

· 研究报告 ·

红景天苷在比格犬体内绝对生物利用度研究

黄彪^{1,2}, 单晓菊², 赵鑫¹, 曹永兵¹, 周婷婷¹, 范国荣¹ (1. 海军军医大学药学院, 上海 200433; 2. 科文斯医药研发(上海)有限公司, 上海 201203)

【摘要】 目的 建立比格犬血浆中的红景天苷的 HPLC-MS/MS 测定方法, 研究红景天苷在比格犬体内的绝对生物利用度。**方法** 以天麻素为内标, 血浆样品经蛋白沉淀后, 经 Symmetry RP₁₈ (100 mm×4.6 mm, 3.5 μm) 柱分离, 使用体积分数 0.1% 甲酸溶液(A)-含 0.1% 甲酸和 20% 乙腈的甲醇溶液(B)作为流动相, 进行等度洗脱(35% B), 流速为 0.4 ml/min, 柱温 40 °C, 进样量 2 μl; 通过电喷雾电离源 (ESI), 以多反应监测 (MRM) 模式进行负离子检测, 红景天苷、天麻素的 MRM 离子对分别为 m/z 299.1→118.9、 m/z 285.1→122.9。比格犬分别以口服和静注两种给药方式给予红景天苷原料药, 在不同时间点取血, 样品采用 HPLC-MS/MS 法测定, 研究红景天苷的药动学及绝对生物利用度。**结果** 红景天苷的质量浓度在 10 ~ 10 000 ng/ml 内线性关系良好 ($r>0.9986$), 最低定量浓度为 10.0 ng/ml。方法回收率为 89.5% ~ 91.8%, 日内精密性 (RSD) < 9.7%, 日间精密性 (RSD) < 7.3%。单剂量口服 15 mg/kg 或静注 1.5 mg/kg 红景天苷原料药后, $c_{\max}$ 分别为 (9 680±3 725) 和 (9 310±1 645) ng/ml; $t_{\max}$ 分别为 (1.25±0.67) 和 (0.011±0.017) h, AUC_{0-t} 分别为 (20 535.4±5 200.0) 和 (4 646.7±720.5) ng·h/ml, $AUC_{0-\infty}$ 分别为 (20 607.9±5 266.2) 和 (4 691.6±715.2) ng·h/ml; $t_{1/2}$ 分别为 (1.31±0.63) 和 (0.98±0.13) h。**结论** 该方法简便快速、灵敏可靠, 可用于红景天苷体内过程研究。红景天苷在比格犬体内的绝对生物利用度为 (43.9±11.2)%。

【关键词】 红景天苷; 液相-串联质谱; 药动学; 绝对生物利用度

【中图分类号】 R969.1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1006-0111(2021)01-0062-06

【DOI】 10.12206/j.issn.1006-0111.202012001

Absolute bioavailability of salidroside in Beagle dog

HUANG Biao^{1,2}, SHAN Xiaojun², ZHAO Xin¹, CAO Yongbing¹, ZHOU Tingting¹, FAN Guorong¹ (1. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Chemistry Solution, Covance Pharmaceutical Research and Development (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

【Abstract】 Objective To develop a HPLC-MS/MS method for the absolute bioavailability study of salidroside in Beagle dogs. **Methods** Gastrodin was used as internal standard. Plasma samples were treated by protein precipitation and separated by Symmetry RP₁₈ column (100 mm×4.6 mm, 3.5 μm). 0.1% formic acid in water(A) and 0.1% formic acid in acetonitrile: methanol (20 : 80, V/V) (B) were used as the mobile phase for isocratic elution with 35% mobile phase B. The flow rate was 0.4 ml/min. Column temperature was 40 °C. Injection volume was 2 μl. By electrospray ionization source (ESI) and multi-reaction monitoring (MRM) mode, the MRM ion pairs of salidroside and gastrodin were identified as m/z 299.1→118.9 and m/z 285.1→122.9, separately. Blood samples were collected at different time points after oral or intravenous administration of salidroside. The harvested plasma samples were analyzed by HPLC-MS/MS method to assess the pharmacokinetics and absolute bioavailability of salidroside. **Results** Excellent linearity ($r>0.9986$) was found in the concentration range of 10–10 000 ng/ml for salidroside and the lowest quantitative concentration was 10 ng/ml. The recovery was 89.5%–91.8%. The intra-day precision (RSD) was less than 9.7%, and the inter-day precision (RSD) was less than 7.3%. After a single oral dose of 15 mg/kg or an intravenous injection of 1.5 mg/kg of salidroside, $c_{\max}$ was (9 680±3 725) and (9 310±1 645) ng/ml; $t_{\max}$ was (1.25±0.67) and (0.011±0.017) h, AUC_{0-t} was (20 535.4±5 200.0) and (4 646.7±720.5) ng·h/ml, $AUC_{0-\infty}$ was (20 607.9±5 266.2) and (4 691.6±715.2) ng·h/ml; $t_{1/2}$ was (1.31±0.63) and (0.98±0.13) h, respectively. **Conclusion** The LC-MS/MS method established in this study was simple, rapid, sensitive and reliable. It meets the regulatory requirements of biological analysis for pharmacokinetic properties of salidroside in Beagle dogs. The absolute bioavailability of salidroside in Beagle dogs is (43.9±11.2)%.

