

珍菊降压片在大鼠体内药动学研究

童静玲, 朱让腾*, 罗利飞(台州恩泽医疗中心集团恩泽医院, 浙江 台州 318050)

摘要: 目的 建立同时测定大鼠血浆中芦丁和氢氯噻嗪的 LC-MS/MS 方法, 并研究珍菊降压片在大鼠体内的药动学。方法 采用蛋白质沉淀法处理血浆样品, 色谱柱为 Pntulips BP-C₁₈ 柱(2.1 mm×50 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水梯度洗脱, 柱温为 30 ℃; 流速为 0.45 mL·min⁻¹。采用电喷雾离子源, 选择离子反应监测模式。采用 DAS 2.0 软件计算药动学参数。结果 方法学验证结果表明内源性杂质不干扰待测物和内标的测定, 芦丁和氢氯噻嗪的线性范围分别为 5~1 000 ng·mL⁻¹($r^2=0.997\ 1$)和 2.5~500 ng·mL⁻¹($r^2=0.995\ 8$)。芦丁和氢氯噻嗪药动学参数: AUC_(0-t) 为(107 157.31±38 056.63), (130 387.28±46 306.69)ng·mL⁻¹·min⁻¹; T_{1/2z} 为(108.65±20.95), (240.86±46.44)min; T_{max} 为(34.25±16.34), (120.00±0.00)min; C_{max} 为(683.44±254.03), (368.45±136.95)ng·mL⁻¹。结论 该方法准确度、精密度、回收率和基质效应均符合生物基质样品测试要求, 适用于珍菊降压片在大鼠体内的药动学研究。

关键词: 珍菊降压片; 芦丁; 氢氯噻嗪; 药动学; 大鼠

中图分类号: R917.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2019)04-0451-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.04.014

引用本文: 童静玲, 朱让腾, 罗利飞. 珍菊降压片在大鼠体内药动学研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(4): 451-455.

Pharmacokinetic Study of Zhenju Jiangya Pill in Rats

TONG Jingling, ZHU Rangteng*, LUO Lifei(Enze Hospital, Taizhou Enze Medical Center, Taizhou 318050, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a LC-MS/MS method for the simultaneous determination of rutin and hydrochlorothiazide in rat plasma and to study the pharmacokinetics of Zhenju Jiangya Pill in rats. **METHODS** The plasma sample was handled by protein precipitation. The column was Pntulips BP-C₁₈ column(2.1 mm×50 mm, 5 μm) with the mobile phase of acetonitrile and water by gradient elution at 0.45 mL·min⁻¹. The column temperature was 30 ℃. The electrospray ion source and the ion reaction monitoring mode were used. DAS 2.0 software was used to calculate the pharmacokinetic parameters. **RESULTS** Methodological verification results showed that the endogenous impurities did not interfere with the determination of the analytes and internal standard. The linear ranges of rutin and hydrochlorothiazide were 5–1 000 ng·mL⁻¹($r^2=0.997\ 1$) and 2.5–500 ng·mL⁻¹($r^2=0.995\ 8$), respectively. The pharmacokinetic parameters of rutin and hydrochlorothiazide were as follows: AUC_(0-t) were (107 157.31±38 056.63), (130 387.28±46 306.69)ng·mL⁻¹·min⁻¹, T_{1/2z} were (108.65±20.95), (240.86±46.44)min, T_{max} were (34.25±16.34), (120.00±0.00)min, C_{max} were (683.44±254.03), (368.45±136.95)ng·mL⁻¹. **CONCLUSION** The precision, accuracy, mean recoveries and the matrix effects were satisfied with the requirements of biological sample measurement. The method was successfully applied to the pharmacokinetic study of Zhenju Jiangya Pill in rats.

