

1011-1017.

[12] 王耿焕, 沈和平, 金成胜, 等. 鬼臼毒素纳米靶向制剂的制备与理化性质评价[J]. 医药导报, 2018, 37(10): 1237-1240.

[13] 王宏媛, 刘 强, 张云杰, 等. 尼莫地平纳米结构脂质载体的制备及大鼠体内药动学[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16): 178-182.

[14] 杨金枝, 孙文霞, 王姣姣, 等. 白杨素固体脂质纳米粒的制备及其药动学行为[J]. 中成药, 2018, 40(1): 76-80.

[15] 徐 凯, 魏永鸽. 高乌甲素磷脂复合物纳米粒的制备、表征及药动学研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(5): 870-874.

[16] 万 坤, 孙立力, 胡雪原, 等. 姜黄素纳米结构脂质载体的药动学[J]. 中成药, 2014, 36(12): 2503-2507.

[17] 王 倩, 郑海雅, 周 颖, 等. 蛇床子素联合肿瘤坏死因子诱导凋亡配体对乳腺癌干细胞的杀伤效应[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(2): 225-231.

[18] 耿雯倩, 俞 媛, 钟延强. 治疗神经退行性疾病的纳米药物递释系统研究进展[J]. 医药导报, 2016, 35(1): 66-70.

补骨脂二氢黄酮甲醚在大鼠体内的组织分布

郭晓伟¹, 钱 璐^{2,3}, 郭夫江³, 谢 凡², 李医明³, 王 瑞³, 李文艳^{2*}
(1. 上海中医药大学附属曙光医院心血管内科, 上海 200120; 2. 上海市浦东新区公利医院药剂科, 上海 200135; 3. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

摘要: 目的 研究补骨脂二氢黄酮甲醚在大鼠体内的组织分布。方法 通过超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 法, 分析采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相 0.05% 甲酸-乙腈, 梯度洗脱; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 30 ℃; ESI 离子源; 正离子模式。大鼠灌胃给予补骨脂二氢黄酮甲醚 (70 mg/kg) 后, 于不同时间点 (0.083、0.25、0.5、1、4 h) 测定其在心、肝、脾、肺、肾、脑、胃、小肠中的组织浓度。**结果** 各组织中均检测到补骨脂二氢黄酮甲醚, 其组织浓度依次为胃>小肠>肝>肺>肾>脾>心>脑, 除胃、小肠 (0.25 h) 外其他组织在 0.5 h 达到最高浓度。**结论** 该方法简便、稳定、可靠, 可用于补骨脂二氢黄酮甲醚的体内分析。
关键词: 补骨脂二氢黄酮甲醚; 组织分布; UPLC-MS/MS
中图分类号: R969.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2019)06-1209-05
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.06.002

In vivo tissue distribution of bavachinin in rats

GUO Xiao-wei¹, QIAN Jun^{2,3}, GUO Fu-jiang³, XIE Fan², LI Yi-ming³, WANG Rui³, LI Wen-yan^{2*}
(1. Department of Cardiovascular, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200120, China; 2. Department of Pharmacy, Shanghai Pudong New Area Gongli Hospital, Shanghai 200135, China; 3. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the *in vivo* tissue distribution of bavachinin in rats. **METHODS** Using an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method, the analysis was per-

收稿日期: 2019-02-28
基金项目: 上海市科委科技创新行动计划 (16401902000); 上海市临床药学重点专科建设项目 (区属) 经费资助 (2018)
作者简介: 郭晓伟 (1984—), 女, 从事中药活性成分及心血管病防治研究。Tel: (021) 20256537, E-mail: guoxiaoweibaoming@126.com
*** 通信作者:** 李文艳 (1971—), 女, 硕士, 主任药师, 硕士生导师, 从事中药新药和临床药学研究。Tel: (021) 58858730-5160, E-mail: liwenyan_linda@163.com
网络出版日期: 2019-03-06
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.r.20190305.1000.002.html>

formed on a 30 ℃ thermostatic Waters ACQUITY UPLC HSS T3 column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), with the mobile phase comprising of 0.05% formic acid-acetonitrile flowing at 0.3 mL/min in a gradient elution manner, and ESI source in a positive ionization mode was selected. Rats were given intragastric administration of bavachinin (70 mg/kg), after which the tissue concentrations in heart, liver, spleen, lung, kidney, brain, stomach and small intestine were determined at different time points (0.083, 0.25, 0.5, 1, 4 h). **RESULTS** Bavachinin was detected in various tissues, whose tissue concentrations were in sequence of stomach>small intestine>liver>lung>kidney>spleen>heart>brain. Except for stomach and small intestine (0.25 h), the other tissues reached the highest concentration at 0.5 h. **CONCLUSION** This simple, stable and reliable method can be used for the *in vivo* analysis of bavachinin.

