

LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中黄酮醇糖苷及其主要代谢物

董磊^{1,2}, 刘金秋², 李亮², 陈笑艳², 单伟光¹, 钟大放^{1,2*}

(1. 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘要: 黄酮醇糖苷是处于临床试验阶段的新药, 拟用于治疗高脂血症。本文建立了液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 法测定 SD 大鼠血浆中的黄酮醇糖苷 (M0) 及其代谢物苷元 (M1) 和葡萄糖醛酸结合物 (M2): 采用 d_6 -黄酮醇糖苷作为内标, 血浆样品经甲醇 (含 0.2% 甲酸) 沉淀蛋白后, 通过 XDB C₁₈ (50 mm×4.6 mm, 1.8 μm) 色谱柱分离, 以去离子水 (含 0.2% 甲酸)-甲醇为流动相梯度洗脱, 色谱运行时间为 4.5 min。采用电喷雾电离源 (ESI), 以多反应监测模式 (MRM) 检测。用于定量分析 M0、M1 和 M2 的离子对分别为 m/z 461.3 → m/z 299.1、 m/z 299.1 → m/z 283.1 和 m/z 475.0 → m/z 299.1, 用于定量分析内标 d_6 -黄酮醇糖苷的离子对为 m/z 467.3 → m/z 305.1。本方法经验证后, 成功应用于 SD 大鼠药动学研究。SD 大鼠灌胃给予黄酮醇糖苷 30 mg·kg⁻¹ 后, M0 的 C_{max} 为 (341 ± 106) ng·mL⁻¹、 AUC_{0-t} 为 (1 960 ± 725) h·ng·mL⁻¹, M1 在血浆中的含量低于分析方法的定量下限 2 ng·mL⁻¹, 无法测定相应浓度计算 C_{max} 和 AUC_{0-t} , M2 的 C_{max} 为 (1 720 ± 843) ng·mL⁻¹、 AUC_{0-t} 为 (8 510 ± 2 920) h·ng·mL⁻¹, M2 的 C_{max} 约为 M0 的 5.0 倍, AUC_{0-t} 约为 M0 的 4.3 倍。结果表明, SD 大鼠灌胃给予黄酮醇糖苷后, 在体内主要以原形 M0 和代谢物 M2 的形式存在, 且 M2 的暴露量显著高于 M0, 推测黄酮醇糖苷经口服给药后在体内经肠菌群水解成苷元形式被吸收, 经历较强的首过代谢后, M1 进一步生成葡萄糖醛酸结合物。本文首次测定了黄酮醇糖苷在大鼠血浆中的主要代谢物, 为临床药动学试验设计提供了依据。

关键词: 液相色谱-串联质谱; 黄酮醇糖苷; 葡萄糖醛酸结合物; 药动学

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 08-1344-07

Simultaneous determination of flavonol glycoside and its major metabolites by LC-MS/MS in rat plasma

DONG Lei^{1,2}, LIU Jin-qiu², LI Liang², CHEN Xiao-yan², SHAN Wei-guang¹, ZHONG Da-fang^{1,2*}

(1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China;

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

Abstract: Flavonol glycoside is in clinical trials for treatment of hyperlipidemia. An accurate and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed and validated for the simultaneous determination of flavonol glycoside (M0), aglycone (M1) and glucuronide conjugate (M2) in rat plasma. d_6 -Flavonol glycoside was used as internal standard (IS). After extraction from the plasma by protein precipitation, the analytes and internal standard were separated on a XDB C₁₈ column (50 mm×4.6 mm, 1.8 μm) using a gradient elution procedure. The mobile phase consisted of methanol and water (0.2% formic acid) at a flow rate of 0.6 mL·min⁻¹. The total run time was 4.5 min. Positive electrospray ionization was performed using multiple reaction monitoring (MRM) with transitions of m/z 461.3 → m/z 299.1 for M0, m/z 299.1 → m/z 283.1 for M1, m/z 475.0 → m/z 299.1 for M2, and m/z 467.3 → m/z 305.1 for d_6 -flavonol glycoside. The method was validated and successfully applied to the pharmacokinetics study of flavonol glycoside in SD rats which

收稿日期: 2018-01-31; 修回日期: 2018-03-31.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-21-50800738, E-mail: dfzhong@simm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0086

were given flavonol glycoside ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) by gavage. The C_{\max} of M0 is $(341 \pm 106) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and AUC_{0-t} is $(1960 \pm 725) \text{ h} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, while the C_{\max} of M2 is $(1720 \pm 843) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and AUC_{0-t} is $(8510 \pm 2920) \text{ h} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. The results suggest that flavonol glycoside existed mainly in the form of M0 and M2 in rats. After flavonol glycoside being hydrolyzed by the intestinal flora, it was absorbed in the form of aglycone and further metabolized to M2 after the first-pass effect. In this paper, the main metabolites of flavonol glycoside in rat plasma were determined for the first time, which provided a basis for the design of clinical pharmacokinetic experiment.

