

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定大鼠尿液中盐酸小檗碱含量

LCMSMS-120

摘要：建立一种测定大鼠尿液中的盐酸小檗碱的超高效液相色谱串联质谱法（UHPLC-MS/MS）并用于考察灌胃给予大鼠盐酸小檗碱药代动力学情况。样品经处理后，用超高效液相色谱 LC-30A 快速分离盐酸小檗碱，三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行定量分析。使用内标法在 $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ~ $1000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内绘制校准曲线，线性良好，相关系数为 0.9999。对高、中、低三浓度生物样品进行批次内、批次间精密度考察，RSD% 在 6.77 以下，符合 SFDA 报批要求。

关键词：盐酸小檗碱；药物代谢动力学；超高效液相色谱串联质谱法

小檗碱（结构式如图 1）是一种异喹啉类生物碱，是从毛茛科黄连属植物黄连的根状茎中提取的主要有效成分，具有广谱抗菌作用，临床上一般使用其盐酸盐治疗肠道感染与腹泻。Weijia Kong 等人 2004 年报道小檗碱具有降血脂作用。动物实验及细胞实验同样证明小檗碱在降脂方面效果显著。通过进一步的机制研究发现小檗碱的降脂原理与他汀类药物并不相同：他汀类药物是通过增加 LDLR mRNA 的转录来降低血脂，而小檗碱则是通过稳定 LDLR mRNA 从而增加 LDL 受体的表达来降低胆固醇，以达到降血脂的目的。临床发现，小檗碱在血浆中的极低浓度即可产生药理活性。因此利用高效液相色谱-三重四极杆质谱（LC-MS/MS）联用技术，我们建立了一种准确、快速、灵敏的小檗碱定量方法。

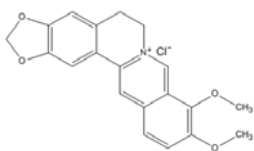


图1 盐酸小檗碱结构式

实验部分

1.1 药物

盐酸小檗碱购自 J&K Scientific Ltd，内标巴马汀购自中国食品药品检定研究院，纯度均大于 98%。

1.2 动物

SD 雄性大鼠（SPF 级），250~290 g，购买于中国食品药品检定研究院实验动物资源中心，合格证号 SCXK（京）2009-0017；实验前大鼠 12 h 禁食，但自由饮水。

1.3 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC

自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站；AG-135 电子天平（瑞士 Mettler 公司）；XW-80A 型微型漩涡混合仪（金坛市盛蓝仪器制造有限公司）；TH2-100 型恒温培养摇床（上海一恒科技有限公司）；氮气吹扫仪 MD200-2（杭州奥盛仪器有限公司）；Heraeus Pico 21 离心机（Thermo Scientific, 德国）。

1.4 试剂

乙腈购自美国 Fisher 公司（Fairlawn, NJ, USA）；实验用水由 Milli-Q Plus 水净化系统（Millipore, Ltd.）经去离子与二次净化制得；甲酸（纯度 99%，LCMS 级，Wako, Japan）；其余试剂均为分析纯，购自北京化学试剂公司。

方法和结果

2.1 对照品溶液及内标溶液的配制

精密称取 5 mg 盐酸小檗碱对照品，置于 50 mL 容量瓶中，加甲醇溶解定容，配制成 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液，从中取出 100 μL 溶液置 10 mL 容量瓶中，以甲醇定容后倍比稀释得到一系列不同浓度的对照品溶液 0.5, 1.5, 10, 50, 100, 500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；另精密称取盐酸巴马汀，以甲醇配制成 250 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标溶液。

2.2 标准曲线与质控样品的配制

200 μL SD 大鼠尿液，加入盐酸小檗碱系列溶液 20 μL ，加入内标（250 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 盐酸巴马汀甲醇溶液）10 μL ，配制成相当于尿液浓度为 5, 10, 50, 100, 500, 1000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，按“生物样品处理”项下操作，记录盐酸小檗碱与内标的峰面积，以浓度为横坐标，峰面积比值为纵坐标，绘制标准曲线。

2.3 大鼠尿液样品处理方法

取 200 μL SD 大鼠尿液，加入 10 μL 内标（250 $\text{ng}/$

mL 盐酸巴马汀甲醇溶液)，加入 50 μL 0.5 M 氢氧化钠水溶液，涡旋混匀 1 min；加入 1 mL 乙酸乙酯，涡旋混匀 2 min，5000 rpm 离心 5 min，分离上清液于 40 oC 氮气流吹干，残留物以 100 μL 流动相（乙腈 -0.5% 甲酸水溶液 =1:4 v: v）复溶，离心取上清，10 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

2.4 色谱条件

色谱柱采用岛津 Shim-pack XR-ODS II 75 mm \times 2 mm, 2.2 μm 。色谱条件为流动相：乙腈 - 水（0.5% 甲酸）；梯度：0 min: 15:85; 4 min: 30:70; 4.01 min: 80:20; 5.5 min: 80:20; 5.6 min: 15:85; 8 min: 15:85；流速：0.5 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ ；柱温：40 oC；进样量为 10 μL 。

2.5 质谱条件

离子化模式：ESI(+)
 离子喷雾电压：4.5 kV
 雾化气：氮气 3.0 L/min
 干燥气：氮气 15 L/min
 碰撞气：氩气
 DL 温度：300 $^{\circ}\text{C}$
 加热模块温度：450 $^{\circ}\text{C}$
 扫描模式：多反应监测 (MRM)
 驻留时间：30 ms
 延迟时间：2 ms
 MRM 参数：见表 1

