超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱和超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱用于血浆中苦杏仁苷及其代谢产物野黑樱苷的定性和定量分析

高 萌¹, 王跃生³, 魏惠珍¹, 欧阳辉², 何明珍²,
曾恋情¹, 申峰云¹, 郭 强¹, 饶 毅^{1*}

(1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004; 2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006; 3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

摘要:建立了大鼠灌胃麻杏石甘汤后血浆中苦杏仁苷、野黑樱苷的定性及定量方法。样品经液液萃取净化处理,定性采用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱仪(UPLC-QTOF-MS/MS),经 Shim-pack XR-ODS III 色谱柱(75 mm×2.0 mm, 1.6 μm)分离,定量采用超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱仪(UPLC-Q-TRAP-MS),经 Agilent C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)分离,电喷雾负离子化(ESI)及 MRM 模式测定,流动相均为乙腈-0.1% (v/v)甲酸水溶液。结果显示苦杏仁苷、野黑樱苷在相应浓度范围内线性关系良好(相关系数分别为 0.999 0、0.997 0),精密度(RSD)小于 9.20%,回收率为 82.33%~95.25%,检出限(LOD)约为 0.50 ng/mL。本方法快速简便,为血浆样品中苦杏仁苷、野黑樱苷的定性和定量分析提供良好参考。

关键词:超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱;超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱;苦杏仁苷;野黑樱苷;大鼠血浆

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2014)06-0591-09

Qualitative and quantitative analysis of amygdalin and its metabolite prunasin in plasma by ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole time of flight mass spectrometry and ultra-high performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry

GAO Meng¹, WANG Yuesheng³, WEI Huizhen¹, OUYANG Hui², HE Mingzhen²,
ZENG Lianqing¹, SHEN Fengyun¹, GUO Qiang¹, RAO Yi^{1*}

(1. Jiangxi University of Chinese Traditional Medicine, Nanchang 330004, China; 2. The National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China; 3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract: A method was developed for the determination of amygdalin and its metabolite prunasin in rat plasma after intragastric administration of Moxing shigan decoction. The analytes were identified by ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole time of flight mass spectrometry and quantitatively determined by ultra-high performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry. After purified by liquid-liquid extraction, the qualitative analysis of amygdalin and prunasin in the plasma sample was performed on a Shim-pack XR-ODS III HPLC column (75 mm×2.0 mm, 1.6 μm), using acetonitrile-0.1% (v/v) formic acid aqueous solution. The detection was performed on a Triple TOF 5600 quadrupole time of flight mass spectrometer. The quantitative analysis of amygdalin and prunasin in the plasma sample was performed by separation on an Agilent C₁₈ HPLC column (50 mm×2.1

* 通讯联系人.Tel: (0791) 87119609, E-mail: raoyi99@126.com.
基金项目:国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(2010CB530602).
收稿日期:2014-01-13

mm, 1.7 μ m), using acetonitrile-0.1% (v/v) formic acid aqueous solution. The detection was performed on an AB Q-TRAP 4500 triple quadrupole mass spectrometer utilizing electrospray ionization (ESI) interface operated in negative ion mode and multiple-reaction monitoring (MRM) mode. The qualitative analysis results showed that amygdalin and its metabolite prunasin were detected in the plasma sample. The quantitative analysis results showed that the linear range of amygdalin was 1.05–4 200 ng/mL with the correlation coefficient of 0.999 0 and the linear range of prunasin was 1.25–2 490 ng/mL with the correlation coefficient of 0.997 0. The method had a good precision with the relative standard deviations (RSDs) lower than 9.20% and the overall recoveries varied from 82.33% to 95.25%. The limits of detection (LODs) of amygdalin and prunasin were 0.50 ng/mL. With good reproducibility, the method is simple, fast and effective for the qualitative and quantitative analysis of the amygdalin and prunasin in plasma sample of rats which were administered by Maxing shigan decoction.

