制,2013,21(6):748-751.

[2] 蔡菊芳,黄明龙,王少峰,等.彩超对糖尿病肾血流动力学改变的观察分析[J].中华全科医学,2012,10(6):954-955.

[3] 郑洪新.中医基础理论专题研究[M].北京:人民卫生出版社,2009:103.

[4] 孙昕,俞惠琴.芎归滴丸对大鼠脑血流量的影响[J].山东医药工业,1994,18(4):44-45.

[5] 孙昕,魏强,俞惠琴.芎归滴丸毒理学研究[J].中草药,1998,29(12):820-821.

[6] 石光,石岩,孙晓波,等.糖尿病肾病大鼠模型制备方法与模型建立标准研究[J].辽宁中医药大学学报,2014,16(7):171-173.

[7] 李志杰,张悦.糖尿病肾病动物模型的研究进展[J].生命

科学,2011,23(1):90-94.

[8] 陈奇.中药药理研究方法学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:31.

[9] 段立鸣,肖艳,张杰丹.参川芎嗪注射液联合大剂量黄芪注射液治疗糖尿病肾病的临床观察[J].中国药房,2013,24(12):1094-1095.

[10] 钟同环.厄贝沙坦治疗糖尿病肾病的疗效观察[J].医学信息,2014(23):151.

[11] 胡金梅,张松,张厚兴,等.厄贝沙坦治疗糖尿病肾病的疗效观察[J].中国医药导报,2010,7(2):59-60.

[12] 王玉华,刘群娣,苏晔.不同剂量厄贝沙坦治疗糖尿病肾病的疗效观察[J].中国医药导刊,2011,13(6):1021-1022.

[13] 张婷,高彦彬.中医药治疗糖尿病肾病研究进展[J].世界中医药,2014,9(5):679-683.

[14] 孙树良,郑杨.活血化瘀法治疗糖尿病肾病临床观察[J].辽宁中医学院学报,2006,8(2):84-85.

[15] 金玉青,洪远林,李建蕊,等.川芎的化学成分及药理作用研究进展[J].中药与临床,2013,4(3):44-48.

[16] 刘医辉,杨世英,马伟林,等.当归药理作用的研究进展[J].中国当代医药,2014,21(22):192-196.

* 主管药师,硕士。研究方向:临床药物治疗、药事管理。电话:0871-68217128。E-mail: vampireicecream@163.com

通信作者:主治医师。研究方向:肿瘤危重症治疗。电话:0871-68185656-2036。E-mail: liyw20008@163.com

(收稿日期:2016-07-08 修回日期:2016-12-03)
(编辑:林 静)

groups, 6 in each group, which were intragastrically administrated 10, 20, 40 mg/kg of indigo solution. The sample blood 0.3 mL was taken from eye socket before administration and 0.083, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 48, 72 h after administration, separating the plasma, then LC-MS/MS was used to determine the plasma concentration of indigo after methanol precipitation. The column was Agilent Poroshell EC-C₁₈ with mobile phase consisting of methanol-5 mmol/L ammonium acetate solution (95:5, V/V) at a flow rate of 0.4 mL/min; multiple reaction monitoring was conducted for the quantitative analysis, with ion pair of 263.1-218.8 (indigo) and 237.2-194.1 (carbamazepine, internal standard). Pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 3.0 software. RESULTS: The linear range of indigo was 0.5-100 ng/mL ($r=0.999\ 9$), intra-day and inter-day RSDs were lower than 9% ($n=5$); matrix effects of low, medium and high does quality control samples were $(98.25 \pm 3.71)\%$, $(102.23 \pm 2.64)\%$, $(102.29 \pm 3.79)\%$ ($n=5$). The pharmacokinetic parameters of indigo in low-dose, medium-dose, high-dose groups were $t_{\max}$ of (8.6 ± 1.1) , (9.2 ± 0.8) and (9.5 ± 0.8) h; $c_{\max}$ of (30.9 ± 8.6) , (44.9 ± 10.1) , (96.1 ± 17.4) ng/mL; $t_{1/2}$ of (14.9 ± 2.1) , (16.3 ± 2.9) , (15.3 ± 3.7) h; AUC_{0-72 h} of (366.6 ± 83.4) , (694.9 ± 105.8) , $(1\ 223.42 \pm 108.7)$ ng·h/mL, respectively. CONCLUSIONS: The method shows high sensitivity, good specificity, and can be used for the content determination of indigo in plasma samples of rats. The pharmacokinetics of indigo in rats *in vivo* fits non-compartment model.

