

大鼠血浆中中枢神经保护药物 SC 的含量测定方法建立

LCMSMS-322

摘要： 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用，建立了一种大鼠血浆中药物 SC 的含量测定方法。血浆样品经处理后，用超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8060 在 5.5 min 内完成定量分析。SC 在大鼠血浆中 10~600 ng/mL 内线性良好，相关系数为 0.9992，标线各点的准确度范围在 96.4~105.9% 之间。此方法快速、简单、选择性强和灵敏度高，可以用于临床前 SC 的药代动力学研究。

关键词： 大鼠血浆 SC 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

对中药和天然药物活性成分研究是新药发现的重要途径之一，目前临床使用的药物约 50% 直接或间接来源于天然产物。我国记载在案的天然药用动植物超过万余种，丰富的资源为我国从天然药物中发现新药奠定了物质基础。从中药萃取液中提取出了一种具有中枢神经保护活性的药物（代号 SC），经研究发现，该物质具有心血管保护活性，有望开发为一类新型心

血管药物。目前，该药物正在进行体内药代动力学研究，因此我们开发了大鼠血浆中药物 SC 的含量测定方法。

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用，建立了以芹菜素为内标的大鼠血浆中药物 SC 的定量分析方法，该方法操作简便、特异性好、灵敏度高、分析速度快，适用于 SC 的大鼠药代动力学研究。

■ 实验部分

1.1 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-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2（输液泵），DGU-20A5R（在线脱气机），SIL-30ACMP（自动进样器），CTO-20AC（柱温箱），CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.89 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：ACQUITY UPLC HSS T3 Column (2.1 mm × 150 mm, 1.8 μm)

流动相：A 相 - 水；B 相 - 乙腈

流速：0.40 mL/min

柱温：40°C

进样量：10 μL

自动进样器温度：15°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.50	Pumps	Pump B Conc.	95
3.50	Pumps	Pump B Conc.	95
3.60	Pumps	Pump B Conc.	20
5.50	Controller	Stop	

质谱条件:

离子源: ESI (-)

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 10.0 L/min

接口温度: 300°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

干燥气流速: 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 59 ms

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
SC	-	377.30	217.30*	13.0	32.0	25.0
			277.30	17.0	10.0	21.0
芹菜素	520-36-5	269.20	117.05	29.0	35.0	25.0

* 表示定量离子对

1.3 样品制备

标准溶液配制: 使用乙腈溶液分别制备浓度为 20 µg/mL 和 2 µg/mL 的 SC 和芹菜素的储备溶液。加入适当体积乙腈稀释储备溶液, 制备浓度为 0.1、0.5、1、2 和 6 µg/mL 的 SC 标准工作溶液, 芹菜素通过乙腈稀释储备溶液至终浓度为 20 ng/mL 备用。所有储存溶液储存在 4°C, 所有工作溶液在使用前均新鲜制备。90 µL 新鲜大鼠血浆中分别加入 10 µL SC 工作标准溶液和 10 µL 芹菜素内标工作溶液, 涡旋混合后加入 290 µL 甲醇沉淀蛋白, 样品涡旋 5 分钟后以 13,000 g, 4°C 离心 10 分钟, 取上清液 200 µL 直接进行 LC-MS/MS 分析。SC 血浆样品标曲的最终浓度分别为 10、50、100、200 和 600 ng/mL。

样品前处理方法: 100 µL 大鼠血浆样品加入 10 µL 芹菜素内标工作液, 涡旋混合后加入 290 µL 甲醇沉淀蛋白, 样品涡旋 5 分钟后以 13,000 g, 4°C 离心 10 分钟, 取上清液 200 µL 直接进行 LC-MS/MS 分析。

结果讨论

2.1 MRM 色谱图

血浆基质的标准样品 MRM 色谱图:

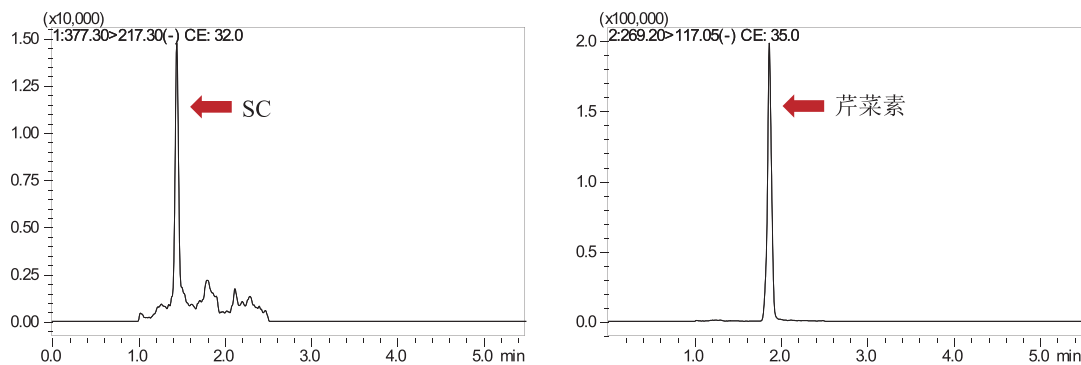


图 1 血浆基质中 SC (10 ng/mL) 及内标芹菜素 (2 ng/mL) 的 MRM 色谱图

2.2 线性范围

浓度为 0.1、0.5、1、2 和 6 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液，按照 1.3 中的样品前处理方法进行处理后按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积比为纵坐标，内标法制作标准曲线（图 2）。在 10~600 ng/mL 浓度范围内线性良好，线性方程、线性范围和相关系数见表 3。