Key words: ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole time of flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS/MS); ultra-high performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-Q-TRAP-MS); amygdalin; prunasin; rat plasma

麻杏石甘汤最早见于汉代张仲景所著《伤寒论》一书,由麻黄、苦杏仁、石膏、甘草 4 味药材组成。具有辛凉宣泄,清肺平喘功效。其中苦杏仁为常用止咳平喘药,有小毒,归肺、大肠经^[1]。苦杏仁中的有效成分是苦杏仁苷(amygdalin,结构式见图 1)。苦杏仁苷为医药上常用的祛痰止咳剂、辅助性抗癌药^[2],苦杏仁含有苦杏仁苷约 2.4%,苦杏仁苷受杏仁中的苦杏仁酶及樱叶酶等水解,依次生成野黑樱苷(prunasin,结构式见图 1)和扁桃腈,再分解生成苯甲酸和氢氰酸^[3]。

近年来对于复杂成分的定性和定量分析,尤其是人或动物体液中微量成分的测定方面,液相色谱-质谱联用作为一种高效互补的分离鉴定技术,具有灵敏度高、结果准确等特点而得到广泛应用^[4-6]。根据文献报道^[7-11],目前采用液相色谱-质谱联用技术对大鼠体内苦杏仁苷的研究存在定量限较高,样品处理复杂,且在口服药物后未能检测到苦杏仁苷原型的问题,而对苦杏仁苷代谢产物仅有定性分析。另据报道,对大鼠进行苦杏仁生品水煎液灌胃给药和苦杏仁苷注射给药,结果显示苦杏仁苷注射给药后在血浆样品中可检测到苦杏仁苷原型,而灌胃给药后则未检测到原型,只能检测到其代谢产物野黑樱苷^[12-14]。本研究首先采用液相色谱-四极杆飞行时间质谱(UPLC-QTOF-MS/MS)联用技术,根据精确质量数测定及 MS/MS 分析大鼠灌胃麻杏石甘汤后的血浆样品,检测到了代谢产物野黑樱苷及苦杏仁苷原型,同时使用液相色谱-三重四极杆质谱联用仪(UPLC-Q-TRAP-MS)对待测物进行定量分析,为

探讨麻杏石甘汤中苦杏仁活性成分的体内变化过程提供科学参考。

图 1 苦杏仁苷和野黑樱苷的结构式

Fig. 1 Structures of amygdalin and prunasin

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

仪器:岛津 LC-30A 液相色谱-AB Triple TOF 5600 四极杆飞行时间质谱联用仪(数据采集 Analyst TF 1.6 ABSciex;数据分析 Peak View software Version 1.2.0.3);岛津 LC-30A 液相色谱-AB Q-TRAP 4500 三重四极杆质谱联用仪(数据采集 Analyst 1.6.1 ABSciex);万分之一天平(AB104-N,梅特勒-托利多);十万分之一天平(岛津 AUW2200 电子分析天平);超声波清洗仪(KQ-250DB,昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司);台式离心机:TGL-16C(上海安亭科学仪器厂);涡旋仪:IKA Vortex Genius 3;低温保存箱:DW-40L262(青岛海尔特种电器有限责任公司)。

对照品:苦杏仁苷对照品购自中国药品生物制品检定所(批号 110820-201004);野黑樱苷对照品购自碧伊(上海)化学科技有限公司(批号 BBP02178);氯霉素(chloramphenicol, 内标)对照品购自中国药品生物制品检定所(批号 130303-200614)。

试剂:甲酸、甲酸铵(Sigma 公司);乙酸乙酯、乙醚、二氯甲烷(分析纯,上海实验试剂有限公司);水:娃哈哈纯净水,经 Millipore 超纯水仪过滤;HPLC 级甲醇、乙腈(Fisher 公司)。

饮片:生麻黄(北京市双桥燕京中药饮片厂,批号 812018)、炙甘草(北京市双桥燕京中药饮片厂,批号 1003035)、制苦杏仁(江中(武宁)中药饮片有限公司,批号 120130)、生石膏(北京市双桥燕京中药饮片厂,批号 908089)。

动物:清洁级 SD 大鼠,雄性,体重为(220±20)g,湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号 SCXK(湘)2011-0003。

1.2 实验步骤

1.2.1 标准储备溶液和工作溶液的配制

精密称取苦杏仁苷、野黑樱苷和氯霉素对照品适量置于 25 mL 容量瓶中,用甲醇配制成质量浓度分别为 84.0、99.6 和 12.4 mg/L 的标准储备液,4℃冷藏,备用。

