

文章编号 1006-8147(2017)04-0372-05

论 著

HPLC-MS 法测定大鼠血浆中银杏萜内酯的浓度及药代动力学研究

佟若菲^{1,2}, 张 因², 李维超², 房志仲³

(1.天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2.天津市儿童医院药剂科, 天津 300074; 3.天津医科大学药学院, 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070)

摘要 目的:建立 HPLC-MS 法同时测定大鼠血浆中银杏内酯 A (GA)、银杏内酯 B (GB)、银杏内酯 C (GC) 浓度的方法,经系统方法学验证后,应用于大鼠的药代动力学研究。方法:以酮洛芬为内标,以甲醇-10 mmol/L 乙酸铵水溶液为流动相,血浆样品中的 GA、GB、GC 和内标经 ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱分离后,采用电喷雾离子源 (ESI), 负离子一级全扫描模式检测。将建立的方法应用于大鼠静脉注射舒血宁的药代动力学研究。药动学参数由 DAS2.0 统计软件进行计算。结果:GA、GB 和 GC 均在 50~5 000 ng/mL 范围内线性关系良好,批内和批间精密度和准确度结果显示,批内、批间变异均小于 10%,相对误差分别为 -1.0%~-3.0%、-1.2%~-1.5%和 -2.9%~-3.2%,方法学考察均符合要求。结论:建立的 HPLC-MS 法灵敏度高、专属性强,适用于银杏叶提取物制剂中所含银杏萜内酯药代动力学研究。

关键词 HPLC-MS; 银杏内酯; 药代动力学; 大鼠

中图分类号 R9

文献标志码 A

Concentration determination and pharmacokinetic study of ginkgolides by HPLC - MS in rat plasma

TONG Ruo-fei^{1,2}, ZHANG Nan², LI Wei-chao², FANG Zhi-zhong³

(1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Pharmacy, Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300074, China; 3. College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics (Theranostics), Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To establish HPLC-MS method for simultaneous concentration determination of ginkgolides (GA), ginkgolides B (GB), and ginkgolides C (GC) in rat plasma, and to apply it to the pharmacokinetic study in rats. **Methods:** Ketone ibuprofen was used as internal standard, ammonium acetate in methanol - 10 mmol/L aqueous solution was used as mobile phase, the plasma samples of GA, GB, GC, and internal standard were divided by the ZORBAX SB - C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 microns) chromatographic column separation, and by using electrospray ion source (ESI), negative ion level of full scan mode was detected. The method was used in pharmacokinetic study of shu xue ning with intravenous administration in rat. Pharmacokinetic parameters were calculated by DAS2.0 statistical software. **Results:** GA, GB and GC were in 50~5 000 ng/mL in linear range, and batch variations were less than 10%, the relative errors were -1.0%~-3.0%, -1.2%~-1.5% and -2.9%~-3.2%, respectively. And the methodology met the requirements. **Conclusion:** The established HPLC-MS method has high sensitivity, strong specificity, and may be suitable for the pharmacokinetic study of the ginkgo biloba extract.

Key words HPLC-MS; ginkgolides; pharmacokinetic; rat

银杏为银杏科银杏属植物 (Ginkgo biloba Linn), 又名公孙树, 银杏叶为银杏的干燥叶, 将其加工制成提取物后可制成多种剂型^[1]。研究发现银杏叶提取物 (extracts of ginkgo biloba, Egb) 对心血管疾病有良好的疗效, 其药用价值受到广泛关注^[2-3]。银杏叶中主要有效成分为黄酮类和萜内酯类, 其中萜内酯类主要为银杏内酯 (ginkgolides) A、B、C 等和白果内酯 (bilobalides)。药理研究表明 Egb 能有效抑制氧自由基的活性, 抑制血小板活性因子 (platelet activating factor, PAF), 抑制血小板聚集及血栓形