Key words: LC-MS/MS; flavonol glycoside; glucuronide conjugate; pharmacokinetics

黄酮醇糖苷 (3',4'-二甲氧基黄酮醇-*D*-葡萄糖苷) 是人工合成的黄酮醇糖苷类化合物, 能够改善血液循环, 降低胆固醇, 其原型为某一中药提取的黄酮化合物 3,3',4'-三羟基黄酮^[1]。上海捌加壹医药科技有限公司研究开发一类新药黄酮醇糖苷, 目前处于临床试验阶段。

王秀云等^[2]采用 LC-MS/MS 法, 以泮托拉唑为内标测定黄酮醇糖苷在 SD 大鼠体内的血浆浓度。该实验测定了 SD 大鼠灌胃给予黄酮醇糖苷后血浆中原形药物黄酮醇糖苷的浓度, 发现其药时曲线呈现双峰现象, 但没有给出合适的解释, 且该实验仅测定 SD 大鼠血浆中原形药物的浓度, 没有测定相应代谢物, 所得数据不能完整地体现黄酮醇糖苷在 SD 大鼠体内的药代动力学特点。娄琮等^[3]采用 LC-MS/MS 法, 以泮托拉唑为内标测定黄酮醇糖苷在 SD 大鼠体内的组织分布及排泄。该实验结果表明, 黄酮醇糖苷灌胃后快速广泛地分布于各组织中, 且无长时间蓄积, 在尿液、粪便、胆汁中排泄量极少, 说明黄酮醇糖苷在大鼠体内存在着广泛的代谢过程, 大多以代谢产物形式排出体外, 但关于黄酮醇糖苷在 SD 大鼠体内的代谢途径以及以何种代谢物形式排出体外等均未得出结论。

本实验室通过 UPLC/Q-TOF MS 技术, 分析了受试者口服黄酮醇糖苷片后血浆和尿样中黄酮醇糖苷及代谢产物的相关信息, 在血浆中主要检测到原形药物黄酮醇糖苷 (M0) 和葡萄糖醛酸结合物 (M2), 在尿样中除 M0 和 M2 外还检测到少量的苷元 (M1), 结构式见图 1。结果表明代谢物的暴露量较高, 在药

物处置过程中占有重要地位, 但尚未有文献报道黄酮醇糖苷在人体或动物体内的代谢情况。

本实验旨在建立准确、快速、灵敏的 LC-MS/MS 法同时测定 SD 大鼠血浆中黄酮醇糖苷、苷元和葡萄糖醛酸结合物, 并将验证后的方法应用于临床前药动学研究, 以支持临床药动学试验设计。

材料与方法

药品和试剂 黄酮醇糖苷 (含量 95.72%)、苷元 (含量 99.0%)、葡萄糖醛酸结合物 (含量 96.2%)、*d*₆-黄酮醇糖苷和黄酮醇糖苷原料药均由第二军医大学、上海捌加壹医药科技有限公司提供, 甲醇 (德国 Merck 公司)、乙腈 (德国 Merck 公司)、甲酸 (上海 TCI 公司) 均为色谱纯, 二甲亚砜 (国药集团化学试剂有限公司) 为分析纯, 去离子水由 Millipore 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, 加拿大 AB Sciex 公司; 岛津液相色谱系统 (包括 DGU-20A3 型脱气机, LC-20AD 型二元液相泵, SIL-20AC 型自动进样器和 CTO-20A 型柱温箱), 日本岛津公司。

色谱条件 分析柱: XDB C₁₈ (50 mm × 4.6 mm, 1.8 μm, Agilent); 预柱: C₁₈ 保护柱 (4 mm × 3.0 mm, 5 μm, 美国 Phenomenex 公司); 流动相: A 相 (含 0.2% 甲酸的去离子水)-B 相 (甲醇); 采用的梯度洗脱程序如下: 0~0.5 min, 65% B; 0.5~1.3 min, 65%~95% B; 1.3~3.0 min, 95% B; 3.0~3.1 min, 95%~65% B; 3.1~4.5 min, 65% B; 流速: 0.6 mL·min⁻¹; 柱

