

不同给药途径灯盏乙素及其代谢物在大鼠体内处置差异研究

张媛^{1,2}, 于松达², 钟大放², 徐海燕^{1*}, 陈笑艳^{2*}

(1. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘要: 建立液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 法同时测定大鼠血浆和组织中灯盏乙素及其代谢物异灯盏乙素浓度, 比较不同给药途径下灯盏乙素和代谢物在大鼠体内处置的差异。大鼠分别经静脉 ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和灌胃 ($80 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 给予灯盏花素, 于给药前和给药后不同时间点取血和主要组织。匀浆处理后, 以 LC-MS/MS 法测定灯盏乙素与异灯盏乙素浓度。测定血浆中灯盏乙素/异灯盏乙素线性范围为 $10.0/5.00\sim 5000/2500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、各组织中灯盏乙素/异灯盏乙素线性范围为 $30.0/15.0\sim 10000/5000 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。所建方法的精密度与准确度、选择性、交叉干扰、基质效应等均符合生物样品的分析要求。静脉给药后, 灯盏乙素主要分布于小肠、膀胱和肾脏组织, 异灯盏乙素的血浆和组织暴露量不足灯盏乙素暴露量的 5%。灌胃给药后, 灯盏乙素在大部分组织中暴露量高于血浆暴露量, 主要分布于消化道、膀胱、肾上腺和肺组织, 异灯盏乙素血浆暴露量高于灯盏乙素, 但其组织暴露量明显低于灯盏乙素。建立的 LC-MS/MS 法适用于大鼠血浆和各组织中的灯盏乙素/异灯盏乙素浓度测定。两种给药方式下, 灯盏乙素和异灯盏乙素在大鼠体内分布存在明显差异, 灯盏乙素灌胃给药组的组织/血浆暴露比高于静脉给药组, 异灯盏乙素组织分布程度低于灯盏乙素。两种给药方式下在脑组织中均可检测到灯盏乙素, 但未检测到异灯盏乙素, 推测是因为脑组织 OATP 转运体对灯盏乙素的亲和力远高于异灯盏乙素。

关键词: 灯盏乙素; 异灯盏乙素; 液相色谱-串联质谱; 大鼠; 组织分布

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 08-1357-07

Comparative study of disposition of scutellarin and its major metabolite with different administration routes in rats

ZHANG Yuan^{1,2}, YU Song-da², ZHONG Da-fang², XU Hai-yan^{1*}, CHEN Xiao-yan^{2*}

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: The study was designed to establish an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of scutellarin and its major metabolite isoscutellarin in rat tissues and plasma, and to investigate the effect of different route of administration on the tissue distribution of scutellarin and its metabolite in rats. Rats were treated both intravenously and intragastrically with 20 and 80 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ scutellarin, respectively. Blood and tissues were collected at predetermined intervals. The concentrations of scutellarin and isoscutellarin were determined by a validated LC-MS/MS method. The method was linear in concentration ranges of $10.0/5.00\sim 5000/2500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ for scutellarin/isoscutellarin in the rat plasma and $30.0/15.0\sim 10000/5000 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ in tissues with acceptable accuracy and precision. Data obtained after an intravenous administration of scutellarin to rats showed that the drug was distributed predominantly into the small intestine, bladder and kidney. The exposures of the metabolite isoscutellarin in plasma and tissue were both less than 5% of the parent drug. After an

收稿日期: 2018-03-19; 修回日期: 2018-05-04.

*通讯作者 Tel: 86-24-23986985, E-mail: xhy411@163.com;

Tel: 86-21-50800738, E-mail: xychen@simm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0236

intra-gastric administration, stomach wall and small intestine were the preferred sites for scutellarin disposition, followed by bladder, adrenal gland and lung at concentrations significantly higher than its plasma concentration. The plasma exposure of isoscutellarin was higher than that of the parent drug, but its tissue exposure was significantly lower than that of scutellarin. The method established in this study was successfully applied to characterization of the tissue profiles of scutellarin and its metabolite in rats. The route of administration has a marked impact on the disposition of scutellarin and its metabolite in rats. Ratios of the tissue to plasma concentrations after intra-gastric administration were obviously higher than those after intravenous administration. Scutellarin could pass the blood-brain barrier in a marked extent, but isoscutellarin was not detected in the rat brain, which may be attributed to the fact that scutellarin is a higher-affinity substrate for OATP than isoscutellarin.