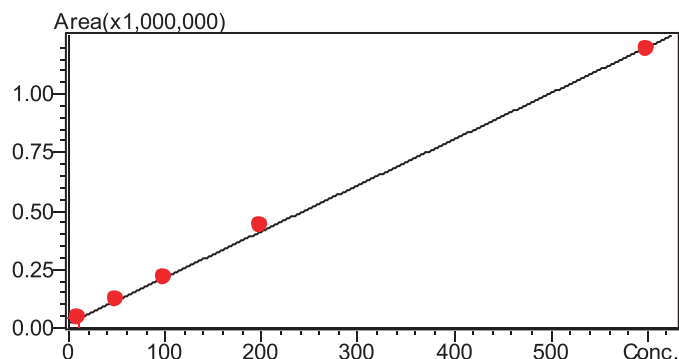


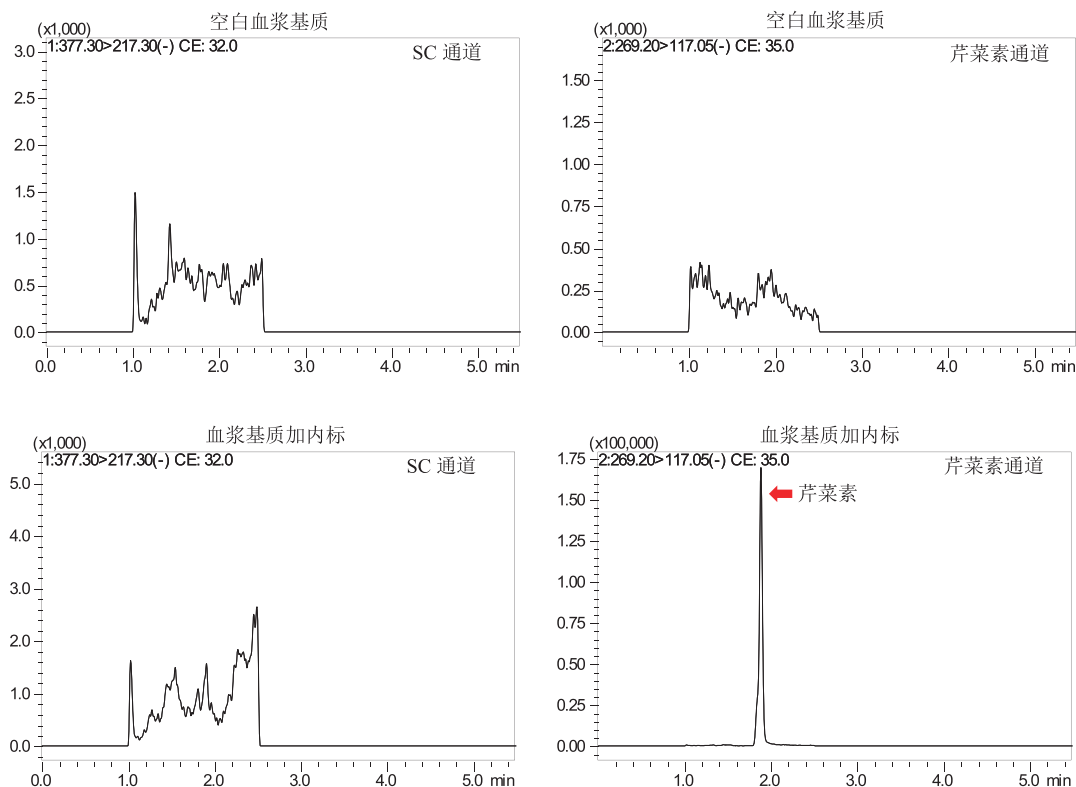
图 2 标准工作曲线

表 3 校准曲线参数

编号	名称	标准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)	相关系数 r	Q3 Pre Bias (V)
1	SC	$Y = (1965.72)X + (21.6984)$	10~600	96.4~105.9%	0.9992	25.0

2.3 特异性验证

分别考察空白替代基质、空白替代基质加内标和 10 ng/mL 替代基质加标样品，结果表明，替代基质对目标物 SC 及其内标的检测均无干扰，同时内标芹菜素亦不干扰 SC 的检测（见图 3）。



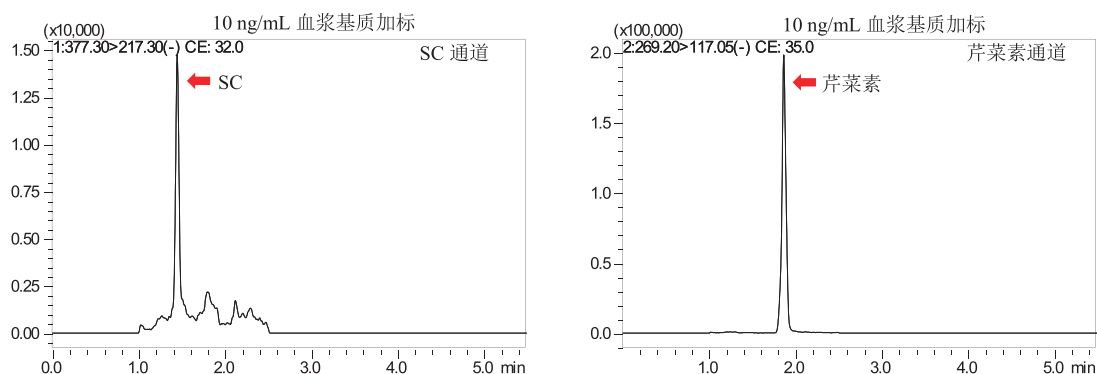


图3 特异性验证结果

2.4 精密度和准确度

用血浆基质配制定量下限、低、中、高四个浓度的样品，即 LLOQ (10 ng/mL)、LOQ (20 ng/mL)、MOQ (300 ng/mL) 和 HOQ (500 ng/mL)。连续三天对各样品分别测定 6 次，考察批内、批间的精密度和准确度，结果如表 4 所示。SC 的批内和批间精密度分别小于 7.8% 和 7.6%。

