

[制 剂]

返魂草颗粒中 2 种成分在大鼠血浆中的药代动力学行为

于 倩^{1,2}, 王晓波^{1*}, 杨媛媛¹, 张瑞亚^{1,2}

(1. 中国人民解放军第二一〇医院, 辽宁 大连 116015; 2. 大连医科大学药学院, 辽宁 大连 116044)

摘要: **目的** 建立 LC-MS 法同时测定返魂草颗粒中对羟基苯甲酸和对羟基苯乙酸在大鼠血浆中的含有量, 并研究两者的药代动力学行为。**方法** 分析采用 C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 乙酸-乙腈; 体积流量 0.6 mL/min; 进样量 10 μL。测定大鼠灌胃给药后不同时间点的血浆药物浓度, 并计算两种成分的药代动力学参数。**结果** 对羟基苯甲酸和对羟基苯乙酸线性范围分别为 0.4 ~ 2 000、5 ~ 2 000 ng/mL, 平均回收率分别为 98.36%、96.67%, RSD 小于 4.91%; 基质效应分别为 89.82%、95.94%, RSD 小于 7.78%, 无交叉干扰, RSD 小于 15%。两者药动学参数分别为 $t_{1/2}$ (9.769 ± 2.766)、(4.983 ± 1.003) h, T_{max} (1.083 ± 0.204)、(0.583 ± 0.204) h, C_{max} (122.9 ± 46.225)、(1 273.5 ± 316.491) ng/mL, AUC_{0-t} (853.95 ± 242.035)、(3 066.109 ± 524.633) μg/(L · h), CL/F (1 223.792 ± 389.327)、(333.049 ± 53.07) L/(h · kg), MRT_{0-t} (12.602 ± 3.475)、(5.225 ± 0.688) h。**结论** 该方法快速、精确、可靠, 适用于返魂草颗粒的药代动力学研究。

关键词: 返魂草颗粒; 对羟基苯甲酸; 对羟基苯乙酸; 药代动力学行为; 大鼠; 血浆; LC-MS

中图分类号: R969.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)07-1481-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.07.009

Pharmacokinetic behaviors of two constituents in Fanhuncao Granules in rat plasma

YU Qian^{1,2}, WANG Xiao-bo^{1*}, YANG Yuan-yuan¹, ZHANG Rui-ya^{1,2}

(1. No. 210 Hospital of PLA, Dalian 116015, China; 2. School of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

ABSTRACT: **AIM** To develop an LC-MS method for determining the contents of *p*-hydroxylbenzoic acid and *p*-hydroxyphenylacetic acid in Fanhuncao Granules in rat plasma and to study their pharmacokinetic behaviors. **METHODS** The analysis was performed on a C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), mobile phase was 0.1% acetic acid-acetonitrile, flow rate was 0.6 mL/min, and injection volume was 10 μL. The drug concentrations in rat plasma at different time points were detected after intragastric administration, and thus the pharmacokinetic parameters of two constituents were calculated. **RESULTS** The linear ranges of *p*-hydroxylbenzoic acid and *p*-hydroxyphenylacetic acid were 0.4 – 2 000 ng/mL and 5 – 2 000 ng/mL, the average recoveries were 98.36% and 96.67% with the RSDs of less than 4.91%, and the matrix effects were 89.82% and 95.94% with the RSDs of less than 7.78%, respectively. And no cross interference existed among the matrices with the RSDs of less than 15%. Their pharmacokinetic parameters were $t_{1/2}$ of (9.769 ± 2.766) h and (4.983 ± 1.003) h, T_{max} of (1.083 ± 0.204) h and (0.583 ± 0.204) h; C_{max} of (122.9 ± 46.225) ng/mL and (1 273.5 ± 316.491) ng/mL, AUC_{0-t} of (853.95 ± 242.035) μg/(L · h) and (3 066.109 ± 524.633) μg/(L · h), CL/F of (1 223.792 ± 389.327) L/(h · kg) and (333.049 ± 53.07) L/(h · kg), and MRT_{0-t} of (12.602 ± 3.475) h and (5.225 ± 0.688) h, respectively. **CONCLUSION** This rapid, accurate and reliable method is appropriate for the pharmacokinetic study of Fanhuncao Granules.