【Key words】 salidroside; HPLC-MS/MS; pharmacokinetics; absolute bioavailability

【作者简介】 黄彪, 硕士研究生, Tel: 13761163863, Email: huangbiao1109@163.com

【通信作者】 范国荣, 博士, 博士生导师, 研究方向: 药物分析, Email: guorfan@163.com

红景天为景天科大花红景天 [*Rhodiola crenulata* (Hook.f.et Thoms.) H. Ohba] 的干燥根和根茎^[1], 是一种多年生草本或亚灌木植物。大部分生长于海拔 3 500 ~ 5 000 m 的石灰岩、花岗岩地冰川、山梁草地或山谷岩石上, 享有“高原人参”、“雪山仙草”之美称, 被当代医学界誉为“东方神草”, 被全球医药界喻为“黄金植物”^[2], 已被前苏联科学家确定为植物适应原^[3]。目前的研究表明, 红景天具有抗应激、抗疲劳、抗氧化、抗癌、抗抑郁、保护肝肾、增强机体免疫力和神经保护等作用^[4-7]。

目前, 国内外对红景天多集中于其药效研究, 体内药物含量测定和生物利用度研究又多以大鼠为研究对象。在以往研究的大鼠试验中, 不同给药途径和不同剂量下, 红景天苷绝对生物利用度 (F_{abs}) 结果为 32.1% ~ 98%^[8-11], 范围之大可能和红景天苷在体内的主动转运有关。而主要参与分子主动转运的钠依赖性葡萄糖转运体介导 (SGLT1) 在肠黏膜中所占的比例极其有限。在有限的肠道转运介导下, 剂量不同可能会导致生物利用度研究结果不同。当口服红景天苷剂量大于 24 mg/kg 时, 大鼠肠道出现了饱和吸收过程, 且证明此饱和过程与 SGLT1 相关^[12]。由于肠道中 SGLT1 占比有限, 若给药剂量过高, 可能会导致药物肠道重吸收较差, 进而体现为生物利用度降低。因此, 为了更加科学地考察体内生物利用度, 合适剂量的选择尤为重要。

关于测定比格犬体内红景天苷含量的分析方法研究报道较少。Mao 等^[8]建立了测定犬血浆中红景天苷含量的 HPLC 法, 线性范围为 0.83 ~ 520 $\mu\text{g/ml}$ ($r=0.9926$), 最低定量下限为 0.83 $\mu\text{g/ml}$ 。因定量限较高, 不足以满足其体内药动力学分析。陈帅等^[13]应用 UHPLC-MS/MS 法, 采用柱前衍生化的样品处理同时测定了比格犬血浆中的红景天苷和酪醇含量。其中, 红景天苷的定量下限为 0.02 $\mu\text{mol/L}$, 质量浓度相当于 6.01 ng/ml。该方法的样品处理方式为先用乙腈蛋白沉淀法去除基质中的蛋白组分, 上清溶液经碱化后孵育进行衍生化, 最后用甲基叔丁基醚进行液液萃取, 氮气吹干复溶后进样。虽检测限满足体内药动力学分析, 在批量处理样品时条件苛刻且步骤复杂。且以上研究均未对红景天苷在比格犬体内绝对生物利用度进行评估。

本实验旨在建立准确、快速、灵敏的 LC-MS/MS 法测定比格犬血浆中红景天苷含量, 并对其绝对生物利用度进行研究。血浆样品预处理采用蛋白沉淀, 并将验证后的方法应用于临床前药动力学研

究, 包括生物利用度研究, 为支持临床药动力学试验设计提供依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Triple quad 5500 型三重四极杆串联质谱仪, 配备电喷雾电离源(加拿大 AB Sciex 公司); 岛津液相色谱系统(包括 DGU-20A_{3R} 型脱气机、LC-30AD 型二元液相泵、SIL-30AC 型自动进样器和 CTO-20A 型柱温箱, 日本岛津公司)。Elma sonic P 300H 超声波清洗器(德国埃尔玛公司); XPR6UD5 和 XPE205 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司)。

红景天苷(海军军医大学药学院药物分析教研室, 含量 99.0%, 批号: 20180901); 天麻素(内标, 上海同田生物技术有限公司, 含量: 98.9% 批号: 4031921)。甲醇、乙腈、甲酸(均为色谱纯, Sigma-Aldrich 公司); 超纯水(自制, Millipore 纯水仪)。

