

HPLC-MS 法测定大鼠尿中黄芪甲甙的含量及其药动力学研究

顾泳川, 王广基

(中国药科大学药物代谢研究中心, 南京 210009)

摘要 目的 建立测定大鼠尿中黄芪甲甙含量的新方法。方法 采用固相萃取高效液相色谱-质谱联用法对大鼠尿中黄芪甲甙的含量进行测定。色谱条件为: DiamonsilTM C₁₈(4.6 mm×250 mm)柱, 流动相: 乙腈-水(40:60 v/v), 流速 0.8 mL/min, 电喷雾型质谱检测器。结果 黄芪甲甙在 0.1~10 μg/mL 线性良好 ($r=0.9991$, $n=5$), 最低检测限为 10 ng/mL。高、中、低浓度的日内和日间变异系数均小于 10%, 平均回收率 > 90%。用此法测定了大鼠静注黄芪甲甙后的尿药浓度并计算了药代动力学参数, 消除速率常数 $k=0.27 \text{ h}^{-1}$, 肾排泄速率常数 $k_e=2.5 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ 。结论 该方法符合生物样品分析要求, 为黄芪甲甙的体内含量测定提供了新的方法。

关键词 黄芪甲甙; 固相萃取; HPLC-MS; 排泄动力学

中图分类号: TQ460.7⁺² R060.1 文献标识码: A

文章编号: 1000-5048(2002)03-0222-03

黄芪为重要的益气中药, 味甘, 性温, 有补气固表、利尿、脱毒、排脓、敛疮、生肌等功效^[1], 我国药典规定以豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hisao 或膜荚黄芪 *A. Membranaceus* (Fischs.) Bge. 的干燥根供药用。研究表明黄芪甲甙为黄芪中的主要有效成分(结构如图 1)。迄今为止, 测定黄芪甲甙的方法主要有薄层扫描法^[2]、比色法^[3]、HPLC-UV 法^[4]、HPLC-ELSD 法^[5]及 HPLC-示差折光检测法^[6]。由于黄芪甲甙无紫外吸收, 上述高效液相色谱法灵敏度

较低, 不能满足检测体内黄芪甲甙的要求。本文采用固相萃取富集大鼠尿中的黄芪甲甙, 然后用 HPLC-MS 进行分离测定, 建立一种测定大鼠尿中黄芪甲甙的方法。

1 材 料

1.1 药品与试剂

黄芪甲甙(江苏省药物研究所, 990414), 乙腈(色谱纯, 美国 Fisher 公司), 水为三蒸水, 其它试剂均为分析纯。黄芪甲甙对照品(中国药品生物制品检定所), 地高辛(中国药品生物制品检定所)。

1.2 仪器

HP1100 LC/MSD 联用系统(含双高压泵, 在线真空脱气机, 自动进样器, 柱温箱, 电喷雾离子化接口的四级质谱检测器以及 HP Chemstation Rev. A. 0803. 色谱工作站), 津腾固相萃取支架, Waters Oasis HLB 固相萃取小柱。

1.3 动物

SD 大鼠(雄性, 240~260 g, 中科院上海实验动物中心提供)。

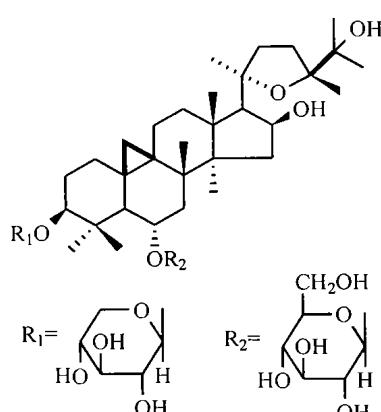


Fig. 1. Chemical structures of astragaloside IV

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: DIKMA 公司 DiamonsilTM C₁₈ (5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm), 流动相: 乙腈-水 (40:60, v/v), 流速 0.8 ml/min, 柱温箱 25 °C。离子化方式: 电喷雾离子化 (ESI); 选择性离子检测 (SIM): 黄芪甲甙 807.5 [M + Na]⁺, 地高辛 803.5 [M + Na]⁺; 传输电压 90V; 干燥气流速: 10.5 L \cdot min⁻¹; 雾化压力 40psig; 干燥气温度: 350 °C; 毛细管电压 4000V。

2.2 尿的收集和处理

SD 大鼠禁食 12 h, 预先用 3 ml 生理盐水灌胃以利尿, 尾静脉注射黄芪甲甙 2.0 mg/kg, 收集 0~1, 1~4, 4~8, 8~16, 16~24, 24~36, 36~48 h 的尿液。