KEY WORDS: Fanhuncao Granules; *p*-hydroxylbenzoic acid; *p*-hydroxyphenylacetic acid; pharmacokinetic be-

收稿日期: 2016-03-04

基金项目: 国家科技重大专项 (2009ZXJ09002-019)

作者简介: 于 倩 (1991—), 女, 硕士生, 研究方向为药代动力学。Tel: (0411) 39847094, E-mail: 15898187507@163.com

* 通信作者: 王晓波 (1961—), 男, 博士, 教授, 研究方向为药理学。Tel: (0411) 39847094, E-mail: wxbbenson0653@sina.com

havior; rats; plasma; LC-MS

返魂草又名麻叶千里光 (*Senecio cannabifolius* Less), 为菊科千里光属多年生草本植物, 具有较明显的抗菌、抗病毒、解热、镇痛、抗炎、调节免疫、抗急性肺损伤、抗胃溃疡等药理作用^[1-6]。其中, 酚酸类成分是抗菌抗病毒的主要活性物质^[7-10], 也是控制返魂草质量的重要指标。返魂草颗粒是以返魂草为原料所制成的单方制剂, 用于治疗肺内感染、慢性支气管炎、哮喘性支气管炎和急性呼吸道感染等症状。目前, 对返魂草中原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸和金丝桃苷等成分的研究报道较多^[11-14], 但尚未见关于对羟基苯甲酸和对羟基苯乙酸的报道。本实验以这两种活性成分为研究对象, 利用 LC-MS 法同时测定其在大鼠血浆中的含有量, 并研究了药物在体内动力学行为, 可为分析其体内过程和临床前药代动力学提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试药 返魂草颗粒 (中国人民解放军第二一〇医院制剂中心)、对羟基苯甲酸、对羟基苯乙酸对照品 (沈阳药科大学天然药物化学室提供, 含有量均≥98%); 咖啡酸标准品 (批号 D0610AS, 美仑生物技术有限公司, 含有量>98%)。乙腈、甲醇、乙酸均为色谱纯 (美国 Tedia 公司); 羧甲基纤维素钠为化学纯 (国药集团化学试剂有限

公司)。

1.2 仪器 AB Trple Quad™4500 质谱仪 (美国 AB SCIEX 公司); 超快速液相色谱仪 (日本岛津公司); BSA 224S 电子天平、Arium 611VF 超纯水机 (德国 Satoruis 公司); KH-100DB 数控超声波清洗器 (昆山禾创超声仪器有限公司); Vortex-Genie 2 涡旋振荡器 (美国 Scientific Industries); TGL-16M 台式高速离心机 (上海安亭科学仪器厂); 移液枪 (20、200、1 000 μL, 德国 Eppendorf 公司)。

1.3 动物 SD 雄性大鼠 6 只, 体质量 250 ~ 300 g, SPF 级, 动物合格证号 SCXK (辽) 2015-0001, 购自辽宁长生生物技术有限公司, 实验前适应性喂养 1 周。

1.4 色谱条件

1.4.1 液相条件 C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相 0.1% 乙酸-乙腈 (3:1); 体积流量 0.6 mL/min; 进样量 10 μL。

1.4.2 质谱条件 离子源 ESI; 喷雾电压 4 500 V (-); 鞘气体积流量 30 L/min; 辅助器体积流量 5 L/min; 毛细管电压 -37 V (-); 毛细管温度 300 ℃; 扫描方式为多反应监测 (MRM) 模式, 每种成分选择响应值最高的离子对用于测定, 检测离子见表 1。

表 1 检测离子

Tab. 1 Detection ions

成分	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	去簇电压/V	射入电压/V	碰撞能量/V	碰撞室射出电压/V
对羟基苯甲酸	137.1	93.1	-17	-2.5	-21	-9
对羟基苯乙酸	151.1	107.1	-30	-7	-9.1	-8.1
内标	179.8	135.9	-84	-13	-20.4	-4

1.5 溶液配制

1.5.1 标准品溶液 精密称取对羟基苯甲酸、对羟基苯乙酸适量, 甲醇溶解定容, 配制成 0.2 mg/mL 标准品贮备液。使用时以此为母液, 根据实际需要乙腈逐级稀释, 得到一系列不同质量浓度的工作液。