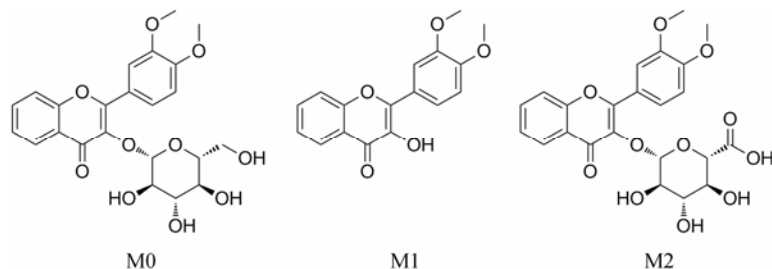


Figure 1 The chemical structures of flavonol glycoside (M0), aglycone (M1) and glucuronide conjugate (M2)

温为 40 °C; 进样量: 2.00 μL 。

质谱条件 离子源为电喷雾电离源; 正离子方式检测; 源喷射电压为 5 500 V; 温度为 500 °C; 离子源气体 1 (N_2) 压力为 50 psi (1 psi \approx 6.9 kPa); 离子源气体 2 (N_2) 压力为 50 psi; 气帘气体 (N_2) 压力为 35 psi; 扫描方式为多反应监测, 碰撞气压力为 9 psi; 扫描时间为 100 ms。待测物的离子反应分别为: m/z 461.3 \rightarrow m/z 299.1 (M0)、 m/z 299.1 \rightarrow m/z 283.1 (M1)、 m/z 475.0 \rightarrow m/z 299.1 (M2)、 m/z 467.3 \rightarrow m/z 305.1 (d_6 -黄酮醇糖苷)。

标准系列样品和质控样品的制备 分别精密称取黄酮醇糖苷、苷元、葡萄糖醛酸结合物对照品各两份, 用二甲亚砜溶解并用甲醇定容, 获得质量浓度均为 1.00 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 M0、M1、M2 储备液各两份, 分别用于配制标准系列样品和质控样品。

以甲醇-水 (50 : 50, v/v) 稀释 M0、M1、M2 储备液及质控储备液, 获得标准系列溶液和质控溶液, 分别取标准系列溶液 10 μL , 加入大鼠空白血浆 190 μL , 获得 M0/M1/M2 浓度为 2.00/2.00/5.00、4.00/4.00/10.0、10.0/10.0/25.0、20.0/20.0/50.0、50.0/50.0/125、100/100/250、200/200/500、400/400/1 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准系列样品。以甲醇稀释内标储备液 (970 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 获得 8 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标工作溶液。用大鼠空白血浆配制质控样品 [M0/M1/M2 质量浓度为: 2.00/2.00/5.00 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (LLOQ)、6.00/6.00/15.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (LQC)、40.0/40.0/100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (MQC) 和 320/320/800 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (HQC)] 均储存于 -70 °C 条件下备用。

血浆样品预处理 血浆样品预处理采用蛋白沉淀法。向 35 μL 大鼠血浆样品中加入内标工作溶液 35 μL 和甲醇 (含 0.2% 甲酸) 140 μL , 涡流混合 10 min 后, 离心 15 min (3 700 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 取上清液 130 μL 加入去离子水 (含 0.2% 甲酸) 70 μL , 涡流混合 10 min, 取 2.00 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

方法验证 对建立的方法进行方法验证, 参照中国药典 2015 年版指导原则和相关国际规范的相关要求^[4, 5], 从方法的选择性、标准曲线和定量下限、精密度和准确度、稳定性、回收率、基质效应和稀释效应等方面进行方法验证。

选择性 分别取 6 个不同来源的大鼠空白血浆样品以及用相应大鼠空白血浆配制的 LLOQ 样品进行 LC-MS/MS 分析测定, 考察不同来源空白血浆中的内源性物质是否干扰待测物及内标的测定。

标准曲线 大鼠血浆样品 2.00/2.00/5.00 ~ 400/400/1 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 8 个浓度点, 分别按照“血浆样品

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, 采用加权 ($W = 1/X^2$) 最小二乘法进行回归运算, 求得的直线回归方程即为标准曲线。

精密度与准确度 取大鼠低、中、高 3 个浓度质控样品, 按照“血浆样品预处理”项下操作, 每个浓度进行 6 样本分析并在 3 日内测试, 分别根据当日标准曲线计算每一样本的测得浓度并根据 QC 样品结果计算本方法日内、日间精密度和准确度。

