

UPLC-MS/MS法同时测定人血浆中阿魏酸和芍药苷的含量

冯雪科^{1*},徐振文²,温中明³(1.深圳市宝安区福永人民医院,广东深圳 518000;2.深圳市龙华新区龙华人民医院,广东深圳 518109;3.深圳市光明新区人民医院,广东深圳 518000)

中图分类号 R917;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)03-0218-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.03.09

摘要 目的:建立一种同时测定人体血浆中阿魏酸和芍药苷的方法。方法:采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)检测技术,分别以羟甲香豆素和栀子苷为内标,采用正离子方式检测,多反应监测模式扫描,检测离子通道为阿魏酸 m/z 195.1→151.2和羟甲香豆素 m/z 177.1→161.2、芍药苷 m/z 503.1→219.2和栀子苷 m/z 411.1→216.1。色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈(150 mm×2.1 mm,1.7 μm),流动相为0.5%冰醋酸-乙腈(82:18, V/V),流速为0.3 ml/min,柱温为40℃。结果:两种成分均在3 min内完成检测。阿魏酸、芍药苷的质量浓度分别在4.5~250.0、37.5~2 000.0 ng/ml范围内与指标成分和内标峰面积比呈良好线性关系,定量限分别为4.5、37.5 ng/ml;高、中、低质量浓度阿魏酸平均加样回收率分别为(91.2±5.7)%、(93.8±7.6)%、(92.7±7.5)%,芍药苷平均加样回收率分别为(90.5±7.6)%、(90.2±4.4)%、(91.7±4.2)%;精密度RSD在5.3%~9.4%范围内;稳定性RSD<±10%。结论:所建方法分析时间短、专属性好、准确度高,适用于同时测定人血浆中阿魏酸和芍药苷的含量。

关键词 当归芍药散;阿魏酸;芍药苷;超高效液相色谱-串联质谱法;血药浓度

Simultaneous Determination of Ferulic Acid and Paeoniflorin in Human Plasma by UPLC-MS/MS

FENG Xue-ke¹, XU Zhen-wen², WEN Zhong-ming³(1.Shenzhen Baoan District Fuyong People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518000, China; 2.Shenzhen Longhua New District Longhua People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518109, China; 3.Shenzhen Guangming New District People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of ferulic acid and paeoniflorin in human plasma. METHODS: Using hymecromone and geniposide as internal standard, UPLC-MS/MS method was adopted. The scanning was operated in positive ion mode under MRM mode. The detection ion channels were as follows: m/z 195.1→151.2 for ferulic acid and m/z 177.1→161.2 for hymecromone, m/z 503.1→219.2 for paeoniflorin and m/z 411.1→216.1 for geniposide. The separation was performed on Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) column with mobile phase consisted of 0.5% glacial acetic acid-acetonitrile (82:18, V/V) at the flow rate of 0.3 ml/min. The column temperature was set at 40 °C. RESULTS: 2 components were determined within 3 min. The linear range were 4.5-250.0 ng/ml for ferulic acid and 37.5-2 000.0 ng/ml for paeoniflorin. The limits of quantification were 4.5 ng/ml and 37.5 ng/ml. The average recoveries of ferulic acid were (91.2% ± 5.7%), (93.8% ± 7.6%), (92.7% ± 7.5%) at high, medium and low concentrations; those of paeoniflorin were (90.5 ± 7.6)%, (90.2 ± 4.4)% and (91.7 ± 4.2)% at high, medium and low concentrations. RSD of precision were 5.3%-9.4% and that of stability was lower than ± 10%. CONCLUSIONS: The analysis time of the method is short and the method has high specificity and accuracy. It can be used for simultaneous determination of ferulic acid and paeoniflorin in human plasma.

KEYWORDS Danggui shaoyao powder; Ferulic acid; Paeoniflorin; UPLC-MS/MS; Plasma concentration

当归芍药散(Dangguisaoyao San, DSS)出自张仲景的《金匱要略》,由当归、白芍、茯苓、白术、川芎、泽泻6味中药组成,具有养血调肝、健脾利湿、养血益脾等功效,是治疗妊娠腹痛及妇人杂病的良方。多年来,当归芍药散不仅在妇科,而且在中医临床各科均得到广泛应用。现代药理研究表明,当归芍药散对胆碱能神经有激活作用^[1],对神经细胞凋亡有抑制作用^[2],对记忆损伤及学习记忆能力有改善作用^[3-4],并可预防老年痴呆^[5-6]。另外,当归芍药散对生殖系统、血液流变学、免疫系统和心血管系统均有不同程度的保护作用^[7-11]。

