

## 柱前衍生化结合 UHPLC-MS/MS 法同时测定 Beagle 犬血浆中的红景天苷和酪醇

陈 帅<sup>1,2</sup>, 夏媛媛<sup>2</sup>, 魏广力<sup>2</sup>, 李全胜<sup>2</sup>, 刘梦杰<sup>1,2</sup>, 陈 勇<sup>1\*</sup>, 司端运<sup>2\*</sup>

(1. 湖北大学中药生物技术省重点实验室, 湖北大学绿色资源生物转化协同创新中心, 湖北 武汉 430062;  
2. 天津药物研究院释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193)

**摘要:** 本文建立了同时测定 Beagle 犬血浆中红景天苷及酪醇浓度的柱前衍生化结合 UHPLC-MS/MS 的分析方法。血浆样品用乙腈沉淀蛋白后, 上清液与丹磺酰氯进行衍生化反应, 终止反应后采用甲基叔丁基醚进行提取, 提取物复溶后经反相色谱分离, 色谱柱为 ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub>, (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈 (含 0.1% 甲酸)-水 (含 10% 乙腈, 0.1% 甲酸), 梯度洗脱, 分析时间为 9 min。在正离子条件下采用多反应监测模式对两种待测物进行同时测定。用于定量分析的离子对分别为  $m/z$  534.2→372.0 (红景天苷衍生物),  $m/z$  372.0→171.0 (酪醇衍生物) 和  $m/z$  506.0→171.0 (内标熊果苷衍生物)。在上述条件下, 红景天苷和酪醇分别在 0.02~20 和 0.1~10 μmol·L<sup>-1</sup> 内线性良好, 定量下限分别为 0.02 和 0.1 μmol·L<sup>-1</sup>; 批内、批间精密密度均小于 8.68%; 准确度在 ±11.4% 范围之内。本方法灵敏度高, 专属性好, 适合用于 Beagle 犬灌胃给药后血液中红景天苷、酪醇的药动学研究。

**关键词:** 红景天苷; 酪醇; 丹磺酰氯; 衍生化; UHPLC-MS/MS; 药代动力学

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 02-0296-06

## Simultaneous determination of salidroside and tyrosol in Beagle dog plasma using UHPLC-MS/MS after pre-column dansyl chloride derivatization

CHEN Shuai<sup>1,2</sup>, XIA Yuan-yuan<sup>2</sup>, WEI Guang-li<sup>2</sup>, LI Quan-sheng<sup>2</sup>, LIU Meng-jie<sup>1,2</sup>,  
CHEN Yong<sup>1\*</sup>, SI Duan-yun<sup>2\*</sup>

(1. Hubei Province Key Laboratory of Biotechnology of Chinese Traditional Medicine, Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-resources, Hubei University, Wuhan 430062, China; 2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

**Abstract:** A pre-column derivatization method combined with UHPLC-MS/MS was developed for the simultaneous determination of salidroside and tyrosol in Beagle dog plasma. After protein precipitation by acetonitrile, the liquid supernatant was treated with dansyl chloride under dark conditions at 60 °C for 30 min, and then, the sample solution was extracted using methyl tertiary butyl ether. The multiple reaction monitoring in positive ion mode was used for MS detection of the tested analytes with the specific ion transitions of  $m/z$  534.2→372.0 for salidroside derivative,  $m/z$  372.0→171.0 for tyrosol derivative and  $m/z$  506.0→171.0 for

收稿日期: 2016-09-09; 修回日期: 2016-11-02.