KEYWORDS: Zhenju Jiangya Pill; rutin; hydrochlorothiazide; pharmacokinetic; rats

珍菊降压片是中国传统中药与高血压治疗药物相结合的中西药复方降压制剂, 在增强疗效的同时, 降低不良反应^[1-2]。目前, 该复方以片剂形式在中国高血压患者中得到广泛应用, 年销售额超过 1 000 万美元^[3]。复方片重 0.25 g, 包括 0.03 mg 盐酸可乐定, 5 mg 氢氯噻嗪, 20 mg 芦丁、100 mg 野菊花提取物和 100 mg 珍珠粉^[4]。珍菊降压片的临床推荐剂量是每次 1 片, 每日 3 次。方中野菊花清热去火, 清肝明目, 平肝降压; 珍珠粉平肝潜阳, 安神定惊, 清热解毒, 共为主药。盐酸可

乐宁为中枢降压药, 氢氯噻嗪为利尿降压药, 共为辅药。芦丁降低毛细血管通透性, 增加其张力, 为佐使药。诸药合用共奏平肝、潜阳、清热、降压之功效^[5-6]。该复方虽然临床应用广泛, 但主要成分的药代动力学特征未见系统研究。阐明复方中主要成分的体内过程, 对于指导临床应用, 发挥更大疗效, 避免不良反应发生, 具有重要的意义。

本实验采用高效液相色谱-串联质谱联用(LC-MS/MS)技术建立和验证了大鼠血浆中芦丁和氢氯噻嗪同时测定的方法, 用于大鼠灌胃珍菊降

基金项目: 浙江省中医药科学研究基金项目(2015ZB131); 台州市市级科技计划项目(14SF103); 恩泽集团课题(17EZB8)

作者简介: 童静玲, 女, 副主任中药师 Tel: (0576)89218789 E-mail: tongjingling@outlook.com *通信作者: 朱让腾, 男, 硕士, 主任医师 Tel: (0576)89218681 E-mail: zhurangteng@outlook.com

压片后芦丁和氢氯噻嗪的药动学研究。

1 材料与动物

1.1 仪器

Finnigan TSQ Quantum 型液相色谱-质谱联用仪(LC-MS/MS, 美国 Finnigan 公司); Sigma 3K15 高速低温离心机(Sigma 公司); XW-80A 旋涡混合器(上海青浦沪西仪器厂); AR2130 OHAUS 电子天平(美国奥豪斯公司); KQ 500DE 型数控超声波清洁器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药物与试剂

珍菊降压片(批号: 161212, 亚宝药业集团股份有限公司); 芦丁对照品(批号: 100080-201409; 纯度: 91.9%)、芍药苷对照品(内标, 用于芦丁定量, 批号: 110736-201640; 纯度: 95.2%)和氢氯噻嗪对照品(批号: 100309-201404; 纯度: 99.7%)均购自中国食品药品检定研究院; 氯沙坦对照品(内标, 用于氢氯噻嗪定量, 批号: MB1578-S; 纯度: 98.0%; 大连美仑生物技术有限公司); 甲醇、乙腈均为色谱纯, 购自美国 Fisher Scientific 公司; 水为娃哈哈纯净水。

1.3 动物

6 只成年 SD 大鼠, ♂, 体质量 230~270 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 动物许可证号: SCXK(沪)2012-0002。动物饲养温度 23~26 °C, 湿度 40%~60%, 12 h 光照交替。

2 方法与结果

2.1 色谱和质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Pntulips BP-C₁₈ 柱(2.1 mm×50 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-水(B)梯度洗脱, 梯度洗脱程序为 0~0.5 min, 5%→10%A; 0.5~2.0 min, 10%→40%A; 2.0~3.0 min,

40%→95%A; 3.0~3.5 min, 95%A; 3.5~3.6 min, 95%→5%A; 3.6~5.0 min, 5%A。柱温为 30 °C; 流速为 0.45 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI), 扫描方式为选择离子检测, 喷雾电压 3 500 V, 雾化温度 250 °C, 毛细管温度 300 °C, 扫描时间 100 ms。待测物及内标的质谱参数和二级质谱图分别见表 1 和图 1。