本研究旨在建立同时检测人体内当归芍药散中两个标志性成分阿魏酸和芍药苷的超高效液相色谱-串联质谱

(UPLC-MS/MS)法^[12-14],以期为体内当归芍药散含药血清的定量检测与药动学研究做准备。

1 材料

1.1 仪器

Quattro Premier液质联用仪,配有电喷雾电离(ESI)离子源(美国Waters公司);ACQUITY超高压液相色谱仪,包括四元泵、二极管阵列检测器(DAD)、自动进样器、Masslynx 4.02工作站(美国Waters公司);Milli-Q纯水机(美国Millipore公司)。

1.2 药材

当归、芍药、茯苓、白术、泽泻、川芎均购自深圳市宝安区福永人民医院中药房,由笔者鉴定为真品。

1.3 试剂

阿魏酸(批号:110773-201012)、羟甲香豆素(内标,批号

*主管中药师。研究方向:临床药学。E-mail:feng2013703@163.com

100241-200503)、芍药苷(批号:110736-201136)、栀子苷(内标,批号110749-201115)对照品均购自中国食品药品检定研究院(结构与离子扫描MS见图1);甲醇、乙腈(色谱纯,德国Merck公司);水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

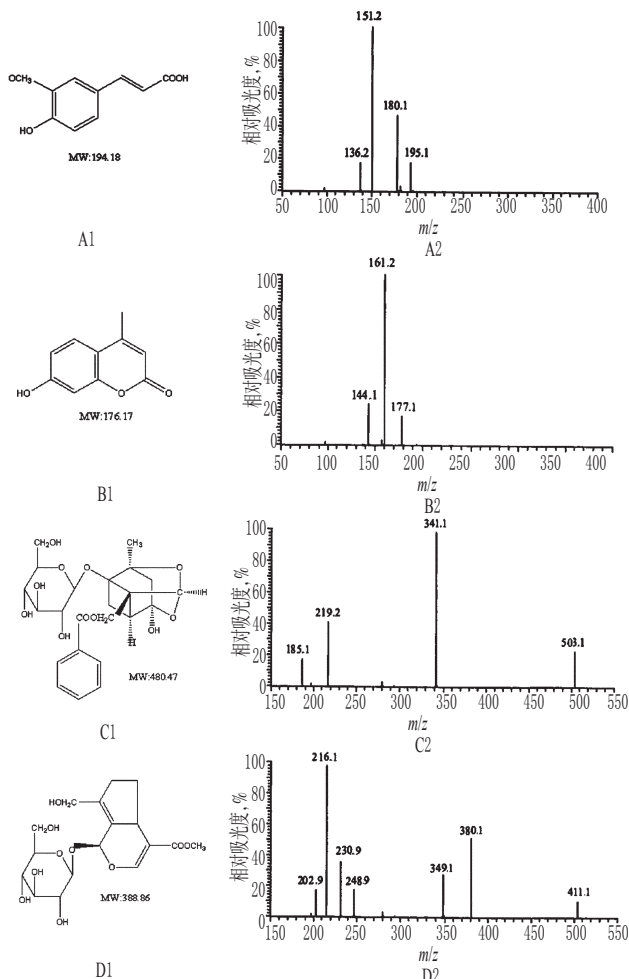


图1 对照品结构与产物离子扫描MS图

A1.阿魏酸结构;A2.阿魏酸离子扫描MS;B1.羟甲香豆素结构;B2.羟甲香豆素离子扫描MS;C1.芍药苷结构;C2.芍药苷离子扫描MS;D1.栀子苷结构;D2.栀子苷离子扫描MS

Fig 1 The structure and product ion scan spectra of reference substance

A1. ferulic acid structure; A2. ferulic acid MS; B1. hymecromone structure; B2. hymecromone MS; C1. paeoniflorin structure; C2. paeoniflorin MS; D1. geniposide structure; D2. geniposide MS