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (81503154).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-27-88663590, E-mail: 1740952455@qq.com;

Tel / Fax: 86-22-84845261, E-mail: sidy@tjipr.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0882

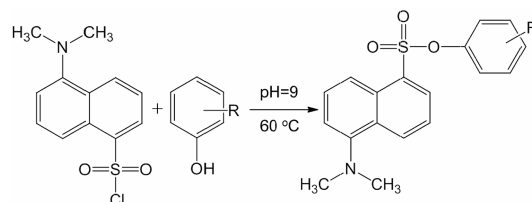
arbutin derivative. The chromatograph separation was achieved on an ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) with a gradient mobile phase consisting of acetonitrile (0.1% formic acid)-water (10% acetonitrile, 0.1% formic acid) for 9 min. The assay showed a good linearity over the range of 0.02/0.1–20/10 μmol·L<sup>-1</sup> with a lower limit of quantitation of 0.02 and 0.1 μmol·L<sup>-1</sup> for salidroside and tyrosol in dog plasma, respectively. The intra- and inter-day precisions were all less than 8.68%, and the accuracy was within ±11.4%. The established method with a high sensitivity, good specificity and reliability was appropriate for simultaneous determination of salidroside and tyrosol in dog plasma and successfully applied to a pharmacokinetic study after intragastric administration of salidroside to Beagle dogs.

**Key words:** salidroside; tyrosol; dansyl chloride; derivatization; UHPLC-MS/MS; pharmacokinetics

红景天系景天科景天属多年生草本或亚灌木植物, 主要生长在高海拔、高寒的藏、吉地区。我国应用红景天历史悠久, 在藏医《四部医典》和《本草纲目》中均有记载。现代药理研究表明, 红景天苷及其苷元酪醇为红景天的有效成分。大量研究证明红景天苷具有广泛的药理作用, 包括抗老化、抗缺氧、抗疲劳、抗抑郁、镇静催眠、抗辐射、增强机体免疫力、保护心脑血管、抗肾损害和抗肿瘤等<sup>[1, 2]</sup>。

目前, 国内外对红景天的研究多集中于药效, 对同时测定红景天苷和酪醇含量的分析方法研究报道较少, 且大多采用高效液相色谱 (HPLC-UV) 法<sup>[3–6]</sup>。如 Lin 等<sup>[6]</sup>采用 HPLC 法同时测定灌胃给药红景天苷和酪醇后大鼠血浆中两种药物的浓度, 定量下限分别为 2.83 和 53.9 μmol·L<sup>-1</sup>; Guo 等<sup>[7]</sup>采用 LC-MS/MS 方法同时测定大鼠血浆中红景天苷和酪醇的浓度, 定量下限分别为 0.167 和 0.145 μmol·L<sup>-1</sup>。以上两种方法对红景天苷的检测灵敏度均较低, 不能满足其体内药动学分析。此外, Wu 等<sup>[8]</sup>应用 LC-MS/MS 法同时测定了大鼠血浆中的红景天苷和酪醇含量, 定量下限分别为 0.167 和 0.036 μmol·L<sup>-1</sup>, 该方法的样品处理方式固相萃取, 在批量处理样品时成本较高且步骤复杂, 并且红景天苷的检测灵敏度较低。

在 LC-MS/MS 分析过程中, 衍生化法可以增强化合物的离子化效率, 提高检测灵敏度, 并且能通过改变药物的极性而改善药物的色谱分离<sup>[9]</sup>。丹磺酰氯作为一种广泛应用的衍生化试剂, 主要应用于荧光检测以及优化酚类和胺类化合物的质谱响应等方面。通过与丹磺酰氯进行衍生化反应, 在化合物的结构中引入一个碱性含氮基团, 使其易于在酸性流动相中离子化, 从而增强待测物的质谱响应。酚类化合物与丹磺酰氯的反应过程<sup>[10]</sup>如图 1 所示。本研究旨在通过红景天苷和酪醇与丹磺酰氯发生衍生化反应, 建立一种灵敏度更高、样品使用量更小、更经济可靠的检测方法, 为临床前药代动力学研究提供方法依据。