成, 调节各种炎性细胞产生的炎性反应, 增加血流等抗缺血药理活性^[4-5]。此外, Egb 还具有扩张脑血管, 抑制谷胺酸毒性, 改善脑缺血缺氧导致的能量代谢障碍和酸中毒, 减轻缺血性脑水肿, 降血脂、抗动脉粥样硬化等药理活性^[6-7]。本文以酮洛芬为内标物质, 采用 HPLC-MS 的方法建立同时测定大鼠血浆中所含银杏内酯 A、B、C 浓度的方法, 并进行了大鼠静脉注射舒血宁后体内药代动力学的研究。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 Agilent 1200 型 HPLC 系统、Agilent 6310 Iron Trap MS 仪 (美国安捷伦公司); Chemstation

作者简介 佟若菲 (1977-), 女, 副主任药师, 硕士在读, 研究方向: 临床药学; 通信作者: 房志仲, E-mail: fangzhizhong@tjmu.edu.cn。

B. 01.03-SR2 色谱工作站(美国安捷伦公司)及6300 Series Ion Trap LC/MS Software 6.1 质谱工作站(美国安捷伦公司);Milli-Q Academic 水纯化系统(美国 Millipore 公司);AL104 Mettler 电子分析天平(瑞士 Mettler 公司);高速离心机(德国 Beckman 公司);低温冰箱(日本 SANYO 公司);XW-80A 型微型涡旋混匀器(上海沪西分析仪器厂);HGC-12 样品浓缩氮吹仪(天津市恒奥科技发展有限公司)。

1.1.2 药品与试剂 银杏内酯 A 对照品/GA(中国药品生物制品检定所,批号 110862-200608);银杏内酯 B 对照品/GB(中国药品生物制品检定所,批号 110863-200608);银杏内酯 C 对照品/GC(中国药品生物制品检定所,批号 110864-200604);舒血宁注射剂(北京双鹤高科天然药物有限责任公司,批号:100303);酮洛芬对照品(上海科兴实验室设备有限公司,批号 100337);肝素钠(天津市生物化学制药有限公司);甲醇(色谱纯,天津康科德科技有限公司);其它试剂均为市售分析纯。

1.2 实验动物 Wistar 大鼠 8 只,体质量(300 ± 20)g,雄性,实验前禁食 12 h 不禁水,购自中国人民解放军军事医学科学院卫生环境医学研究所动物实验中心,许可证号:SCXK-(军)-2009-0003,合格证号:0000618。

1.3 色谱及质谱条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱:ZORBAX SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm),Agilent Zorbax C₁₈ 保护柱(12.5 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-10 mmol/L 乙酸铵溶液,梯度洗脱(表 1);流速:1 mL/min;进样量:20 μL;柱温:30 ℃。

表 1 HPLC 流动相梯度洗脱

Tab 1 Gradient elution HPLC mobile phase

时间/min	10 mmol/L 乙酸铵(A)/%	甲醇(B)/%
0	30	70
20	50	50
30	65	35

1.3.2 质谱条件 采用 ESI 负离子模式同时进行检测,检测模式为一级全扫描方式(Scan 模式)。具体仪器参数:雾化器压力 30 psi;毛细管电压 3.5 kV;干燥气为 N₂ 气,干燥器温度 350 ℃,干燥气流速 8.0 L/min。

1.4 方法学考察

1.4.1 血浆样品处理 取大鼠血浆 500 μL,加入甲醇 200 μL,酮洛芬内标液 100 μL(浓度 2 000 ng/mL),涡旋 30 s,加入乙醚:正己烷(4:1)提取液 3 mL,涡旋

2 min,3 000 r/min 离心 10 min,取上层有机相 2.7 mL,下层液体再加入乙醚:正己烷(4:1)提取液 3 mL,合并两次有机相,40 ℃水浴 N₂ 吹干,残渣用 100 μL 甲醇复溶,涡旋 1 min,取上清液 20 μL 进样分析。

