

应用液质联用技术同时检测血浆样品中的 16 种人参皂苷成分

刘厚甫, 周明眉, 张伯礼, 程翼宇, 李川

(中国科学院上海药物研究所药物代谢研究中心, 上海 201203)

Simultaneous Quantification of Sixteen Ginsenoside Derivatives in Plasma

LIU Hou-fu, ZHOU Ming-mei, ZHANG Bo-li, CHENG Yi-yu, LI Chuan

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

Abstract: Ginseng is a key component in traditional Chinese medicine and is also one of the most extensively used botanical products in the West. To assess systemic exposure of bioactive ginsenosides after oral administration of ginsenoside-containing herbs or formulations, A specific, sensitive, rapid and anti-interference method for simultaneous determination of GR_{A3}, GR_{B1}, GR_{B2}, GR_D, GR_{G3}, GR_{H2}, C-K, Ppd, G-20g-Rf, GR_E, GR_{G1}, GR_F, GR_{H1}, NGR₁, and PGF₁₁ in plasma was developed, which involves liquid chromatography/tandem mass spectrometry in selected reaction monitoring mode. Very low mobile phase modifier HCOONH₄ (0.005% g·L⁻¹) was found to be able to greatly increase response for [M+H]⁺ and slightly for [M+Na]⁺. CH₃OH was used to extract ginsenosides from plasma simultaneously. Analysis of methanol-precipitated plasma samples was achieved by positive ion LC-ESI-MS/MS using a reversed-phase C₁₈ column eluted with a H₂O/CH₃OH gradient. 16 ginsenosides were eluted within 10 min and can avoid matrix effect. The on-column quantification limits of the newly developed method were 6.85 pg for protopanaxatriol, ginsenoside Rf, Rg₁, Re, and 20g-Rf, 0.185 ng for ginsenoside Rh₂, and 20.6 pg for the other ginsenosides. The multi-analyte quantitative bioassay was fully validated and the acceptance criteria were fulfilled for each analyte tested. This newly developed method should prove useful for wide-scale monitoring of ginsenoside plasma concentrations for both pharmaceutical investigations and clinical applications.

Keywords: LC-MS/MS; ginsenosides; multi-analyte bioassay

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2007) 增刊-88-02

人参对中枢神经系统、心血管、内分泌、免疫系统有着广泛的药理活性。人参皂苷及其在肠道的水解产物被认为是亚洲人参、西洋参、三七中主要的药理活性成分, 然而它们的作用机理仍不十分清楚, 服用人参制剂后机体对皂苷类成分暴露水平的评估有助于揭开其药效物质基础。本工作首次报道了应用 LC-MS/MS 技术定量大鼠血浆中的 Ppd、GR_{H2}、C-K、GR_{G3}、GR_D、GR_{B2}、GR_{B1}、GR_{A3}、Ppt、GR_{H1}、GR_F、GR_{G1}、NGR₁、GR_E、G-20g-Rf 和 PGF₁₁, 并将这一技术应用于人参及其制剂的药代动力学研究。

1 实验部分

1.1 药物与试剂

对照品 GR_{B1}、GR_D、GR_{G3}、GR_{H2}、GR_{G1}、GR_F、GR_E、Ppd、Ppt、NGR₁、C-K 和 PGF₁₁ 购自中国药品与生物制品检定所; GR_{B2}、GR_{A3} 和 G-20g-Rf 购自风山渐股份有限公司 (中国昆明); GR_{H1} 购自安徽芜湖贰尔塔科技公司; 其它试剂均为分析纯。

1.2 主要分析仪器及优化后的液质联用分析条件

液质联用分析系统是 Agilent 1100 系列和美国 Thermo Finnigan 公司 TSQ_{quantum} 三级四极杆质谱检测器。液相分离条件包括: Phenomenex[®] Luna 5 μm C₁₈ 柱 (50 mm \times 2.1 mm, i.d., 5 μm), 柱温控制在 25 $^{\circ}\text{C}$ 左右; 流动相为甲醇-水系统; 流速设为 0.3 mL $\cdot\text{min}^{-1}$; 进样量为 5 μL 。质谱检测采用 ESI 离子源, 在正离子检测方式下, 选择 SRM 工作模式进行二级质谱分析。

1.3 实验方法

向 20 μL 血浆样品中加入 80 μL 甲醇沉淀蛋白, 1 600 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 振摇 5 min, 离心后, 取上清液 5 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