KEY WORDS: bavachinin; tissue distribution; UPLC-MS/MS

补骨脂为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实, 其性温, 味辛、苦, 归肾、脾经, 具有温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻的功效^[1], 补骨脂二氢黄酮甲醚是从中提取分离得到的天然产物, 具有广泛的生物活性, 如抗癌、抗血管生成、抗过敏、抗炎、抗菌、抗氧化、治疗阿兹海默症等^[2-8], 课题组前期研究发现^[9-10]该成分是天然的过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 三重激动剂, 有明显的抗糖尿病、血脂异常特性, 而且可改善小鼠脂肪肝; 药代动力学研究显示, 它在大鼠体内的血药浓度较低, 表观分布容积较大, 可能存在广泛的组织分布^[11], 但目前尚无有关其组织分布的报道。因此, 本实验建立超高效液相串联质谱法 (UPLC-MS/MS) 检测大鼠灌胃给药后主要器官中补骨脂二氢黄酮甲醚组织浓度, 研究该成分组织分布, 以期为其体内动态变化过程提供更多数据, 合理解释其有效性和毒副作用, 并为后续相关研究提供参考。

1 材料

1.1 试药 补骨脂二氢黄酮甲醚、补骨脂甲素 (内标) 从补骨脂中分离纯化得到, 其结构通过质谱、氢谱、碳谱鉴定, 含有量>98%。乙腈为色谱纯 (美国 Fisher 公司); 甲酸为色谱纯 (德国 CNW 公司); 甲醇等其他试剂均为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司); 水为超纯水 (自制)。

1.2 仪器 UltiMate 3000 超高效液相色谱-TSQ 三重四级杆质谱联用系统, 配置脱气装置、自动进样器、柱温箱、质谱检测器等 (美国 Thermo Fisher 公司); BT25S 电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); 冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); Vortex-5 漩涡混合器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 高通量组织研磨仪 (上海万柏生物科技有限公司)。

1.3 动物 清洁级 SD 大鼠, 雄性, 体质量 (200±20) g, 由上海中医药大学实验动物中心提供 [购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 合格证号 SCXK (沪) 2012-0002], 相关动物实验符合上海中医药大学实验动物伦理委员会要求 (批准文号 ACSHU-20110G115)。

2 方法与结果

2.1 标准溶液制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取补骨脂二氢黄酮甲醚约 10.0 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 乙腈定容, 即得, 4 ℃下保存。

2.1.2 内标溶液 精密称取补骨脂甲素约 10.0 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 乙腈定容, 4 ℃下保存。临用前精密移取适量, 乙腈逐级稀释成 1 μg/mL, 即得。

2.2 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相 0.05% 甲酸-乙腈, 梯度洗脱, 程序见表 1; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 5 μL。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution programs

时间/min	0.05% 甲酸/%	乙腈/%
0	45	55
1.5	2	98
3.5	2	98
3.51	45	55
6	45	55

2.3 质谱条件 ESI 离子源, 多反应监测 (MRM), 正离子模式。喷雾电压 3 500 V; 加热气温度 300 ℃; 鞘气 30 arb (1 arb=175 kPa); 辅助气 10 arb; 离子传输毛细管温度 251 ℃; 扫描峰宽 *m/z* 0.500; 单峰扫描时间 0.250 s, 优化后质谱参数见表 2。

表 2 优化后各成分质谱参数

Tab. 2 MS parameters for various constituents after optimization

成分	Tube lens 电压/V	碰撞能/eV	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	<i>t_R</i> /min
补骨脂二氢黄酮甲醚	110. 87	25	339. 035	219. 018	3. 07
补骨脂甲素(内标)	118. 13	23	325. 008	149. 006	2. 36