1.4.2 对照品溶液和内标溶液的制备 精密称取 GA、GB、GC 对照品置 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,得每 1 mL 各含 GA 0.505 mg、GB 0.500 mg、GC 0.500 mg 的对照品混合溶液,作为储备液,临用时稀释至所需浓度;精密称取酮洛芬 5.00 mg,甲醇定容成 2 000 ng/mL 的工作液。储备液和工作溶液 4 ℃冰箱保存待用。

1.4.3 方法专属性考察 取来源于 6 个不同个体的空白血浆 500 μL,按“血浆样品处理法”项操作,取上清液 20 μL 进样分析;另取来源于 6 个不同个体的空白血浆,配成含 10 ng/mL 银杏内酯 A、B、C,按“血浆样品处理方法”进行处理、测定。

1.4.4 标准曲线与质控样品的制备 将 GA、GB、GC 对照品混合储备液用甲醇稀释成浓度分别为 50、100、200、400、1 000、2 000、5 000 ng/mL 的溶液,取一定量的空白血浆,分若干份,每份 500 μL,将 100 μL GA、GB、GC 对照品混合标准溶液加入空白血浆中,按照前述血浆处理法操作。同样按上述方法得到质量控制样品(GA、GB 和 GC:100、1 000 和 5 000 ng/mL)。以被测化合物和内标的峰面积比对被测化合物的血药浓度进行线性回归,得到回归方程。

1.4.5 最低定量限 取 6 个不同个体的空白血浆各 500 μL,配成含 10 ng/mL 银杏内酯 A、B、C,按“血浆样品处理方法”进行处理、测定。

1.4.6 提取回收率和基质效应 按血浆处理方法制备浓度分别为 20、200 和 1 000 ng/mL GA、GB 和 GC 对照品血浆,测得 GA、GB 和 GC 的峰面积(A_e)。取上述 3 个浓度 GA、GB 和 GC 的混合对照品溶液未经提取直接进样测定得到各被测物的提取回收率。空白大鼠血浆按“血浆样品处理”项下步骤提取后,分别向其中加入 3 个质控浓度的 GA、GB 和 GC 以及内标标准品溶液,并进行测定。将测定所得的峰面积分别与相同浓度的标准液直接进样测定所得到的峰面积进行比较,即可考查基质效应。

1.4.7 精密度与准确度 按血浆处理方法制备浓度分别为 20、200 和 1 000 ng/mL GA、GB 和 GC 对照品血浆,测定 GA、GB 和 GC 与内标的峰面积比值,由标准曲线计算实测量,每批每个浓度平行操作 6 份,连续 3 批,分别考察批内、批间精密度和准确度。

