

天麻素血药浓度测定及药动学研究

华雯妍, 朱艺芳, 张全英* (苏州大学附属第二医院, 药剂科临床药理试验室, 江苏 苏州 215004)

摘要: 目的 建立天麻素血浆药物浓度 LC-MS/MS 测定法, 测定健康受试者血浆中天麻素的浓度并评价天麻素胶囊的药动学。方法 建立以阿昔洛韦为内标的天麻素血药浓度 LC-MS/MS 测定方法, 色谱柱为 Atlantis T3(100 mm×3.0 mm, 3 μ m), 流动相为乙腈-水(10:90), 对 18 名健康受试者单剂量口服 150 mg 天麻素胶囊进行药动学研究。结果 建立了简单、专属的天麻素血浆药物浓度的 LC-MS/MS 测定法, 以沉淀法进行样品前处理, 无杂质干扰测定, 灵敏度达到了 3.00 ng·mL⁻¹, 每个生物样品分析时间仅为 2 min。18 名健康受试者口服天麻素胶囊 150 mg 后, 测定血浆样品并估算天麻素的药动学参数, $T_{\max}$ 均值为 (0.8±0.3)h, $t_{1/2}$ 均值为 (2.1±0.4)h, $C_{\max}$ 均值为 (378±84)ng·mL⁻¹, AUC_{0-12} 均值为 (878±175)ng·h·mL⁻¹, $AUC_{0-\infty}$ 均值为 (897±175)ng·h·mL⁻¹。结论 本法快速、准确、灵敏度高且前处理简单, 能很好的应用于药动学研究。

关键词: 天麻素; LC-MS/MS; 药动学

中图分类号: R969.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)07-0634-04

Determination of Gastrodin in Human Plasma by LC-MS/MS and Its Application in Pharmacokinetic Study

HUA Wenyan, ZHU Yifang, ZHANG Quanying* (Department of Clinical Pharmacology Research Lab, The Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the plasma concentration of gastrodin and evaluate the pharmacokinetics of the gastrodin capsule. **METHODS** We developed an LC-MS/MS assay method using aciclovir as the internal standard to determine the plasma concentration of gastrodin. An Atlantis T3 column (100 mm×3.0 mm, 3 μ m) and the mobile phase of CH₃CN-water (10:90) were used for LC-ESI (-) and MRM for MS. **RESULTS** A simple and specific method has been developed to determinate the plasma concentrations of gastrodin by LC-MS/MS. Each plasma sample was preprocessed by adding methanol, and analysed within 2 minutes. No significant interfering peaks were observed. The lower limit of quantitation was 3.00 ng·mL⁻¹. An oral dose of gastrodin capsules was given to 18 healthy male volunteers. The pharmacokinetic parameters of the test capsule were as follows: the $T_{\max}$ were (0.8±0.3)h, the $t_{1/2}$ were (2.15±0.38)h, the $C_{\max}$ were (378±84) ng·mL⁻¹, the AUC_{0-12} were (878±175) ng·h·mL⁻¹, the $AUC_{0-\infty}$ were (897±175)ng·h·mL⁻¹, respectively. **CONCLUSION** The method is simple in pretreatment and is rapid, sensitive and accurate in analysis. This method was successfully applied to study the pharmacokinetics of gastrodin in healthy Chinese volunteers.

KEY WORDS: gastrodin; LC-MS/MS; pharmacokinetic

天麻素是名贵中药天麻的主要活性成分, 可恢

复大脑皮质兴奋与抑制过程间的平衡失调, 产生镇

作者简介: 华雯妍, 女, 药师, 硕士 Tel: (0512)67783687
Tel: (0512) 67783687 E-mail: silverspray @163.com

E-mail: mini.10.30@hotmail.com *通信作者: 张全英, 女, 主任药师

静安神和镇痛作用,能促进受损脑组织的恢复,缓解神经性头痛等,用于神衰、神衰综合征及血管神经性头痛等症(如偏头痛、三叉神经痛、枕骨大神经痛等),毒性低,不良反应小。另外有试验证明,天麻中提取的天麻糖复合物在视网膜缺血/再灌注过程中有明显的治疗作用^[1]。天麻素在动物体内的药动学研究已有报道^[2-3],注射液人体药动学研究已有报道^[4],其口服制剂的人体药动学研究至今未见报道。本试验采用LC-MS/MS简便、快速测定人血浆中的天麻素浓度,建立定量限达到3.00 ng·mL⁻¹的血药浓度测定方法,估算口服天麻素胶囊的药动学参数,为临床用药提供依据。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