Key words: scutellarin; isoscutellarin; LC-MS/MS; rat; tissue distribution

灯盏花素是从灯盏花中提取的黄酮类有效成分,其中 90% 以上成分为灯盏乙素 (scutellarin, 结构如图 1 所示)。药理学研究揭示,灯盏乙素能够显著降低血液黏度和血脂水平,改善脑血流量,降低血管阻力和抗血小板凝集及抗血栓形成^[1-5]。临床上主要以口服和注射两种形式用药。

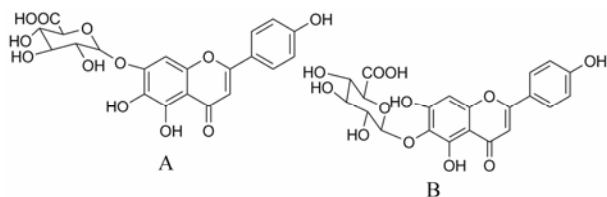


Figure 1 Chemical structures of scutellarin (A) and isoscutellarin (B)

文献^[6]报道,受试者口服灯盏花素 60 mg,灯盏乙素血浆浓度不足 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,血浆中主要成分是其代谢产物异灯盏乙素 (isoscutellarin, 结构如图 1 所示)。大鼠药动力学研究结果也显示灯盏乙素的口服生物利用度很低,灌胃给药后异灯盏乙素也是大鼠血浆中的主要代谢产物^[7]。进一步体外代谢机制研究表明^[8-11],灯盏乙素在肠道菌群作用下可水解成苷元,进一步代谢生成灯盏乙素和异灯盏乙素,虽然灯盏乙素在肠壁代谢生成速率远高于异灯盏乙素,但其与肝脏摄取转运体 OATP2B1 的亲合力大于异灯盏乙素,更容易进入肝细胞发生进一步代谢和胆汁排泄,从而引起更强的肝脏首过清除效应,导致灯盏乙素和异灯盏乙素的药动力学差异,但两者在组织分布是否有差异未见报道。而了解组织分布特征,有利于研究灯盏乙素的药效机制、明确其毒性靶器官。

本研究旨在建立一种简单、快速能同时测定大鼠血浆和各组织中灯盏乙素和异灯盏乙素的 LC-MS/MS 定量方法,探索静脉和灌胃给予灯盏花素后,灯盏乙

素和异灯盏乙素在大鼠体内组织分布的差异,为不同给药途径药效学 and 安全性评价提供参考。

材料与方法

药品和试剂 注射用灯盏花素 (批号 20170407-1, 其中灯盏乙素纯度为 99.0%)、灯盏乙素对照品 (批号 110842-201508, 纯度 99.31%)、异灯盏乙素对照品 (批号 20170626, 纯度 98.98%) 均由昆明龙津药业股份有限公司提供,黄芩苷对照品 (批号 B0321AS, 含量 99.34%) 购于大连美仑生物技术有限公司,甲酸 (德国 Fluka 公司)、甲醇和乙腈 (德国 Merck 公司) 均为色谱纯,磷酸 (国药集团化学试剂有限公司)、二甲亚砜 (国药集团化学试剂有限公司) 均为分析纯,去离子水由法国 Millipore 超纯水仪制备。

仪器 Triple quad 5500 型三重四极杆串联质谱仪,配备电喷雾电离源 (ESI 源),加拿大 AB Sciex 公司; Analyst 1.6.3 定量处理软件,加拿大 AB Sciex 公司;液相色谱系统,包括 LC-30AD 型输液泵, SIL-30AC 型自动进样器和 CTO-20A 型柱温箱,日本岛津公司; Precellys 24 多功能样品均质器,法国 Bertin 公司。

色谱条件 色谱柱为 Agilent Eclipse plus C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 3.5 μm, 美国 Agilent 公司);流动相: A 相 (含有 0.1% 甲酸的水溶液), B 相 (甲醇);采用梯度洗脱程序,如下: 0~0.5 min, 40% B; 0.5~1.5 min, 40%~65% B; 1.5~1.8 min, 65%~95% B; 1.8~2.2 min, 95% B; 2.2~2.3 min, 95%~40%; 2.3~3.0 min, 40% B。流速为 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温为 40 °C,进样量为 8.0 μL。

质谱条件 离子源为电喷雾电离源 (ESI 源);正离子方式检测;源喷射电压: 5500 V;温度为 550 °C;离子源气体 1 (N₂) 压力为 50 psi (1 psi ≈ 6.9 kPa);离子源气体 2 (N₂) 压力为 60 psi;气帘气体 (N₂) 压