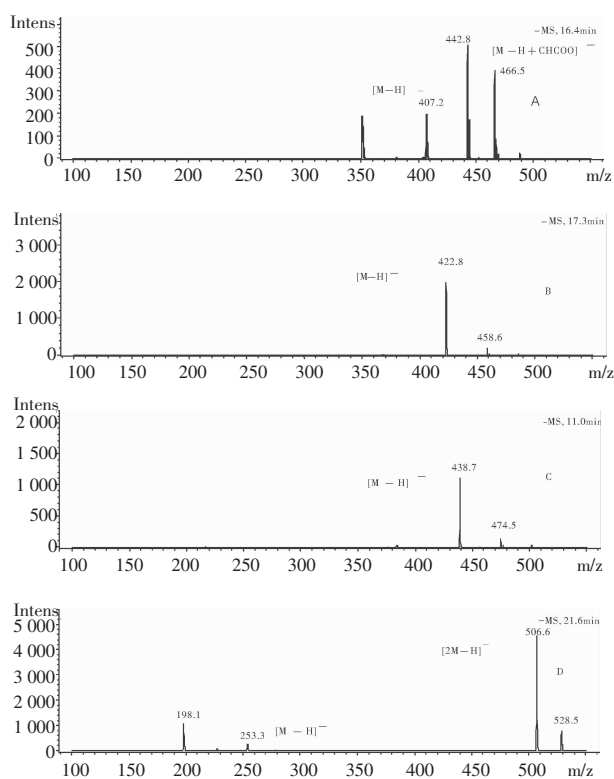
1.4.8 稳定性考察 按“1.4.1”项下分别配制浓度

为 20、200 和 1 000 ng/mL GA、GB 和 GC 对照品血浆,分别进行室温稳定性试验(于室温条件下放置 0 和 24 h)、冷冻稳定性试验(各浓度对照品血浆于 -20°C 冷冻放置 0 和 7 d)和冻融稳定性试验(各浓度对照品血浆 -20°C 冻融 3 次)。

1.5 药代动力学实验 8 只 Wistar 大鼠,按体质量大鼠尾静脉给药,给药剂量按照临床上人用剂量折算成大鼠用等效剂量为银杏叶提取物 6.5 mg/kg,给药体积为 0.4 mL/200 g。在给药后 5、15、30、60、90、120 和 180 min 眼球后静脉丛取血约 0.3 mL。离心管肝素抗凝,3 000 r/min 离心 10 min,取血浆 -80°C 保存备用。

2 结果

2.1 质谱行为 本质谱条件下,用于定量分析的离子对为 GA 466.5 \rightarrow 407.2,GB 458.6 \rightarrow 422.8,GC 474.5 \rightarrow 438.7,酮洛芬(内标)528.5 \rightarrow 506.6,见图 1。



A: 银杏内酯 A; B: 银杏内酯 B; C: 银杏内酯 C; D: 酮洛芬(内标)

图 1 负离子一级全扫描 MS 图

Fig 1 MS figure for negative ion level scan

2.2 专属性实验结果 大鼠空白血浆色谱图、空白血浆外加 GA、GB、GC 和内标色谱图见图 2 及图 3;负离子模式下,银杏内酯 C、A、B 和出峰时间分别为 10.6、16.1、16.9,内标酮洛芬的出峰时间为 21.4,血浆中内源性物质不干扰待测物和内标的测定。

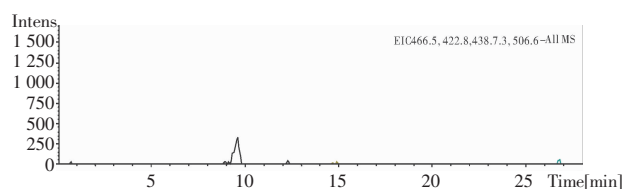
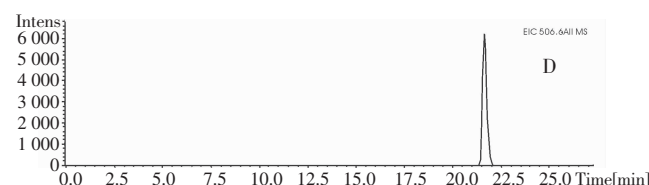
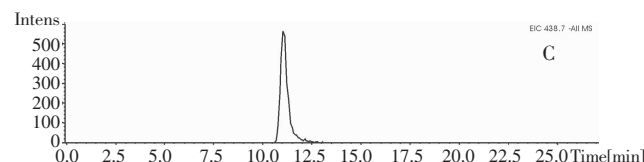
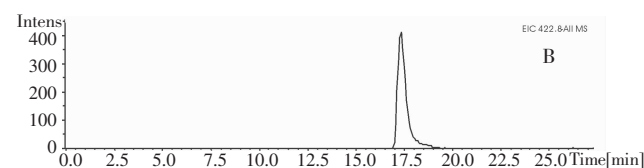
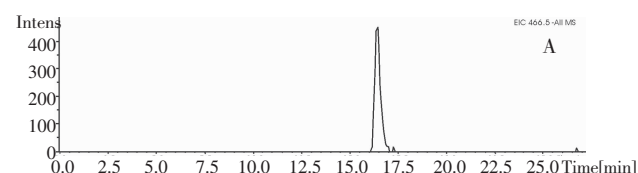