取尿样 1 ml 加入内标地高辛溶液 10 μ l (50 μ g/ml), 混匀后于 1000 g 离心 5 min, 上清液通过已活化的固相萃取小柱, 用 3 ml 水淋洗, 继用甲醇 2 ml 洗脱, 洗脱液于 45 °C 氮气吹干, 残渣用 200 μ l 流动相溶解, 离心 (3000 g, 10 °C, 10 min), 取上清液 20 μ l 进样。

2.3 黄芪甲甙标准曲线的制备及最低检测限测定

于空白尿中分别加入黄芪甲甙对照品标准溶液, 使其浓度为 0.1, 0.5, 1, 5, 10 μ g/ml 标准品系列 5 份, 按“2.2”项下操作, 进行分析。以样品的离子流峰面积 (A_s) 与内标的离子流峰面积 (A_{is}) 的比值 (f) 对样品浓度 (C) 作直线回归, 求得回归方程为 $f = 2.425C + 0.0759$, 相关系数 $r = 0.9991$, 线性范围 0.1~10 μ g/ml。按上述条件测得黄芪甲甙最低检测限 10 ng/ml。

2.5 方法的专属性

在本实验条件下, 尿样中黄芪甲甙和内标分离完全, 空白尿样中无干扰。黄芪甲甙的保留时间为 6.4 min, 内标地高辛的保留时间为 5.5 min (图 2), 本法具有较高的专属性。

2.6 精密度试验

分别用空白尿液配制黄芪甲甙浓度为 0.1、1.0、10 μ g/ml 的样品, 按“2.2”项下操作, 记录样品的离子流峰面积 (A_s) 与内标的离子流峰面积 (A_{is}) 的比值。测定日内变异和 5 d 的日间变异, 结果见表 1。从表 1 可知该方法精密度好, 日内及日间误差 (RSD) 均小于 10%。

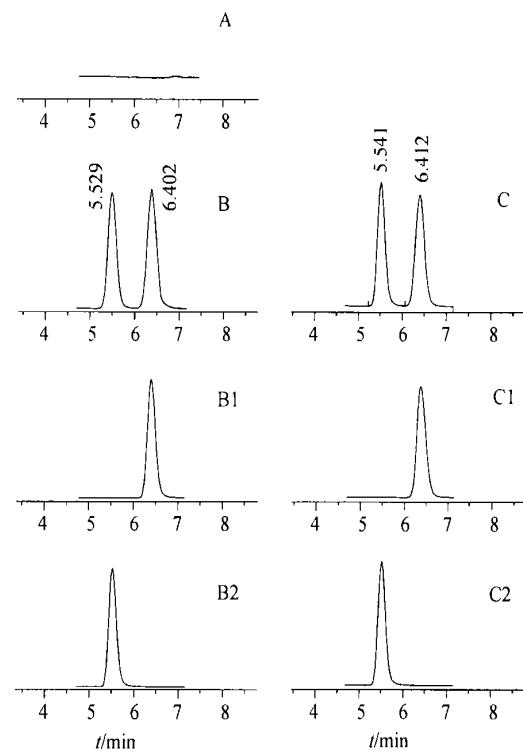


Fig 2. Chromatograms of Astragaloside IV in urine by HPLC-MS.

A. Blank urine, B. Drug-free urine spiked with Astragaloside IV and internal standard, (B₁) Astragaloside IV (B₂) internal standard. C. Urine sample after intravenous injection Astragaloside IV, (C₁) ASI, (C₂) internal standard

Tab 1. Precision of the method with determination of Astragaloside IV ($n = 5$)

Added (μ g/ml)	Intra-day		Inter-day	
	Found	RSD(%)	Found	RSD(%)
0.1	0.110 \pm 0.008	7.27	0.094 \pm 0.006	6.38
1.0	1.08 \pm 0.05	4.24	0.94 \pm 0.06	5.56
10	10.12 \pm 0.32	3.13	9.96 \pm 0.54	4.68

2.7 回收率试验

分别用空白尿液配制黄芪甲甙浓度为 0.1、1.0、10 μ g/ml 的样品, 按“2.2”项下操作, 记录样品峰面积, 另配制相应浓度为 0.1, 1.0, 10 μ g/ml 的对照品甲醇溶液, 按“2.2”项下氮气吹干起开始操作, 记录样品峰面积并依法测定, 结果见表 2。结果表明, 高、中、低 3 个浓度的回收率均大于 90%。