分别吸取不同体积的苦杏仁苷标准储备液,用甲醇逐级稀释成质量浓度为 4 200、2 100、1 050、525.00、105.00、52.50、10.50、5.25、1.05 和 0.53 ng/mL 的系列标准溶液;分别吸取不同体积的野黑樱苷标准储备液,用甲醇逐级稀释成质量浓度为 2 490、1 245、622.50、249.00、124.50、24.90、12.45、6.23、1.25 和 0.62 ng/mL 的系列标准溶液。

分别吸取苦杏仁苷和野黑樱苷标准储备液各 10 mL 置于 20 mL 容量瓶中混合,用甲醇逐级稀释成系列混合标准溶液,其中苦杏仁苷质量浓度分别为 4 200、2 100、1 050、525.00、105.00、52.50、10.50、5.25、1.05 和 0.53 ng/mL;野黑樱苷质量浓度分别为 2 490、1 245、622.50、249.00、124.50、12.45、6.23、1.25 和 0.62 ng/mL。

1.2.2 麻杏石甘汤药液的煎煮

按麻杏石甘汤处方比例(麻黄、杏仁、石膏和甘草质量比为 6:6:24:6)取各味饮片,先称取麻黄药材、石膏药材,加入方药总质量的 8 倍水,称重,计算煎煮前的总重。加热至沸腾,然后改用小火煎煮 30 min,再加入甘草、苦杏仁煎煮 40 min,补重,趁热过滤,即得麻杏石甘汤汤剂,于 80℃旋转浓缩至 1

g/mL 药液。密封后-20℃储存,备用。

1.2.3 给药与样品采集

健康 SD 大鼠,雌雄各半,实验前 12 h 禁食不禁水,灌胃 1.2.2 项下制得的麻杏石甘汤药液,连续 7 天,在末次给药 1 h 后,大鼠心脏取血至含肝素钠的 EP 离心管中,立即离心 3 000 r/min×10 min 后取上层血浆分装,置于-40℃冰箱中冰冻待测。

1.2.4 血浆样品处理

精密吸取 100 μL 血浆,加入 30 μL 内标溶液,加入 1 mL 的乙酸乙酯,涡旋混合提取 5 min,离心 5 000 r/min×5 min,将有机层转移至另一离心管中,再加入 1 mL 的乙酸乙酯与水层涡旋混合提取 5 min,离心 5 000 r/min×5 min,合并两次乙酸乙酯液,合并液用 N₂ 在 40℃下吹干,残渣用 100 μL 甲醇溶解,涡旋 5 min,离心 15 000 r/min×5 min,取上清液,待测。

1.3 仪器分析条件

1.3.1 色谱条件

定性色谱条件:Shim-pack XR-ODS III(75 mm×2.0 mm, 1.6 μm);柱温 40℃;进样量 5 μL;流速 0.25 mL/min;流动相 A 为 0.1% (v/v) 甲酸水溶液,流动相 B 为乙腈,梯度洗脱程序:0~1.5 min, 1% B;1.5~7.0 min, 1% B~10% B;7.0~10.0 min, 10% B~20% B;10.0~15.0 min, 20% B~90% B;15.0~17.0 min, 90% B;17.1~20.0 min, 1% B。

定量色谱条件:Agilent C₁₈(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm);柱温 40℃;进样量 2 μL;流速 0.3 mL/min;流动相 A 为 0.1% (v/v) 甲酸水溶液,流动相 B 为乙腈。梯度洗脱程序:0~0.05 min, 1% B;0.05~1.70 min, 1% B~63% B;1.70~2.00 min, 63% B~90% B;2.00~3.00 min, 90% B;3.01~4.00 min, 1% B。

1.3.2 质谱条件

定性条件:AB Triple TOF 5600 四极杆飞行时间质谱仪采用电喷雾离子化(ESI)源,喷雾电压(IS):-4 500 V,离子化温度(TEM):600℃;雾化气(GS1):413 685 Pa;辅助加热气(GS2):482 633 Pa;气帘气(CUR):206 843 Pa;碰撞气(CAD):Medium;扫描模式:Negative。一级质谱采集范围为 m/z 100~800,累积时间 200 ms,二级质谱采集范围为 m/z 90~800,累积时间 100 ms,碰撞能量(CE) 40 eV;碰撞能量叠加(CES) 15。