力为 30 psi; 扫描方式为多反应监测 (MRM), 碰撞气压力为 9 psi; 扫描时间为 45 ms。检测离子对: m/z 463→123 (灯盏乙素), m/z 463→123 (异灯盏乙素) 和 m/z 447→123 (黄芩苷, 内标)。

标准系列样品和质控样品的制备 精密称取灯盏乙素和异灯盏乙素适量, 用含 1% 甲酸的甲醇溶解并定容, 获得各自的储备液。

分别精密吸取灯盏乙素和异灯盏乙素储备液适量, 以含 1% 甲酸的甲醇稀释, 获得质量浓度为 100/50.0、40.0/20.0、16.0/8.00、4.00/2.00、1.20/0.600、0.400/0.200、0.200/0.100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 灯盏乙素/异灯盏乙素的标准系列溶液及 80.0/40.0、12.0/6.00、0.600/0.300、0.200/0.100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质控工作溶液。上述溶液采用经酸化处理的大鼠空白血浆进一步稀释, 获得灯盏乙素/异灯盏乙素血浆质量浓度分别为 5 000/2 500、2 000/1 000、800/400、200/100、60.0/30.0、20.0/10.0 和 10.0/5.00 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准系列样品和血浆质量浓度为 4 000/2 000、600/300、30.0/15.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质控样品。

组织浓度测定的标准系列样品和质控样品是采用空白肝组织匀浆液 (以含 10% 的 8 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸的乙腈制备组织匀浆, 1:5, w/v) 配制。灯盏乙素/异灯盏乙素的组织样品测定的标准曲线质量浓度分别为 30.0/15.0、60.0/30.0、150/75.0、500/250、1 000/500、2 000/1 000、5 000/2 500、10 000/5 000 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$; 质控样品质量浓度分别为 30.0/15.0、90.0/45.0、800/400、8 000/4 000 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

生物样品预处理 取经磷酸酸化处理的血浆样品 25.0 μL , 加入黄芩苷溶液 (100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 25.0 μL 和含 1% 甲酸的乙腈 100 μL , 涡流 1 min, 离心 10 min (4 $^{\circ}\text{C}$, 14 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 后, 取上清液 50 μL , 加入去离子水 100 μL , 混匀后取 8.0 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

大鼠各组织样品在室温解冻后, 剪取一半以上的组织, 置于冰盘上, 用手术剪将组织剪碎 (小于 1 $\text{cm}\times 1\text{cm}$), 再混合, 进一步剪碎。精密称取组织样品适量, 置于匀浆管中。加入相当于其重量 5 倍体积的含 10% 的 8 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸的乙腈制备匀浆。取组织匀浆液样品 25.0 μL , 加入内标溶液 (100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 25.0 μL 和含 1% 甲酸的乙腈 100 μL , 涡流 1 min, 离心 5 min 后, 取上清液 50.0 μL 加入去离子水 150 μL , 混匀后取 8.0 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

方法学验证

交叉干扰 用大鼠酸化空白血浆配制 5 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 灯盏乙素样品和 2 500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 异灯盏乙素

样品, 考察测定时灯盏乙素和异灯盏乙素是否相互干扰。

选择性 分别取 6 个不同来源的经酸化处理的大鼠空白血浆或空白组织样品以及用相应空白基质配制的定量下限 (LLOQ) 样品 (灯盏乙素/异灯盏乙素血浆质量浓度为 10.0/5.00 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 灯盏乙素/异灯盏乙素组织浓度为 30.0/15.0 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) 进行 LC-MS/MS 分析测定, 考察不同来源空白基质中的内源性物质是否干扰待测物及内标的测定。

标准曲线与定量下限 血浆或组织的标准系列样品按照“生物样品预处理”项下操作, 以每个待测物浓度为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标, 用加权 ($W=1/X^2$) 最小二乘法进行回归运算, 求得的标准曲线的相关系数 (r^2) 均大于 0.99。取 LLOQ 样品, 进行 6 样本分析, 根据当日标准曲线计算每一样本的测得浓度, 计算该浓度的日内和日间精密度和准确度。

精密度和准确度 取灯盏乙素/异灯盏乙素血浆或组织的低、中、高质控样品, 按“生物样品预处理”项下操作, 每个浓度进行 6 样本分析。血浆质控样品连续进行 3 天的测定, 根据每日结果求算待测物的日内、日间精密度和准确度。组织的质控样品进行一个分析批的测定, 根据结果求算待测物的日内精密度和准确度。