2.4 组织分布实验 36 只大鼠随机分为 6 组（5 组给药组，1 组空白组），每组 6 只，给药前禁食 12 h，自由饮水。精密称取补骨脂二氢黄酮甲醚适量，溶于聚乙二醇（PEG400）、聚乙二醇硬脂酸酯（HS15）中，配制成 30 mg/mL 淡黄色透明均一溶液，临用前生理盐水稀释至 6 mg/mL，单次灌胃给药，剂量为 70 mg/kg。于给药后 0.083、0.25、0.5、1、4 h 麻醉，腹主动脉取血，迅速取出心、肝、脾、肺、肾、脑、胃、小肠，生理盐水洗去表面浮血，滤纸吸干残余液体，分装，-80 ℃冰箱中冻存备用。

2.5 样品前处理 分析前，将组织样品从-80 ℃冰箱中取出，室温下放置使其自然解冻。精密称取 100 mg，加入 3 倍量超纯水匀浆（90 s、64 Hz），

精密移取 50 μL，置于 1.5 mL 离心管中，加入补骨脂甲素(内标，1 μg/mL) 5 μL，195 μL 乙腈沉淀蛋白，涡旋 5 min，离心（4 ℃、13 000 r/min）10 min，上清液再次离心，置于液相小瓶中分析。

2.6 数据处理 Xcalibur 2.2 软件（美国 Thermo 公司）计算每只大鼠给药后不同时间点各组织中药物浓度。

2.7 方法学考察

2.7.1 专属性试验 取空白肝组织匀浆、加入补骨脂二氢黄酮甲醚（1 ng/mL）后肝组织匀浆、给药 4 h 后肝组织匀浆适量，按“2.5”项下方法处理后在“2.2”和“2.3”项条件下进样测定，结果见图 1~2。