1.5.2 内标溶液 精密称取咖啡酸标准品适量, 加入乙腈溶解, 得到 1 μg/mL 工作液。

1.5.3 返魂草颗粒给药混悬液 取返魂草颗粒样品适量, 于研钵中研细, 精密称取适量, 置于 50 mL 离心管中, 加入生理盐水配制的 0.1% 羧甲基纤维素钠溶液, 制得大鼠灌胃混悬液, 相当于对羟基苯甲酸、对羟基苯乙酸含有量分别为 0.8、

0.2 mg/kg。

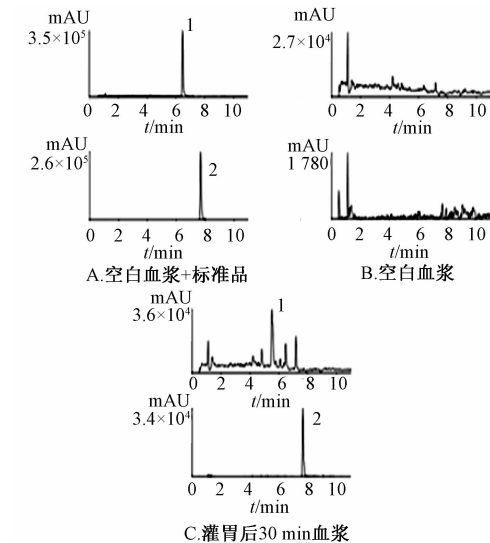
1.6 血浆样品处理方法 取血浆 50 μL, 置于干净 EP 管中, 加入 1 μg/mL 内标溶液 20 μL 以及乙腈 150 μL, 涡旋混合 1 min, 于 4 ℃ 下 14 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 与水按 1:1 比例稀释, 进样 10 μL 测定分析。

1.7 血浆样品采集 取 SD 雄性大鼠 6 只, 给药前禁食 12 h, 自由饮水, 称定质量, 均灌胃 1 g/kg 返魂草颗粒混悬液, 于给药后 0、0.083 3、0.016 7、0.25、0.5、1、1.5、2、4 (恢复供食)、6、8、12、24、48 h 眼眶取血约 0.2 mL, 置于肝素化的离心管中, 于 4 ℃ 下 6 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 置于另一干净离心管中, 储

存于 -80 ℃ 冰箱中, 冷冻待测。

2 方法学考察

2.1 专属性试验 按照本实验条件, 测定给药前不同来源的大鼠空白血浆、空白血浆中加入标准品、给药后实际血浆样品, 色谱图见图 1。由图可知, 峰形和各成分选择性均良好, 均能和血浆中的内源性成分达到很好的基线分离, 空白样品在相应位置上均无干扰。



1. 对羟基苯乙酸 2. 对羟基苯甲酸
1. *p*-hydroxyphenylacetic acid 2. *p*-hydroxybenzoic acid

图 1 LC-MS 色谱图
Fig. 1 LC-MS chromatograms

2.2 标准曲线 精密吸取 0.2 mg/mL 标准品贮备液, 配制成 1.25、2.5、5、12.5、25、50、125、250、500、1 000、2 000、2 500 ng/mL 混合标准溶液, 分别取 10 μL, 加入装有 50 μL 血浆的一次性 EP 管中, 按“1.6”项下方法操作, 得到系列质量浓度溶液, 与空白血浆样品一起进样测定。以待测物质量浓度与内标质量浓度比值为横坐标 (*x*), 待测物峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标 (*y*), 加权最小二乘法^[15]线性回归 (权重系数 1/*X*²), 结果见表 2, 可知对羟基苯甲酸、对羟基苯乙酸分别在 0.4 ~ 2 000、5 ~ 2 000 ng/mL 范围内线性关系良好。

表 2 回归方程、相关系数及线性范围
Tab. 2 Regression equations, correlation coefficients and linear ranges

成分	回归方程	相关系数	线性范围/ (ng·mL ⁻¹)
对羟基苯甲酸	$y = 0.098\ 2x + 0.859$	0.997 2	0.4 ~ 2 000
对羟基苯乙酸	$y = 0.012\ 3x + 1.29$	0.995 0	5 ~ 2 000

2.3 精密度与准确度试验 取空白血浆 50 μL, 分别加入混合标准品溶液 10 μL, 配制成 12、192、1 540 ng/mL 质控样品, 每个质量浓度平行 5 份, 同法制备, 连续测定 3 d, 计日内、日间精密度及准确度。结果, 两种成分日内及日间 RSD 在 0.38% ~ 4.76% 之间, 准确度均大于 97.59%, 均符合生物样品分析方法要求。