基质效应 分别取 6 个不同来源的经酸化处理的大鼠空白血浆或空白组织样品, 除不加内标外, 其余按“生物样品预处理”项下操作, 取上清液置于另一试管中, 加入灯盏乙素/异灯盏乙素对照质控溶液和内标溶液, 涡流 1 min, 取 8.0 μL 进行 LC-MS/MS 分析, 获得相应峰面积 (A)。同时另取去离子水代替空白基质, 按上述处理, 获得相应峰面积 (B)。以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算血浆或组织样品的基质效应, 计算公式为 $A/B\times 100\%$ 。以分析物和内标的基质效应比值计算内标归一化的基质效应因子。

稳定性 考察了灯盏乙素和异灯盏乙素在酸化的大鼠血浆样品室温放置 6 h、6 次冷冻-解冻循环、 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 93 天、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 93 天的稳定性以及大鼠血浆样品经沉淀蛋白处理后室温放置 6 h、自动进样器放置 26 h 的稳定性。考察了灯盏乙素/异灯盏乙素在大鼠肝组织匀浆样品室温放置 19 h、4 次冷冻-解冻循环、 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 54 天的稳定性以及经沉淀蛋白处理后的组织匀浆样品自动进样器放置 32 h 的稳定性。

样品预处理回收率 取低、中、高 3 个浓度的血

浆质控样品,按“血浆样品预处理”项下操作,每一浓度进行6样本分析,获得相应峰面积(A)。同时另取大鼠酸化空白血浆。除不加内标外,其余按“血浆样品预处理”项下操作,取上清液置于另一试管中,加入灯盏乙素/异灯盏乙素对照质控溶液和内标溶液,涡流1 min,取8.0 μL 进行LC-MS/MS分析,获得相应峰面积(B)。以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算回收率,计算公式为 $A/B \times 100\%$ 。

组织分布研究及数据分析 静脉给药组:SD大鼠30只,体重180~220 g,年龄7~8周,随机分成5个时间组,每一时间组6只,雌雄各半。单次静脉注射给予20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灯盏花素,给药剂量为5 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。实验期间自由进食和饮水。5组大鼠分别于给药前(0 h)、给药后15 min、1 h、3 h和12 h,麻醉后经腹主动脉放血处死,立即解剖采集脑、心、肝、脾、肺、肾、膀胱、胃壁、小肠(空肠)、肾上腺。收集部分全血;剩余全血离心后,分离血浆,加入1/10倍血浆体积的8 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸溶液;各组织用冷生理盐水冲净表面残留血液及内容物,吸干后贴好标签, -70°C 保存待测。

灌胃给药组:SD大鼠24只,体重180~220 g,年龄7~8周,随机分成4个时间组,每一时间组6只,雌雄各半。单次灌胃给予80 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灯盏花素,给药

体积为10 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。实验期间自由进食和饮水。4组大鼠分别于给药后2、4、8和12 h如上采集血浆和组织样品。

所得的血浆和组织浓度-时间数据采用Phoenix WinNonlin[®] 6.3(美国Pharsight公司)软件以非房室模型进行处理和统计分析。

结果

1 质谱分析

在本实验色谱/质谱条件下,灯盏乙素、异灯盏乙素以及内标黄芩苷主要产生 m/z 463、 m/z 463、 m/z 447的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 峰。选择性对 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 峰进行产物离子扫描,三者均易生成脱去葡萄糖醛酸的碎片离子 m/z 287(灯盏乙素和异灯盏乙素)和 m/z 271(黄芩苷),为提高检测时选择性,进一步增加碰撞能量,获得均为 m/z 123的特征碎片离子,用于作为MRM扫描时的检测的产物离子。待测物及内标的产物离子扫描质谱图及可能的断裂方式见图2。

2 方法学验证

2.1 选择性和交叉干扰 在本实验色谱条件下,灯盏乙素的色谱保留时间约0.90 min,异灯盏乙素的色谱保留时间约1.24 min,黄芩苷的色谱保留时间约1.51 min(图3)。选择性实验结果表明大鼠空白血浆