Tab 2. Extraction recoveries of astragaloside IV ($n = 3$)

Conc (μ g/ml)	Recovery %	RSD %
0.1	90.1 \pm 8.6	9.5
1	94.2 \pm 5.3	5.6
10	90.6 \pm 4.9	5.4

2.8 大鼠尿中累积排泄百分率及其消除动力学常数

不同时间段测得的尿药累积排泄百分率-时间见图3。从图3可见,原型药物的尿药总排泄量约占给药量的9%,16 h 尿累积排泄量占尿总排泄量的99%以上。用尿药释放速率的对数 $\log(dXu/dt)$ 与中点时间 tm 作图(见图4),按照尿药速率方程式 $\log(dXu/dt) = \log kX_0 - (k/2.303) tm$ ($X_0 = 0.5 \text{ mg}$)^[8],求算动力学参数,得出ASI的在大鼠体内的消除速率常数为 $k = 0.27 \text{ h}^{-1}$,肾排泄速率常数为 $ke = 2.5 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ 。

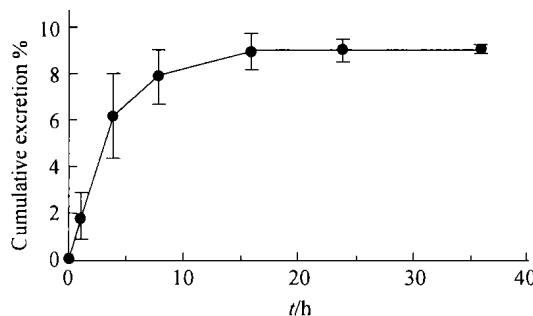


Fig. 3. Cumulative urine excretion percentage- time curve of Astragaloside IV in rats($n=5$)

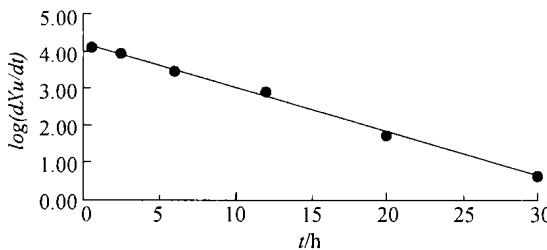


Fig. 4. Graph of $\log(dXu/dt) \sim tm$

Xu: Excretion amount of ASI in urine(ng) during a period of time tm;
Middle time

3 讨 论

1) 黄芪甲甙仅有末端紫外吸收($\lambda_{\text{max}} = 200.8 \text{ nm}$),如采用紫外检测器检测,易受干扰。目前文献报道^[2]以及中国药典(2000年版)均采用薄层扫描法进行定量,而薄层扫描法的稳定性和重现性相对较差,且操作繁琐,灵敏度很低。虽然可以先经衍生化后再使用HPLC-UV进行检测^[7],但样品预处理麻烦,精密度差,且灵敏度也不高。最近也有采用HPLC-ELSD检测^[3]的报道,但对于生物样品来说,其检测的专属性和灵敏度都无法达到要求。

本文建立的HPLC-MS的方法灵敏度高,最低检测限 10 ng/ml ,杂质干扰小,操作简便,是一种检测体内黄芪甲甙的新型有效分析方法。

2) ASI除了在甲醇中溶解度较好外,在其它各种有机溶剂中溶解度均较差,由于 ASI 在尿液中含量较低,因此能有效地将 ASI 从尿中提取出是关键一步。曾试用过常用的有机溶剂如正己烷、乙醚、氯仿、苯以及它们之间与其它有机溶剂如异丙醇、正丁醇、乙酸乙酯的混合物共十几种复合溶媒提取 ASI,效果均不理想;而使用固相萃取回收率高,干扰少。固相萃取时淋洗是减少测定时杂质干扰的重要一步,特别对于色谱图中前 5 min 的峰形影响较大。淋洗条件经优化以 3 ml 的水淋洗可有效的除去尿样中大多数的盐类,使测定时样品不受干扰。

3) HPLC-MS 对 ASI 进行离子扫描时,发现有 $807.5[M+\text{Na}]^+$, 和 $823.5[M+\text{K}]^+$ 两个峰,而未见 $785.5[M+\text{H}]^+$, 其中 $807.5[M+\text{Na}]^+$ 丰度较大,故选取此峰进行定量。作者也曾在 Shimadzu LC/MS2010 和 PE Sciex API2000 上对 ASI 进行过检测,得到相同的结果。