表 1 待测物及内标的质谱参数

Tab. 1 The MS parameters of analytes and internal standard

化合物	ESI/+/-	母离子/ m/z	子离子/ m/z	碰撞能 量/V	保留时 间/min
芦丁	[M+Na] ⁺	633.2	324.3	36	3.67
芍药苷	[M+Na] ⁺	503.1	341.2	27	3.28
氢氯噻嗪	[M-H] ⁻	296.1	204.9	19	2.37
氯沙坦	[M-H] ⁻	423.4	207.1	13	2.61

2.2 对照品和内标物溶液的配制

分别精密称取芦丁对照品和氢氯噻嗪对照品适量, 用二甲基亚砜溶解, 并配制成浓度分别为 10, 5 mg·mL⁻¹ 的贮备液。临用前将 2 个储备液等量混合, 用乙腈逐级稀释, 配制成系列标准溶液。分别精密称取芍药苷对照品和氯沙坦对照品适量, 用二甲基亚砜溶解, 并用乙腈稀释成内标工作溶液, 其中芍药苷和氯沙坦的浓度分别为 1 000, 500 ng·mL⁻¹。

2.3 血浆样品处理

取 100 μL 大鼠血浆样品, 加入 300 μL 含有芍药苷和氯沙坦的乙腈溶液(沉淀剂), 充分涡旋振荡 1 min, 14 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清 10 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

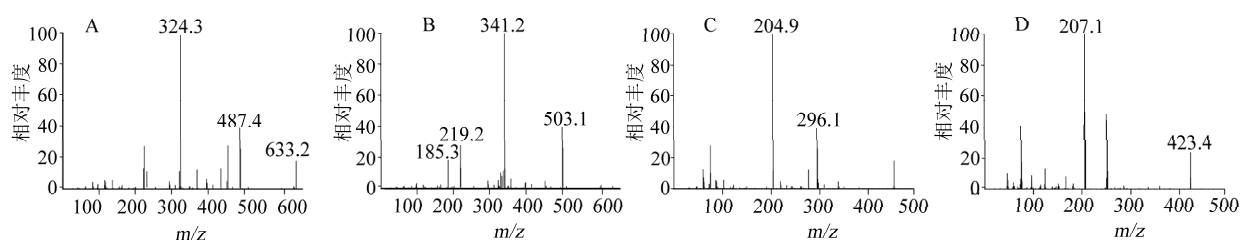


图 1 待测物及内标二级质谱图

A-芦丁; B-芍药苷; C-氢氯噻嗪; D-氯沙坦。

Fig. 1 The product ion scan spectrum of analytes and internal standard

A-rutin; B-paeoniflorin; C-hydrochlorothiazide; D-losartan.

2.4 方法学验证

2.4.1 专属性试验 空白大鼠血浆样品、大鼠血浆加标样品和大鼠给药 5 min 后血浆样品的典型色谱图见图 2。峰形及分离度良好, 血浆中内源性物质不干扰待测物和内标的测定, 方法的专属性良好。

2.4.2 标准曲线和定量限 在空白大鼠血浆中按体积比 1:99 加入系列标准溶液, 使得大鼠血浆中的芦丁和氢氯噻嗪系列浓度分别为 5, 20, 100, 500, 750, 1 000 ng·mL⁻¹ 和 2.5, 10, 50, 250, 375, 500 ng·mL⁻¹。质控样品按照同样方法配制, 大鼠血浆中芦丁和氢氯噻嗪的浓度分别为 10, 400, 800 ng·mL⁻¹ 和 5, 200, 400 ng·mL⁻¹。

采用加权最小二乘法计算标准曲线方程, 以芦丁与内标芍药苷的峰面积比值为 Y , 以芦丁的质量浓度为 X , 得到的回归方程为 $Y=0.002\ 62+0.001\ 48X$, 权重因子 $W=1/X^2$, 相关系数 $r^2=0.997\ 1$; 以氢氯噻嗪与内标氯沙坦的峰面积比值为 Y , 以氢氯噻嗪的质量浓度为 X , 得到的回归方程为 $Y=0.102+0.566X$, 权重因子 $W=1/X^2$, 相