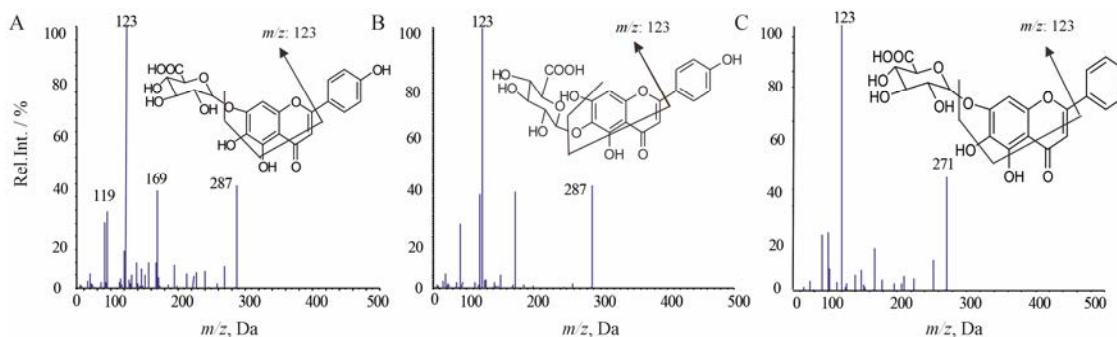


Figure 2 Product ion mass spectra of $[\text{M}+\text{H}]^+$ ions for scutellarin (A), isoscutellarin (B) and internal standard baicalin (C)

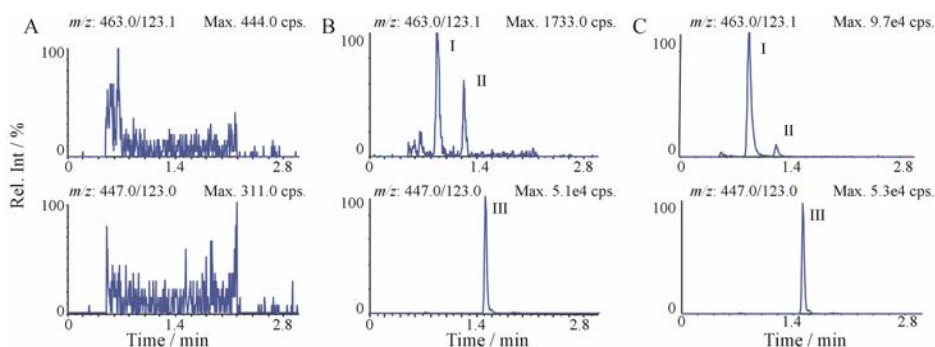


Figure 3 Representative MRM chromatograms of scutellarin (I), isoscutellarin (II) and baicalin (III, IS). A: Blank plasma sample; B: Blank plasma spiked with scutellarin/isoscutellarin (10.0/5.00 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) and baicalin (100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$); C: A plasma sample at 1 h after an intravenous administration to rats

和空白肝匀浆中内源性物质均不干扰待测物的测定。待测物间色谱完全分离, 无相互干扰。

2.2 标准曲线和定量下限 测定大鼠血浆中灯盏乙素和与异灯盏乙素的线性范围分别为 $10.0 \sim 5\ 000\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $5.00 \sim 2\ 500\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。典型标准曲线回归方程为: 灯盏乙素, $y=0.005\ 58x+0.003\ 09$ ($r=0.998\ 1$); 异灯盏乙素, $y=0.001\ 07x+0.003\ 51$ ($r=0.997\ 5$)。取大鼠 LLOQ 血浆样品 (灯盏乙素/异灯盏乙素质量浓度为 $10.0/5.00\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 进行 6 样本分析, 连续测定 3 天并分别根据当日标准曲线求得每一样本的测得浓度。求得灯盏乙素的日内精密密度为 6.2%, 日间精密密度为 6.5%, 准确度 (RE) 为-5.1%; 异灯盏乙素的日内精密密度为 9.6%, 日间精密密度为 9.5%, 准确度 (RE) 为-3.3%。实验结果表明, LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中灯盏乙素、异灯盏乙素的定量下限分别为 10.0 和 $5.00\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

测定大鼠组织匀浆中灯盏乙素与异灯盏乙素的线性范围分别为: $30.0 \sim 10\ 000\ \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $15.0 \sim 5\ 000\ \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。典型标准曲线回归方程为: 灯盏乙素, $y=0.001\ 53x+0.004\ 25$ ($r=0.999\ 1$); 异灯盏乙素, $y=0.001\ 07x+0.003\ 51$ ($r=0.997\ 5$)。取大鼠组织匀浆 LLOQ 样品 (灯盏乙素/异灯盏乙素组织质量浓度为 $30.0/15.0\ \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) 进行 6 样本分析, 根据当日标准曲线求得每一样本的测得浓度。求得灯盏乙素的日内精密密度为 3.1%, 日内准确度 (RE) 为 6.8%; 异灯盏乙素的日内精密密度为 11.1%, 准确度 (RE) 为-6.8%。实验结果表明, LC-MS/MS 法测定大鼠组织中灯盏乙素和异灯盏乙素的定量下限分别为 30.0 和 $15.0\ \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.3 精密密度与准确度 灯盏乙素与异灯盏乙素血浆样品和组织样品测定准确度与精密密度数据分别见表 1 和表 2。各待测物低、中、高质控样品的日内和日间的精密密度和准确度均符合生物样品测定相关要求。