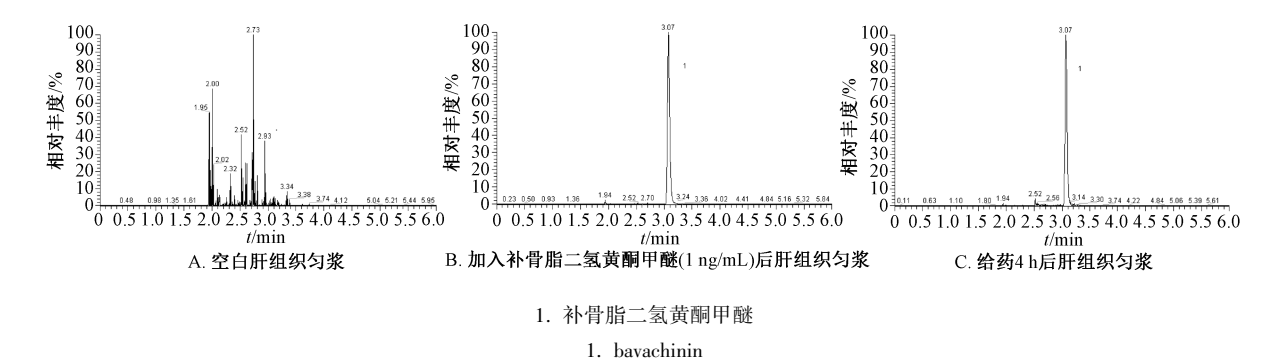


图 1 补骨脂二氢黄酮甲醚 MRM 色谱图
Fig. 1 MRM chromatograms of bavachinin

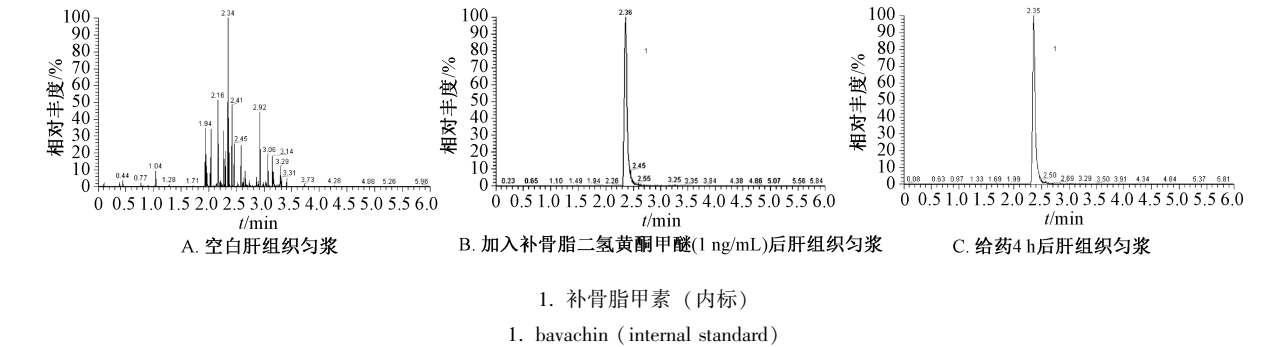


图 2 补骨脂甲素（内标）MRM 色谱图
Fig. 2 MRM chromatograms of bavachin (internal standard)

由图可知，样品预处理后内源性物质不干扰待测物、内标测定，方法专属性良好。

2.7.2 线性关系考察 精密移取内标溶液(1 μg/mL) 5 μL、“2.1.1”项下对照品溶液5 μL、乙腈190 μL，

加入 50 μL 空白组织匀浆中, 按“2.5”项下方法处理, 配制成含补骨脂二氢黄酮甲醚 600、500、300、100、50、20、5、2、1、0.4 ng/mL 的标准样品溶液, 在“2.2”和“2.3”项条件下进样测定。以待测物质量浓度为横坐标 (X), 待测物与内标峰面积比值为纵坐标 (Y) 进行回归, 结果见表 3, 可知该成分在各组织中线性关系良好, 最低定量限 (LLOQ) 为 0.4 ng/mL (信噪比 $S/N>5$)。

表 3 补骨脂二氢黄酮甲醚在各组织中的线性关系

Tab. 3 Linear relationships of bavachinin in various tissues

组织	回归方程	r	线性范围/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$
心	$Y=0.013\ 8X+0.049\ 6$	0.996 8	0.4~600
肝	$Y=0.021\ 3X+0.002\ 0$	0.991 9	0.4~600
脾	$Y=0.014\ 0X+0.017\ 5$	0.991 7	0.4~600
肺	$Y=0.015\ 0X+0.012\ 8$	0.996 4	0.4~600
肾	$Y=0.017\ 6X+0.004\ 5$	0.995 2	0.4~600
脑	$Y=0.014\ 6X-0.001\ 0$	0.996 3	0.4~600
胃	$Y=0.014\ 3X+0.014\ 4$	0.996 9	0.4~600
肠	$Y=0.013\ 2X+0.012\ 2$	0.992 9	0.4~600

2.7.3 精密度、准确度试验 取“2.7.2”项下标准样品溶液 (0.4 ng/mL) 及低、中、高质量浓度 (1、50、500 ng/mL) 质控样品溶液, 按“2.5”项下方法处理, 于 24 h 内在“2.2”和“2.3”项条件下进样测定 5 次, 连续 3 d, 结果见表 4, 可知该方法精密度、准确度良好。

表 4 精密度、准确度试验结果 ($n=6$)

Tab. 4 Results of accuracy and precision tests ($n=6$)

原有量/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	日内			日间		
	测得量/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	精密度 RSD/%	准确度/ %	测得量/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	精密度 RSD/%	准确度/ %
0.4	0.45	17.0	113.73	0.46	13.63	115.58
1	0.94	14.5	94.09	0.87	11.45	87.12
50	48.72	8.4	97.43	47.74	3.39	95.48
500	472.77	9.2	94.55	481.78	2.21	96.36

2.7.4 提取回收率、基质效应试验 取“2.7.2”项下标准样品溶液及“2.7.3”项下质控样品溶液, 平行 6 份, 在“2.2”和“2.3”项条件下进样测定, 比较提取后的峰面积与空白匀浆提取后加入补骨脂二氢黄酮甲醚的峰面积, 考察提取回收率; 比较向提取后空白组织匀浆液中加入“2.1.1”项下对照品溶液所得峰面积与相同质量浓度对照品溶液所得峰面积, 考察基质效应, 结果见表 5, 可知均符合 FDA 生物样品分析指南^[12]规定。