2.4 回收率、基质效应及交叉干扰试验 取空白血浆样品 50 μL, 加入 12、192、1 540 ng/mL 质控样品 10 μL, 每个质量浓度平行 5 份, 同法处理, 进样分析, 所测峰面积记为 A。

取空白血浆样品 50 μL, 同法操作, 每个质量浓度平行 5 份, 离心后获得上清液, 加入与相同质量浓度的质控样品 10 μL, 进样分析, 所测峰面积记为 B。

取流动相 50 μL, 加入 12、192、1 540 ng/mL 质控样品 10 μL, 每个质量浓度平行 5 份, 加入内标混匀, 进样分析, 所测峰面积记为 C。

计算公式为提取回收率 = $A/B \times 100\%$, 基质效应 = $A/C \times 100\%$ 。

同法制备相同质量浓度的单成分与混合成分血浆样品, 交叉进样测定, 考察两种成分是否存在交叉干扰, 结果见表 3。由表可知, 该方法满足生物样品定量分析的要求 (RSD < 4.91%), 血浆中无明显内源性物质干扰 (RSD < 7.78%), 而且两种成分不存在交叉干扰 (RSD < 15%)。

表 3 回收率、基质效应及交叉干扰 (% , $\bar{x} \pm s$)
Tab. 3 Recoveries, matrix effects and cross interferences (% , $\bar{x} \pm s$)

成分	回收率	基质效应	交叉干扰
对羟基苯甲酸	98.36	89.82	101.73
对羟基苯乙酸	96.67	95.94	88.61

2.5 稳定性试验 取空白血浆样品, 加入低、中、高质量浓度的质控样品, 每个质量浓度平行 5 份, 同法处理, 制成不同质量浓度的血浆质控样品, 于 -80 ℃ 放置 10 d 后测定, 考察长期冷冻放置稳定性; 于 25 ℃ 放置 2 h 后测定, 考察室温短期放置稳定性; 在进样盘于 4 ℃ 放置 24 h, 考察临时储存稳定性。结果, 3 种条件下 RSD 均 < 15%, 表明该方法稳定性良好。

2.6 药代动力学研究 取“1.7”项下血浆样品, 同法处理, 与标准曲线一同进样测定, 计算对羟基苯甲酸、对羟基苯乙酸血药浓度, 并绘制血药浓度-时间曲线, 结果见图 2。再用 DAS 2.0 软件进

行数据处理，对血药浓度结果采用非房室模型计算主要的药动学参数，结果见表 4。

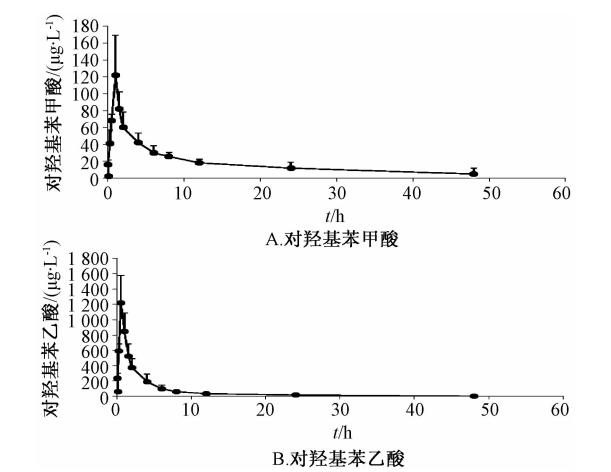


图 2 血药浓度-时间曲线 (n=6, $\bar{x} \pm s$)
Fig. 2 Plasma concentration-time curves (n=6, $\bar{x} \pm s$)

表 4 药代动力学参数 (n=6, $\bar{x} \pm s$)		
Tab. 4 Pharmacokinetic parameters (n=6, $\bar{x} \pm s$)		
参数	对羟基苯甲酸	对羟基苯乙酸
$t_{1/2}/h$	9.769 ± 2.766	4.983 ± 1.003
T_{max}/h	1.083 ± 0.204	0.583 ± 0.204
$C_{max}/(ng \cdot mL^{-1})$	122.9 ± 46.225	1 273.5 ± 316.491
$AUC_{0-t}/[\mu g \cdot (L \cdot h)^{-1}]$	853.95 ± 242.035	3 066.109 ± 524.633
$(CL/F)/[L \cdot (h \cdot kg)^{-1}]$	0.981 ± 0.312	0.067 ± 0.012
MRT_{0-t}/h	12.602 ± 3.475	5.225 ± 0.688