1.2 色谱与质谱条件

1.2.1 色谱条件

Symmetry RP₁₈ 色谱柱(Waters 公司, 100 mm $\times$ 4.6 mm, 3.5 μm); 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: 0.1% 甲酸溶液, 流动相 B: 含 0.1% 甲酸和 20% 乙腈的甲醇溶液; 等度洗脱比例为 35% 流动相 B; 流速 0.4 ml/min, 进样量: 2 μl 。

1.2.2 质谱条件

离子源为电喷雾电离源; 负离子方式检测; 源喷射电压为 -4 500 V; 去溶剂温度为 550 $^{\circ}\text{C}$; 雾化器压力 (GS1): 75 psi; 辅助气压力 (GS2): 60 psi; 帘气压力为 35 psi; 入口电压 (EP): -10 V; 碰撞室出口电压 (CXP): -14 V; 扫描方式为多反应监测, 扫描时间为 100 ms。雾化气、帘气、碰撞气由氮气发生器产生; 采用多反应监测 (MRM) 模式, 离子监测通道为: m/z 299.1 $\rightarrow$ 118.9(红景天苷), m/z 285.1 $\rightarrow$ 122.9(天麻素)。红景天苷和天麻素去簇电压分别为 -70 和 -40 eV, 碰撞能量分别为 -19 和 -17 eV。

1.3 溶液的制备

1.3.1 红景天苷储备液和工作溶液

分别精密称取红景天苷对照品 2 份, 用 40% 乙腈水溶液溶解并定容, 获得质量浓度均为 0.2 mg/ml 的红景天苷储备液 2 份, 分别用于配制标准系列样品和质控样品工作液。按照一定的比例混合, 用 40% 乙腈水溶液稀释, 获得红景天苷浓度为: 0.2、0.4、2、8、32、80、180 $\mu\text{g/ml}$ 的标准系列样品工作液和浓度为 0.2、0.6、10、160 $\mu\text{g/ml}$ 的质

控样品工作液。于 4℃ 保存, 备用。

1.3.2 内标储备液和工作溶液

精密称取天麻素对照品一份, 用 40% 乙腈水溶液溶解并定容, 获得质量浓度为 0.1 mg/ml 的天麻素储备液一份。以 40% 乙腈水溶液稀释内标储备液获得 4 000 ng/ml 的内标工作溶液, 于 4℃ 保存, 备用。

1.4 标准系列样品和质控样品的制备

取标准系列溶液或储备液 50 μl 至 1.5 ml EP 管中, 加入比格犬空白血浆 950 μl, 涡旋 10 s, 获得红景天苷浓度为 10、20、100、400、1 600、4 000、9 000、10 000 ng/ml 的标准系列样品以及浓度为 10、30、500 和 8 000 ng/ml 质控样品。标准系列样品每日新鲜配制, 质控样品于 -20 或 -70℃ 保存, 备用。

1.5 血浆样品处理

精密吸取血浆 50 μl, 置于 Axygen 96 孔深孔板中, 加入内标 50 μl, 涡旋 1 min, 加入 450 μl 甲醇, 涡旋 3 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 取出上清液 300 μl, 氮气吹干, 加入 10% 乙腈 200 μl, 涡旋 3 min 后, 取 2 μl 进行 LC-MS/MS 分析。

1.6 动物实验

动物实验部分在上海新冈实验动物场完成。比格犬, 体重 6~8 kg, 雌雄各半; 年龄 24~30 周, 给药前禁食 12 h, 自由饮水, 给药后 4 h 统一进食。

比格犬口服组 ($n=6$, 雌雄各半) 给予红景天苷原料药 15 mg/kg, 分别于给药前 0.5 h 内和给药后即刻、15、30、45 min 及 1、1.5、2、3、4、5、6、8、10、16、24 h 经前肢静脉取血 1 ml 置于肝素钠抗凝试管中, 离心 10 min (3 000 r/min, 4℃) 分离血浆, -70℃ 保存待测。

比格犬静脉注射组 ($n=6$, 雌雄各半) 给予红景天苷原料药 1.5 mg/kg, 分别于给药前 0.5 h 内和给药后即刻、2、5、10、20、30、45 min 及 1、1.5、2、3、4、6、8、12 h 经前肢静脉取血 1 ml 置于肝素钠抗凝试管中, 离心 10 min (3 000 r/min, 4℃) 分离血浆, -70℃ 保存待测。

1.7 数据处理

将所建立并经过验证的方法应用于红景天苷动物药动学研究。所得的血浆浓度-时间数据采用 Phoenix WinNonlin 8.1 (美国 Pharsight 公司) 软件, 以非房室模型计算药动学参数。绝对生物利用度 (F_{abs}) 计算方法见公式(1):

$$F_{abs}(\%) = \frac{AUC_{0-\infty(po)} \times Dose_{iv}}{AUC_{0-\infty(iv)} \times Dose_{po}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: $AUC_{0-\infty(po)}$ 为口服给药后 $AUC_{0-\infty}$ 统计值; $AUC_{0-\infty(iv)}$ 为静脉注射后 $AUC_{0-\infty}$ 统计值; $Dose_{po}$ 为口服剂量; $Dose_{iv}$ 为静脉注射剂量。