图 2 空白血浆负离子 EIC 色谱图

Fig 2 EIC chromatograms for blank plasma anion



A: GA(10 ng/mL); B: GB(10 ng/mL); C: GC(10 ng/mL); D: 酮洛芬(内标)

图 3 空白血浆加对照品负离子 EIC 色谱图

Fig 3 EIC chromatograms for blank plasma and reference substance anion

2.3 标准曲线和定量下限结果 GA、GB 和 GC 血药浓度的标准曲线由 7 个浓度(每个浓度 3 份)的数据转化而成。得到峰面积与血药浓度的线性回归方程分别为:GA $y=1.8737 \times 10^{-3}x+0.0354$ ($r=0.9813$);GB $y=1.0523 \times 10^{-2}x+0.0139$ ($r=0.9869$);GC $y=3.9004 \times 10^{-3}x-0.0100$ ($r=0.9863$),其中 y 为待测化合物与内标的峰面积比值, x 为待测化合物的血药浓度。表明 GA、GB 和 GC 均在 50~5 000 ng/mL 范围内线性关系良好,定量下限分别为 10.5 ng/mL、10.5 ng/mL、10.6 ng/mL。

2.4 提取回收率和基质效应结果 测得 GA、GB 和 GC 峰面积(A_c),每个浓度平行操作 5 份。提取回收率按 A_e/A_c 计算;基质效应的考查可表示为: A_{extr}/A_{st} ,其中 A_{extr} 为空白血浆提取后加入相应标准液

后测定所得到的峰面积, A_{st} 为标准液直接进样所得到的峰面积。结果显示在本试验条件下, GA、GB、GC 和内标物不存在明显的基质效应, 回收率符合要求(表 2)。

表 2 各被测物基质效应和回收率($\bar{x} \pm s$, %, $n=5$)

Tab 2 Matrix effect and recovery ($\bar{x} \pm s$, %, $n=5$)

被测物/(ng/mL)	基质效应(A_{extr} / A_{st})	提取回收率(A_e/A_c)
GA		
20	85.8	83.2±4.4
200	89.1	78.9±2.7
1 000	92.4	81.6±2.8
GB		
20	87.2	84.5±2.9
200	90.6	86.2±2.9
1 000	91.7	88.5±3.5
GC		
20	86.6	82.3±5.5
200	89.8	80.7±4.5
1 000	91.4	85.3±3.7

2.5 精密度和准确度结果 GA、GB、GC 批内和批间精密度和准确度结果显示, 批内、批间变异均小于 10%, 相对误差分别为-1.0%~-3.0%、-1.2%~-1.5%和-2.9%~-3.2%(表 3), 该法满足生物样品分析方法的要求。

表 3 各被测物的精密度与准确度

Tab 3 Measured precision and accuracy

被测物/(ng/mL)	批内($n=5$, RSD%)	批间($n=3$, RSD%)	准确度(RE%)
GA			
20	4.6	2.1	-1.0
200	5.8	5.4	0.4
1 000	5.5	4.8	-3.0
GB			
20	3.9	3.2	-1.5
200	6.0	2.6	-2.4
1 000	4.6	8.6	-1.2
GC			
20	6.3	3.6	-2.9
200	6.1	7.2	0.6
1 000	4.4	5.2	-3.2

2.6 稳定性考察结果 将测定的峰面积比代入标准曲线, 计算并比较各份稳定性样品测定值和标准值的差异, 试验结果表明 GA、GB 和 GC 对照品血浆在以上条件下稳定(表 4)。