Agilent 1200 液相色谱仪(四元泵、自动进样器、柱温箱), API-4000 型三重串联四极杆质谱仪, Analyst 1.4.2 色谱工作站。天麻素胶囊(山东齐都药业有限公司,含天麻素 50 mg·粒⁻¹,批号: 051122)。天麻素标准品(山东齐都药业有限公司,批号: 20071216,含量: 99.5%)。阿昔洛韦标准品(中国药品生物制品检定所,含量: 99.0%,批号: 630-200001)。甲醇和乙腈为色谱级,试验用水为灭菌注射用水(安徽双鹤药业有限责任公司)。

1.2 色谱与质谱条件

流动相: 乙腈-水(10:90);流速: 0.6 mL·min⁻¹; 色谱柱: Atlantis T3(100 mm×3.0 mm, 3 μm)(美国 Waters 公司); 预柱: Phenomenex Security Guard C18(4 mm×3.0 mm); 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μL。质谱扫描方式: 多反应监测(MRM); 离子极性: 负离子; 离子化方式: 气动辅助电喷雾离子化; 检测对象: 天麻素, [M-H]⁻, m/z: -285.1→-122.9; 阿昔洛韦, [M-H]⁻, m/z: -224.0→-150.0。雾化气: 275.8 kPa, 加热辅助气: 241.3 kPa, 喷雾电压: -5 500V, 雾化温度: 500 °C。

1.3 给药方案

18 名健康男性受试者单剂量口服 150 mg 受试制剂(含天麻素 150 mg)后,于服药前和服药后 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 7, 9, 12 h 取前臂静脉血各 4 mL 置肝素管中, 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 分离血浆, 于-40 °C 冷冻保存待测。18 名健康受试者年龄(23.1±1.7)岁, 体重(64.3±5.5)kg, 身高(172.2±0.3)cm。所有受试者无药物过敏史, 试验前经体检肝、肾功能正常, 心

电图正常, 试验前两周及试验期间未服用其他任何药物, 不吸烟、不饮酒。所有受试者均了解试验药物及试验过程, 并自愿签署知情同意书。服药前空腹 10 h 以上, 药物用 200 mL 水送服, 服药后 2 h 禁水, 4 h 禁食, 试验期间统一清淡饮食, 禁止饮用任何饮料, 避免剧烈运动。

1.4 样品处理方法

精密吸取血浆 200 μL 至 1.5 mL 离心管中, 加 500 ng·mL⁻¹ 内标液 50 μL, 混匀, 加 600 μL 甲醇沉淀蛋白; 涡旋 1 min, 于 16 000 r·min⁻¹、5 °C 离心 10 min, 取上清液 100 μL 加水 200 μL, 涡旋混匀, 进行 LC-MS/MS 测定。

2 结果

2.1 方法的专属性

在本试验所采用的色谱条件下, 天麻素的保留时间在 1.32 min 左右, 内标的保留时间在 1.23 min 左右, 天麻素及内标峰形良好, 并且无杂峰干扰测定, 见图 1。

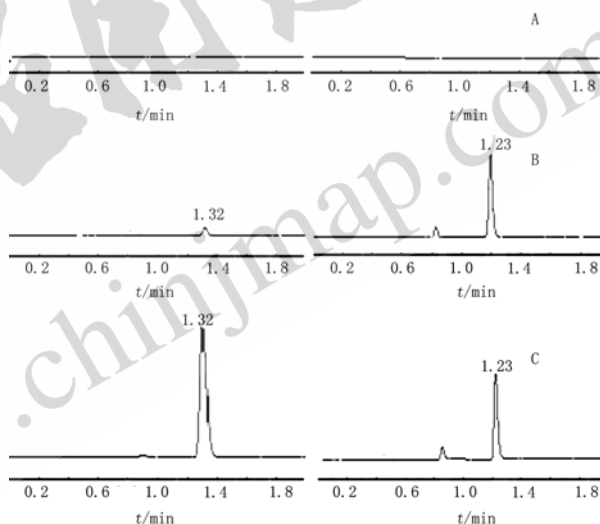


图 1 天麻素专属性色谱图

A-空白血浆; B-空白血浆加入天麻素对照品和内标对照品(3.00 ng·mL⁻¹); C-健康受试者口服天麻素胶囊后 7 h 的血浆样品; 1-天麻素; 2-内标