4) 目前尚未见有关 ASI 排泄动力学方面的报道,本实验首次测定了 ASI 在大鼠尿中原型药物的排泄,原型药物的尿药总排泄量约占给药量的 9%。同时应用本方法对大鼠胆汁中的 ASI 进行了测定,结果表明原型药物在胆汁中的排泄量约占给药量的 40%。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2000. 249-250.
- [2] 鲁 静(Lu J), 王宝琴(Wang BQ). 黄芪甲甙的薄层扫描法测定[J]. 中成药(Chin Tradit Pat Med), 1992, 14(6): 34-35.
- [3] 陆一心(Lu YX). 黄芪甲甙定量方法的研究[J]. 中成药, 1996, 18(2): 38-39.
- [4] 付铁军(Fu TJ), 李伯刚(Li BG), 元 乔(Yuan Q)等. 高效液相色谱法测定黄芪注射液中黄芪甲甙的含量[J]. 天然产物研究与开发(Nat Prod Res Dev), 1997, 9(4): 53-56.
- [5] Li WK, Fitzloff JF. Determination of astragaloside IV in Radix astragali (Astragalus membranaceusvar. mongholicus) using high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection [J]. J Chromatogr Sci. 2001, 39(11): 459-462.
- [6] 池玉梅(Chi YM), 姜海英(Jiang HY). HPLC 示差折光检测测定黄芪精口服液中黄芪甲甙的含量[J]. 中国药学杂志(China Pharmacy), 2003, 43(10): 711-713.

- Pharm J, 2001, 36(1): 49-51.
- [7] Yao MG, Qi Y, Bi KS, et al. A precolumn derivatization high performance liquid chromatographic method with improved sensitivity and specificity for the determination of astragaloside IV in radix astragali [J]. J Chromatogr Sci, 2000, 38(8): 325-328.
- [8] 奚念朱(Xi NZ)编. 药剂学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 468-468.

Determination and Pharmacokinetical Study of Astragaloside IV in Rats Urine by HPLC-MS

GU Yong-Chuan, WANG Guang-Ji

Center of Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

ABSTRACT **AIM** The purpose is to develop a new method for the determination of Astragaloside IV in rat's urine. **METHODS** The HPLC-MS method utilizing solid phase extraction was established to determine the concentration of Astragaloside IV in rat's urine. The analysis was carried on Diamonsil (tm) C₁₈ column (4.6×250 mm, 5 μm). The mobile phase was CH₃CN-H₂O (40:60, v/v), with flow rate 0.8 ml/min, electrospray MS detector. **RESULTS** The calibration curve was linear ($r=0.9991$, $n=5$) in the range of 0.1~10 μg/ml for Astragaloside IV. The limit of detection (LOD) was 10 ng/ml. The average recovery was 91.63% and RSD of intra-day and inter-day was smaller than 10%. This method was applied to the determination of ASI in rats and the pharmacokinetical parameters were calculated as follows: $k=0.27 \text{ h}^{-1}$, $ke=2.5 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$. **CONCLUSION** A reliable HPLC-MS assay for Astragaloside IV was developed. The assay method was appropriate for determination of Astragaloside IV in rat's urine.

KEY WORDS Astragaloside IV; Solid phase extraction; HPLC-MS; Excretion Pharmacokinetics

中国医药论坛——WTO与中国医药市场高层报告会

2002年5月20日,“中国医药论坛—WTO与中国医药市场高层报告会”在京举行。会议由中国医药企业管理协会主办,世界贸易组织WTO—副总干事曼多查先生(Miguel Rodriguez Mendoza)、联合国贸易和发展会议项目主任佩多·洛夫先生(Pedro Roffe)分别作了“中国医药市场开放后企业家的战略思考”和“与贸易相关的知识产权保护规划与医药知识产权保护”的报告,就入世对中国医药企业的机遇与挑战以及WTO的基本规则与贸易争端的解决等相关问题作精彩讲演。国家药品监督管理局副局长桑国卫、国家经贸委经济运行局副局长于明德等也参加了有关WTO与中国医药产业前景的讨论。桑国卫副局长作了“加入WTO与中国的药品监督管理”的报告。

在经济全球化的背景下,医药产业界的这次盛会显得意义深远,它标志着我国医药界在加入WTO的元年已开始从实际着手寻找更多的机会。

(源于《医药经济报》)