3 讨论

本实验首次采用 LC-MS 法同时测定返魂草颗粒中对羟基苯甲酸和对羟基苯乙酸在大鼠血浆中的含量，发现该方法准确可靠，灵敏度高，检测时间短，样品用量少，可满足生物样品分析要求。另外，药代动力学分析得到灌胃返魂草颗粒后血药浓度-时间曲线，还通过非房室模型测得药动学参数，这将进一步应用于返魂草颗粒的临床研究。

流动相考察时，比较了甲酸-水，0.1% 乙酸-水和 0.2% 乙酸-水，发现水相比比例为 75%（0.1% 乙酸）时，峰形良好，各成分分离度理想，出峰时间大大缩短至 8 min，检测灵敏度高，提高了分析效率。而且，质谱条件选择对羟基苯甲酸、对羟基苯乙酸、内标的质荷比分别为 137.1→93.1、151.1→107.1、179.8→135.9 时，各离子对均响应值较高，而且信号稳定，故作为监测反应离子对用于定量测定。

乙腈与甲醇相比，其沉淀蛋白效率更高，故本

实验采用 3 倍乙腈蛋白沉淀法后，离心获得纯净的血浆样品，操作简便，节约样本和处理时间，减少液体转移步骤，提高了准确性。稀释后，进样与流动相比比例保持一致，增加目标成分检测灵敏度，减少基质效应干扰，降低离子抑制程度，可满足生物样品检测要求。

参考文献：

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草：第 7 册[M]. 上海：上海科学技术出版社，1999：943.

[2] 商明秀，陈秀兰，尚士光，等. 返魂草提取物解热镇痛的药效学研究[J]. 中国医药导刊，2007，9(6)：508-509.

[3] Tao Y, Jiang W, Cheng Y Y, *et al.* Two new compounds from *Senecio cannabifolius* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2012, 14 (9)：826-830.

[4] 赵光云，王晓波，袭荣刚，等. 返魂草素 II 对小鼠全氟异丁烯吸入性急性肺损伤的预防作用[J]. 解放军药学报，2013，29(1)：13-15.

[5] 林 莉，杜惠莲，李 琦. 返魂草提取物对胃溃疡大鼠胃黏膜炎症反应的调节作用[J]. 中华中医药学刊，2010，28 (6)：1298-1300.

[6] 杨秀东，冯乾坤，李婷婷，等. 麻叶千里光化学成分及药理作用研究[J]. 长春中医药大学学报，2006，22 (3)：70-71.

[7] 吴 斌，吴立军，张 磊，等. 麻叶千里光抗菌化学成分的研究 (I) [J]. 沈阳药科大学学报，2004，21 (5)：341-344.

[8] Niu T Z, Zhang Y W, Bao Y L, *et al.* A validated high-performance liquid chromatography method with diode array detection for simultaneous determination of nine flavonoids in *Senecio cannabifolius* Less. [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 76: 44-48.

[9] 王作君，韦 平，贾 辉，等. HPLC 法同时测定千里光中对羟基苯甲酸和邻羟基苯甲酸的总含量及对羟基苯乙酸的含量[J]. 中国药师，2014，17(5)：767-769.

[10] 傅 钰，范红艳，杨颖杰，等. 返魂草提取物的药理作用研究进展[J]. 吉林医药学院学报，2014，34 (5)：294-297.

[11] 马鸿雁，杨 莉，王长虹，等. HPLC 法同时测定返魂草颗粒中 6 种活性成分[J]. 中成药，2012，34 (8)：1496-1500.

[12] 姜振邦，刘有平，李小童，等. RP-HPLC 法同时测定返魂草中 3 种酚酸类成分[J]. 中草药，2009，40 (11)：1819-1821.

[13] 刘艳清，汪洪武，鲁湘鄂. RP-HPLC 测定返魂草颗粒中绿原酸和咖啡酸含量 [J]. 中成药，2007，29 (10)：1451-1453.

[14] 马鸿雁，王长虹，杨 莉，等. 单麻叶千里光的化学成分 [J]. 中国天然药物，2009，7(1)：28-30.

[15] 钟大放. 加权最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题[J]. 药物分析杂志，1996，16(5)：343-346.