表 4 批内批间精密度和准确度结果

样品	批内 (n=6)			批间 (n=18)		
	平均实测值	CV (%)	准确度 (%)	平均实测值	CV (%)	准确度 (%)
LLOQ	9.6	6.5	86.5-101.5	10.4	6.1	86.5-116.7
LOQ	21.4	7.8	91.1-113.3	21.4	7.6	91.1-113.3
MOQ	284.5	1.5	92.7-96.4	282.3	3.2	87.6-98.8
HOQ	459.8	4.5	86.5-96.9	456.1	4.2	86.5-96.9

2.5 残留

在高浓度样品 (600 ng/mL) 后进样分析空白样品，考察 SC 及其内标芹菜素的残留情况，结果如图 4 所示。结果表明，高浓度样品进样分析后 SC 无明显残留现象，内标芹菜素残留峰面积为 4003，高浓度样品中内标峰面积为 418886，二者比值为 0.95% (小于 5%)，因此残留不会影响定量结果的准确性。

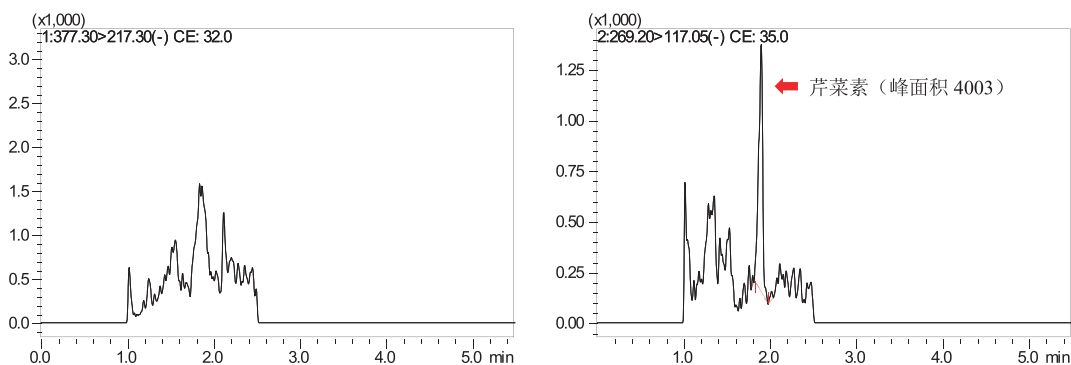


图4 残留考察

2.6 基质效应

分别考察低浓度和高浓度样品的基质效应，并通过分析物的基质因子除以内标的基质因子，计算得到经内标归一化的基质因子，结果如表 5 所示。结果表明，低浓度和高浓度样品及其内标基质因子的 CV (%) 小于 15%，且内标归一化基质因子的 CV (%) 小于 15%。

表 5 基质效应考察

项目	LOQ			HOQ		
	SC 基质因子	内标基质因子	内标归一化基质因子	SC 基质因子	内标基质因子	内标归一化基质因子
1	0.73	0.83	0.87	0.80	0.87	0.91
2	0.76	0.90	0.85	0.79	0.85	0.93
3	0.84	0.85	0.99	0.88	0.87	1.00
4	0.76	0.83	0.92	0.77	0.91	0.84
5	0.82	0.82	1.00	0.83	0.85	0.98
6	0.84	0.88	0.96	0.86	0.85	1.01
均值	0.79	0.85	0.93	0.82	0.87	0.95
CV (%)	5.6	3.5	6.2	4.6	2.7	6.1

■ 结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用，建立了大鼠血浆中药物 SC 的含量测定方法。实验结果显示，浓度为 10~600 ng/mL 范围内的标准曲线相关系数 R 为 0.9992，标线各点的准确度范围在 96.4~105.9% 之间。各浓度样品 (LOQ、MOQ 和 HOQ) 的批内精密度和批间精密度分别为 1.5-7.8% 和 3.2-7.6%，准确度范围为 86.5-113.3%。此方法快速、简单、选择性强和灵敏度高，可以为临床前 SC 的药代动力学研究提供很好的借鉴和参考。

岛津应用云