**Figure 1** Derivative scheme of dansylation for compounds containing phenolic hydroxyl group

## 材料与方法

**药品与试剂** 红景天苷供试品 (批号: 14070203; 纯度: 100.6%), 由福建省闽东力捷迅药业有限公司提供; 红景天苷对照品 (批号: 110818-201517; 纯度: 99.4%)、熊果苷标准品 (批号: 111951-201301; 纯度: 99.7%), 酪醇标准品 (批号: 111676-200602; 纯度: 100%), 中国食品药品检定研究院; 丹磺酰氯 (批号: BCBPQ4057V; 纯度: 99.8%), 美国 Sigma 公司; 色谱纯乙腈, Thermo Fisher 公司; 分析纯甲基叔丁基醚, 天津漠德威化学科技有限公司; 分析纯无水甲酸、无水碳酸钠, 天津市光复精细化工研究所; 分析纯碳酸氢钠, 伊普赛诺科技 (天津) 有限公司; 去离子水, 实验室自制。

**动物** 健康 Beagle 犬 6 只, 普通级, 体重 (9.31±0.77) kg。购于北京玛斯生物技术有限公司, 动物质量合格证编号: 11400600001067 (雌), 11400600001065 (雄), 生产许可证: SCXK (京) 2011-0003。实验动物由天津药物研究院新药评价有限公司动物房饲养。动物使用方案已经获得天津药物研究院新药评价有限公司 IACUC 批准。

**仪器** ACQUITY TQD<sup>™</sup> UPLC/MS/MS 型液质联用仪 (包括在线脱气、二元梯度泵、自动进样器、柱温箱、ESI 源、Masslynx 4.1 数据处理软件等), 美国 Waters 公司; MS-100 型恒温混匀仪, 杭州奥盛仪器有限公司; Sorvall Legend Micro 17R 台式高速冷冻离心机, Thermo Fisher Scientific 公司; Turbo Vap LV

型样品浓缩仪, 美国 Caliper 公司; BM-40 型纯水制备系统, 北京中盛茂源科技发展有限公司。

**色谱条件** ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, ID, 1.7 μm), 柱温 35 °C; 乙腈 (含 0.1% 甲酸) (A 相)-水 (含 0.1% 甲酸和 10% 乙腈) (B 相) 流动相, 梯度洗脱 (0~5 min, 50% A; 5~5.1 min, 50% A→90% A; 5.1~7.5 min, 90% A; 7.5~7.6 min, 90% A→50% A; 7.6~9 min, 50% A), 流速 0.2 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量 5 μL。

**质谱条件** 电喷雾离子化源 (ESI); 毛细管电压 3 000 V; 锥孔电压 30 V; 离子源温度 110 °C; 去溶剂气温度 350 °C, 去溶剂气流量 650 L·h<sup>-1</sup>, 锥孔气流量 50 L·h<sup>-1</sup>。正离子多反应监测模式 (MRM); 用于定量分析的离子对分别为:  $m/z$  534.2→372.0 (红景天苷衍生物), 碰撞能为 20 V;  $m/z$  372.0→171.0 (酪醇衍生物), 碰撞能为 25 V;  $m/z$  506.0→171.0 (内标熊果苷衍生物), 碰撞能为 35 V。

#### 溶液配制

**对照品溶液** 精密称取红景天苷、酪醇对照品适量, 分别用乙腈配制为 750 和 3 000 μmol·L<sup>-1</sup> 的红景天苷和酪醇贮备液。随后用乙腈将红景天苷和酪醇贮备液稀释成 0.02/0.1、0.05/0.2、0.2/0.5、1/1、5/2、10/5 和 20/10 μmol·L<sup>-1</sup> 系列混合对照溶液。