基质效应 分别取 6 个不同来源大鼠空白血浆和一份空白溶血血浆 50.0 μL 加入甲醇 (含 0.2% 甲酸) 200 μL , 涡流 10 min, 离心 15 min (3 700 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 取上清液 168 μL 于另一试管, 分别加入对应的低、高浓度对照质控溶液 7.00 μL 和 35.0 μL 内标溶液, 涡流 10 min 后取上清液 130 μL , 加入去离子水 (含 0.2% 甲酸) 70.0 μL , 涡流 10 min, 取 2.00 μL 进行 LC-MS/MS 分析, 获得相应峰面积 (A)。同时另取去离子水 50 μL 代替大鼠空白血浆, 按上述方法操作获得相应峰面积 (B)。以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算基质效应, 公式为 $A/B \times 100\%$, 并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。

回收率 采用大鼠空白血浆配制的低、中、高 3 个浓度的血浆样品, 按照“血浆样品预处理”项下操作, 每个浓度进行 6 样本分析。同时另取大鼠空白血浆 50.0 μL 加入甲醇 (含 0.2% 甲酸) 200 μL , 涡流 10 min, 离心 15 min (3 700 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 取上清液 168 μL 于另一试管, 加入对应的低、中、高浓度对照质控溶液 7.00 μL 和内标溶液 35.0 μL , 涡流 10 min 后取上清液 130 μL , 加入去离子水 (含 0.2% 甲酸) 70.0 μL , 涡流 10 min, 取 2.00 μL 进行分析, 获得相应峰面积 ($n = 3$)。用提取后色谱峰面积与未经提取的色谱峰面积之比计算提取回收率。

稳定性 考察了黄酮醇糖苷、苷元和葡萄糖醛酸结合物大鼠血浆样品室温放置 6 h, 全血样品室温放置 2 h, 经沉淀蛋白处理后室温放置 6 h, 自动进样器放置 24 h, 大鼠血浆样品 -20 °C 经历 3 次冷冻-解冻循环, 大鼠血浆样品 -70 °C 经历 3 次冷冻-解冻循环的稳定性。

药动学研究及数据分析 动物实验部分在中国科学院上海药物研究所实验动物中心完成。SD 大鼠, 体重 180 ~ 220 g, 雌雄各半; 年龄 7 ~ 8 周, 给药前禁食 12 h, 自由饮水, 给药后 4 h 统一进食。SD 大鼠灌胃给予黄酮醇糖苷原料药 30 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 分别于给药前 0 h 和给药后 10 min、20 min、40 min、1.0 h、2.0 h、

4.0 h、6.0 h、8.0 h、10 h、24 h 和 32 h 经眼球后静脉丛取血 0.2 mL 置于 EDTA-K₂ 抗凝试管中, 离心 5 min (11 600×g, 4 °C) 分离血浆, -70 °C 保存待测。

所得的血浆浓度-时间数据采用 Phoenix Win Nonlin[®] 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

本实验首先考察了 M0、M1 和 M2 在 ESI 离子源下的质谱响应, 结果表明在 ESI 源正离子模式下响应较好, 均可产生 [M+H]⁺ 峰和 [M+Na]⁺ 峰, 所以选择了 ESI 源正离子模式。在正离子检测模式下, 选择性对 [M+H]⁺ 峰进行产物离子扫描, 并对碰撞能量和去簇电压进行条件优化, 确定用于定量分析 M0、M1 和 M2 的离子对分别为 m/z 461.3 → m/z 299.1、 m/z 299.1 → m/z 283.1 和 m/z 475.0 → m/z 299.1, 用于定量分析内标 *d*₆-黄酮醇糖苷的离子对为 m/z 467.3 → m/z 305.1。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 结果表明, 大鼠空白血浆中的内源性物质不干扰 M0、M1、M2 的测定, 同时同位素内标不干扰待测物的测定, 待测物对内标也无影响。典型色谱图见图 3: M0 的出峰时间约 1.47 min, M2 的出峰时间约 1.50 min, M1 的出峰时间在 2.5 min 左右, 在 M1 的离子通道中 1.50 min 处的色谱峰来自于 M0 和