定量条件:AB Q-TRAP 4500 三重四极杆质谱仪采用 ESI 源,多反应监测(MRM)模式测定;喷雾电压(IS):-4 500 V,离子化温度(TEM):600℃;

雾化气 (GS1): 413 685 Pa; 辅助加热气 (GS2): 482 633 Pa; 气帘气 (CUR): 206 843 Pa; 碰撞气 (CAD): Medium; 优化的各离子对质谱参数值见表 1。

表 1 MS/MS 定量分析参数

Table 1 Parameters for MS/MS quantitative analysis					
Compound	Retention time/min	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP/V	CE/V
Amygdalin	1.75	502.1	323.0	40	19
Prunasin	1.84	340.1	161.0	98	24
Chloramphenicol	2.15	322.0	152.0	103	23

DP: declustering potential; CE: collision energy.

2 结果与讨论

2.1 定性方法的建立与优化

野黑樱苷 (分子式为 $C_{14}H_{17}NO_6$) 为苦杏仁苷 (分子式为 $C_{20}H_{27}NO_{11}$) 脱去一分子糖而得, 均含有 N 原子, 因此首先对其选择正离子扫描进行分析。在前期实验中, 采用超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱仪在正离子模式下对待测物分析, 未发现野黑樱苷 $[M+H]^+$ 峰。在 m/z 318 附近有一未知物, 初步推断可能为野黑樱苷 $[M+Na]^+$ 峰, 但进一步分析该化合物发现其二级质谱与野黑樱苷无相关性, 可能为一未知干扰物。为验证结果, 使用了超高效

液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱仪对未知物和野黑樱苷及苦杏仁苷进行分析, 通过提取精确相对分子质量, 拟合元素组成, 偏差小于 5 ppm, 苦杏仁苷一级质谱图中显示 m/z 为 480.146 7 (图 2 a1), 推测为 $[M+Na]^+$ 分子离子峰, 二级质谱图中信号最强的 m/z 为 347.095 3 (图 2 a2), 推测为母离子脱去中性碎片扁桃腈 (C_8H_7NO), 野黑樱苷一级质谱图 (图 2 b1) 中显示 m/z 为 318.094 0, 推测为 $[M+Na]^+$ 分子离子峰, 同时图中存在一个与野黑樱苷母离子精确质量数 (m/z 318.094 0) 相近的质量数 (m/z 318.307 6)。这两个精确质量数在四极杆飞行时间质谱中可以分辨, 但是在分辨率低的三重四极杆质谱中难以区分, 因此对此未知干扰物进行了二级质谱确证, 图 2 b2 为野黑樱苷和未知干扰物的二级质谱碎片信息。野黑樱苷母离子 (m/z 318.095 4) 和干扰物母离子 (m/z 318.301 5) 的子离子为 m/z 256.263 9、185.042 7、88.076 5。通过对子离子拟合分子式, 得知子离子不是野黑樱苷的子离子, 可能为未知物的子离子, 并对野黑樱苷产生干扰; 改变碰撞能量, 干扰离子一直存在, 对大鼠灌胃麻杏石甘汤后的血浆样品处理并进行质谱分析, 同样存在未知物干扰, 且信号强度远大于待测物, 干扰仪器测定。通过对对照品及血浆样品在该模式下

图 2 苦杏仁苷在正离子条件下的 (a1) 一级谱图、(a2) 二级谱图及野黑樱苷在正离子条件下的 (b1) 一级谱图、(b2) 二级谱图

Fig. 2 (a1) MS spectrum and (a2) MS/MS spectrum of amygdalin and (b1) MS spectrum and (b2) MS/MS spectrum of prunasin in positive ion mode

进行质谱分析,结果均存在未知物干扰,因此在采用三重四极杆质谱仪定量分析时要避免采用未知物的子离子为定量离子对。

苦杏仁苷在液相色谱电喷雾电离质谱联用技术的正负离子模式下有良好的信号响应^[15]。选择负离子模式进行监测,通过母离子扫描获得一级质谱图,均找到 $[M+HCOO]^-$ 分子离子峰,苦杏仁苷和野黑樱苷的母离子分别是 m/z 502.157 1 和 m/z 340.104 3。在负离子条件下,野黑樱苷响应值较高,母离子精确质量数周围未发现干扰离子,有利于