Fig 1 Typical chromatograms of gastrodin

A-blank plasma; B-blank plasma spiked with gastrodin and internal standard; C-plasma obtained from a volunteer at 7 h after a single oral administration of gastrodin capsule; 1-gastrodin; 2-IS

2.2 标准曲线及定量下限

精密吸取空白血浆 180 μL, 加入天麻素标准系列溶液 20 μL, 配制成相当于天麻素血浆浓度为 3.00, 5.00, 10.0, 20.0, 50.0, 100, 200, 500 ng·mL⁻¹ 的样品, 按“1.4”项下操作, 记录样品及内标峰面积。以天麻素与其内标峰面积比值 Y 对血药浓度

X作权重回归计算,得平均权重回归方程($n=6$): $Y=0.014\ 67+0.031\ 8X$, $r=0.998\ 9$, 权重系数($w=1/x^2$)。血浆中天麻素在 $3.00\sim 500\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性良好,定量限为 $3.00\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($\text{RSD}=7.1\%$, $n=6$)。

2.3 精密度与准确度

精密吸取空白血浆 $180\ \mu\text{L}$,加入天麻素质控标准溶液 $20\ \mu\text{L}$,配制低、中、高浓度样品($4.00, 40.0, 400\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$),按“1.4”项下操作,记录样品及内标峰面积,测定3批($n=15$),根据随行标准曲线计算实测浓度。统计分析得低、中、高浓度样品的批内精密度分别为 6.3% , 5.2% 和 5.3% ;批间精密度分别为 11.4% , 2.2% 和 0.1% ;准确度分别为 103% , 103% 和 99.6% 。

2.4 提取回收率

精密吸取空白血浆 $180\ \mu\text{L}$,加入天麻素标准系列溶液 $20\ \mu\text{L}$,配制低、中、高浓度样品($4.00, 40.0, 400\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$),按“1.4”项下操作,测定并分别计算3中浓度样品和内标的峰面积比值 $f_x(f_x=A_s/A_i, n=5)$ 。另外精密吸取血浆 $180\ \mu\text{L}$,加 $600\ \mu\text{L}$ 甲醇涡旋离心后,分别加入低、中、高天麻素质控标准溶液 $20\ \mu\text{L}$,按“1.4”项下操作,测定并分别计算样品和内标的峰面积比值 $f_s(f_s=A_s/A_i, n=5)$ 。天麻素的提取回收率 $R\%=f_x/f_s\times 100\%$,低、中、高浓度分别为 101% , 92.7% 和 91.4% 。

2.5 稳定性

精密吸取空白血浆 $180\ \mu\text{L}$,加入天麻素标准系列溶液 $20\ \mu\text{L}$,配制低、高浓度样品($4.00, 400\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$),血浆样品于室温放置 $6\ \text{h}$ 、反复冻融3次和 $-40\ ^\circ\text{C}$ 放置 $20\ \text{d}$ 后,分别按“1.4”项下操作测定,另外处理完毕的样品在自动进样器放置 $24\ \text{h}$ 后测定,根据随行标准曲线计算实测浓度,与加入浓度进行比较并计算 RSD 。结果显示,所有稳定性考察样品实测浓度与加入浓度比较,浓度变化均在 $85\%\sim 115\%$ 之间, RSD 均小于 10% 。

2.6 药动学参数统计及生物等效性评价

用DAS 2.0程序处理计算药动学参数。18名健康志愿者单剂量口服 $150\ \text{mg}$ 受试制剂的药动学参数见表1,平均血药浓度-时间曲线见图2。

3 讨论

在已有的研究中,大部分国内外学者以HPLC建立了天麻素血浆样品的测定法,以紫外作为检测手段^[2-7],可达到的最低定量限(LLOQ)为 $400\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[5]。随着液质联用技术的发展,近年又开

表1 天麻素药动学参数

Tab 1 Pharmacokinetic parameters after oral administration of the gastrodin capsule

药动学参数	$\bar{x}\pm s$
$C_{\max}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	378 ± 84
$T_{1/2}/\text{h}$	2.1 ± 0.4
$T_{\max}/\text{h}$	0.8 ± 0.3
$\text{AUC}_{0-12}/\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	878 ± 175
$\text{AUC}_{0-\infty}/\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	897 ± 175