2.7 药代动力学实验结果 将大鼠给药后血浆按照“血浆样品处理方法”进行处理后, HPLC-MS 仪进样分析, 根据线性回归方程计算血药浓度, 绘制血药浓度-时间曲线(图 4~6)。结果显示静脉注射舒

血宁后, 其药效物质 GA、GB 和 GC 消除较快, 血药浓度在 3 h 内大幅下降, 各被测物的半衰期($t_{1/2}$)约为 1 h。主要药代动力学参数见表 5。

表 4 各被测物的稳定性($n=3$, RE %)

Tab 4 Stability of the measured object($n=3$, RE %)

被测物/(ng/mL)	冻融(3 次)	-20 ℃储存 30 d	室温 24 h
GA			
20	-2.4	-5.4	2.8
200	-2.8	-3.4	0.7
1 000	4.4	-4.1	1.3
GB			
20	2.7	4.3	7.0
200	-1.6	-5.6	-1.0
1 000	5.0	-4.4	1.4
GC			
20	3.7	8.0	1.3
200	-10.0	6.1	2.7
1 000	-5.3	5.2	2.6

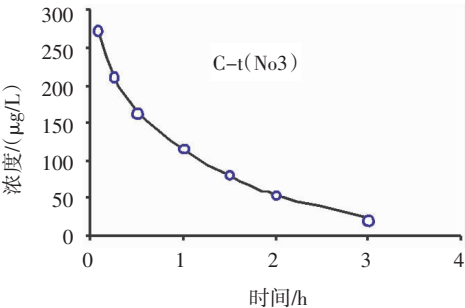


图 4 GA 血药浓度-时间曲线图
Fig 4 Time curve for ginkgolide A blood drug concentration

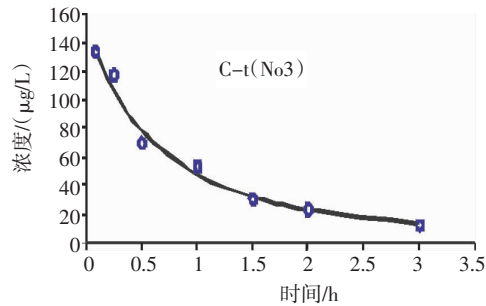


图 5 GB 血药浓度-时间曲线图
Fig 5 Time curve for ginkgolide B blood drug concentration

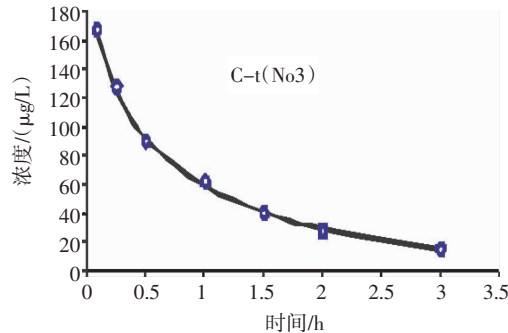


图 6 GC 血药浓度-时间曲线图
Fig 6 Time curve for ginkgolide C blood drug concentration

表 5 各被测物的主要药代动力学参数

Tab 5 The main pharmacokinetic parameters

参数	单位	GA	GB	GC
AUC ₍₀₋₄₎	μg/(L·h)	276.4	121.1	149.1
AUC _(0-∞)	μg/(L·h)	303.5	137.5	162.1
t _{1/2}	h	0.867	1.053	0.84
Cl	L/(h·kg)	1.071	0.79	1.104
V	L/kg	1.324	1.19	1.328