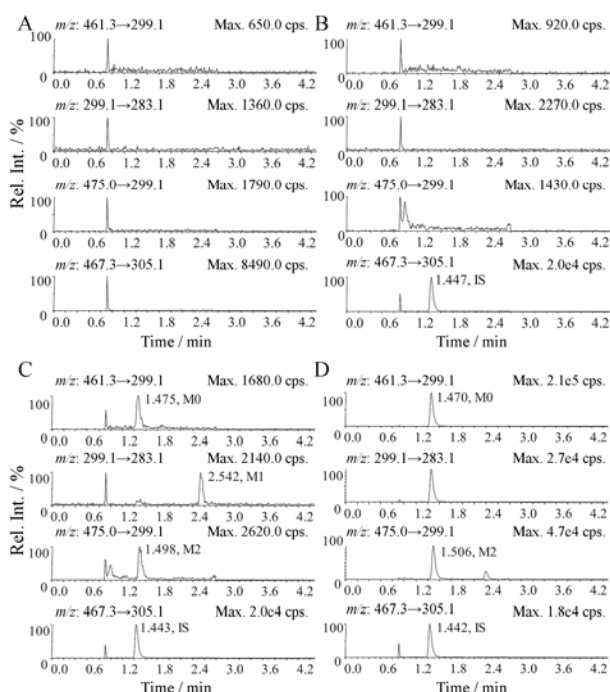


Figure 3 Typical MRM chromatograms of M0, M1, M2 and *d*₆-flavonol glycoside in rat plasma. A: Blank plasma; B: Blank plasma spiked with 8 ng·mL⁻¹ *d*₆-flavonol glycoside; C: LLOQ (2.00/2.00/5.00 ng·mL⁻¹) sample spiked with 8 ng·mL⁻¹ *d*₆-flavonol glycoside; D: A plasma sample spiked with 8 ng·mL⁻¹ *d*₆-flavonol glycoside of 40 min after oral 30 mg·kg⁻¹ flavonol glycoside

M2 的源内裂解。

2.2 标准曲线和定量下限 求得的标准曲线的相关系数 (r^2) 均大于 0.99。测定大鼠血浆样品中 M0、M1、M2 的线性范围分别为 2.00~400、2.00~400 和 5.00~1 000 ng·mL⁻¹。典型标准曲线方程为: M0,

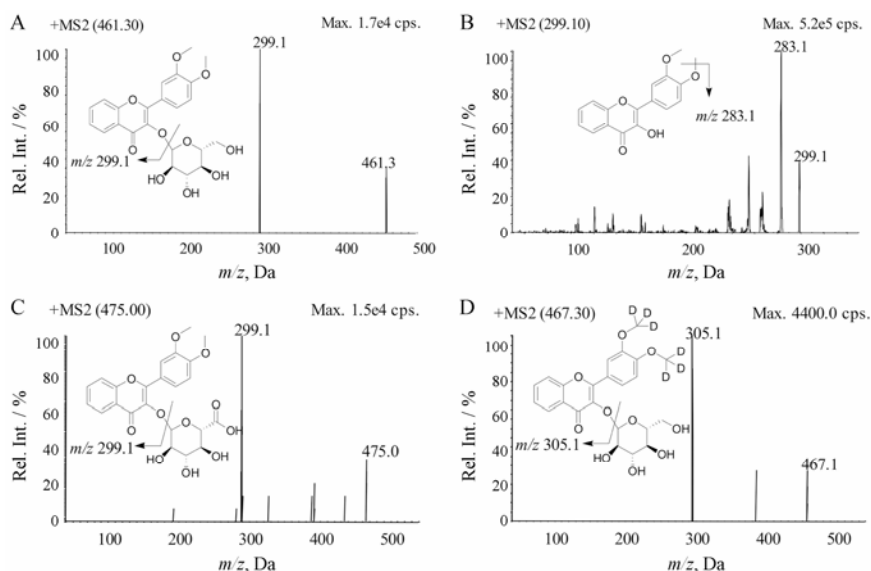


Figure 2 The chemical structures and product mass spectra of [M+H]⁺ ions of M0 (A), M1 (B), M2 (C) and *d*₆-flavonol glycoside (IS, D)

$y = 0.0581x + 0.01$ ($r^2 = 0.9986$); M1, $y = 0.0671x - 0.00483$ ($r^2 = 0.9980$); M2, $y = 0.0309x - 0.00841$ ($r^2 = 0.9980$)。取大鼠 LLOQ 血浆样品 (M0/M1/M2 质量浓度为 2.00/2.00/5.00 ng·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。求得该质量浓度 M0 的日内精密密度为 5.4%, 日间精密密度为 6.5%, 准确度 (RE) 为-0.6%; M1 的日内精密密度为 6.0%, 日间精密密度为 8.2%, 准确度为-1.5%; M2 的日内精密密度为 5.1%, 日间精密密度为 6.4%, 准确度为-0.4%。实验结果表明, LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中 M0、M1、M2 的定量下限分别为 2.00、2.00 和 5.00 ng·mL⁻¹。