关系数 $r^2=0.995\ 8$ 。芦丁和氢氯噻嗪的定量限分别为 5, 2.5 ng·mL⁻¹。

2.4.3 精密度与准确度 采用 3 个浓度的质控样品考察大鼠血浆中芦丁与氢氯噻嗪的日内与日间精密度和准确度, 随行标准曲线定量。结果显示精密度和准确度均符合生物样品测试要求。结果见表 2。

2.4.4 提取回收率与基质效应 采用 3 个浓度的质控样品考察大鼠血浆中芦丁与氢氯噻嗪的提取回收率与基质效应, 正常处理的质控样品与相同浓度标准溶液响应值的比值为提取回收率; 大鼠空白血浆提取后加入标准溶液与相同浓度标准溶液响应值的比值为基质效应($n=3$)。结果见表 3。

2.4.5 稳定性试验 采用低、高 2 个浓度的质控样品考察大鼠血浆中芦丁与氢氯噻嗪的稳定性($n=6$), 考察的条件分别为大鼠血浆样品室温放置 6 h, -20 °C 冷冻 10 d, 3 次冻融, 以及处理后在自动进样器放置 24 h。结果显示芦丁和氢氯噻嗪在这 4 种条件下稳定性良好。结果见表 4。

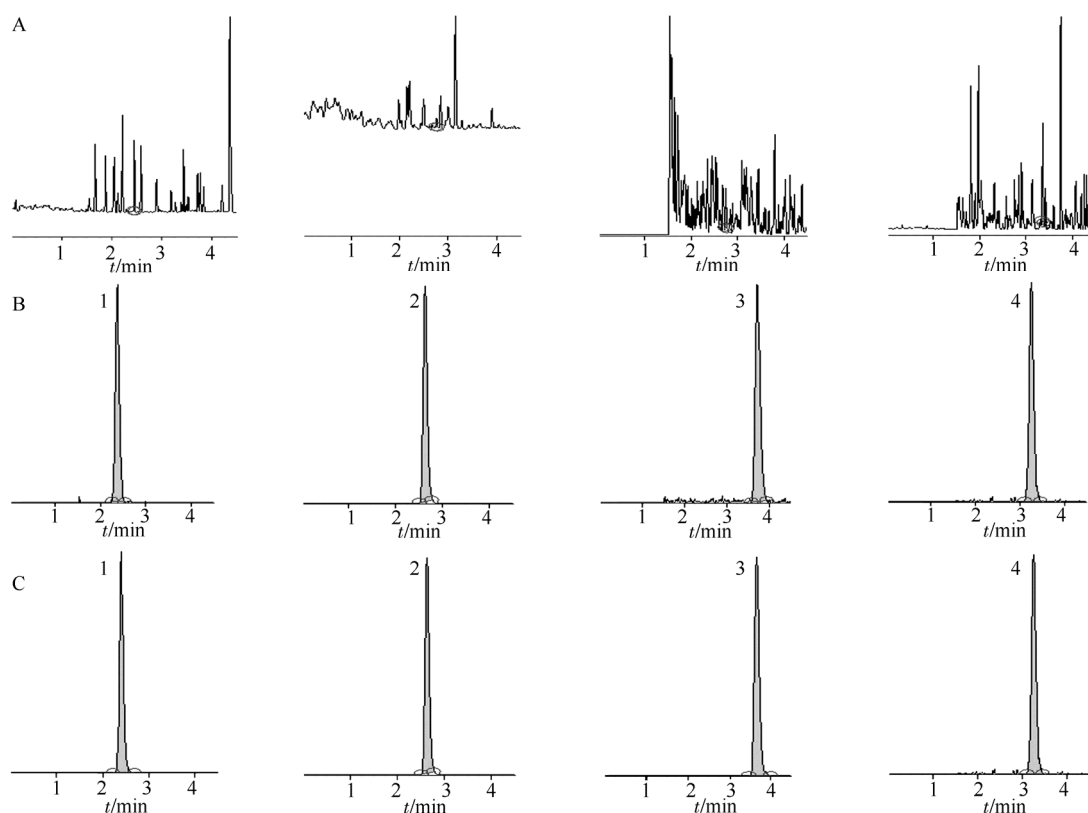


图 2 大鼠特征血浆色谱图

A-空白血浆样品; B-血浆加标样品; C-给药 5 min 后血浆样品; 1-芦丁; 2-芍药苷; 3-氢氯噻嗪; 4-氯沙坦。

Fig. 2 The chromatograms in rat plasma

A-blank plasma sample; B-plasma sample spiked with internal standard solution; C-plasma sample after 5 min administration; 1-rutin; 2-paeoniflorin; 3-hydrochlorothiazide; 4-losartan.

表 2 大鼠血浆中芦丁与氢氯噻嗪的精密度和准确度

Tab. 2 The precision and accuracy of rutin and hydrochlorothiazide determination in rat plasma

化合物	浓度/ng·mL ⁻¹	日内(n=6)			日间(n=18)		
		测得值/ng·mL ⁻¹	精密度/%	准确度/%	测得值/ng·mL ⁻¹	精密度/%	准确度/%
芦丁	10	10.03±1.22	12.16	100.30	9.97±1.09	10.93	99.70
	400	410.63±53.57	13.05	102.66	385.26±32.64	8.47	96.32