表 5 提取回收率、基质效应试验结果 ($n=6$)

Tab. 5 Results of extraction recovery and matrix effect tests ($n=6$)

成分	原有量/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	提取回 收率/%	提取回收 率 RSD/%	基质效 应/%	基质效应 RSD/%
补骨脂二氢黄酮甲醚	0.4	106.84	6.6	97.80	4.9
	1	109.04	5.7	95.09	5.5
	50	103.87	3.0	99.58	3.8
	500	101.70	4.6	103.34	3.8
补骨脂甲素 (内标)	—	97.31	2.4	105.20	5.3

2.7.5 稳定性试验 空白肝脏匀浆中加入补骨脂二氢黄酮甲醚, 制备标准样品、质控样品溶液, 平行 6 份, 室温下放置 24 h (短期稳定性), $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下放置 2 周 (长期稳定性), 反复冻融 3 次 (冻融稳定性), 自动进样器中放置 8 h (自动进样器稳定性) 后, 在“2.2”和“2.3”项条件下进样测定, 结果见表 6, 可知待测物在组织样品中稳定。

表 6 稳定性试验结果 ($n=6$)

Tab. 6 Results of stability tests ($n=6$)

指标	原有量/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	测得量/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	RSD/ %
短期稳定性 (室温下放置 24 h)	0.4	0.38	9.91
	1	1.00	8.63
	50	51.44	7.87
	500	502.59	11.89
长期稳定性 ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下放置 2 周)	0.4	0.40	9.44
	1	0.98	8.57
	50	51.63	9.77
	500	517.18	10.14
冻融稳定性 (反复冻融 3 次)	0.4	0.40	10.61
	1	1.00	5.21
	50	50.68	8.46
	500	512.36	9.90
自动进样器稳定性 (自动进样器中放置 8 h)	0.4	0.39	13.18
	1	0.98	9.96
	50	51.05	9.51
	500	498.42	11.46

2.8 组织浓度测定 将灌胃后 0.083、0.25、0.5、1、4 h 分离的各组织制成匀浆, 按“2.5”项下方法处理, 测定组织浓度, 公式为组织浓度=样品溶液质量浓度 $\times$ 稀释倍数 (5 倍) $\times$ 0.3 mL /组织质量, 结果见表 7、图 3。灌胃给药后各组织中均可检测到补骨脂二氢黄酮甲醚, 其组织浓度依次为胃>小肠>肝>肺>肾>脾>心>脑, 而且除胃、小肠 (0.25 h) 外其他组织在 0.5 h 达到最高浓度。

表 7 补骨脂二氢黄酮甲醚组织浓度测定结果 (n=6)

Tab. 7 Results of tissue concentration determination of bavachinin (n=6)

组织	组织浓度/(ng·mg ⁻¹)				
	0.083 h	0.25 h	0.5 h	1 h	4 h
心	0.09	0.93	1.82	0.81	0.24
肝	0.52	3.55	4.41	1.32	0.50
脾	0.34	1.06	1.66	0.94	0.36
肺	1.54	1.66	4.28	2.05	0.15
肾	0.11	1.01	1.96	1.21	0.29
脑	0.07	0.39	0.69	0.72	0.13
胃	14.43	20.22	19.19	11.99	3.72
小肠	10.55	13.67	4.65	4.98	7.18

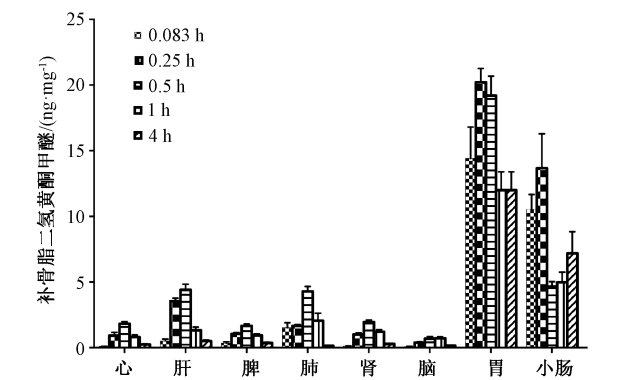


图 3 不同时间点各组织中补骨脂二氢黄酮甲醚组织浓度

Fig. 3 Tissue concentrations of bavachinin in various tissues at different time points