KEYWORDS Indigo; LC-MS/MS; Rats; Plasma; Pharmacokinetics

青黛,别名靛花、蓝靛,主要含靛蓝、靛玉红、色胺酮和青黛酮等活性成分,具有清热解毒、消肝泻火、凉血止血、定惊之功效。近年来,青黛类中药被广泛用于内科、外科、儿科、妇科、传染科等病症的治疗,引起了国内外研究者的重视^[1]。靛蓝是青黛的主要成分之一,具有抗病毒作用^[2],对幽门螺旋杆菌的体外抗菌活性较好^[3-4],但其体内过程文献报道较少。目前对于靛蓝的分析方法主要有高效液相色谱(HPLC)法^[5]、气相色谱-质谱联用(GC-MS)法^[6]和液相色谱-质谱联用(LC-MS)法^[7],大多用于中药质量标准评价或体外试验测定,样品分析时间长、样品前处理方法复杂、定量下限高,均不太适合用于生物样本分析及体内过程评价。在本研究中,笔者拟以卡马西平为内标,建立以液相色谱-电喷雾串联质谱(LC-MS/MS)法^[8]测定大鼠血浆中靛蓝含量的分析方法,并将其用于靛蓝在大鼠体内的药动学研究。

1 材料

1.1 仪器

5500 Q TRAPTM质谱仪,配有电喷雾(ESI)离子源(美国AB Sciex公司);30A系列超HPLC仪(日本岛津公司);H1650-W高速台式离心机(湖南湘仪实验室开发有限公司,离心半径:20 cm)。

1.2 药品与试剂

靛蓝对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:110716-201111,纯度:≥98%);卡马西平对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100142-201004,纯度:≥99%);甲醇、乙酸铵为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为Milli-Q超纯水。

1.3 动物

SD大鼠,♂,体质量200~220 g,购自第三军医大学实验动物中心,动物合格证号为SCXK(军)2007-015、SCXK(渝)2007-0003。实验所使用大鼠的购买、实验处置都严格遵循《第三军医大学实验动物管理暂行规定》。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取靛蓝对照品适量(相当于靛蓝10.0 mg),置于10 mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释制成质量浓度为1.0 mg/mL的贮备液。精密量取上述贮备液10 μL,加入990 μL甲醇,涡旋混匀,得10 μg/mL的对照品溶液,-20℃下保存,备用。

2.1.2 内标溶液 精密称取卡马西平对照品10.11 mg(相当于卡马西平10.0 mg),置于10 mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释制成质量浓度为1.0 mg/mL的贮备液。精密量取上述贮备液10 μL,加入990 μL甲醇,涡旋混匀,制得10 μg/mL的内标溶液,-20℃下保存,备用。

2.2 色谱条件与质谱条件

色谱柱:Agilent Poroshell EC-C₁₈(150 mm×3.0 mm, 2.7 μm);流动相:甲醇-5 mmol/mL乙酸铵溶液(95:5, V/V, pH 6.8),流速:0.4 mL/min;柱温:25℃;进样量:2 μL。

靛蓝和卡马西平的离子化采用ESI离子源,正离子模式,以多反应监测(MRM)模式分析。离子源参数:气帘气为39 psi(1 psi=6 895 Pa),雾化气为88 psi,辅助加热气为89 psi,离子源温度为500℃,离子源电压为5 000 V。四级杆参数:靛蓝监测离子对(m/z)为263.1~218.8,去簇电压(DP)为60 eV,碰撞能量(CE)为33 eV,碰撞池出口电压(CXP)为3.3 eV;卡马西平监测离子对(m/z)为237.2~194.1,DP为100 eV,CE为26.3 eV,CXP为5.9 eV。

2.3 样品处理

将40 ng/mL内标甲醇溶液1 mL加入到0.1 mL样品中,涡旋混匀2 min,13 000 r/min离心5 min,取上清过0.22 μm微孔滤膜,滤液供LC-MS/MS上样分析。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 按相关专属性试验方法检测发现,在正离子模式下,靛蓝和内标产生了质子化的母离子[M+1]⁺。质谱图中可观察到,靛蓝主要的离子为 m/z 263.1,内标主要的离子为 m/z 237.2;靛蓝强度最高的子离子为 m/z 218.8,内标强度最高的子离子为 m/z 194.1。

在“2.2”项条件下,内源性杂质对待测物无干扰,靛蓝和内标峰形良好,保留时间分别为2.92、2.16 min。靛蓝和内标的质谱图见图1,LC-MS/MS图见图2。