其检测。在选定母离子后,进行子离子扫描获得二级质谱图,苦杏仁苷的主要特征碎片离子为 m/z 323.097 7,野黑樱苷的主要特征碎片离子为 m/z 161.044 4,通过对特征碎片离子拟合元素组成,偏差小于 5 ppm,分析为母离子脱去 $C_8H_8NO^-$ 碎片离子产生,结果见图 3。使用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱仪在负离子模式对大鼠灌胃麻杏石甘汤后的血浆样品定性分析,确认苦杏仁苷原型和代谢产物野黑樱苷的存在,并且无干扰物影响野黑樱苷的测定。

图 3 苦杏仁苷在负离子条件下的 (a1) 一级谱图、(a2) 二级谱图及野黑樱苷在负离子条件下的 (b1) 一级谱图、(b2) 二级谱图
Fig. 3 (a1) MS spectrum and (a2) MS/MS spectrum of amygdalin and (b1) MS spectrum and (b2) MS/MS spectrum of prunasin in negative ion mode

2.2 定量方法的建立与优化

质谱监测采用 LC-QTOF-MS/MS 定性分析时负离子模式下的离子对。在优化色谱条件时考察了不同流动相体系(乙腈-甲酸水溶液和乙腈-水溶液)下待测物质的响应,结果显示在水相中添加适量甲酸有助于待测物质电离,信号强度明显提高。因此,本实验采用乙腈-0.1% (v/v) 甲酸水溶液作为流动相,获得了最佳质谱灵敏度。

2.3 样品前处理方法的选择与优化

血浆样品基质较为复杂,用有机溶剂(甲醇、乙腈)沉淀蛋白法处理样品,内源性物质干扰较大,提取回收率低于液-液萃取法。本研究采用液-液萃取法对样品进行处理。考察了不同萃取溶剂(乙酸乙酯、乙酸乙酯-乙醚、二氯甲烷)、萃取次数及不同体积萃取溶剂等因素对回收率的影响。结果见表 2,以乙酸乙酯作为萃取溶剂时,2 mL 萃取溶剂分两次萃取,可获得较高的灵敏度和回收率,适用于体内微量成分的定量。

表 2 采用不同方式、不同溶剂处理大鼠血浆样品时苦杏仁苷及野黑樱苷的回收率

Compound	Precipitation/%		Extraction/%		
	Methanol	Acetonitrile	Ethylacetate	Ethylacetate-ether	Dichloromethane
Amygdalin	83.93	84.20	86.15	60.54	63.27
Prunasin	74.01	78.32	91.00	90.28	76.21

2.4 定量方法的验证

2.4.1 方法专属性

分别取大鼠空白血浆 6 份,加入苦杏仁苷和野黑樱苷的混合对照品溶液及灌胃麻杏石甘汤后的含药血浆,按 1.2.4 项下方法处理,分别进样测定。色谱图见图 4,在上述定量色谱及质谱条件下,4 min 内可测得大鼠血浆中苦杏仁苷及其代谢产物野黑樱苷,血浆中内源性成分不干扰目标组分的测定。本方法分析速度快、专属性高。

2.4.2 定量限、检出限和方法的线性范围

取 1.2.1 项下用甲醇配制好的 10 个不同浓度的混合对照品溶液各 100 μL ,分别加入至空白血浆中并按 1.2.4 项下方法处理,分别进样 2 μL ,以血浆中各成分的质量浓度 X 为横坐标,以待测物与内标物的峰面积比值 Y 为纵坐标,用加权 ($W=1/X^2$) 最小二乘法进行回归,得各化合物在相应浓度范围内的线性方程、线性相关系数 (r)、定量限 (LOQ, $S/N\geq 10$) 和检出限 (LOD, $S/N=3$),结果见表 3。

图 4 (a) 空白大鼠血浆、(b) 空白大鼠血浆添加苦杏仁苷、野黑樱苷、氯霉素和 (c) 大鼠灌胃麻杏石甘汤后血浆样品的提取离子色谱图
Fig. 4 Extracted ion chromatograms of amygdalin, prunasin and chloramphenicol in (a) blank rat plasma, (b) blank plasma spiked with amygdalin, prunasin and chloramphenicol, (c) plasma sample obtained 60 min after intragastric (ig) administration of Moxing shigan decoction

表 3 苦杏仁苷和野黑樱苷的线性范围、线性方程、相关系数、定量限和检出限

Table 3 Linear ranges, linear equations, correlation coefficients (r), LOQs, LODs of amygdalin and prunasin					
Compound	Linear range/(ng/mL)	Linear equation	r	LOQ/(ng/mL)	LOD/(ng/mL)
Amygdalin	1.05–4200	$Y=0.000375X+0.000489$	0.9990	1.05	0.53
Prunasin	1.25–2490	$Y=0.00111X+0.0128$	0.9970	1.25	0.62

Y: peak area ratio of analyte to internal standard; X: mass concentration, ng/mL.