向大鼠空白血浆中加入已知量的待测化合物, 配成血药浓度为 9 000、3 000、1 000、333、111、37.0、12.3、4.10 及 1.37 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准血样。以被测化合物的峰面积 (Y) 对被测化合物在血样中的浓度 (X) 进行线性回归, 并以浓度的倒数 ($1/X$) 为加权系数, 求得测定效应与浓度的回归方程。

16 种皂苷类成分在分析过程中的稳定性考察包括: 血浆样品中反复冻溶的稳定性、血浆样品前处理过程中稳定性、复溶溶剂中短期稳定性; 血样提取回收率及基质效应的考察按 B K Matuszewski 等提出的方法考察, 用待测化合物浓度分别为各人参的 LLOQ, 111 及 3 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的质控血样, 进行 LC-MS/MS 分析, 以得出准确性和精密性。

2 结果和讨论

2.1 16 种皂苷类化合物的 LC-MS/MS 分析

根据各人参皂苷的离子化特征以及相对离子丰度, 选定 $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$ 作为 C-K、GR_{g3}、GR_d、GR_{b2}、GR_{b1}、GR_{a3}、GR_f、GR_{g1}、NGR₁、GR_e 和 G-20g-Rf 的监测母离子, 而其余的五种人参皂苷则用 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 作为监测母离子, 选定 CID 后信号最强的子离子作为监测子离子。具体的监测离子通道为: 二醇型人参皂苷 Ppd (m/z 461 \rightarrow 443)、GR_{h2} (m/z 623 \rightarrow 587)、C-K (m/z 645 \rightarrow 203)、GR_{g3} (m/z 807 \rightarrow 365)、GR_d (m/z 969 \rightarrow 789)、GR_{b2} (m/z 1101 \rightarrow 335)、GR_{b1} (m/z 1131 \rightarrow 365)、GR_{a3} (m/z 1263 \rightarrow 497) 和三醇型人参皂苷 Ppt (m/z 477 \rightarrow 109)、GR_{h1} (m/z 639 \rightarrow 621)、GR_f (m/z 823 \rightarrow 365)、GR_{g1} (m/z 823 \rightarrow 643)、NGR₁ (m/z 955 \rightarrow 775)、GR_e (m/z 969 \rightarrow 789)、G-20g-Rf (m/z 985 \rightarrow 365) 以及只在西洋参存在的 PGF₁₁ (m/z 801 \rightarrow 457)。所用的色谱条件使得被分析化合物在 3~8 分钟内被洗脱出来, 三秒钟后的洗脱液才进入 ESI 离子源, 有效的避免了血浆提取液中的杂质污染离子源及干扰被测化合物。

2.2 从血样中提取 16 种人参皂苷化合物

用甲醇沉淀血浆样品 (血浆: 甲醇=1: 4), 回收率在 16.7%~35.7% 之间, Post-column infusion 实验结果表明其能很好的避开血浆中基质的干扰, 进一步研究显示其无明显的绝对基质效应和相对基质效应 (-6.5%~9.1%), 这 16 种皂苷类成分在整个分析过程中稳定。

2.3 分析方法的标准曲线、准确性、精密度和最低定量限

在最低为 1.37 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 最高为 9 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度范围内, 对这 16 种来自三七中的皂苷类成分的峰面积对其血药浓度进行线性回归, 其回归曲线线性良好 ($r \geq 0.992$)。在 LLOQ 的批内准确性为 86.8%~118%, 精密密度为 9.0%~16.8%; 在中高浓度的批内准确性为 88.3%~113%, 精密密度为 0.9%~14.7%。本方法 Ppd、C-K、GR_{g3}、GR_d、GR_{b2}、GR_{b1}、GR_{a3}、NGR₁、PGF₁₁ 的 LLOQ 为 4.12 ng $\cdot\text{mL}^{-1}$; Ppt、GR_f、GR_{g1}、GR_e、G-20g-Rf 为 1.37 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; GR_{h2} 为 37.0 ng $\cdot\text{mL}^{-1}$; GR_{h1} 为 12.3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.4 分析方法在口服人参皂苷提取物后在大鼠中的药代动力学研究

Sprague-Dawley 单剂量口服亚洲人参、西洋参、三七 (剂量为 2 g 生药材水提物每千克) 后, 在血中发现了 GR_d、GR_{b2}、GR_{b1}、GR_{a3}、GR_{g1}、NGR₁、GR_e、PGF₁₁ 以及代谢产物 C-K, 其中 GR_{b1} 的浓度最高, 可达 940 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 各人参皂苷一般在服药后 8 h 达峰。