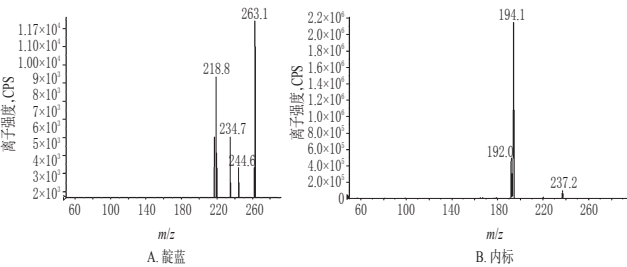


图1 靛蓝和内标的质谱图

Fig 1 Spectrometry of indigo and internal standard

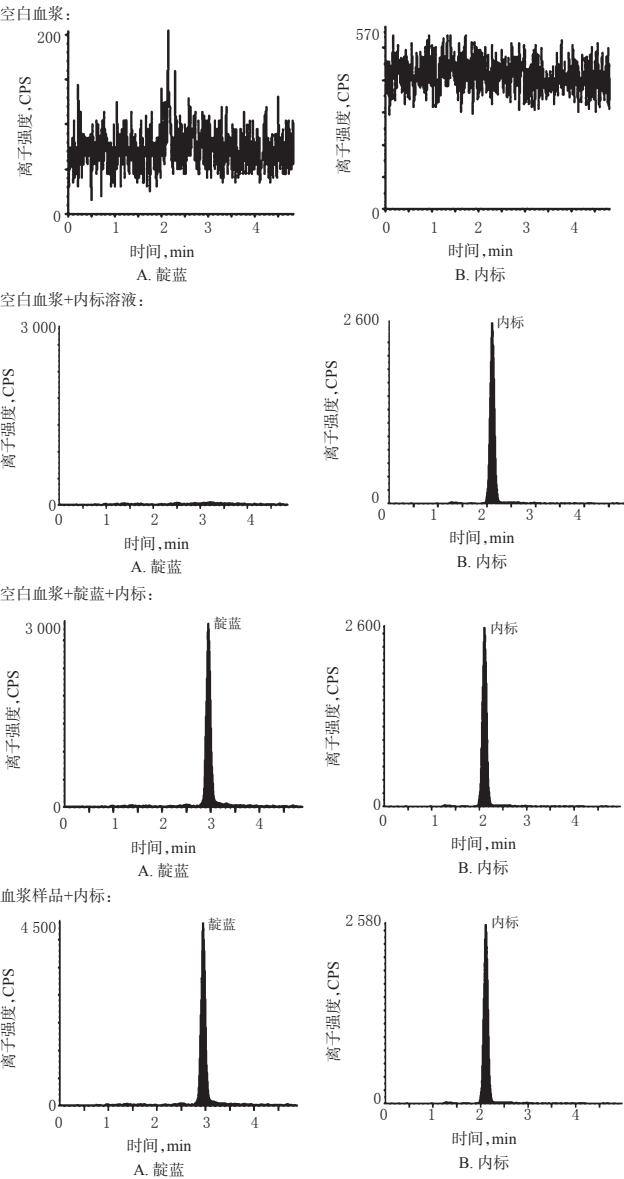


图2 液相色谱-串联质谱图

Fig 2 LC-MS/MS spectrometry

2.4.2 线性关系与定量下限考察 取大鼠空白血浆加入适量的靛蓝对照品溶液,分别制备成含靛蓝100、50、40、20、5、2、1、0.5 ng/mL的质控样品,按“2.3”项下方法

处理后,进样测定。以靛蓝的峰面积和内标峰面积的比值(y)与靛蓝的质量浓度(x)进行回归分析,得回归方程为 $y=0.049\ 3x+0.015\ 9(r=0.999\ 9)$ 。结果表明,靛蓝检测质量浓度的线性范围为0.5~100 ng/mL,定量下限为0.5 ng/mL。

2.4.3 基质效应考察 分别以甲醇沉淀后的大鼠空白血浆和去离子水为溶剂,制备靛蓝低、中、高质量浓度(1、10、80 ng/mL)的样品,每个质量浓度5份,按“2.3”项下方法处理后,进样测定。基质效应(%)=沉淀后空白血浆制备样品的峰面积/去离子水制备样品的峰面积×100%;内标归一化的基质效应(%)=靛蓝的基质效应/内标的基质效应×100%。基质效应考察结果见表1。

表1 基质效应考察结果($\bar{x}\pm s, n=5$)