2 结果

2.1 专属性

分别取 6 个不同来源的比格犬空白血浆样品以及用相应比格犬空白血浆配制的定量下限 (LLOQ) 样品进行 LC-MS/MS 分析测定, 考察不同来源空白血浆中的内源性物质是否干扰待测物及内标的测定。

结果表明, 比格犬空白血浆中的内源性物质不干扰红景天苷的测定, 同时内标不干扰待测物的测定, 待测物对内标也无影响。

2.2 色谱特性

在选定的条件下, 红景天苷和内标峰形良好, 红景天苷的保留时间约为 1.6 min, 内标的保留时间约为 1.2 min, 内源性杂质不干扰测定。空白血浆、红景天苷及内标、红景天苷及内标加入空白血浆中的色谱图、比格犬口服 1.5 h 样品中红景天苷及内标色谱图见图 1。

2.3 线性范围

取“1.4”项下制备的标准含药血浆样品 50 μl, 按照“1.5”项下血浆样品前处理方法操作, 以每个待测物浓度为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标, 采用加权 ($W=1/X^2$) 最小二乘法进行回归运算, 求得的直线回归方程即为标准曲线, 相关系数 r 均 >0.9986 。比格犬血浆样品中红景天苷浓度在 10~10 000 ng/ml 与峰面积比线性良好, 最低定量浓度为 10 ng/ml。典型标准曲线方程为: $Y=0.00348X+0.000397(r=0.9991)$ 。

2.4 定量下限

取比格犬 LLOQ 血浆样品 (红景天苷质量浓度为 10 ng/ml) 进行 6 份样本分析, 连续测定 3 d 并分别根据当日标准曲线求得每份样本的测得浓度。求得该质量浓度红景天苷的日内精密度分别为 8.3%, 日间精密度为 7.3%, 准确度 (RE) 为 6.0%。实验结果表明, LC-MS/MS 法测定比格犬血浆中红景天苷的定量下限为 10 ng/ml。

2.5 精密度与准确度

取比格犬低、中、高 3 个浓度质控样品, 按照“1.5”项下操作, 每个浓度进行 6 样本分析并在连续 3 d 内测试, 分别根据当日标准曲线计算每份样本的测得浓度并根据 QC 样品结果计算本方法日内、日间精密度和准确度。