2.4 基质效应 大鼠血浆样品中, 灯盏乙素在低、高浓度经内标校正的基质效应因子分别为 119.2% 和 102.9%, 相对标准差均小于 6.2%; 异灯盏乙素在低、高浓度经内标校正的基质效应因子分别为 104.4% 和 100.5%, 相对标准差均小于 7.8%。在大鼠组织样品中, 灯盏乙素在低、高浓度经内标校正的基质效应因子分别为 87.6% 和 88.7%, 相对标准差均小于 3.5%; 异灯盏乙素在低、高浓度经内标校正的基质效应因子分别为 91.6% 和 93.1%, 相对标准差均小于 5.1%。结果表明, 待测物和内标在本实验选择的色谱和质谱条件下, 可忽略生物基质效应的影响。

Table 1 Precision and accuracy data for the determination of scutellarin/isoscutellarin in rat plasma. $n=6$, $\bar{x}\pm s$

Compound	Concentration/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$		Precision (RSD)/%		Accuracy (RE)/%
	Added	Found	Intra-day	Inter-day	
Scutellarin	10.0	9.49 ± 0.62	6.2	6.5	-5.1
	30.0	29.2 ± 1.4	7.1	4.7	-2.7
	600	592 ± 15	2.4	2.5	-1.4
	4 000	$3\ 868 \pm 133$	3.1	3.4	-3.3
Isoscutellarin	5.0	4.83 ± 0.46	9.6	9.5	-3.3
	15.0	14.5 ± 0.8	5.5	5.7	-3.1
	300	294 ± 6	2.0	2.1	-2.1
	2 000	$1\ 968 \pm 61$	2.0	3.1	-1.6

Table 2 Precision and accuracy data for the determination of scutellarin/isoscutellarin in rat liver tissue. $n=6$, $\bar{x}\pm s$

Compound	Concentration/ $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$		Precision RSD/%	Accuracy (RE)/%
	Added	Found		
Scutellarin	30.0	32.0 ± 1.0	3.1	6.8
	90.0	91.6 ± 3.4	3.7	1.8
	800	823 ± 2	2.3	2.9
	8 000	$7\ 987 \pm 183$	2.3	-0.2
Isoscutellarin	15.0	14.0 ± 1.6	11.1	-6.8
	45.0	45.6 ± 2.2	4.8	1.3
	400	411 ± 10	2.5	2.7
	4 000	$4\ 075 \pm 52$	1.3	1.9

2.5 稳定性 低、高两浓度灯盏乙素和异灯盏乙素血浆 (组织匀浆) 样品, 在本实验所考察的储存条件下放置后再进行测定, 获得偏差 (RE) 均在 $\pm 15\%$ 之内, 表明待测物在本实验条件下放置稳定。

2.6 回收率 大鼠血浆样品经蛋白沉淀处理后, 灯盏乙素在低、中、高浓度的回收率分别为 96.9%、105.8% 和 102.4%, 异灯盏乙素在低、中、高浓度的回收率分别为 93.6%、102.5% 和 101.2%。

3 组织分布差异研究

将所建立并经验证的方法应用于灯盏乙素及其代谢物异灯盏乙素的组织分布差异研究, 待测物各组织浓度经时数据用 WinNonlin 药动学软件拟合, 拟合方法选择非房室模型, 计算大鼠各组织中灯盏乙素及异灯盏乙素的 $\text{AUC}_{0-12\text{h}}$ 值。不同给药途径, 大鼠各组织中灯盏乙素与异灯盏乙素的 $\text{AUC}_{0-12\text{h}}$ 比较见图 4 和图 5。以 $\text{AUC}_{\text{plasma } 0-12\text{h}}$ 为参比, 计算两种给药方式下的组织/血浆暴露量比值, 数据处理结果见表 3。

大鼠静脉注射灯盏花素后, 灯盏乙素主要分布于消化道、膀胱和肾脏组织, 代谢物异灯盏乙素的血浆和组织暴露量均不足灯盏乙素暴露量的 5%。灌胃给予灯盏花素后, 大部分组织中灯盏乙素暴露量高