Tab 1 Results of matrix effects($\bar{x}\pm s, n=5$)

待测物	加入量,ng/mL	基质效应,%	内标归一化的基质效应,%
靛蓝	1	98.25±3.71	94.83±8.27
	10	102.23±2.64	98.63±6.62
	80	102.29±3.79	98.72±6.12
内标	40	103.87±6.21	

2.4.4 精密度和准确度试验 制备低、中、高质量浓度(1、10、80 ng/mL)的质控样品,每个质量浓度5份,按“2.3”项下方法处理后,进样测定,连续测定3 d,考察日内、日间精密度和准确度。结果显示,低、中、高质量浓度质控样品的日内RSD分别为8.13%、1.93%、2.48%($n=5$),日间RSD分别为3.27%、4.36%、4.85%($n=3$),准确度分别为94.2%、103.2%、108.72%($n=5$)。

2.4.5 稳定性试验 制备低、中、高质量浓度(1、10、80 ng/mL)的质控样品,分别置于室温下4 h($n=5$)、自动进样器内24 h($n=5$)、-80℃下14 d($n=5$)、-80℃反复冻融3次($n=5$),再按“2.3”项下方法处理后进样测定,考察稳定性。结果显示,RSD均小于15%,表明靛蓝的血浆样品在上述条件下均稳定。

2.5 药动力学实验

将18只大鼠随机分为低、中、高剂量组,每组6只,分别ig 10、20、40 mg/kg的靛蓝溶液。分别于给药前和给药后0.083、0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、10、12、16、24、48、72 h眼眶采血0.3 mL并抗凝,常温下4 000 r/min(离心半径:20 cm)离心5 min分离血浆后,-80℃下冻存。采用LC-MS/MS法测定血浆中靛蓝的浓度,绘制药-时曲线。各组大鼠体内靛蓝的药-时曲线见图3。

采用DAS 3.0软件,按非房室模型测定靛蓝的主要药动力学参数。结果显示,靛蓝在大鼠体内9 h左右达到峰浓度, $t_{1/2}$ 约为15 h, c_{max} 、 $AUC_{0-72\ h}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 相对于给药剂量呈近似线性的变化。各组大鼠体内靛蓝的药动力学参数见表2。

3 讨论

3.1 色谱条件优化

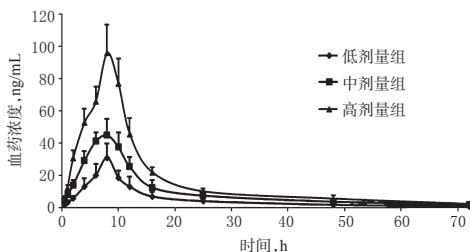


图3 各组大鼠体内靛蓝的药-时曲线($n=6$)

Fig 3 Concentration-time curves of indigo in rats *in vivo* in each group($n=6$)

表2 各组大鼠体内靛蓝的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Pharmacokinetic parameters of indigo in rats *in vivo* in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	低剂量组	中剂量组	高剂量组
$t_{\max}$, h	8.6 ± 1.1	9.2 ± 0.8	9.5 ± 0.8
$c_{\max}$, ng/mL	30.9 ± 8.6	44.9 ± 10.1	96.1 ± 17.4
$t_{1/2}$, h	14.9 ± 2.1	16.3 ± 2.9	15.3 ± 3.7
MRT, h	19.2 ± 5.9	20.9 ± 1.5	18.9 ± 2.2
CL, L/h·kg	10.3 ± 2.2	10.9 ± 1.4	12.7 ± 1.1
AUC _{0-72h} , ng·h/mL	366.6 ± 83.4	694.9 ± 105.8	$1\,223.4 \pm 108.7$
AUC _{0-∞} , ng·h/mL	398.7 ± 64.6	740.8 ± 96.3	$1\,263.2 \pm 108.9$

大鼠血浆中靛蓝测定方法建立过程中,提高检测的灵敏度是一个比较关键的问题。本实验参考文献[9-10]对方法建立过程的多个环节进行了优化,使得定量下限为0.5 ng/mL。

笔者比较了水、乙腈、甲醇、甲醇-乙腈(1:1, V/V)、甲醇-水(1:1, V/V)、乙腈-水(1:1, V/V)和甲醇-乙腈-水(1:1:1, $V/V/V$)、含0.1%甲酸的甲醇、含0.1%甲酸的乙腈、含0.1%甲酸的水、含0.1%甲酸的甲醇-乙腈(1:1, V/V)、含0.1%甲酸的甲醇-水(1:1, V/V)、含0.1%甲酸的乙腈-水(1:1, V/V)和含0.1%甲酸的甲醇-乙腈-水(1:1:1, $V/V/V$)对靛蓝对照品的溶解效果,发现甲醇的溶解效果最好,且超声(60 Hz, 40 ℃)就能产生助溶效果。