1.4 患者资料

收集深圳市宝安区福永人民医院中医门诊和病房2010年7月—2011年12月应用当归芍药散的成年患者25例血样标本,同时记录每位患者当次就诊时的各项生理指标及具体用药信息。所收集患者均无实质性严重疾病;肝功能正常;服用当归芍药散1周以上,达到稳态血药浓度。血药浓度为临床常规监测的结果,不给患者增加额外痛苦与负担,并全部获得了患者的知情同意。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (150 mm×2.1

mm, 1.7 μm); 流动相: 水(含0.5%冰醋酸)-乙腈(82:18, V/V); 流速: 0.3 ml/min, 柱温: 40 °C, 进样量: 10 μl; 全波长扫描。

2.2 MS条件

离子源: ESI, 正离子模式监测; 扫描方式: 多反应监测(MRM); 毛细管电压: 3.50 kV; 锥孔电压: 70.00 V, 其他二级锥孔电压: 3.00V; 六级杆透镜电压: 0.30 V; 离子源温度: 100 °C; 脱溶剂气温度: 350 °C; 锥孔气流量: 50 L/h; 脱溶剂气流量: 450 L/h; 选择质核比范围: 100~1 500 m/z; 检测通道: 阿魏酸 m/z 195.1→151.2和羟甲香豆素(内标) m/z 177.1→161.2, 芍药苷 m/z 509.1→219.2和栀子苷 m/z 411.1→216.1(内标)。数据由Masslynx 4.02软件获得和处理。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取阿魏酸、芍药苷对照品各1.0 mg, 用甲醇溶解并定容至100 ml量瓶中, 即为贮备母液(质量浓度为10.0 μg/ml), 4 °C贮藏, 备用。取阿魏酸贮备母液用甲醇依次稀释成质量浓度为250、100、50、20、12.5、4.5 ng/ml的阿魏酸对照品系列溶液, 4 °C贮藏, 备用; 取芍药苷贮备母液用甲醇依次稀释成质量浓度为2 000、1 250、500、250、100、37.5 ng/ml的芍药苷对照品系列溶液, 4 °C贮藏, 备用。

2.3.2 内标溶液的制备 精密称取羟甲香豆素苷、栀子苷对照品各1.0 mg, 用甲醇溶解并定容至100 ml量瓶中, 即为贮备母液(质量浓度为10.0 μg/ml), 4 °C贮藏, 备用。取羟甲香豆素、栀子苷贮备母液用甲醇分别稀释成质量浓度为400、200 ng/ml的内标溶液, 4 °C贮藏, 备用。

2.3.3 质控样品的制备 分别取不同质量浓度的对照品系列溶液250 μl与内标溶液100 μl, 置于500 μl空白血浆中, 得高、中、低质量浓度的质控样品, 即阿魏酸(100、50、12.5 ng/ml)、芍药苷(1 250、500、100 ng/ml), -20 °C贮藏, 备用。

2.4 血浆样品的处理

患者以处方量(当归9 g、芍药18 g、茯苓12 g、白术12 g、泽泻12 g、川芎9 g, 适当粉碎后制备)服用, 每次6 g, 每天3次, 温酒送服。服完2 h后抽取静脉血5 ml, 用微量加样器精密吸取250 μl置离心超滤管中, 以离心半径为13.5 cm、12 000 r/min离心10 min。滤液加内标溶液100 μl, 涡旋5 min, 置另一离心管中, 37 °C水浴氮气吹干, 残留物加水150 μl复溶, 以离心半径为13.5 cm、12 000 r/min离心10 min, 取上清液10 μl进样。患者首次服药前抽取静脉血10 ml作为空白。

2.5 方法学考察

2.5.1 方法专属性 分别取0.2 ml空白血浆、0.2 ml空白血浆+对照品+内标、0.2 ml患者服药后血浆样品, 按“2.4”项下方法处理, 再按“2.1”“2.2”项下色谱、MS条件进样测定。结果显示, 在MRM模式下, 阿魏酸和芍药苷及对应的内标都能够很好地分离, 峰形良好, 无杂质峰干扰。栀子苷、芍药苷、羟甲香豆素、阿魏酸的保留时间分别为1.1、1.3、2.1、2.9 min。色谱见图2。

2.5.2 标准曲线的制备 按“2.3”项下方法制备对照品系列液, 按“2.4”项下方法处理, 再按“2.1”“2.2”项下色谱、MS条件进样测定。以各对应指标成分的质量浓度(x)为横坐标, 指标成分和内标峰面积比(y)为纵坐标, 进行线性回归, 分别得阿魏酸、芍药苷的回归方程为 $y=0.038\ 794\ 5x-0.132\ 247\ 1$ ($r=0.999\ 5$)、 $y=0.046\ 173\ 3x+0.012\ 114\ 3$ ($r=0.999\ 5$)。结果表明, 阿魏酸、芍药苷的质量浓度分别在4.5~250.0、37.5~2 000.0