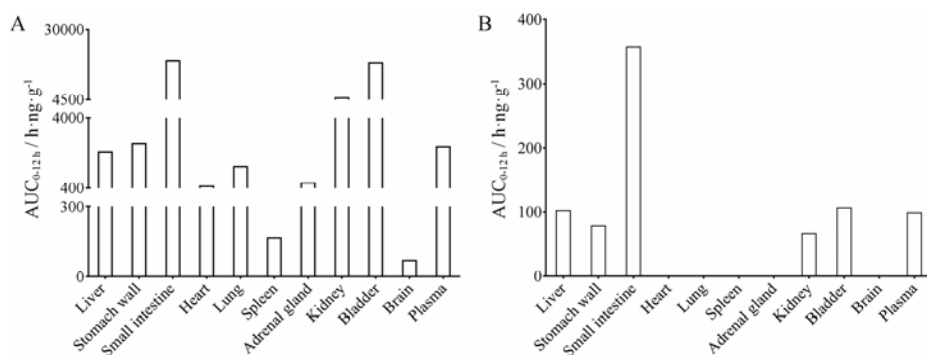


Figure 4 The tissue AUC_{0-12h} data of scutellarin and isoscutellarin in rats after $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ intravenous administration. A: Scutellarin; B: Isoscutellarin

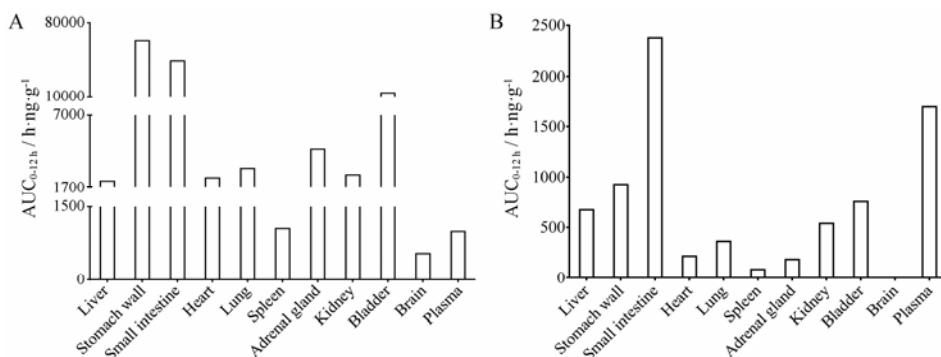


Figure 5 The tissue AUC_{0-12h} data of scutellarin and isoscutellarin in rats after $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ intragastric administration. A: Scutellarin; B: Isoscutellarin

Table 3 The $AUC_{\text{tissue}}/AUC_{\text{plasma}}$ ratios of scutellarin and isoscutellarin with different administration routes in rats ($n=6$). n.d.: Not detected; iv: Intravenous injection; ig: Intragastrically

Tissue	Scutellarin		Isoscutellarin	
	iv	ig	iv	ig
Liver	0.90	2.20	1.03	0.40
Stomach wall	1.06	63.27	0.80	0.55
Small intestine	7.39	44.14	3.62	1.40
Heart	0.19	2.45	n.d.	0.13
Lung	0.60	3.14	n.d.	0.21
Spleen	0.07	1.06	n.d.	0.05
Adrenal gland	0.26	4.54	n.d.	0.11
Kidney	2.02	2.65	0.67	0.32
Bladder	7.08	13.30	1.08	0.44
Brain	0.03	0.55	n.d.	n.d.
Plasma	1.00	1.00	1.00	1.00

于血浆暴露量, 灯盏乙素主要分布于消化道、膀胱、肾上腺和肺组织; 异灯盏乙素血浆暴露量高于灯盏乙素, 但其组织暴露量明显低于灯盏乙素。在给药后 12 h, 除了在灌胃组的小肠和胃壁组织还可检测到约 $200\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 左右的灯盏乙素浓度外, 静脉和灌胃组其他组织中灯盏乙素和异灯盏乙素浓度均低于定量下限。

讨论

灯盏乙素与异灯盏乙素为同分异构体, 具有相同的 MRM 离子对, 本文通过优化流动相的组成和比例, 利用梯度洗脱的方式使二者达到色谱完全分离, 且色谱运行时间不到 3 min, 满足大批量样品测定的需求。