笔者比较了乙腈和甲醇对待测物和内标的洗脱效果,发现甲醇洗脱所得色谱峰更窄、峰形更好、灵敏度更高;比较了甲醇-水和甲醇-乙酸铵缓冲盐体系,发现若体系中没有乙酸铵,则有拖尾现象,而在流动相中添加5 mmol/L 乙酸铵后,对峰形有较大的改善。

笔者比较了等度洗脱[甲醇-5 mmol/L 乙酸铵溶液(体积比依次为80:20、85:15、90:10、95:5)和甲醇]和梯度洗脱的效果,发现甲醇-5 mmol/L 乙酸铵溶液(95:5, V/V)洗脱时灵敏度最高,且出峰时间最短。

3.2 给药剂量的设定

在前期的预实验中,笔者进行了给药剂量的摸索,分别给予5、10、20、40、80 mg/kg,每个剂量组2只大鼠。结果发现5 mg/kg 给药剂量所测得的药-时曲线上的点有1/3在本方法的定量下限以下,而80 mg/kg 给药剂量所得的药-时曲线在 $t_{\max}$ 附近的点有超限的现象,在10~

40 mg/kg 的给药剂量范围内所测定的血药浓度都在工作曲线的线性范围内,故本实验采用10、20、40 mg/kg 为给药剂量。

3.3 取血时间点的设定

在前期的预实验中,笔者通过每组2只大鼠所测定的血药浓度,采用DAS 3.0软件处理后获得的 $t_{\max}$ 在8.5 h左右。根据采样时间点的设计原则,即兼顾药物的吸收相(吸收相至少需要2~3个采样点)、平衡相(在 $c_{\max}$ 附近至少需要3个采样点)和消除相(需要4~6个采样点),整个采样时间至少应持续到3~5个半衰期,据此笔者设定了本研究的采血时间点。

参考文献

- [1] Stasiak N, Kukula-Koch W, Glowinski K. Modern industrial and pharmacological applications of indigo dye and its derivatives: a review[J]. *Acta Pol Pharm*, 2014, 71(2): 215-221.
- [2] 奇锦峰,孙晨,王永辉,等.板蓝根及所含靛蓝和靛玉红强烈抑制小鼠肾主要有机阴离子转运体Oat1, Oat2和Oat3[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2014, 28(6): 878-886.
- [3] 杜平华,朱世真,吕品. 20种中药材对幽门螺杆菌体外抗菌活性的研究[J]. *中药材*, 2001, 24(03): 188-189.
- [4] Chiang YR, Li A, Leu YL, *et al.* An *in vitro* study of the antimicrobial effects of indigo naturalis prepared from *Strobilanthes formosanus* Moore[J]. *Molecules*, 2013, 18(11): 14381-14396.
- [5] 胡艳红,李志浩. HPLC测定小儿清咽颗粒中靛蓝和靛玉红的含量[J]. *现代仪器与医疗*, 2013, 19(4): 58-61.
- [6] Degani L, Riedo C, Chiantore O. Identification of natural indigo in historical textiles by GC-MS[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(6): 1695-1704.
- [7] Tsuji S, Nakano M, Furukawa M, *et al.* Identification and determination of the isomer and subsidiary color in food blue no.2 (indigo carmine) by LC/MS and HPLC[J]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 2005, 46(3): 116-120.
- [8] 梅升辉,罗旭颖,李倩,等. LC-MS/MS法测定人血浆中替加环素的浓度及其临床应用[J]. *中国药房*, 2016, 27(5): 612-615.
- [9] Pauk V, Havlicek V, Papoušková B, *et al.* Simultaneous identification of historical pigments Prussian blue and indigo in paintings by electrospray mass spectrometry[J]. *J Mass Spectrom*, 2013, 48(8): 927-930.
- [10] Lu HT, Liu J, Deng R, *et al.* Preparative isolation and purification of indigo and indirubin from *Folium isatidis* by high-speed counter-current chromatography[J]. *Phytochem Anal*, 2012, 23(6): 637-641.

(收稿日期:2016-07-25 修回日期:2016-12-19)

(编辑:邹丽娟)