**质控溶液** 精密量取上述红景天苷、酪醇对照贮备液适量, 用乙腈稀释配制 0.05/0.2、1/1 和 16/8 μmol·L<sup>-1</sup> 红景天苷和酪醇混合质控 (QC) 工作液。

**内标溶液** 精密称取熊果苷对照品适量, 用乙腈配制为 400 μg·mL<sup>-1</sup> 内标贮备液, 再用乙腈稀释为 500 ng·mL<sup>-1</sup> 的内标溶液。

**衍生化溶液** 避光称取丹磺酰氯适量, 用乙腈配制 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> 丹磺酰氯溶液, -20 °C 避光保存。

**给药溶液** 称取红景天苷适量, 配制成 100 mg·mL<sup>-1</sup> 的生理盐水溶液, 给药体积为 1 mL·kg<sup>-1</sup>。

**血浆样品处理** 吸取犬血浆 50 μL, 加入乙腈 50 μL, 内标 100 μL, 涡旋 2 min, 4 °C 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min。取上清液 100 μL 至 1.5 mL EP 管, 加入碱溶液 (100 mmol·L<sup>-1</sup> 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液-100 mmol·L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> 水溶液, 1:5, pH 9) 100 μL, 避光加入丹磺酰氯 (0.5 mg·mL<sup>-1</sup>) 乙腈溶液 100 μL, 涡旋 2 min, 在 60 °C 条件下孵育 30 min。孵育后加入甲基叔丁基醚 900 μL, 涡旋 2 min 后离心 5 min, 取上清液 800 μL 用 N<sub>2</sub> 吹干, 加入复溶溶液 (乙腈-水, 50:50) 120 μL, 涡旋离心后进样 5 μL, 进行 UHPLC-MS/MS

定量分析。

**线性关系** 取空白犬血浆 50 μL, 加入混合对照溶液 50 μL, 配制成浓度为 0.02/0.1~20/10 μmol·L<sup>-1</sup> 的血浆样品, 进行 UHPLC-MS/MS 分析。以红景天苷衍生物或酪醇衍生物与内标熊果苷衍生物的色谱峰面积比 ( $Y$ ) 为纵坐标、血浆中待测物的浓度 ( $X$ ) 为横坐标, 用加权 ( $W=1/X^2$ ) 最小二乘法进行直线回归。

**批内、批间精密度与准确度** 取空白犬血浆 50 μL, 按标准曲线制备方法配制定量下限、低、中、高 4 个浓度 (0.02/0.1、0.05/0.2、1/1 和 16/8 μmol·L<sup>-1</sup>) 红景天苷/酪醇 QC 样品, 每一浓度每天进行 6 样本分析, 连续测定 3 天, 根据当日标准曲线计算 QC 样品的浓度。

**基质效应和回收率** 样品 A: 取质控溶液 (低、中、高浓度) 各 50 μL, 按血浆样品处理过程 (不加犬血浆, 以 50 μL 水代替; 50 μL 质控溶液代替乙腈) 处理样品, 进样 5 μL, 记录红景天苷衍生物、酪醇衍生物和内标衍生物的色谱峰面积  $A$ 。样品 B: 取空白犬血浆 50 μL, 加入乙腈 150 μL, 涡旋后离心, 取上清液 100 μL, N<sub>2</sub> 吹干, 取 A 溶液 100 μL 复溶, 按血浆样品处理过程操作, 进样 5 μL, 记录待测物衍生物和内标衍生物的色谱峰面积  $B$ 。样品 C: 取质控溶液 (低、中、高浓度) 各 50 μL, 按血浆样品处理过程 (以 50 μL 空白犬血浆代替血浆, 质控溶液代替 50 μL 乙腈) 处理样品, 进样 5 μL, 记录待测物衍生物和内标衍生物的色谱峰面积  $C$ 。峰面积比  $B/A \times 100\%$  即为红景天苷、酪醇和内标的基质效应; 峰面积比  $C/B \times 100\%$  即为红景天苷、酪醇和内标的提取回收率。

**稳定性** 考察低、高浓度的含药血浆样品 (红景天苷/酪醇浓度为: 0.05/0.2 和 16/8 μmol·L<sup>-1</sup>) 室温放置 2 h, -80 °C 冻融循环 2 次, -80 °C 长期冻存以及处理过的样品于自动进样器 10 °C 放置 24 h 的稳定性。