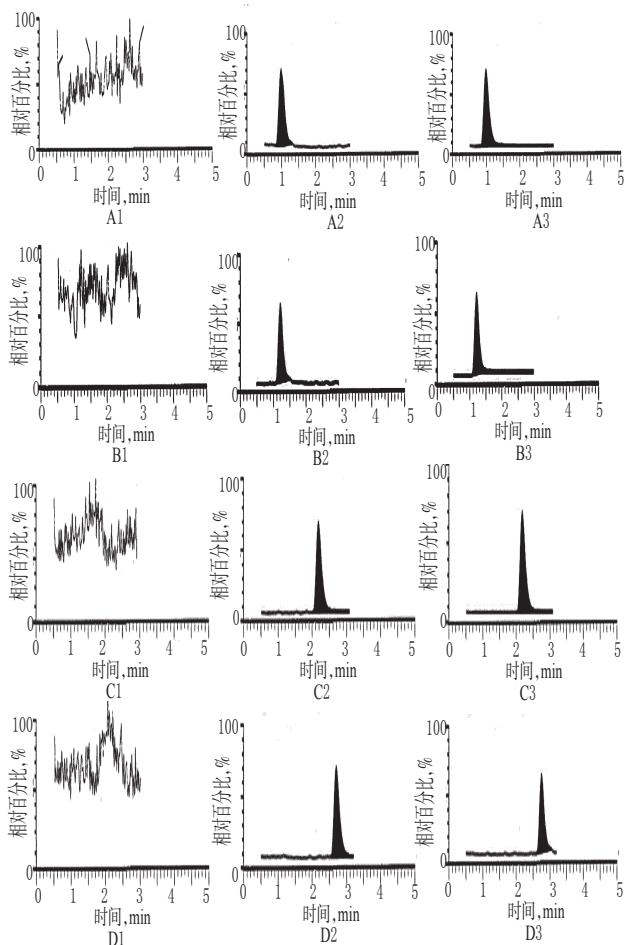


图2 MRM模式下的典型色谱图

A1.空白对照;A2.空白对照+梔子苷对照品+内标;A3.血浆样品;B1.空白对照;B2.空白对照+芍药苷对照品+内标;B3.血浆样品;C1.空白对照;C2.空白对照+羟甲香豆素对照品+内标;C3.血浆样品;D1.空白对照;D2.空白对照+阿魏酸对照品+内标;D3.血浆样品

Fig 2 Typical chromatograms in MRM mode

A1.blank control; A2.blank control+geniposide control+internal standard; A3.plasma sample; B1. blank control; B2.blank control+paconiflorin control+internal standard; B3. plasma sample; C1. blank control; C2. blank control+hymecromone control+internal standard; C3. plasma sample; D1.blank control; D2.blank control+ferulic acid control+internal standard; D3. plasma sample

ng/ml范围内与指标成分和内标峰面积比呈良好线性关系。阿魏酸、芍药苷的定量限分别为4.5、37.5 ng/ml。

2.5.3 精密度试验 按“2.3”项下方法制备高、中、低质量浓度的标准质控样品各5份,按“2.4”项下方法处理,再按“2.1”“2.2”项下色谱、MS条件测定日内精密度(6次)、日间精密度(5 d)。结果显示,高、中、低质量浓度的标准质控样品RSD为5.3%~9.4%,表明该试验方法符合目前生物样品分析方法指导原则中的有关规定^[15]。

2.5.4 回收率试验 按“2.3”项下方法制备高、中、低质量浓度的标准质控样品各5份,按“2.4”项下方法处理,再按“2.1”“2.2”项下色谱、MS条件测定,测得峰面积后与相同质量浓度对照品溶液直接进样所得峰面积进行比较,计算加样回收率。结果显示,高、中、低质量浓度阿魏酸平均加样回收率分别为(91.2±5.7)%、(93.8±7.6)%、(92.7±7.5)%;高、中、低