2.3 精密度与准确度 准确度与精密度数据见表 1。大鼠每一浓度水平 M0 的 QC 样品的日内精密密度均小于 5.4%, 日间精密密度均小于 3.7%, 准确度在-0.4%~3.3%; 每一浓度水平 M1 的 QC 样品的日内精密密度均小于 4.0%, 日间精密密度均小于 5.9%, 准确度在 2.2%~5.2%; 每一浓度水平 M2 的 QC 样品的日内精密密度均小于 3.0%, 日间精密密度均小于 3.1%, 准确度在 0.1%~1.7%。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。

Table 1 The intra-and inter-day precision and accuracy of the QC samples of M0, M1 and M2. $n=6, \bar{x} \pm s$

Compd.	Concentration /ng·mL ⁻¹	Mean ± SD /ng·mL ⁻¹	Precision (RSD)/%		Accuracy (RE)/%
			Intra-day	Inter-day	
M0	2.00	1.99 ± 0.13	5.4	6.5	-0.6
	6.00	6.20 ± 0.23	5.4	3.7	3.3
	40.0	40.6 ± 1.1	3.4	2.7	1.6
	320	319 ± 6	2.7	2.0	-0.4
M1	2.00	1.97 ± 0.16	6.0	8.2	-1.5
	6.00	6.21 ± 0.36	4.0	5.9	3.5
	40.00	42.1 ± 1.6	3.8	3.8	5.2
	320	327 ± 8	2.8	2.3	2.2
M2	5.00	4.98 ± 0.32	5.1	6.4	-0.4
	15.0	15.2 ± 0.5	3.0	3.1	1.4
	100	102 ± 2	2.7	2.2	1.7
	800	801 ± 17	2.9	2.1	0.1

2.4 样品处理回收率和基质效应 大鼠血浆样品经蛋白沉淀处理后, M0 在低、中、高浓度的回收率分别为 108.0%、103.2% 和 100.3%, M1 在低、中、高浓度的回收率分别为 108.1%、107.6% 和 109.9%, M2 在低、中、高浓度的回收率分别为 96.7%、96.2% 和 92.8%。在大鼠血浆样品中, M0 在低、高浓度经内标校正后的基质效应分别为 102.0% 和 100.1%, 相对标准差分别为 3.3% 和 1.1%; M1 在低、高浓度经内标校

正后的基质效应分别为 74.2% 和 76.1%, 相对标准差分别为 11.6% 和 5.8%; M2 在低、高浓度经内标校正后的基质效应分别为 90.5% 和 91.5%, 相对标准差分别为 6.6% 和 4.2%。结果表明, 待测物在本实验选择的色谱和质谱条件下, 可忽略基质效应的影响。

2.5 稳定性 本文考察了黄酮醇糖苷、苷元和葡萄糖醛酸结合物低、高两浓度血浆、全血样品在不同储存条件下的稳定性: 大鼠全血样品室温放置 2 h; 大鼠血浆样品室温放置 6 h; 血浆样品经预处理后室温放置 6 h; 血浆样品经预处理后自动进样器放置 24 h; 经历-20℃下 3 次冷冻-解冻循环; 经历-70℃下 3 次冷冻-解冻循环, 在上述条件下, 血浆及全血样品均稳定。

2.6 稀释实验 本实验考察了血浆浓度超出定量上限的大鼠血浆样品, 经空白大鼠血浆稀释后的准确度。取 M0/M1/M2 的稀释质控样品 (大鼠血浆样品质量浓度为 1 600/1 600/4 000 ng·mL⁻¹), 用空白大鼠血浆稀释 5 倍后, 按“血浆样品预处理”项下操作, 进行 6 样本分析。结果表明, 大鼠血浆样品经空白大鼠血浆稀释 5 倍后测定不影响结果的准确度。

3 药动学研究

将所建立并经过验证的方法应用于黄酮醇糖苷的动物药动学研究。SD 大鼠灌胃给予黄酮醇糖苷 30 mg·kg⁻¹后, M0 和 M2 的药时曲线见图 4, M0、M1 和 M2 的药动学参数见表 2。

讨论

目前, 运用 LC-MS/MS 法研究其他黄酮类化合物的药动学生物分析方法已有很多报道^[6-12], 但没有黄酮醇糖苷代谢物的相关报道。本实验将稳定同位素标记物 d₆-黄酮醇糖苷作为待测物 M0、M1 和 M2 的内标, 减少了基质对于定量测定的影响, 提高了分析结果的准确度与精密密度。实验过程中, M0 和 M2 发生