**稀释效应** 犬空白血浆和适量的质控贮备液配制成红景天苷/酪醇浓度为 800/400 μmol·L<sup>-1</sup> 血浆样品, 用空白血浆稀释 50 倍后, 测定稀释后血浆中待测物的实际浓度, 测定结果与稀释因子相乘后的实际浓度和理论浓度进行对比。

**药动学研究** 5 只健康 Beagle 犬, 灌胃给药 (100 mg·kg<sup>-1</sup>) 红景天苷生理盐水溶液, 于给药前和给药后 0.0833、0.25、0.5、0.75、1、2、3、4、6、9、12 和 24 h 采血 0.5 mL, 离心分离血浆, -80 °C 保存待测。

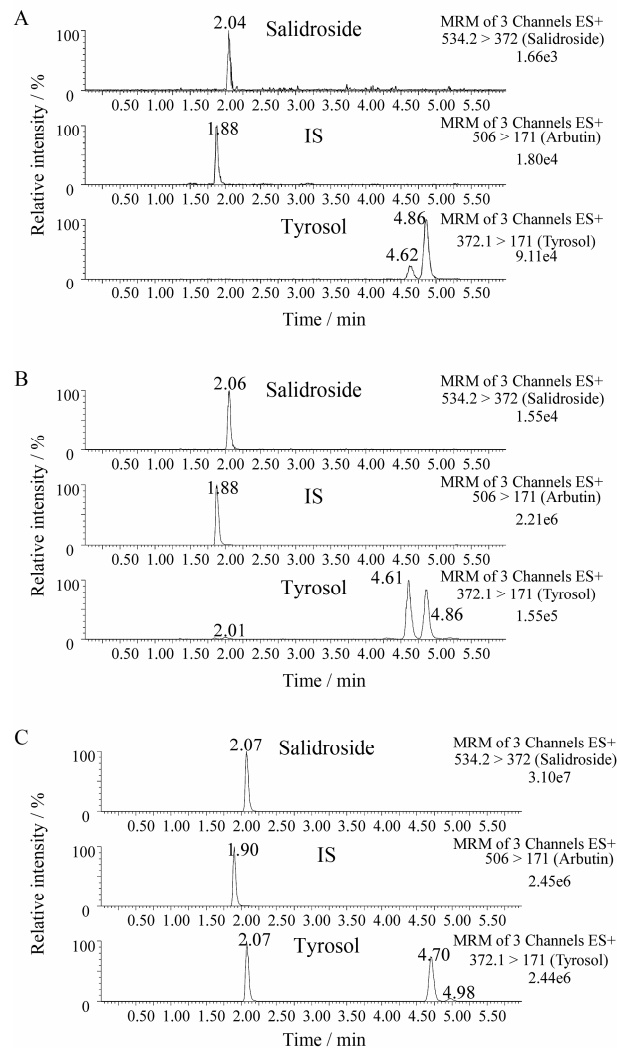
**数据处理** 使用 Masslynx 4.1 数据处理软件, 对待测物及内标进行积分, 记录峰面积, 求得血浆校正

曲线并且计算每只动物的红景天苷和酪醇浓度数据; 应用 WinNonlin 6.3 药代动力学软件, 选择非房室模型统计矩法计算药代参数  $t_{\max}$ 、 $t_{1/2}$ 、 $C_{\max}$ 、 $AUC_{0-t}$  和  $AUC_{0-\infty}$ 。

## 结果

### 1 方法学验证

**1.1 专属性** 犬空白血浆样品的色谱见图 2A; 将定量下限浓度的混合溶液和内标溶液加入空白犬血浆中, 依同法操作, 色谱图见图 2B, 红景天苷衍生物、酪醇衍生物和内标衍生物的保留时间分别为 2.06、4.62 和 1.88 min; Beagle 犬灌胃给药后 3 h 的血浆样品色谱图见图 2C。结果表明, 空白血样中内源性物质