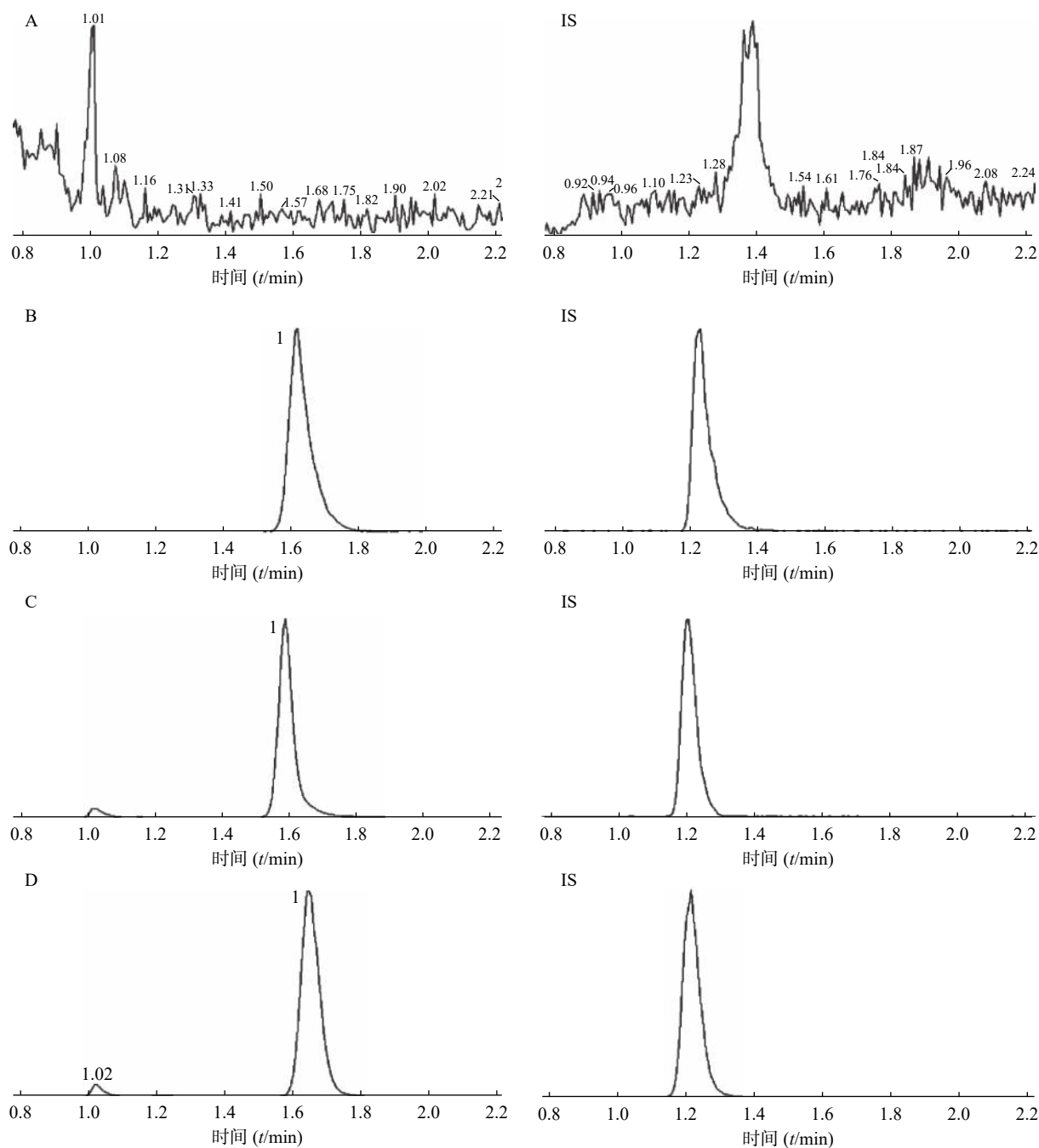


图 1 红景天苷典型质量色谱图

A.空白比格犬血浆; B.红景天苷标准溶液; C.比格犬血浆中添加红景天苷高浓度样品(10 000 ng/ml);
D.比格犬口服红景天苷后 1.5 h 血浆样品; IS.天麻素(内标); 1.红景天苷

红景天苷质控(QC)样品的精密度与准确度结果见表 1。待测物低、中、高质控样品的日内和日间精密度和准确度均符合生物样品测定相关要求。待测物低、中、高质控样品的日内和日间精密度和准确度均符合生物样品测定相关要求。

2.6 基质效应

分别取 6 个不同来源比格犬空白血浆和一份空白溶血血浆 50 μ l, 不加内标溶液(用 50 μ l 40% 乙腈替代内标工作溶液), 按照“1.5”项下操

表 1 红景天苷精密度和准确度试验结果

浓度 (ng/ml)	日内(n=6)		日间(n=18)	
	准确度 (RE/%)	精密度 (RSD/%)	准确度 (RE/%)	精密度 (RSD/%)
10	8.3	10.0	7.3	6.0
30	9.7	-2.0	6.0	-1.3
500	3.3	-3.0	3.4	-0.2
8 000	3.8	-3.5	2.7	-1.5

作, 40 °C 氮气下吹干, 加入 200 μ l 由流动相配制的相对应的低、高浓度对照质控溶液和内标溶液, 涡流后离心 5 min, 取 2 μ l 进行 LC-MS/MS 分析, 获得相应峰面积 (A)。同时, 另取去离子水 50 μ l 代替比格犬空白血浆, 按上述方法操作获得相应峰面积 (B)。以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算基质效应, 公式为 $A/B \times 100\%$, 并以分析物和内标的基质效应比值计算内标归一化的常规基质效应和溶血血浆基质效应。

在比格犬常规血浆样品中, 红景天苷低、高浓度经内标校正后的基质效应分别为 96.3% 和 96.6%, 相对标准差分别为 8.4% 和 4.1%。溶血血浆样品中, 低、高浓度经内标校正后的基质效应分别为 99.4% 和 96.7%, 相对标准差分别为 5.0% 和 7.0%。

结果表明, 待测物红景天苷在本试验选择的色谱和质谱条件下, 可忽略基质效应的影响。

2.7 提取回收率

采用比格犬空白血浆配制的低、中、高 3 个浓度的血浆样品, 按照“1.5”项下操作, 每个浓度进行 6 样本分析。同时另取比格犬空白血浆 50 μ l, 不加内标溶液 (用 50 μ l 40% 乙腈溶液替代内标工作溶液), 其余按照“1.5”项下操作, 于 40 °C 氮气下吹干后, 加入对应的低、中、高浓度对照质控溶液和内标溶液, 涡流 5 min, 取 2 μ l 进行分析, 获得相应峰面积 ($n=3$)。用提取后色谱峰面积与未经提取的色谱峰面积之比计算提取回收率。

比格犬血浆样品经蛋白沉淀处理后, 红景天苷在低、中、高浓度的回收率分别为 91.8%、94.3% 和 89.5%。

2.8 稳定性试验

考察了红景天苷储备液和工作溶液室温 6 h、比格犬血浆样品室温放置 24 h、比格犬血浆样品 -20 °C/-70 °C 经历 5 次冷冻-解冻循环的稳定性以及比格犬血浆样品 -20 °C/-70 °C 经历 22 d 冷冻后的稳定性。全血样品室温/湿冰放置 2 h、样品处理后自动进样器放置 96 h。