质量浓度芍药苷平均加样回收率分别为(90.5±7.6)%、(90.2±4.4)%、(91.7±4.2)% ,表明高、中、低质控样品有着一致的回收率。

2.5.5 稳定性试验 取“2.3”项下高、中、低质量浓度的标准质控样品各5份,置于室温保存(25℃)8 h后测定,考察血浆样品的短期稳定性;取“2.3”项下高、中、低质量浓度的标准质控样品各5份,冷冻贮藏于-20℃,两周后测定,考察血浆样品的长期稳定性;取“2.3”项下高、中、低质量浓度的标准质控样品各5份,冷冻贮藏于-20℃,在室温中充分解冻,然后再次冷冻,每次间隔24 h,重复两个冻融周期后测定,考察血浆样品的2周期冻融稳定性。结果显示,被测物在上述贮藏条件下测得的实际值均在理论值的±10%范围内波动,表明各种成分在血浆样品中稳定性良好。

2.5.6 基质效应 取500 μl空白血浆,经液-液萃取处理后,加入100 μl内标溶液和不同质量浓度的对照品溶液,制得高、中、低质量浓度的血浆样品(质量浓度与“2.3.3”项下相同);另取流动相100 μl代替空白血浆,按“2.3”项下方法处理,再按“2.1”、“2.2”项下色谱、MS条件测定,测得的峰面积相比即可评价基质效应。结果显示,高、中、低质量浓度阿魏酸的RSD分别为11.2%、13.1%、9.8%;高、中、低质量浓度芍药苷的RSD分别为5.2%、12.5%、17.1%。

3 讨论

有文献报道,采用高效液相色谱(HPLC)法同时检测当归芍药散中的阿魏酸和芍药苷,其检测时间长达40 min,而且容易受其他成分峰的影响^[12]。笔者采用UPLC分离技术,在3 min内完成阿魏酸和芍药苷的定量分析,同时采用MS/MS的MRM模式,屏蔽了其他成分的影响,并采用内标法定量,极大地提高了方法的准确性。

由于芍药苷和内标梔子苷在正离子模式下有失去完整葡萄糖和葡萄糖残基两种裂解途径,而在负离子模式下只能失去葡萄糖残基,且在正离子模式下的碎片离子较为丰富^[14],因此笔者采用正离子模式下分析。同时,因为阿魏酸和芍药苷的结构和分子质量差异很大,为更好地校正高灵敏的MS的系统误差,笔者采用与阿魏酸和芍药苷结构对应的羟甲香豆素和梔子苷双内标来校正。

本试验经过方法学验证,精密性、基质效应、稳定性、重复性的RSD<20%,符合体内药物分析的要求;回收率在90%以上,说明方法系统误差小,所得数值准确,可用于人体内当归芍药散中阿魏酸和芍药苷的含量测定。

参考文献

- [1] Hiramatsu M, Komatsu M, Yuzurihara T, et al. Enhanced cholinergic function in aged rats treated with TJ-23 [J]. *J Anti Aging Med*, 1999, 2(1): 51.
- [2] 胡增晓,杨胜,周文霞,等.当归芍药散活性部位JD-30对快速老化模型小鼠学习记忆功能的影响及其机理的初步研究[J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(Suppl): 13.
- [3] 寇俊萍,金卫峰,华敏,等.当归芍药散对多种记忆损伤动物模型的影响[J]. *中成药*, 2002, 24(3): 191.
- [4] 马世平,詹莹,瞿融.当归芍药散的抗氧化作用研究[J]. *中药药理与临床*, 2001, 17(3): 1.
- [5] 刘孟渊,王达平,刘玉平,等.加味当归芍药散治疗老年性痴呆的疗效观察[J]. *广州中医药大学学报*, 2001, 18(1): 30.
- [6] 高德义,黄贾生,何宏文,等.当归芍药散治疗老年性痴呆

鸡血藤醇提物对血虚模型小鼠的补血作用

张浩^{1*}, 申玉清^{2#}(1.解放军第324医院药剂科, 重庆 400020; 2.重庆市大渡口区人民医院, 重庆 400084)

中图分类号 R285;R852 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)03-0221-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.03.10