**Figure 2** The chromatograms of the blank dog plasma (A), the blank dog plasma spiked with salidroside ( $0.02 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), tyrosol ( $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and IS ( $500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  arbutin) (B), the dog plasma sample collected at 3 h post dosing of  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  salidroside (C)

的响应低于 LLOQ 的 1/5 以及内标响应的 1/20, 对待测物和内标的定量测定不会产生明显影响。

**1.2 线性关系与定量下限** 红景天苷的回归方程为  $Y=0.328X-0.0000550$  ( $r=0.9983$ ), 酪醇的回归方程为  $Y=0.800X+0.0205$  ( $r=0.9995$ )。结果表明红景天苷和酪醇在  $0.02/0.1\sim 20/10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  内线性良好, 定量下限分别为  $0.02$  和  $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (信噪比  $>10$ )。

**1.3 批内、批间精密度与准确度** 结果表明, 红景天苷和酪醇在定量下限的批内、批间精密度 (RSD) 均小于 8.59%, 准确度 (RE) 在  $\pm 2.68\%$  之间; 低、中、高 3 个浓度 QC 样品的批内、批间精密度 (RSD) 均小于 8.68%, 准确度 (RE) 在  $\pm 11.4\%$  之间。

**1.4 基质效应和回收率** 结果表明, 红景天苷在 3 个浓度水平的基质效应分别为  $101\pm 0.0420\%$ 、 $89.4\pm 0.0248\%$ 、 $94.1\pm 0.0737\%$ ; 回收率分别为  $96.5\pm 2.76\%$ 、 $100.0\pm 2.27\%$ 、 $105\pm 1.97\%$ ; 酪醇的基质效应分别为  $96.6\pm 0.0252\%$ 、 $88.5\pm 0.0186\%$ 、 $92.7\pm 0.0669\%$ ; 回收率分别为  $105\pm 1.97\%$ 、 $107\pm 2.92\%$ 、 $102\pm 1.57\%$ ; 内标的基质效应为  $99.6\pm 0.0466\%$ ; 回收率为  $93.8\pm 4.31\%$ 。

**1.5 稳定性** 结果表明, 红景天苷/酪醇的含药血浆在以上贮存条件下和处理后于  $10^\circ\text{C}$  放置 24 h 的测定浓度分别为  $0.0525\pm 0.00135/15.7\pm 0.582$ 、 $0.0572\pm 0.00220/16.3\pm 0.353$ 、 $0.0564\pm 0.00284/16.5\pm 0.507$ 、 $0.0527\pm 0.00191/15.3\pm 0.180$ ;  $0.224\pm 0.00594/7.98\pm 0.149$ 、 $0.218\pm 0.00809/7.78\pm 0.185$ 、 $0.211\pm 0.0101/7.79\pm 0.237$ 、 $0.201\pm 0.00643/7.70\pm 0.0793 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。RSD 均小于 5.03%; RE 均在  $\pm 14.3\%$  范围内, RSD 和 RE 均小于 15%, 稳定性良好。

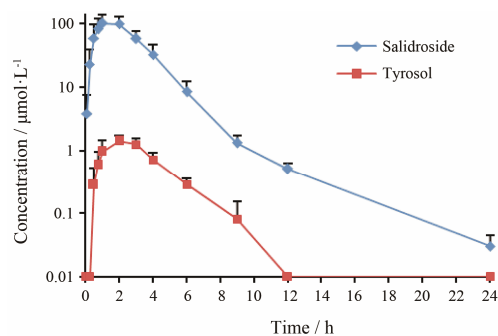
**1.6 稀释效应** 结果表明, 红景天苷的准确度在 88.8%~108% 之间, 精密率为 7.25%; 酪醇的准确度在 90.9%~112% 之间, 精密率为 7.32%。