结果表明, 红景天苷储备液和工作溶液室温至少 6 h、血浆样品中在室温放置 24 h、-20 °C/-70 °C 冻存 22 d、在 -20 °C/-70 °C 存放条件下反复室温冻融 5 次, 以及样品处理后, 在自动进样器放置 96 h, 红景天苷能够保持良好的稳定性。自全血采集至分离待测血浆样本的室温/湿冰 2 h 内, 红景天苷在全血中保持稳定。

2.9 稀释效应

本实验考察了血浆浓度超出定量上限的比格

犬血浆样品, 经空白比格犬血浆稀释后的准确度。取红景天苷的稀释质控样品 (比格犬血浆样品红景天苷质量浓度为 80 000 ng/ml), 用空白比格犬血浆稀释 20 倍后, 按“1.5”项下操作, 进行 6 份样本分析。结果表明, 比格犬血浆样品经空白比格犬血浆稀释 20 倍后测定不影响结果的准确度。

2.10 红景天苷在比格犬体内药动学研究

比格犬单剂量口服给药红景天苷 15 mg/kg 或静脉注射红景天苷 1.5 mg/kg 后, 按“1.6”项下采集的各时间点血浆样品, 并按照“1.5”项下操作, 进行 LC-MS/MS 分析, 测定红景天苷的比格犬血浆浓度。口服给药红景天苷 15 mg/kg 和静脉注射红景天苷 1.5 mg/kg 后的血药浓度-时间数据曲线分别见图 2 和图 3。采用 WinNonlin 软件以非房室模型计算药动学参数 (表 2、表 3)。

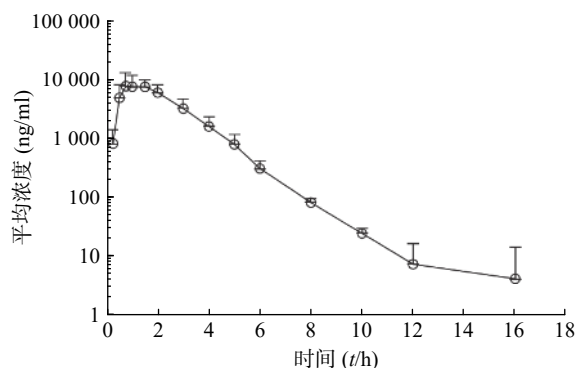


图 2 比格犬口服给药红景天苷 (15 mg/kg) 后的血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

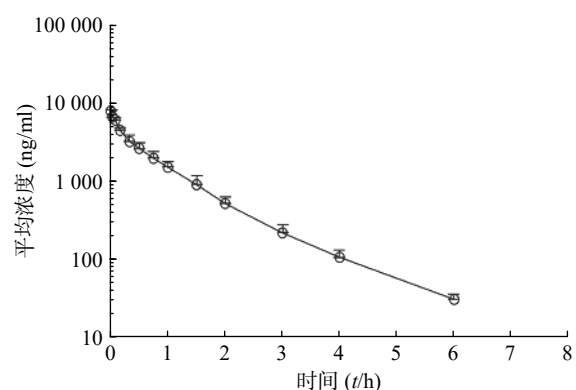


图 3 比格犬静脉注射红景天苷 (1.5 mg/kg) 后的血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

本试验以比格犬单剂量静注给药红景天苷 1.5 mg/kg 后体内血药浓度-时间曲线下面积 $AUC_{0-\infty}$ 为参比, 计算比格犬单次口服给药红景天苷入血的绝对生物利用度。考虑到比格犬动物实验个体差异的特殊性, 采用 6 条比格犬 (雌雄各半) 单剂量口服给药红景天苷 15 mg/kg 及 6 条比格犬 (雌雄各

表 2 比格犬口服 15 mg/kg 红景天苷后血浆药动学参数
($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	雄性犬	雌性犬	平均值
AUC _{0-t} (ng·h/ml)	15 976±1 702	25 095±1 527	20 535±5 200
AUC _{0-∞} (ng·h/ml)	16 005±1 703	25 211±1 692	20 608±5 266
MRT _{0-∞} (t/h)	2.20±0.561	2.39±0.055	2.29±0.371
t _{1/2z} (t/h)	1.02±0.108	1.61±0.845	1.31±0.628
CL _z (L/h·kg)	0.945±0.105	0.597±0.039	0.771±0.203
V _z (L/kg)	1.39±0.232	1.35±0.613	1.37±0.415
c _{max} (ng/ml)	7 867±2 978	11 493±3 995	9 680±3 725
F(%)	34.2±4.9	55.2±7.4	43.9±11.2