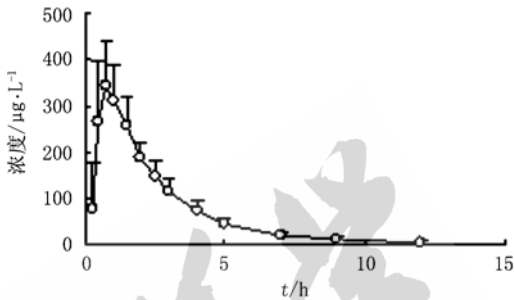


图2 18名健康志愿者单剂量口服天麻素后平均药-时曲线($n=18$)

Fig 2 Mean plasma concentration-time curves after a single oral dose of gastrodin in 18 healthy volunteers($n=18$)

发出一些新方法,ZHANG W等^[8]以LC-MS测定大鼠灌胃天麻提取物后天麻素的血浆药物浓度,灵敏度不高,LLOQ为 $2.00\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,且分析时间长达 $10\ \text{min}$ 。LIN LC等^[9]以LC-MS/MS测定大鼠静脉给药后天麻素血液中药物浓度,方法较灵敏,LLOQ为 $0.5\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,但是分析时间也长达 $10\ \text{min}$,且样品处理方法采用了微透析,成本较高。本研究中所建立的天麻素血浆药物浓度的LC-MS/MS测定法,最低定量限达到 $3.00\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,灵敏度较高,可以满足人体口服天麻素制剂的药动学需要;同时,方法专属性强,样品处理简便,成本低;另外,此法分析时间仅为 $2\ \text{min}$,与国内外现有的测定方法相比分析速度大大加快,对于大批量血浆样品的测定具有很高的实用价值。

天麻素在色谱柱上保留不佳,本研究中采用了对极性化合物有很好的保留且与纯水能完全兼容的Waters Atlantis T3($100\ \text{mm}\times 3.0\ \text{mm}, 3\ \mu\text{m}$)作为分析色谱柱,对样品的保留及峰形均有很大的改善。

由于天麻素口服制剂的人体药动学研究至今未见报道,因此,本研究根据预试验血药浓度测试分析结果设计了采血时间点。另外,由于预试验结果显示达峰浓度个体差异较大,所以设计试验方案时扩大了试验例数。本研究(下转第660页)

(上接第636页)结果显示,天麻素在人体内的吸收分布较为迅速,能快速起效,血药浓度-时间曲线与二室模型的函数曲线符合,研究结果与动物体内的药动学^[2-3]以及注射液人体药动学^[4]的研究结果基本一致。

REFERENCES

- [1] TAO L M, BAO N, MIAO H C, et al. Effects of polysaccharides from *Gastrodia elata* Blume on retina of ischemia reperfusion rats [J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2006, 22 (10): 1233-1236.
- [2] GHEN G, HAO X H, LIU G L. Pharmacokinetics of gastrodin in rats [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2003, 38(2): 127-129.
- [3] YOU J H, TAN T Z, KUANG A R, et al. Biodistribution and metabolism of 3H-gastrodigenin and 3H-gastrodin in mice [J]. *J West China Univ Med Sci*(华西医科大学学报), 1994, 25 (3): 325-328.
- [4] LUO J, WU Z L, WANG H X. Pharmacokinetic study of gastrodin injection [J]. *Pham J Chin PLA*(解放军药理学报),

2006, 22(5): 391-393.

- [5] LI L L, ZHANG Z R, GONG T, et al. Simultaneous determination of Gastrodin and Ligustrazine hydrochloride in dog plasma by gradient high-performance liquid chromatography [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41(4): 1083-1087.
- [6] QIAO W, GUO S C, SU Z G. Pharmacokinetics of Gastrodin in rat plasma and CSF after i.n. and i.v. [J]. *Int J Pharm*, 2007, 341(1/2): 20-25.
- [7] JIANG P, WEN Y S, FAN Y, et al. Determination of gastrodin in plasma of rats by HPLC [J]. *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志), 2006, 26 (6): 700-702.
- [8] ZHANG W, SHENG Y X, ZHANG J L. Determination and pharmacokinetics of gastrodin and *p*-hydroxybenzylalcohol after oral administration of *Gastrodia elata* Bl. extract in rats by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric method [J]. *Phytomedicine*, 2008, 15(10): 844-850.
- [9] LIN L C, CHEN Y F, LEE W C, et al. Pharmacokinetics of gastrodin and its metabolite *p*-hydroxybenzyl alcohol in rat blood, brain and bile by microdialysis coupled to LC-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48 (3):909-917.

收稿日期: 2009-07-24