



Simultaneous Determination of Luteolin and Ayanin in Rat Plasma by HPLC-MS-MS and its Application in a Pharmacokinetic Study

Li LI¹, Ji-Jun LIANG², Yu LIU¹, Li-Jiang CHEN^{1*}, Wen-Jun ZHANG¹ & En LU³

¹ School of Pharmacy, Liaoning University, Shenyang, Liaoning Province, 110036, China.

² Guilong Pharmaceutical (Anhui) Co., Ltd., Xiamen, Anhui Province, 361012, China.

³ Shenyang He Ophthalmology Hospital, Shenyang, Liaoning Province, 110000, China.

SUMMARY. A rapid and sensitive HPLC-MS-MS method was developed and validated for simultaneous determination of luteolin and ayanin, the two main components of total flavonoids in *Callicarpa nudiflora* (TFC), in rat plasma. Separation was achieved on ODS column (150 mm × 4.6 mm ID, 5 μm) with mobile phase consisting of methanol-0.2 mmol/L ammonium acetate solution (80:20, v/v). Electrospray ionization (ESI) source was applied and operated in the negative ion mode. Multiple reaction monitoring (MRM) mode with the transitions of m/z 285→m/z 133, m/z 343→m/z 313 and m/z 283→m/z 268 were used to quantify luteolin, ayanin and wogonin (internal standard, IS), respectively. The linear calibration curve of luteolin and ayanin were obtained in the concentration range of 1.93~472.50 and 0.21~3.82 ng/mL, respectively. The lower limit of quantification (LLOQ) was 1.93 and 0.21 ng/mL for luteolin and ayanin, respectively. The recovery of luteolin and ayanin were in 81.33~85.91% and 80.35~85.62%. The precision (RSD) was less than 9% and the accuracy (RE) was within ± 6% calculated from quality control (QC) samples. After orally administrated of total flavonoids in *C. nudiflora* to rats, the pharmacokinetic parameters of luteolin vs ayanin were as follows: t_{max} : 0.33 vs 0.67 h; C_{max} : 380.30 ng/mL vs 1.65 ng/mL; AUC_{0-t} : 279.60 vs 4.43 ng·h/mL; $AUC_{0-\infty}$: 295.82 vs 6.14 ng·h/mL; $t_{1/2}$: 2.87 vs 4.94 h. The method was proved simple, rapid, sensitive, specific and suitable for pharmacokinetic study of total flavonoids in *C. nudiflora* in rat plasma.

RESUMEN. Un método rápido y sensible de HPLC-MS-MS fue desarrollado y validado para la determinación simultánea de luteolina y ayanina, los dos componentes principales de los flavonoides totales de *Callicarpa nudiflora* (TFC), en plasma de rata. La separación se realizó en una columna ODS (150 mm × 4.6 mm ID, 5 μm) con una fase móvil que consiste en metanol-0,2 mmol/L y solución de acetato de amonio (80:20, v v). Se aplicó una fuente de ionización por electrospray (ESI) operada en modo de ion negativo. El modo de monitorización de reacción múltiple (MRM) con las transiciones de m/z 285→m/z 133, m/z 343→m/z 313 y m/z 283→m/z 268 se utiliza para cuantificar la luteolina, ayanina y wogonina (patrón interno, ES), respectivamente. La curva de calibración lineal de luteolina y ayanina se obtuvieron en el intervalo de concentración de 1,93 ~ 472,50 y 0,21 ~ 3,82 ng/mL. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) fue de 1,93 y 0,21 ng/mL para la luteolina y ayanina, respectivamente. La recuperación de la luteolina y ayanina estaban en 81,33 ~ 85,91% y 80,35 ~ 85,62%. La precisión (RSD) fue inferior a 9% y la exactitud (RE) fue de ± 6% calculado a partir del control de calidad de las muestras. Después de administrados por vía oral los flavonoides totales de *C. nudiflora* a ratas, los parámetros farmacocinéticos de luteolina vs ayanina fueron los siguientes: t_{max} : 0,33 vs 0,67 h; C_{max} : 380,30 vs 1,65 ng/mL; AUC_{0-t} : 279,60 vs 4,43 ng·h/mL; $AUC_{0-\infty}$: 295,82 vs 6,14 ng·h/mL; $t_{1/2}$: 2,87 vs 4,94 h. El método demostró ser simple, rápido, sensible, específico y adecuado para el estudio farmacocinético de flavonoides totales de *C. nudiflora* en plasma de rata.

KEY WORDS: Ayanin, HPLC-MS-MS, Luteolin, Pharmacokinetic study, Total flavonoids in *C. nudiflora*.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: cljlnu@163.com