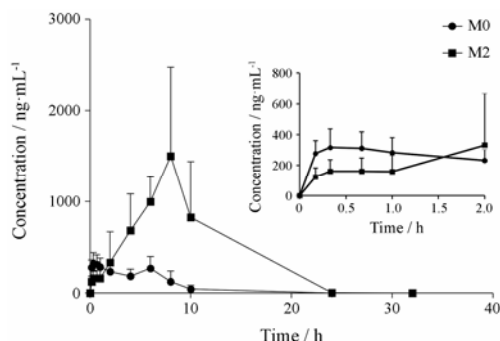


Figure 4 Plasma concentration-time curves of M0 and M2 in rats after oral 30 mg·kg⁻¹ flavonol glycoside. $n=6, \bar{x} \pm s$

Table 2 Pharmacokinetic parameters of M0, M1 and M2 in rat plasma (30 mg·kg⁻¹). *n* = 6, $\bar{x} \pm s$. N.A.: Not applicable

Parameter	Rat		
	M0	M1	M2
t_{max}/h	1.36 ± 2.28	N.A.	8.00 ± 1.26
$C_{max}/ng \cdot mL^{-1}$	341 ± 106	< 2	1 720 ± 843
$AUC_{0-t}/h \cdot ng \cdot mL^{-1}$	1 960 ± 725	N.A.	8 510 ± 2 920
$AUC_{0-\infty}/h \cdot ng \cdot mL^{-1}$	2 350 ± 571	N.A.	N.A.
$t_{1/2}/h$	3.24 ± 2.94	N.A.	N.A.
$MRT_{0-\infty}/h$	6.22 ± 2.89	N.A.	N.A.

源内裂解,影响 M1 的测定,通过改变液相色谱条件,本实验实现了 M1 与 M0 和 M2 的色谱分离,避免了 M0 和 M2 在离子源内裂解而对 M1 测定的影响。经考察, M0、M1 和 M2 在本实验条件下均稳定。

本实验对黄酮醇糖苷进行了定量分析,并首次对黄酮醇糖苷的代谢物苷元和葡萄糖醛酸结合物进行了直接测定。SD 大鼠经灌胃给予黄酮醇糖苷 30 mg·kg⁻¹后, M0 的 C_{max} 为 (341 ± 106) ng·mL⁻¹、 AUC_{0-t} 为 (1 960 ± 725) h·ng·mL⁻¹; M1 在血浆中的含量低于分析方法的定量下限 2 ng·mL⁻¹,无法测定相应浓度计算 C_{max} 和 AUC_{0-t} ; M2 的 C_{max} 为 (1 720 ± 843) ng·mL⁻¹、 AUC_{0-t} 为 (8 510 ± 2 920) h·ng·mL⁻¹。其中 M2 的 C_{max} 为 M0 的 5.0 倍, AUC_{0-t} 为 M0 的 4.3 倍。结果表明,在 SD 大鼠血浆中,黄酮醇糖苷主要以原形和代谢物葡萄糖醛酸结合物这两种形式存在。

根据黄酮类化合物如黄芩苷^[13]、灯盏乙素^[14, 15]等的相关研究,推测黄酮醇糖苷经口服给药后在体内经肠菌群水解成苷元被吸收,经历较强的首过代谢, M1 在肝脏中进一步发生葡萄糖醛酸化反应从而生成 M2。在 SD 大鼠体内, M1 的含量极少,仅能测得少数时间点的血药浓度,可能是由于 M1 发生葡萄糖醛酸化生成 M2 的速度远大于 M0 水解生成 M1 的速度。且 M0 的药时曲线明显存在双峰现象,体现为黄酮醇糖苷在大鼠体内很快达峰(约 1.36 h),之后约于 6 h 左右出现浓度回升现象,这可能是因为胃肠道的不同部位存在多个吸收位点,黄酮醇糖苷在不同部位的吸收速率并不一致而引起双峰现象。

本实验确定了大鼠灌胃给予黄酮醇糖苷后体内主要代谢物形式,并首次测定代谢物的血药浓度,对黄酮醇糖苷的代谢途径做出推测,为黄酮醇糖苷的临床试验设计提供了依据。结果表明,对于黄酮类化合物的药动学研究,不仅要关注原形药物,而且更要关注其代谢物,后者在血浆中的暴露量通常远高于前者。