3 讨论

生物样品通常样品量少，药物浓度低，并含有大量内源性杂质。本实验建立 UPLC-MS/MS 法，并选择 MRM 模式，具有较高的精密度与分辨率，并可有效避免其他内源性杂质对待测物的干扰^[13]，而且该方法灵敏、稳定、可靠，分析时间短，可用于生物样品中低浓度补骨脂二氢黄酮甲醚的检测。

本实验发现，补骨脂二氢黄酮甲醚在心、肝、脾、肺、肾、脑中的分布较迅速，5 min 后即可检测到该成分，15 min 后达到较高浓度，达峰时间约为 30 min，1 h 后其组织浓度明显降低，4 h 后基本消除，这与课题组前期药动学研究结果一致；脑中也有补骨脂二氢黄酮甲醚，表明该成分可通过血脑屏障；肝中补骨脂二氢黄酮甲醚组织浓度较高，表明该成分可能在肝脏富集，从而发挥缓解脂肪肝的作用。胃和小肠是药物主要吸收器官，由于补骨脂二氢黄酮甲醚呈弱酸性和脂溶性，故在胃酸环境中主要呈非离子型，易在胃肠中被动扩散吸收^[14]，本实验发现给药 1 h 后小肠中该成分组织浓度再次

升高，可能与重吸收有关。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：187-188.

[2] Nepal M, Choi H J, Choi B Y, *et al.* Anti-angiogenic and anti-tumor activity of bavachinin by targeting hypoxia-inducible factor-1α[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 691(1-3): 28-37.

[3] Chen X, Wen T, Wei J, *et al.* Treatment of allergic inflammation and hyperresponsiveness by a simple compound, Bavachinin, isolated from Chinese herbs [J]. *Cell Mol Immunol*, 2013, 10(6): 497-505.

[4] Chen X, Shen Y, Liang Q, *et al.* Effect of bavachinin and its derivatives on T cell differentiation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 19(2): 399-404.

[5] Chopra B, Dhingra A K, Dhar K L. *Psoralea corylifolia* L. (Bughuchi) -folklore to modern evidence: review[J]. *Fitoterapia*, 2013, 90: 44-56.

[6] Yin S, Fan C Q, Wang Y, *et al.* Antibacterial prenylflavone derivatives from *Psoralea corylifolia*, and their structure-activity relationship study [J]. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12(16): 4387-4392.

[7] 王天晓, 尹震花, 张伟, 等. 补骨脂抗氧化、抑制 α-葡萄糖苷酶和抗菌活性成分研究[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(14): 2328-2333.

[8] Chen X, Yang Y, Zhang Y. Isobavachalcone and bavachinin from *Psoraleae Fructus* modulate Aβ42 aggregation process through different mechanisms *in vitro* [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(18): 2930-2935.

[9] Guo F J, Huang C, Feng L, *et al.* PPAR α/γ dual agonist and its application: WO, 2014/169800[P]. 2014-10-23.

[10] Feng L, Luo H, Xu Z, *et al.* Bavachinin, as a novel natural pan-PPAR agonist, exhibits unique synergistic effects with synthetic PPAR-γ and PPAR-α agonists on carbohydrate and lipid metabolism in db/db and diet-induced obese mice[J]. *Diabetologia*, 2016, 59(6): 1276-1286.

[11] Qian J, Xie F, Shi Y H, *et al.* Pharmacokinetic and metabolism studies of bavachinin through ultra-high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2018, 32(10): e4293.

[12] Food Drug Administration (FDA). Bioanalytical method validation guidance for industry [R]. [2018-05-24]. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>.

[13] Suneetha A, Raja R K. Comparison of LC-UV and LC-MS methods for simultaneous determination of teriflunomide, dimethyl fumarate and fampridine in human plasma: application to rat pharmacokinetic study[J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(9): 1371-1377.

[14] 魏敏吉, 赵明. 创新药物药代动力学研究与评价[M]. 北京：北京大学医学出版社，2008：11.