### 2 Beagle 犬灌胃给药后的药动学研究

Beagle 犬灌胃给药后, 红景天苷和酪醇的平均药时曲线见图 3, 相应的药动学参数见表 1。结果表明, 红景天苷在 Beagle 犬体内吸收迅速, 血药浓度于 1 h 左右达峰, 随后逐渐下降, 其在体内脱去葡萄糖分子生成其苷元酪醇, 于给药后 0.5 h 在血浆中检测到酪醇的浓度, 与原形药物红景天苷相比略有延迟, 其血药浓度于 2 h 左右达峰, 峰浓度约为原形药物的 1%, 随后血药浓度逐渐下降。

## 讨论

在本研究的预实验过程中发现酪醇的质谱响应



**Figure 3** Mean plasma concentration-time profile of salidroside and tyrosol by UHPLC-MS/MS after oral administration of salidroside ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) to Beagle dogs.  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$

**Table 1** Pharmacokinetic parameters of salidroside and tyrosol after oral administration of salidroside ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) to Beagle dogs.  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$

Parameter	Salidroside	Tyrosol
$t_{\max} / \text{h}$	$1.35 \pm 0.602$	$2.00 \pm 0.707$
$C_{\max} / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$121 \pm 19.5$	$1.43 \pm 0.286$
$\text{AUC}_{0-t} / \text{h} \cdot \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$330 \pm 67.3$	$5.09 \pm 1.25$
$\text{AUC}_{0-\infty} / \text{h} \cdot \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$331 \pm 61.3$	$5.52 \pm 1.19$
$t_{1/2} / \text{h}$	$3.34 \pm 0.138$	$1.88 \pm 0.648$

较低,且在低浓度时响应波动较大,难以满足药代动力学研究的需求。分析造成该现象的原因与酚羟基的结构有关。文献<sup>[10, 11]</sup>报道针对酚羟基结构的液质检测常有采用衍生化来提高质谱响应灵敏度。通过与丹磺酰氯进行衍生化反应,可将含氮基团引入到酚类化合物结构中,形成在ESI条件下正离子方式检测时易离子化结构。丹磺酰氯衍生化产物通常会生成  $m/z$  171.0 特征子离子<sup>[10, 11]</sup>,如酪醇衍生物。但也有例外,Gong等<sup>[12]</sup>报道的淫羊藿苷衍生物这类分子量较大的苷类化合物会产生脱糖的子离子。红景天苷衍生物的质谱断裂方式与文献中淫羊藿苷衍生物的断裂方式一致,均为脱去糖分子,因此产物离子为  $m/z$  372.0。

衍生化反应的效率受多个因素影响。本文参考文献<sup>[10, 11]</sup>报道的丹磺酰氯衍生化条件,考察了4种因素对衍生化反应的影响。首先是衍生化反应时间(5、15、30、45和60 min)对质谱响应值的影响。如衍生化反应时间较短,不同样品衍生化速度会有差异,使得结果重现性较差。反应时间达30 min后质谱响应无明显变化,所以选择30 min作为反应时间。其次,考察了反应温度(30~80 °C)对待测物质谱响应值的影响,结果表明在60 °C条件下,待测衍生物的响应值最高。再次,考察了反应pH值(pH=8、9、10.5、11、12.5)对待测物质谱响应值的影响,结果表明,在pH=9时待测衍生物的响应值最高。最后,

考察了丹磺酰氯浓度对待测物质谱响应值的影响,结果表明,在 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 丹磺酰氯浓度条件下,衍生化反应达到饱和。因此,本文最终确定的衍生化反应条件如下:在60 °C条件下,待测物、内标与 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 丹磺酰氯在pH=9碱性环境中反应30 min。

在色谱分离方面,本文对比了ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEHC<sub>18</sub>、ACQUITY UPLC<sup>®</sup> HSS和ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEHShield RP<sub>18</sub>等色谱柱对衍生物分离的影响。研究发现ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEHC<sub>18</sub>色谱柱的保留时间理想,且峰形较好。此外,在流动相中加入0.1%甲酸有助于改善峰形、提高正离子条件下的ESI效率。在选择内标时,要考虑其结构要与红景天苷类似,并且要含有酚羟基或氨基等能与丹磺酰氯进行衍生化反应的基团。熊果苷结构与红景天苷相近,峰形较好且保留时间与红景天苷接近,适合作为本测定方法的内标。