	800	780.36±64.79	8.30	97.55	796.39±55.23	6.94	99.55
氢氯噻嗪	5	5.42±0.72	13.28	108.40	4.98±0.53	10.64	99.60
	200	198.28±15.14	7.64	99.14	198.58±10.32	5.19	99.29
	400	405.58±33.46	8.25	101.39	399.14±29.42	7.37	99.78

表 3 大鼠血浆中芦丁与氢氯噻嗪的提取回收率与基质效应(n=3)

Tab. 3 Extraction recovery and matrix effect of rutin and hydrochlorothiazide in rat plasma(n=3)

化合物	浓度/ng·mL ⁻¹	提取回收率/%		基质效应/%	
		$\bar{x} \pm s$	RSD	$\bar{x} \pm s$	RSD
芦丁	10	79.58±8.84	11.11	89.07±8.56	9.61
	400	80.62±6.24	7.74	91.23±4.72	5.17
	800	86.72±5.64	6.51	93.68±4.47	4.77
氢氯噻嗪	5	83.08±7.06	8.50	92.36±4.86	5.26
	200	90.53±5.24	5.78	94.55±3.92	4.15
	400	88.04±4.76	5.40	93.25±5.82	6.24

2.5 大鼠体内药动学

6 只大鼠适应性饲养 7 d, 实验前 1 d 至少禁食 12 h, 禁食不禁水, 珍菊降压片按照 0.5 g·kg⁻¹ 的剂量(相当于芦丁 40 mg·kg⁻¹, 氢氯噻嗪 10 mg·kg⁻¹)^[7]灌胃给予大鼠, 分别于给药前和给药后 5, 15, 30, 60, 90, 120, 240, 360, 480, 720, 1 440 min 眼球静脉丛取血 0.25 mL 置于肝素化的抗凝管中。取出的样品以 3 500 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上层血浆置-20℃保存待测^[8-10]。将动物种属、给药剂量、给药方式和测得的血药浓度等信息输入 DAS 2.0 软件, 芦丁与氢氯噻嗪的主要药动学参数和药时曲线分别见表 5 和图 3。测试结果显示, 芦丁的吸收速度较快, 达峰时间较早, 达峰后, 消除速率也快; 氢氯噻嗪的吸收和代谢速度相对较慢, 生物利用度相对较高。