2.4.3 精密度、回收率和基质效应

在空白血浆中分别添加高、中、低 3 个水平的对照品溶液,每个水平 5 份,按 1.2.4 项下方法处理,苦杏仁苷和野黑樱苷的平均回收率为 82.33%~95.25%,日内 RSD 和日间 RSD 分别为 3.22%~

7.89%和 5.73%~9.19%。按 1.2.4 项下方法处理 6 种不同来源空白血浆各 100 μL,在处理后的空白样本中加入高、中、低 3 个浓度混合对照品溶液与内标溶液,进样分析,比较其与同浓度的对照品溶液响应值,计算基质效应。结果见表 4。

表 4 苦杏仁苷和野黑樱苷在不同添加浓度下的回收率、精密度和基质效应

Compound	Spiked/(ng/mL)	Recovery/% (n=5)	RSDs/% (n=5)		Matrix effect/% (n=6)
			Intra-day	Inter-day	
Amygdalin	5.25	92.60±3.13	6.73	7.31	98.32±7.60
	105.00	86.15±7.82	3.22	5.73	102.89±7.23
	1050	90.37±7.20	5.56	7.38	104.15±6.54
Prunasin	6.23	95.25±13.33	7.89	8.40	100.50±5.81
	124.50	91.00±11.47	6.62	7.31	105.05±6.93
	1245	82.33±7.13	6.66	9.19	104.95±7.11

2.4.4 稳定性试验

配制标准血浆样品并测定,考察待测物在各种实验条件下的稳定性。在空白血浆中分别添加高、中、低 3 个水平的待测物标准溶液,按 1.2.4 项下方法处理,处理后在 23℃下 2 h 内重复进样;4℃下 24 h 内重复进样;标准血浆样品经-40℃反复冻融

3 次后测定;标准血浆样品经-40℃条件下贮存 30 天,考察样品的长期稳定性。结果见表 5,含苦杏仁苷、野黑樱苷的血浆样品在 23℃条件下放置 2 h,4℃条件下放置 24 h,-40℃反复冻融 3 次及-40℃冰冻条件下放置 30 天条件下各成分的稳定性均良好,能满足测定要求。

表 5 苦杏仁苷和野黑樱苷在不同添加浓度下的稳定性

Compound	Spiked/ (ng/mL)	RSDs/% (n=5)			
		Bench-top (23℃ for 2 h)	Autosampler rack at 4℃ for 24 h	Three freeze/thaw cycles (-40℃ to 23℃)	Freezing at -40℃ for 30 d
Amygdalin	5.25	5.53	6.79	3.23	4.51
	105.00	1.10	4.40	7.68	3.12
	1050	0.07	5.11	7.32	0.57
Prunasin	6.23	6.67	9.25	10.67	5.07
	124.50	1.32	2.80	9.98	9.73
	1245	0.23	9.27	9.02	12.04

2.5 血浆中苦杏仁苷及野黑樱苷的含量测定与分析

研究证实,麻杏石甘汤具有提高动物免疫能力、抗菌、抗过敏^[16,17]等作用,能有效抑制咳嗽的产生。“随证施量”是中医临床应用中主要的诊疗模式,随证施量是依据临床症状,改变药物用量,以达到增强疗效的作用。麻杏石甘汤在用于治疗咳嗽等病症时,主要通过改变苦杏仁用量来调整疗效。

实验建立了枸橼酸所致大鼠咳嗽模型,研究在此模型下麻杏石甘汤治疗咳嗽的作用效果,通过改变麻杏石甘汤中苦杏仁剂量,探索苦杏仁剂量与苦杏仁中活性成分在体内血药浓度的量效关系。为后期研究苦杏仁剂量与苦杏仁中活性成分在体内血药浓度及治疗效应间的量效关系提供数据参考。实验