灯盏乙素结构中含有邻二酚羟基, 易被氧化, 为确保生物样品采集、储存和分析过程中待测物稳定, 本文在大鼠血浆样品采集时加入了 1/10 样品体积的 $8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸溶液; 组织样品匀浆时, 采用了含 $10\% 8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸的乙腈溶液作为匀浆试剂。生物样品预处理, 则以简单且易操作的蛋白沉淀法代替文献报道的液-液萃取或固相萃取法^[7,8], 使处理后的待测物保持在 pH 2 左右的环境中, 保证其稳定。

大鼠静脉或灌胃给药后, 灯盏乙素与异灯盏乙素在体内消除快速, 在给药后 12 h 大部分组织的灯盏乙素与异灯盏乙素浓度低于定量下限。异灯盏乙素在两种给药方式中均在小肠的药物浓度最高, 这可能是由于异灯盏乙素是在小肠中代谢产生。静脉和灌胃两种给药方式下, 灯盏乙素和异灯盏乙素在大鼠体内分布存在明显差异。灌胃给药组灯盏乙素的

组织/血浆暴露量比值明显高于静脉给药组; 异灯盏乙素在小肠、胃壁、肝、肾和膀胱的组织/血浆暴露量比值静脉组略高于灌胃给药组, 在静脉给药组的血浆暴露量明显低于灌胃给药组, 这可能与异灯盏乙素是由首过代谢生成有关。两种给药方式下, 在脑组织中均可检测到灯盏乙素, 但未检测到异灯盏乙素, 推测是因为脑组织 OATP 转运体对灯盏乙素的亲和力远高于异灯盏乙素。

本实验建立了能同时测定大鼠血浆和各组织中灯盏乙素和异灯盏乙素的 LC-MS/MS 法并成功应用于不同给药途径下灯盏乙素及其代谢物在大鼠体内处置差异研究。在静脉和灌胃给药方式下, 灯盏乙素和异灯盏乙素在大鼠体内的分布存在差异, 提示应关注不同给药方式对灯盏乙素药效和安全性的影响。

致谢: 中国科学院上海药物研究所杨瑛、孙斯文和沈光莹开展动物实验。

References

- [1] Zhang J, Wang LQ, Li YP. Application of Erigeron breviscapine and related products [J]. Chin J Ethn Ethn (中国民族民间医药), 2001, 10: 197-199.
- [2] Ding GH. Progress in pharmacological research and clinical application of breviscapine [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 1999, 10: 68-69.
- [3] Wu JS, Hu TT, Zhang L. Clinical observation of Breviscapine Injection on myocardial ischemia of coronary heart disease [J]. J Math Med (数理医药学杂志), 2000, 13: 318-319.
- [4] Yang JM. Clinical application progress of breviscapine [J]. Chin Pharm (中国药业), 2000, 9: 64-65.
- [5] Wei N. Advances of Breviscapine in Clinical Application and its Side-effects [J]. Chin Pharm (中国药师), 2001, 4: 144-146.
- [6] Chen XY, Cui L, Duan XT, et al. Pharmacokinetics and metabolism of the flavonoid scutellarin in humans after a single oral administration [J]. Drug Metab Dispos, 2006, 34: 1345.
- [7] Gao CY. Absorption and Disposition Study of Scutellarin (大鼠和人体内灯盏乙素吸收及处置机制的研究) [D]. Shanghai: Graduate University of Chinese Academy of Sciences, 2012.
- [8] Gao CY, Chen XY, Zhong DF, et al. Absorption and disposition of scutellarin in rats: a pharmacokinetic explanation for the high exposure of its isomeric metabolite [J]. Drug Metab Dispos, 2011, 39: 2034-2044.
- [9] Gao CY, Zhang HJ, Guo ZT, et al. Mechanistic studies on the absorption and disposition of scutellarin in humans: selective OATP2B1-mediated hepatic uptake is a likely key determinant for its unique pharmacokinetic characteristics [J]. Drug Metab Dispos, 2012, 40: 2009-2020.
- [10] Gao CY, Li Q, Chen XY, et al. Study of the absorption mechanism of scutellarin in human intestine (灯盏乙素口服吸收机制的研究) [C]//The Ninth Chinese Drug and Xenobiotics Metabolism Academic Conference Symposium (第九届全国药物和化学异物代谢学术会议论文集). Wuhan: Chinese Pharmacology Society, 2009: 151-154.
- [11] Gong YJ, Wang JX, Zhang Y, et al. Intestinal lymphatic transport of breviscapine orally administered in rat [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2011, 46: 1262-1267.