摘要 目的:研究鸡血藤醇提物对血虚模型小鼠的补血作用。方法:通过放血以复制小鼠失血性血虚模型;通过腹腔注射环磷酰胺(25 mg/kg)以复制小鼠化学性血虚模型;通过皮下注射乙酰苯肼(20 mg/kg)同时控制饮食以复制小鼠综合血虚模型。60只KM种小鼠随机分为正常对照(等体积生理盐水)组、模型(等体积生理盐水)组、乌鸡白凤丸(4 g/kg)组与鸡血藤醇提物高、中、低剂量(30、15、7.5 g/kg)组。制备模型的同时灌胃给药,每天1次,连续10 d。测定小鼠红细胞计数(RBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞压积(HCT)、血小板计数(PLT)。结果:与正常对照组比较,模型组小鼠RBC、HGB、HCT、PLT降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,鸡血藤醇提物高、中、低剂量组小鼠RBC、HGB升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);鸡血藤醇提物高、中剂量组小鼠HCT、PLT升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论:鸡血藤醇提物对血虚模型小鼠有良好的补血作用,其机制可能与调节血液系统有关。

关键词 鸡血藤;醇提物;血虚;小鼠

Effects of Ethanol Extract of *Spatholobus suberectus* on Blood Deficiency Model Mice

ZHANG Hao¹, SHEN Yu-qing²(1.Dept. of Pharmacy, No. 324 Hospital of PLA, Chongqing 400020, China; 2. Chongqing Municipality Dadukou District People's Hospital, Chongqing 400084, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of ethanol extract of *Spatholobus suberectus* on blood deficiency model mice. METHODS: Hemorrhagic blood deficiency model was induced by bloodletting; the chemical deficiency model was induced by intraperitoneal injection of cyclophosphamide (25 mg/kg); comprehensive blood deficiency model was induced by subcutaneous injection of acetylphenylhydrazine (20 mg/kg) and controlling diet. 60 KM mice were randomized into normal control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), Wuji baifeng pills group (4 g/kg) and ethanol extract of *S. suberectus* high-dose, medium-dose and low-dose groups (30, 15, 7.5 g/kg). Blood deficiency model was induced and given relevant medicines intragastrically once a day for consecutive 10 days. RBC, HGB, HCT and PLT were determined. RESULTS: Compared with normal control group, the levels of RBC, HGB, HCT and PLT were decreased significantly in model group ($P < 0.01$); compared with model group, RBC and HGB in ethanol extract of *S. suberectus* high-dose, medium-dose and low-dose groups were increased significantly ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). HCT and PLT in ethanol extract of *S. suberectus* high-dose and medium-dose groups were increased significantly ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). CONCLUSIONS: The ethanol extract of *S. suberectus* has good effects on blood deficiency model mice, and the mechanism may be related to the regulation of blood system.

KEY WORDS *Spatholobus suberectus*; Ethanol extract; Blood deficiency; Mice

- 36例临床研究[J].中国全科医学,2004,7(11):782.
- [7] 胡兵,董晓蕾,陈林因,等.当归芍药散拮抗雷公藤对雌鼠生殖系统影响的实验研究[J].时珍国医国药,2000,11(9):775.
- [8] 阎艳丽,王鑫国,宋晓宇,等.当归芍药散对高脂血症家兔脂代谢及血液流变学的影响[J].辽宁中医杂志,2005,32(2):170.
- [9] 寇俊萍,华敏,严永清.当归芍药散对小鼠免疫功能的影响[J].中国现代应用药学,2003,20(3):171.
- [10] 阎艳丽,于永军,宋晓宇,等.当归芍药散及煎剂对异丙肾上腺素所致大鼠心肌缺血的影响[J].辽宁中医杂志,2006,33(9):1203.
- [11] 王庆文,徐振文,陈桂红.当归芍药散含药血清对大鼠心肌细胞损伤的保护作用研究[J].中国药房,2013,24(31):2893.
- [12] 曾宇,杜迎翔,马世平.反相高效液相色谱法测定当归芍药散中阿魏酸和芍药苷的含量[J].中国药科大学学报,2004,35(4):341.
- [13] 尚玮玮,郭继芬,乔善义.HPLC/DAD-MS法分析当归芍药散中的主要成分[J].分析测试学报,2005,24(9):59.
- [14] 杨楠,乔善义,孟繁华.采用HPLC-MS/MS技术确定当归芍药散中2个新化合物来源[J].质谱学报,2010,3(3):152.
- [15] 钟大放,李高,刘昌孝.生物样品定量分析方法指导原则(草案)[J].药物评价研究,2011,34(6):409.

(收稿日期:2013-07-16 修回日期:2013-10-21)

* 主管药师。研究方向:临床药学。电话:023-68762088。
E-mail:1525914255@qq.com

通信作者:副主任药师。研究方向:临床药学。电话:
023-68680389。E-mail:haomo67@163.com