3 讨论

本研究建立了大鼠血浆中芦丁和氢氯噻嗪浓度同时测定的方法。在血浆样品处理时, 分别考察了有机溶剂直接沉淀蛋白法、液液萃取法和固

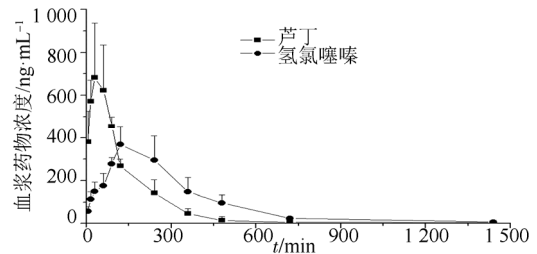


图 3 芦丁和氢氯噻嗪在大鼠体内的药-时曲线(n=6)

Fig. 3 Plasma concentration-time profiles of rutin and hydrochlorothiazide in rats(n=6)

相萃取法, 实验结果表明, 采用有机溶剂直接沉淀蛋白来处理血浆样品的方法简单易行, 处理效率高, 能降低实验成本, 适合较大样本量的处理, 且专属性和灵敏度能够满足药动力学研究的要求。

芦丁和氢氯噻嗪的质谱电离性质不同, 芦丁在正离子模式下有较高响应, 氢氯噻嗪在负离子模式下的响应较为理想, 故本研究采用 ESI⁺/离子同时监测, 并且采用双内标。芦丁和内标芍药苷在正离子监测方式下生成质荷比分别为 m/z 633.2 和 m/z 503.1 的[M+Na]⁺峰。芦丁生成的主要碎片离子为 m/z 324.3, 内标芍药苷生成的主要碎片离子为 m/z 341.2。氢氯噻嗪和内标氯沙坦在负离子检测方式下生成质荷比分别为 m/z 296.1 和 m/z 423.4 的[M-H]⁻峰。氢氯噻嗪生成的主要碎片离子为 m/z 204.9, 内标氯沙坦生成的主要碎片离子为 m/z 207.1, 将以上主要碎片离子作为定量分析时监测的产物离子。流动相采用乙腈-水梯度洗脱, 方法专属性良好, 内源性物质不干扰待测物和内标的测定, 且 4 个化合物达到色谱分离。

表 4 大鼠血浆中芦丁与氢氯噻嗪的稳定性(n=6)

Tab. 4 Stability of rutin and hydrochlorothiazide in rat plasma(n=6)

化合物	浓度/ng·mL ⁻¹	保存条件			
		室温放置 6 h	-20℃冷冻 10 d	3 次冻融	自动进样器放置 24 h
芦丁	10	10.20±1.18	9.79±0.92	9.82±0.81	10.29±1.01
	800	789.49±59.25	836.29±68.32	814.74±72.65	811.16±47.23
氢氯噻嗪	5	5.38±0.42	4.89±0.40	4.94±0.44	5.13±0.24
	400	387.58±19.14	414.67±25.22	395.90±28.76	407.76±19.34

表 5 芦丁与氢氯噻嗪的主要药动参数($n=6$)

Tab. 5 The main pharmacokinetics parameter of rutin and hydrochlorothiazide($n=6$)

药动参数	芦丁	氢氯噻嗪
$AUC_{(0-t)}/ng \cdot mL^{-1} \cdot min$	107 157.31±38 056.63	130 387.28±46 306.69
$MRT_{(0-t)}/min$	155.79±29.41	300.17±56.67
$T_{1/2\alpha}/min$	108.65±20.95	240.86±46.44
T_{max}/min	34.25±16.34	120.00±0.00
$C_{max}/ng \cdot mL^{-1}$	683.44±254.03	368.45±136.95
$V_d/L \cdot kg^{-1}$	58.52±35.04	26.22±15.70
$CL_z/F/L \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$	0.37±0.11	0.075±0.022