在原方的基础上,苦杏仁剂量逐渐递减、逐渐递增 1.5 倍 7 个剂量组,其他药材剂量不变,另设模型组、阳性组(可待因组)、空白组(见表 6),按 1.2.2 项下方法煎煮,按文献^[18]换算成相应的大鼠灌胃剂量,每组灌胃 8 只大鼠,按 1.2.3 项下方法给药后取血浆,按 1.2.4 项下方法处理并测定。血浆中待测成分的血药浓度随麻杏石甘汤中苦杏仁剂量变化趋势见图 5,大鼠灌胃麻杏石甘汤,血浆样品中可同时测到苦杏仁苷及其代谢产物野黑樱苷,随着给药剂量逐级增加,体内苦杏仁苷及野黑樱苷含量呈增加趋势,麻杏石甘汤中苦杏仁剂量在 1.19~13.50 g 的变化范围内,苦杏仁剂量与苦杏仁苷、野黑樱苷血药浓度存在正相关性。

表 6 麻杏石甘汤中苦杏仁剂量的改变致大鼠血浆中苦杏仁苷、野黑樱苷浓度的变化 (n=8)

Table 6 Different dosages of almond in Mxing shigan decoction lead to the plasma concentration changes of amygdalin and prunasin in rat (n=8)

Group	Almond dose/g	Rat ig administration dose/(g/kg)	Plasma concentration/(ng/mL)	
			Amygdalin	Prunasin
Untreated group	—	—	0.00±0.00	0.00±0.00
Blank group	—	—	0.00±0.00	0.00±0.00
Positive group	0	0	0.00±0.00	0.00±0.00
1	1.19	0.09	0.41±0.39	0.58±0.79
2	1.78	0.14	0.53±0.48	0.76±1.25
3	2.67	0.21	0.16±0.18	1.42±2.01
4	4.00	0.31	2.71±0.45	8.96±1.68
5	6.00	0.46	13.47±2.57	21.74±13.29
6	9.00	0.69	4.77±0.38	25.38±17.50
7	13.50	1.04	41.52±6.98	50.96±18.54

图 5 血浆中苦杏仁苷和野黑樱苷血药浓度随麻杏石甘汤中苦杏仁剂量变化趋势图

Fig. 5 Change trend of plasma concentration of amygdalin and prunasin in rat as dose changes of almond in Mxing shigan decoction

3 结论

本研究通过超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱仪测定精确相对分子质量,快速准确定性苦杏仁苷和野黑樱苷,排除未知物干扰,避免假阳性结果。同时使用超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱仪对待测物定量分析,仪器灵敏度高,方法前处理简单,定量限约为 1 ng/mL,分析过程时间短,仅需 4 min,有利于血浆样品中待测成分的测定,为研究血浆中苦杏仁苷、野黑樱苷浓度与麻杏石甘汤中苦杏仁剂量的相关性研究提供技术支持。结果显示在枸橼酸所致大鼠咳嗽模型中,大鼠灌胃麻杏石甘汤,汤剂中苦杏仁剂量从 1.19 g 增加到 13.50 g 时,血浆样品中可同时测到苦杏仁苷及其代谢产物野黑樱苷,且随着给药剂量逐级增加,大鼠体内苦杏仁苷及野黑樱苷含量呈增加趋势,苦杏仁剂量与苦杏仁苷、野黑樱苷血药浓度存在正相关性,为研究苦杏仁

剂量与苦杏仁中活性成分在体内血药浓度及治疗效应间的量效关系提供数据参考。此外,本方法利用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱仪可快速准确定性待测成分的离子对,排除未知物对待测成分的干扰,使待测成分在低分辨率的超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱仪上能够准确测定,可为生物样品中其他待测成分的鉴别和定量提供参考。

参考文献:

[1] National Pharmacopoeia Committee. Chinese Pharmacopoeia; Part 1. Beijing: China Medical Science Press (国家药典委员会. 中国药典: 一部. 北京: 中国医药科技出版社), 2010: 187

[2] Lü J Z, Deng J G. Drugs & Clinic (吕建珍, 邓家刚. 现代药物与临床), 2012, 27(5): 530

[3] Chen N, Liang R. Academic Journal of Guangdong College of Pharmacy (陈娜, 梁仁. 广东药学院学报), 2004, 20(5): 545