表1 MRM优化参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
盐酸小檗碱	336.30	320.00*	-15.0	-31.0	-21.0
		292.05	-15.0	-31.0	-30.0
I.S.	352.30	336.10*	-16.0	-29.0	-22.0
		308.10	-16.0	-28.0	-20.0

*为定量离子对

2.6 方法学考察

2.6.1 专属性试验

选择性是通过大鼠空白尿液 (n > 6) 的检测进行验证的。所有样品的结果表明生物基质不干扰待测物的测定。正离子、多反应检测模式下，典型的多反应检测图谱如图 2，盐酸小檗碱与巴马汀的保留时间均为 3.7 min。

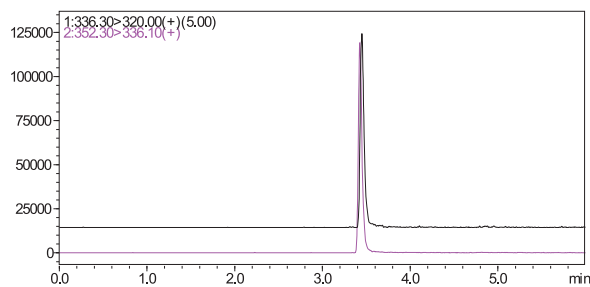


图2 大鼠尿液5 ng/mL $^{-1}$ 色谱图

2.6.2 线性关系考察

分别取空白生物样品，加入适量的系列浓度标准溶液，配制成系列浓度的模拟生物样品。按“2.3 生物样品处理方法”进行处理后进样。记录各成分与内标的峰面积比值，以浓度与峰面积比值做线性回归绘制标准曲线，结果如表 2 所示。

表2 线性结果

基质	回归方程	r	范围
尿液	$y=0.0167x+0.1427$	$r=0.9999$	5 ng/mL ~1000 ng/mL

2.6.3 精密度及回收率试验

分别取空白生物样品，加入适量的对照品标准溶液，配制低、中、高三个浓度的 QC 样品，按“2.3 生物样品处理方法”进行处理后进样。每个浓度进行 5 样本分析，连续测定三批，进行回收率和精密度实验，结果见表 3，结果表明，方法的回收率、批内及批间精密度符合要求。

表3 精密度及回收率结果

基质	加入量 (ng·mL ⁻¹)	批内精密度 (x±s, n=5)	RSD (%)	批间精密度 (x±s, n=5)	RSD (%)	回收率 (%)
尿液	5	4.91± 0.26	5.42	4.99± 0.08	1.64	69.42
	50	50.49± 3.42	6.77	52.21± 2.92	2.92	70.30
	500	500.31± 17.91	3.58	493.46± 5.96	1.21	75.37

2.6.4 稳定性

对尿液进行室温放置 24 h 和 4℃放置 24 h, 按标“标准曲线制备”项下制备盐酸小檗碱浓度为 5, 50, 500 ng·mL⁻¹ 的样品, 进行 5 样本分析; 同时制备 QC 样品。通过与内标峰面积比值计算稳定性, 结果如下表。结果表明, 盐酸小檗碱在尿液中室温放置 24 h 和 4℃放置 24 h 条件下稳定性良好。

表4 大鼠尿液中盐酸小檗碱的稳定性 (n=5)

盐酸小檗碱浓度 (ng·mL ⁻¹)	10	100	500
室温放置24 h (%)	103.67	102.45	100.55
4℃放置24 h (%)	92.12	96.57	90.56
3次冻融 (%)	100.99	99.02	98.25

2.6.5 基质效应

SD 大鼠空白尿液样品, 除不加系列标准溶液和内标外, 按“标准曲线制备”项下操作, 用萃取后的上清液制备浓度为 5, 50, 500 ng·mL⁻¹ 的样品, 每个浓度 5 样本分析。另以复溶样品的流动相配制浓度为 5, 50, 500 ng·mL⁻¹ 的样品, 每个浓度 5 样本分析。以前者处理后样品测得的峰面积与后者流动相直接配制样品测得的峰面积相比, 考察样品的基质效应, 结果如下表。盐酸小檗碱在尿液中不受基质干扰。如表 5。

表5 大鼠尿液中盐酸小檗碱的基质效应结果 (RE%, n=5)

盐酸小檗碱浓度 (ng/mL)	5	50	500
基质效应 (%)	99.67	104.52	99.20

2.7 尿液测定结果

对 4 只大鼠进行灌胃, 口服给药方式下盐酸小檗碱浓度为 200 mg·kg⁻¹。利用 LC-MS/MS 对尿液中盐酸小檗碱及巴马汀的浓度进行分析记录。结果见表 6

表6 SD大鼠盐酸小檗碱尿液排泄结果

时间(h)	尿液排泄量 (μg)	尿液排泄率 (%)
0~6	1555.46±575.13	0.004±0.002
6~12	1873.79±985.61	0.005±0.003
12~24	1662.87±439.26	0.005±0.001
24~36	421.31±173.60	0.001±0.0005
总计	5513.43±1440.46	0.02±0.004

讨论

本文建立使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定大鼠尿液中盐酸小檗碱的快速方法, 经方法学研究表明线性、精密度、灵敏度均满足样品测定要求。大鼠口服 200 mg·kg⁻¹ 盐酸小檗碱, 经 36 小时, 大量小檗碱经尿液排泄, 排泄率为 0.02% ± 0.004。