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] Jin YS, Jiang YY, Wu QY, et al. 3-Oxy-3',4'-dimethoxy flavonoid with hypolipidemic effect: CN, 101244057 [P]. 2008-08-20.
- [2] Wang XY. Quality Control and Therapeutic Drug Monitoring on SD Rat of Innovative Drugs GDH (创新药物 GDH 的质量控制及其在 SD 大鼠体内血药浓度监测) [D]. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2015.
- [3] Lou Q. The Study on Tissue Distribution and Excretion of GDH in Rats (GDH 在大鼠体内的组织分布和排泄研究) [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2015.
- [4] European Medicines Agency. Guideline on Bioanalytical Method Validation [S/OL]. London: European Medicines Agency. 2011 [2015-12-10]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf.
- [5] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2015 ed. Vol 4. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 363-368.
- [6] Zhong DF, Yang BH, Chen XY, et al. Determination of scutellarin in rat plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection [J]. J Chromatogr B, 2003, 796: 439-444.
- [7] Li CR, Zhang L, Lin G, et al. Identification and quantification of baicalein, wogonin, oroxylin A and their major glucuronide conjugated metabolites in rat plasma after oral administration of Radix Scutellariae product [J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 54: 750.
- [8] Duan KF, Yuan ZF, Guo W, et al. LC-MS/MS determination and pharmacokinetic study of five flavone components after solvent extraction/acid hydrolysis in rat plasma after oral administration of *Verbena officinalis* L. extract [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 135: 201-208.
- [9] Fong SY, Wong YC, Zuo Z. Development of a SPE-LC/MS/MS method for simultaneous quantification of baicalein, wogonin, oroxylin A and their glucuronides baicalin, wogonoside and oroxyloside in rats and its application to brain uptake and plasma pharmacokinetic studies [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 97: 9-23.
- [10] Chang L, Ren YP, Cao L, et al. Simultaneous determination and pharmacokinetic study of six flavonoids from Fructus Sophorae extract in rat plasma by LC-MS/MS [J]. J Chromatogr B, 2012, 904: 59-64.
- [11] Wan LL, Guo C, Yu Q, et al. Quantitative determination of

- apigenin and its metabolism in rat plasma after intravenous bolus administration by HPLC coupled with tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 855: 286–289.
- [12] Tong L, Wan MX, Zhang LH, et al. Simultaneous determination of baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin, oroxylin A and chrysin of Radix Scutellariae extract in rat plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 70: 6–12.
- [13] Xing J, Chen XY, Zhong DF. Absorption and enterohepatic circulation of baicalin in rats [J]. *Life Sci*, 2005, 78: 140–146.
- [14] 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: 1345–1352.
- [15] Gao CY, Chen XY, Zhong DF. 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.

东阳光简介

深圳市东阳光实业发展有限公司，现共有员工近 2 万人；主要从事医药、电子材料和健康养生三大产业，在国内拥有广东长安、乳源、湖北宜昌、西藏林芝、贵州遵义五大基地，已拥有中国东阳光科、香港东阳光药两家上市公司，正在积极筹建美国东阳光药，是一个充满希望与活力、正在铸就百年基业的高科技大型股份制企业。

东阳光于 2005 年创办了研究总院，下设东阳光科和东阳光药两个研究院，六大研究所，通过 12 年持之以恒的秉持“安全、有效、可控”的理念，已拥有了持续的、系统的研发能力，并与欧美研发理念接轨，可与国际研发机构衔接。

研究院建立了科学、完善的研发管理体系：在行政上设立了纵向的部和横向的项目组，以硬件和软件建设为中心，项目组以推进单个项目的进度为中心，有分有合交替发展；可以全程独立地进行各类大小分子新药的研发；在分配上设立了项目股权，每个研发人员按职责、工作量、贡献大小都拥有相应的项目成功后的分红权利，底薪、预分红款、正式分红款、科技奖励条例确保了东阳光的研发是一个心往一处想、劲往一处使，竞争而不斗争、补台而不拆台的利益共同体。

研究院有 40 多名外籍和海归专家，100 余名博士，1200 余名硕士，共有 2100 余名研发人员，更能持续发展的是拥有 30 余名国际级的化学结构创造师，目前拥有 5 位中组部“千人计划”、1 位科技部“青年领军人才”；从而形成了特有的“海内精英主导、海归专家指导、海外顾问引导”的研发模式。

东阳光获得了 2 个国家级实验室，国家科技部的抗感染药物国家重点实验室和国家中医管理局的冬虫夏草繁育与产品研发国家重点实验室；2 个项目进入国家“863”计划，15 个项目获得国家“十一五”、“十二五”重大新药专项，制剂国际化与产业化国家级技术中心；两个国家博士后流动站；获得了广东省“企业研发中心”“技术中心”“抗病毒企业重点实验室”“抗体药物工程实验室”等多个研发平台。

东阳光研发项目主要涵盖新药、生物药、首仿药、仿制药、宠物药、农药、化妆品、保健品、新材料。东阳光坚定不移地走高科技、研发创新之路。