[4] Xin Y, Pi Z F, Song F R, et al. Chinese Journal of Chromatography (辛杨, 皮子凤, 宋凤瑞, 等. 色谱), 2011, 29(5): 389

[5] Zhang L, Zhang F C, Wang Z H, et al. Chinese Journal of Chromatography (张琳, 张福成, 王朝虹, 等. 色谱), 2013, 31(9): 898

[6] Zhang P P, Zhang F C, Wang Z H, et al. Chinese Journal of Chromatography (张盼盼, 张福成, 王朝虹, 等. 色谱), 2013, 31(3): 211

[7] Ge B Y, Chen H X, Han F M, et al. J Chromatogr B, 2007, 857: 281

[8] Li X B, Liu C H, Zhang R, et al. J Chromatogr Sci, DOI: 10. 1093/chromsci/bmt063

[9] Wen X D, Liu E H, Yang J, et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012, 67: 114

[10] Ma C H, Qian Y F, Fan X S, et al. J Chromatogr Sci, DOI: 10. 1093/chromsci/bmt026

[11] Zhu K J, Sun X P, Chang X J, et al. China Journal of Chinese Materia Medica (朱克近, 孙晓萍, 常秀娟, 等. 中国实验方剂学杂志), 2011, 36(8): 1015

[12] Fu Z L, Zheng X H, Fang M F. Chinese Traditional Patent Medicine (付志玲, 郑晓晖, 房敏峰. 中成药), 2011, 33(7): 1202

[13] Fang M F, Fu Z L, Wang Q L, et al. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae (房敏峰, 付志玲, 王启林, 等. 中国实验方剂学杂志), 2011, 17(11): 132

[14] Fang M F, Fu Z L, Wang Q L, et al. China Journal of Chinese Materia Medica (房敏峰, 付志玲, 王启林, 等. 中国中药杂志), 2010, 35(20): 2684

[15] Ma J, Liang Q D, Gao Y, et al. Pharm J Chin PLA(马靖, 梁乾德, 高月, 等. 解放军药学报), 2011, 27(5): 410

[16] Li L, Lu F G, Xiong X Y, et al. Acta Chinese Medicine and Pharmacology (李玲, 卢芳国, 熊兴耀, 等. 中医药学报), 2010, 38(2): 25

[17] Huang F, Tong X Y, Zhang R H, et al. Chinese Traditional Patent Medicine (黄丰, 童晓云, 张荣华, 等. 中成药), 2008, 30(11): 1582

[18] Chen Q. Train of Thought about Chinese Medicine Research on Pharmacodynamics. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House (陈奇. 中药药效研究思路与方法. 2 版. 北京: 人民卫生出版社), 2007: 17

微流控芯片实验室与产业联合研讨会通知

第一届微流控芯片实验室与产业联合研讨会(Lab on a Chip Industry Workshop-Microfluidic Applications)将于 2014 年 8 月 2-3 日在美丽的海滨城市大连举行,会期 2 天。本次会议由中国科学院大连化学物理研究所(DICP)及英国皇家化学学会(RSC)所属 Lab on a Chip 杂志共同主办,由中国科学院大连化学物理研究所秦建华研究员担任会议主席。

会议涉及微纳流控新技术、新方法,液滴微流控,纸芯片,芯片传感器,组织器官芯片等主题,以及微流控芯片实验室平台在医学检验、生物医药及环境监测等领域的应用。此外,本次会议还将着重关注研讨微流控技术产业化现状及发展前景,以期促进微流控领域学者与产业界的交流和联合。

届时,将邀请国内外从事微流控芯片实验室研究的一批知名学者及相关企业公司代表出席本次会议,并作邀请报告。会议还安排墙报形式交流,并设有优秀墙报奖。同时,也将有微流控相关仪器产品参展。热忱欢迎来自高校、科研院所及企业公司的同仁踊跃报名参会参展。

- 投稿截止日期:2014 年 7 月 1 日。
- 注册截止日期:2014 年 7 月 15 日。
- 更多相关信息,敬请关注会议官方网站 <http://locchina.com>。
- 感谢您的关注和支持,我们期待在大连欢迎您!
- 会议邮箱:master@locchina.com
- 联系电话:0411-84379059
- 会议秘书:马静云

会议组委会 供稿