表 3 比格犬静注 1.5 mg/kg 红景天苷后血浆药动学参数
($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	雄性犬	雌性犬	平均值
AUC _{0-t} (ng·h/ml)	4 735±1 050	4 557±415	4 646±721
AUC _{0-∞} (ng·h/ml)	4 781±1 042	4 602±411	4 691±715
MRT _{0-∞} (t/h)	1.010±0.064	1.030±0.048	1.020±0.052
t _{1/2z} (t/h)	0.933±0.028	1.03±0.174	0.980±0.132
CL _z (L/h·kg)	0.325±0.078	0.328±0.028	0.326±0.052
V _z (L/kg)	0.437±0.104	0.487±0.102	0.462±0.096
c _{max} (ng/ml)	9 000±1 526	9 620±2 037	9 310±1 645

半)单剂量静注给药红景天苷 1.5 mg/kg 后, 血浆 AUC_{0-∞} 的平均值进行比较, 得到红景天苷在比格犬体内的绝对生物利用度为(43.9±11.2)%。

3 讨论与结论

目前, 对红景天苷的药动学研究多集中在小动物种属(大鼠、小鼠), 仅有少量在比格犬上的研究, 且绝对生物利用度未见文献报道。因此, 本实验旨在建立一种快速、专属性强、灵敏度高的 LC-MS/MS 分析方法, 并应用于比格犬体内红景天苷绝对生物利用度的考察。

在前期的方法考察中, 血浆提取方法考察了蛋白沉淀法[沉淀试剂考察甲醇、乙腈、甲醇(含 0.1% 甲酸)和乙腈(含 0.1% 甲酸)]、液-液萃取法(萃取试剂考察乙酸乙酯、氯仿和异丙醇)。红景天苷在常规液液萃取溶剂中回收率较差。而蛋白沉淀法中基质效应较为明显, 红景天苷及其内标天麻素在初始色谱条件下均表现出较强的基质抑制现象。

以往的研究中, 并未见药典中针对生物分析方法验证所要求的特殊基质(溶血、高脂血等)基质效

应的考察。因高脂血研究不适用于比格犬试验, 固本次仅新增对溶血血浆中基质效应的考察。且前期发现在 LC-MS/MS 检测红景天苷浓度时, 溶血血浆在提取后严重抑制了红景天苷的响应, 使其无法准确定量。本实验最终采用甲醇作为沉淀试剂, 蛋白沉淀后吹干的方式, 对提取物进行浓缩, 并使用 10% 乙腈溶液复溶, 减少了进样过程中的溶剂效应, 从而进一步改善了峰型。同时, 通过对色谱柱的筛选和流动相成分的优化, 使得原始方法中血浆的内源性共流出组分和待测物及内标在不同时间出峰, 很大程度上避免了干扰现象, 并显著改善了基质效应。

另外, 结合以往对大鼠试验中对红景天苷生物利用度差异和剂量关系的研究, 说明本试验在合理的给药剂量下, 所呈现的生物利用度数值有着很高的可靠度和参考价值。在较低的给药剂量下, 所建立的 LC-MS/MS 方法, 定量范围为 10 ~ 10 000 ng/ml, 能充分满足本实验研究的需要。且此方法的专属性、准确度、精密度、基质效应、稳定性等均符合方法学要求, 方法可靠, 能够准确测定比格犬血浆中红景天苷的浓度, 评价其在比格犬体内的药动学行为。

本研究填补了红景天苷在比格犬体内的绝对生物利用度研究的空白, 为以后临床试验中推测人体内暴露量, 考察生物利用度提供了参考数据, 同时为临床选择给药途径提供了依据。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)2015年版[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [2] 许大艳. 红景天苷的合成研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2010.
- [3] KELLY G S. *Rhodiola rosea*: a possible plant adaptogen[J]. *Altern Med Rev*, 2001, 6(3): 293-302.
- [4] 袁瑜, 张良, 李玉锋. 红景天活性成分及药理作用[J]. *食品与药品*, 2007(5): 54-57.
- [5] 居瑞军, 李若婧, 周鹏, 等. 红景天苷注射剂的制备及其在大鼠体内药动学研究[J]. *中国药学杂志*, 2012, 47(18): 1497-1502.
- [6] NI J, LI Y M, LI W M, et al. Salidroside protects against foam cell formation and apoptosis, possibly via the MAPK and AKT signaling pathways[J]. *Lipids Health Dis*, 2017, 16(1): 198.
- [7] FAN F F, YANG L, LI R, et al. Salidroside as a potential neuro-protective agent for ischemic stroke: a review of sources, pharmacokinetics, mechanism and safety[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2020, 129: 110458.