本实验也考察了非衍生化血浆样品处理方法。由于红景天苷极性大,直接采用蛋白沉淀方式有很强的基质效应,而采用液液萃取方式提取回收率又太低。因此,在衍生化之前首先要进行蛋白沉淀;衍生化之后,由于衍生化反应物的极性降低,采用甲基叔丁基醚对待测物和内标进行萃取,提取回收率高且稳定。另外,甲基叔丁基醚还能将反应体系中的碱去除,避免了样品中含有碱而导致的基质效应。

本实验首次通过衍生化反应对红景天苷、酪醇和内标结构进行修饰,在提高检测灵敏度的同时降低了实验成本、减少了样品使用量。对比未衍生化处理样品,此法对红景天苷和酪醇的分析灵敏度均有较大提高,定量下限为 $0.02/0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $S/N > 10$ ),酪醇的定量下限 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 满足实验要求。本方法极大提高了待测物的分析水平,为红景天苷和酪醇的临床前药动力学研究提供了方法学基础,并且为含有酚羟基或氨基的苷类化合物的体内浓度测定以及药代动力学研究提供了新方法。

## References

- [1] Li FL. Research progress in pharmacological effects of salidroside from *Rhodiola* [J]. Mod Food Sci Technol (现代食品科技), 2013, 29: 916–922.
- [2] Li Y, Zhang HF, Li XG. Research advance on pharmacological action of salidroside [J]. J Jilin Med Coll (吉林医药学院学报), 2007, 28: 175–177.
- [3] Song W, Shi XF, Zhang RT, et al. Content determination of rhodioloside and tyrosol in compound *Rhodiola* buccal tablets by HPLC [J]. China Pharm (中国药房), 2011, 22: 621–622.

- [4] Yi ZB, Lai XP, Xu DJ. Simultaneous determination of salidroside and tyrosol in *Rhodiolarosea* by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2009, 40: 1827–1829.
- [5] Yang XY, Lu QQ, Lou DJ, et al. Simultaneous determination of salidroside, tyrosol and gallate in *Rhodiola rosea* by HPLC [J]. *Chin J Anal Lab (分析实验室)*, 2009, 28: 57–60.
- [6] Lin JZ, Zhang DK, Zou L, et al. Research on pharmacokinetics of salidroside and tyrosol in rats [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2014, 36: 1845–1849.
- [7] Guo N, Hu ZW, Fan XX, et al. Simultaneous determination of salidroside and its aglycone metabolite *p*-tyrosol in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Molecules*, 2012, 17: 4733–4754.
- [8] Wu QF, Li G, Fu Y. Simultaneous determination of salidroside and tyrosol in rat plasma by LC-MS/MS and application to their pharmacokinetic study [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理)*, 2013, 24: 169–172.
- [9] Liu HY, Li D, Yong Y, et al. Comparison of three derivatization reagents for the simultaneous determination of highly hydrophilic pyrimidine antitumor agents in human plasma by LC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B*, 2012, 893–894: 49–56.
- [10] Pernica M, Poloucká P, Seifertová M, et al. Determination of alkylphenols in water samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry after pre-column derivatization with dansyl chloride [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1417: 49–56.
- [11] Zhuang XY, Zhong Y, Mei Y, et al. Pre-column derivatization combined with UHPLC-MS/MS for rapid and sensitive quantification of bakuchiol in rat plasma [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 75: 18–24.
- [12] Gong Y, Yip SC, Thamarai SK, et al. Trace analysis of icariin in human serum with dansyl chloride derivatization after oral administration of epimedium decoction by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 860: 166–172.