近年, 借鉴和利用先进的药动学研究技术, 中药复杂体系的药动学研究取得了长足的进步, 中药药动学对于阐明中药复方“多靶点、多组分”的作用机制具有非常积极的作用, 并促进创新中药与现代复方中药的研发及临床合理用药。芦丁为珍菊降压片中含量较高且已被证明具有降血压作用的有效成分^[11-12], 因此研究该成分在大鼠体内的药动学特征, 对于阐明珍菊降压片的体内过程以及药物在体内的安全性和有效性具有重要意义。另外, 珍菊降压片为中西药相结合的复方中药制剂, 与多味中药配伍后, 片中的氢氯噻嗪在大鼠体内的药动学特征与单独使用^[13]时比较, $MRT_{(0-t)}$ 和 $T_{1/2\alpha}$ 均延长, T_{max} 延后, 该结果对于完善临床应用过程中的给药间隔, 提高药物疗效, 降低药物的不良反应具有显著的指导意义。

本研究首次建立了同时测定大鼠血浆中芦丁和氢氯噻嗪的 LC-MS/MS 方法, 并进行了珍菊降压片在大鼠体内的药动学研究。该方法快速、准确、灵敏、简便, 适用于药动学研究, 并可以在相关临床研究中推广。

REFERENCES

[1] XIE J J, QIAO Z D, CHENG M, et al. Comparative effects on general pharmacology of Zhenju Jiangya tablet and its Chinese medicine and western medicine components [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2015, 21(23): 110-116.

[2] QIN J, WANG L, BAI Y, et al. Enhanced absorption and bioavailability of hydrochlorothiazide by Chinese medicines in

the Zhenju antihypertensive compound [J]. J Pharm Pharmacol, 2014, 66(6): 855-864.

[3] QIU X, WANG Z, WANG B, et al. Simultaneous determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and its application to a bioequivalence study [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014(957): 110-115.

[4] QIN J, WANG L, WU L, et al. Development of an LC-MS/MS method for determining the pharmacokinetics of clonidine following oral administration of Zhenju antihypertensive compound [J]. Biomed Chromatogr, 2015, 29(7): 1068-1075.

[5] QU Z J, LI Y L. Meta-analysis on curative effect and safety of Zhenju Jiangya tablet in treatment of essential hypertension [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med(山东中医药大学学报), 2014, 38(3): 220-223.

[6] XIE J J, ZHOU G X, QIAO Z D, et al. Detoxic attenuation mechanism of Zhenju Jiangya Tablets containing phyto-Chinese medicine extracts and chemical drugs' components [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2015, 37(8): 1633-1641.

[7] ZHOU H S. Content determination of hydrochlorothiazide and rutin in zhenjujiangya tablets by high performance liquid chromatography [J]. J Shandong Med Coll(山东医学高等专科学校学报), 2013, 35(5): 328-330.

[8] XIANG Y C, LI H, HUANG Y, et al. Determination of linezolid in critically ill patients plasma by LC-MS/MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(7): 959-962.

[9] XIONG S, LI J L, ZHU X Q, et al. Determination of morroniside concentration in beagle plasma and its pharmacokinetics by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2014, 32(3): 290-293.

[10] LI L, LI H, HUANG Y, et al. Simultaneous determination of five ginkgolic acids in rat plasma by LC-MS/MS and the application in pharmacokinetics study [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2017, 34(12): 1658-1662.

[11] KAUR S, MUTHURAMAN A. Therapeutic evaluation of rutin in two-kidney one-clip model of renovascular hypertension in rat [J]. Life Sci, 2016(150): 89-94.

[12] OLALEYE M T, CROWN O O, AKINMOLADUN A C, et al. Rutin and quercetin show greater efficacy than nifedipin in ameliorating hemodynamic, redox, and metabolite imbalances in sodium chloride-induced hypertensive rats [J]. Hum Exp Toxicol, 2014, 33(6): 602-608.

[13] DUBEY R, GHOSH M. Simultaneous determination and pharmacokinetic study of losartan, losartan carboxylic acid, ramipril, ramiprilat, and hydrochlorothiazide in rat plasma by a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method [J]. Sci Pharm, 2014, 83(1): 107-124.

收稿日期: 2018-06-12
(本文责编: 曹粤锋)