(下转第 96 页)

3 小结

孕激素类药物单独治疗出现肝损伤病例较少, 在使用过程中常常忽略其肝毒性, 未常规监测肝功能指标而不能及时发现潜在的 DILI。本例报告提示, 孕激素类长期大剂量应用的女性患者, 在合并基础疾病、未规律治疗情况下对药物的易感性升高, 临床医师和药师需提醒患者定期监测其肝功能, 如有瘙痒、乏力、纳差等症状, 应警惕 DILI 发生, 及时诊断, 一旦确诊, 应及时适当减量、停药或者换用其他药物及治疗手段。而既往有肝功能不全的患者, 更应警惕性激素类药物肝脏相关的不良反应。

临床药师应充分评估患者病情, 就长期大剂量使用雌孕激素类药物的适应证及安全性与患者充分沟通, 提醒患者定期检查肝功能指标, 提高患者的依从性和用药安全意识, 从而减少 DILI 的发生和危害。

【参考文献】

[1] 中华医学会肝病学分会药物性肝病学组. 药物性肝损伤诊治指南[J]. 肝脏, 2015(20): 750-767.
[2] 袁玲, 杨永耿, 沈有秀, 等. 药物性肝损伤的研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(2): 375-378.
[3] 李扬志, 谢梅青. 孕激素制剂分类及临床应用特点[J]. 实用妇产科杂志, 2011(1): 5-8.
[4] CHITTURI S, FARRELL G C. Chapter 33 - Adverse effects of hormones and hormone antagonists on the liver[M]// Kaplowitz N, DeLeve LD. Drug-Induced Liver Disease. 3Ed. Amsterdam: Elsevier, 2013: 605-619.
[5] PEREZ-MERA R A, SHIELDS C E. Jaundice associated with norethindrone acetate therapy[J]. N Engl J Med, 1962, 267: 1137-1138.

[6] BRADY P C, MISSMER S A, LAUFER M R. Hepatic adenomas in adolescents and young women with endometriosis treated with norethindrone acetate[J]. J Pediatr Adolesc Gynecol, 2017, 30(3): 422-424.
[7] LANGLANDS A O, MARTIN W M. Letter: Jaundice associated with norethisterone-acetate treatment of breast cancer[J]. Lancet, 1975, 1(7906): 584-585.
[8] 黄德良, 戴炜. 炔诺酮致急性药物性肝损伤1例报告[J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(6): 1294-1295.
[9] CHU M C, ZHANG X H, GENTZSCHEIN E, et al. Formation of ethinyl estradiol in women during treatment with norethindrone acetate[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92(6): 2205-2207.
[10] CHOUDHARY N S, BODH V, CHAUDHARI S, et al. Norethisterone related drug induced liver injury: a series of 3 cases[J]. J Clin Exp Hepatol, 2017, 7(3): 266-268.
[11] ELOUNI B, BEN SALEM C, ZAMY M, et al. Cytolytic hepatitis possibly related to levonorgestrel/ethinylestradiol oral contraceptive use: 2 case reports[J]. Ann Pharmacother, 2010, 44(12): 2035-2037.
[12] BOND P, LLEWELLYN W, VAN MOL P. Anabolic androgenic steroid-induced hepatotoxicity[J]. Med Hypotheses, 2016, 93: 150-153.
[13] LUCENA M I, ANDRADE R J, KAPLOWITZ N, et al. Phenotypic characterization of idiosyncratic drug-induced liver injury: the influence of age and sex[J]. Hepatology, 2009, 49(6): 2001-2009.
[14] 吕剑敏, 程锐, 吴伟东. 导致药物性肝损害的相关因素分析及针对性干预措施[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(3): 409-414.
[15] LICATA A, CALVARUSO V, CAPPELLO M, et al. Clinical course and outcomes of drug-induced liver injury: nimesulide as the first implicated medication[J]. Dig Liver Dis, 2010, 42(2): 143-148.
[收稿日期] 2020-02-20 [修回日期] 2020-08-08
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 67 页)

[8] MAO Y, ZHANG X R, ZHANG X D, et al. Development of an HPLC method for the determination of salidroside in beagle dog plasma after administration of salidroside injection: application to a pharmacokinetics study[J]. J Sep Sci, 2007, 30(18): 3218-3222.
[9] 郭娜. 红景天苷及其代谢产物酪醇在大鼠体内的药物代谢动力学研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2012.
[10] CHANG Y W, YAO H T, HSIEH S H, et al. Quantitative determination of salidroside in rat plasma by on-line solid-phase extraction integrated with high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007, 857(1):

164-169.
[11] QI T, GE B K, ZHAO L, et al. Cytosolic β -glucosidase inhibition and renal blood flow suppression are leading causes for the enhanced systemic exposure of salidroside in hypoxic rats[J]. RSC Adv, 2018(8): 8469-8483.
[12] 何丰娟, 刘晓东, 王新廷, 等. 钠依赖性葡萄糖转运体介导红景天苷在大鼠肠中吸收[J]. 中国天然药物, 2009, 7(6): 444-448.
[13] 陈帅, 夏媛媛, 魏广力, 等. 柱前衍生化结合UHPLC-MS/MS法同时测定Beagle犬血浆中的红景天苷和酪醇[J]. 药学学报, 2017(2): 119-124.
[收稿日期] 2020-12-01 [修回日期] 2021-01-05
[本文编辑] 李睿旻