3 讨论

银杏内酯 A、B、C 是强大的血小板活化因子抑制剂^[8-9],是治疗血栓栓塞性疾病和缺血性疾病的主要药理活性物质,同时也是影响血液动力学的主要成份,因此为了保证用药的有效性和安全性,有必要对其代谢进行研究^[10]。鉴于银杏萜内酯在血浆中含量较低且紫外吸收较弱,因此需要高灵敏度、低检测线的现代分离分析手段^[11]。本研究利用 HPLC-MS 联用的方法建立同时检测大鼠血浆中所含 GA、GB 和 GC 浓度,获得大鼠静脉注射舒血宁注射剂后的血药浓度-时间曲线和药动学参数。基于内标物对于控制被测物的提取率,保证血药浓度检测的准确十分重要,本试验对内标物质的选择进行考察,先后以格列本脲、愈创木酚甘油醚、白藜芦醇作为内标物,与 GA、GB 和 GC 混合后进样,结果在我们选定的试验条件下,上述物质出峰时间较晚,增大流动相甲醇浓度后,上述内标物质容易受到血浆内源性物质的干扰而影响测定,而酮洛芬作为内标物质与 GA、GB 和 GC 的极性相近,可作为内标物应用于本试验。

血样提取的方法有许多种^[12-13],经过试验对比筛选,得到上述提取方法,既简单又有效。从最低定量限、基质效应、提取回收率、精密度与准确度、稳定性等方面对血样测定结果进行分析,试验结果良好,该方法完全可以进行药代动力学血药浓度的测定。另外,该法也为银杏叶提取物制剂中所含银杏萜内酯的药代动力学研究提供了一个研究途径。

参考文献:

- [1] 杨扬,周斌,赵文杰. 银杏叶史话:中药/植物药研究开发的典范[J]. 中草药,2016,47(15):2579
- [2] 刘皋林. 银杏制剂的药理作用与临床应用[J]. 上海医药,2016,37(3):8
- [3] Zhang Q, Huang W D, Lv X Y, et al. Ghrelin protects H9c2 cells from Hydrogen peroxide-induced apoptosis through NF- κ B and mitochondria-mediated signaling[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 654(2): 142
- [4] Bikram S, Pushpinder K, Gopichand R D, et al. Biology and chemistry of Ginkgo biloba[J]. Fitoterapia, 2008, 79(6): 401
- [5] Shari B, Wood T, Shaw L, et al. Adverse outcomes among women presenting with signs and symptoms of ischemia and no obstructive coronary artery disease: findings from the National Heart, Lung, and Blood Institute-sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) angiographic core laboratory[J]. Am Heart J, 2013, 166(1): 134
- [6] 姜宏君,吴茜,郭玮,等. 银杏内酯注射液对高脂血症大鼠红细胞膜生物学特性的影响[J]. 中国中医药科技,2015,22(4):393,405
- [7] Tsutsumi Y M, Yokoyama T, Horikawa Y, et al. Reactive Oxygen species trigger ischemic and pharmacological preconditioning: in vivo and in vivo characterization[J]. Life Sci, 2007, 81(15): 1223
- [8] Braquet P, Godfroid J J. PAF-acether specific binding sites. 2. Design of specific antagonists[J]. Trends Pharmacol Sci, 1986, 7(10): 397
- [9] Braquet P. BN-52021 and related compounds: a new series of highly specific PAF-acether antagonists isolated from Ginkgo biloba[J]. Blood Vessels, 1985, 16(6): 558
- [10] Lv H, Wang G J, Li H, et al. Sensitive and selective liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry analysis of ginkgolide B in dog plasma[J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 40(1): 88
- [11] Woelkart K, Feizlmayr E, Dittrich P A, et al. Pharmacokinetics of bilobalide, ginkgolide A and B after administration of three different ginkgo biloba L. preparations in humans[J]. Phytother Res, 2010, 24(3): 445
- [12] Pierluigi M, Antioella D P, Francesca P, et al. LC-MS characterization of terpene lactones in plasma of experimental animals treated with Ginkgo biloba extracts: correlation with pharmacological activity[J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 40(3): 763
- [13] 杨赴云,王景田,金有豫. 银杏内酯 A、B 在家兔体内的药代动力学研究[J]. 中国药理学杂志,2000,35(8):541

(2016-11-09 收稿)