

HPLC-MS/MS 法测花旗松素在 Beagle 犬血浆中的浓度 及其药代动力学研究

仝瑶瑶, 王文艳, 张林琪, 刘万卉

(烟台大学药学院, 山东 烟台 264005)

Determination of Taxifolin in Beagle Dogs Plasma by HPLC-MS/MS and Pharmacokinetic Study

TONG Yao-yao, WANG Wen-yan, ZHANG Lin-qi, LIU Wan-hui

(Pharmaceutical School, Yantai university, Yantai 264005, China)

Abstract: A rapid, sensitive and selective method for the determination of taxifolin in Beagle dog plasma was described by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Resveratrol was used as internal standard (I.S.). MS detection and quantitation were done by mass spectrometer using selected reaction monitoring at m/z 303 and 285 $[M-H]^-$ for taxifolin, and m/z 227 and 185 $[M-H]^-$ for resveratrol. The calibration curve is linear ($r > 0.998$) from 2 to 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, and the lower limit of quantification (LLOQ) is 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Key words: taxifolin; HPLC-MS/MS; pharmacokinetics

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2009) 增刊-0116-02

花旗松素是一种二氢黄酮醇类化合物, 具有抗肿瘤活性、抗氧化、抗辐射的作用。目前报道的测定生物样品中花旗松素的方法有 HPLC^[1]法和 UPLC-MS 法^[2]。HPLC 法由于其灵敏度低, 不能满足花旗松素在犬体内药代动力学研究的需要; UPLC-MS 法的灵敏度较前两种方法有所提高, 但是其最低定量限仅为 6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本工作建立了 HPLC-MS/MS 法, 采用液液萃取处理血浆样品, 最低定量限为 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 为得出更准确的药代动力学参数提供了有力支持。同时, 还给出了花旗松素在犬体内的药代动力学参数。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

TSQ QUANTUM ACCESS 型三重四极杆串联质谱仪: 美国 ThermoFisher 公司产品, 配有 ESI 源以及 Xcalibur 数据处理软件; Agilent 1100 自动进样液相色谱系统: 美国 Agilent 公司产品; Uchrospher C₁₈ 色谱柱 (2.1 m × 150 mm × 1.8 μm): 汉邦公司产品。花旗松素标准品: 成都普思制药有限公司产品; 内标白藜芦醇 (RES): 烟台大学药化室提供。

1.2 样品采集和血浆样品处理

雄性 Beagle 犬 5 只, 实验前晚起禁食不禁水, 给药前称重。实验分 2 次进行, 第 1 次按 2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

静注给药; 2周后按20 mg·kg⁻¹灌胃给药, 给药后均按时间点采血, 将血浆置于-20 °C保存, 待测。

取100 μL血浆样品于具塞离心管中, 以乙酸乙酯为萃取液, 采取液液萃取的方式处理样品, 最后取10 μL进行HPLC-MS/MS分析。

1.3 方法学确证

花旗松素在犬血中的整个方法学确证都严格按照FDA指导原则完成。方法学确证包括专属性, 标准曲线的制备和最低定量限, 精密度与准确度以及稳定性试验。

2 结果与讨论

2.1 方法确证

结果表明, 空白犬血中的内源性物质不干扰花旗松素及其内标的测定。标准曲线的线性范围为2~1 000 μg·L⁻¹, 定量下限为2 μg·L⁻¹, 犬血中花旗松素的线性相关系数为0.998, 符合药代动力学研究要求。精密度与准确度实验, 以及稳定性实验的数据表明, 测定值与添加值的相对偏差不超过15%, 满足实验测定的需要, 保障了分析过程的数据真实、可靠。

2.2 测量条件

流动相选用V(乙腈):V(水, 含0.1% 0.1 mol·L⁻¹醋酸胺及0.01%乙酸)=35:65的溶液, 流速0.3 mL·min⁻¹。采用电喷雾离子化源, 喷射电压3 500 V, 毛细管温度为350 °C, 花旗松素和内标的碰撞能电压分别为15 V和20 V, 以负离子方式选择性离子监测, 检测离子对分别为m/z 303→285和m/z 227→185。

2.3 花旗松素在 Beagle 犬体内的药代动力学结果

Beagle 犬口服及注射花旗松素后, 其统计矩参数列于表1。由表1可知, 2种给药途径的 $t_{1/2}$ 有显著差别, 这与文献报道的一致。说明除了给药剂量会影响半衰期^[2], 给药途径也会对其有显著影响。通过AUC_(0-∞)计算得到绝对生物利用度为9.69%, 与兔的36%^[1]和大鼠的0.17%^[2]有较大差别。

表1 Beagle 犬静注2 mg·kg⁻¹, 口服20 mg·kg⁻¹花旗松素统计矩参数

参数	单位	静注2 mg·kg ⁻¹ 花旗松素		口服20 mg·kg ⁻¹ 花旗松素	
		Mean	SD	Mean	SD
AUC _(0-t)	μg·L ⁻¹ ·min	38 245.6	4 108.0	36 262.6	3 923.7
AUC _(0-∞)	μg·L ⁻¹ ·min	38 484.1	4 157.2	37 285.8	4 255.9
MRT _(0-t)	min	4.0	0.4	108.2	16.7
MRT _(0-∞)	min	5.1	0.5	122.4	18.1
$t_{1/2}$	min	40.1	4.3	104.9	23.7
T_{max}	min			57	6.7
C_{max}	μg·L ⁻¹	2 289.5	137.2	449.2	189.3

3 小结

本实验采用HPLC-MS/MS法检测了给Beagle犬静注和灌胃花旗松素后, 犬血中不同时刻花旗松素的浓度, 绘制了血药浓度-时间曲线, 并根据相应数据, 得出药物动力学参数。

参考文献:

- [1] POZHARITSKAYA O N, KARLINA M V SHIKOV A N, et al. Determination and pharmacokinetic study of taxifolin in rabbit plasma by high-performance liquid chromatography[J]. Phytomedicine, 2009, 16(2): 244-251.
- [2] WANG X D, XIA H J, XING F, et al. A highly sensitive and robust UPLC-MS with electrospray ionization method for quantitation of taxifolin in rat plasma[J]. Journal of Chromatography B, 2009, 877(18/19): 1 778-1 786.