

LC-MS/MS 检测血浆中黄连吴茱萸药对生物碱的研究^{*}

★ 孙冬梅 罗文汇 李素梅 毕晓黎 李养学 (广东省中医研究所 广州 510095)

摘要:目的:快速准确测定黄连-吴茱萸药对中生物碱的血药浓度。方法:采用高效液相色谱-质谱联用法对黄连-吴茱萸药对中盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱和吴茱萸碱的血药浓度进行测定,以甲醇-水为流动相梯度洗脱,Hypersil GOLD C18柱(50 mm×2.1 mm,3 μm)为固定相,流速为0.2 ml/min,柱温为35℃。质谱采用高温电喷雾离子源,以选择反应监测模式进行定量分析,血浆样品用乙腈直接沉淀处理。结果:盐酸小檗碱在1.243~30.578 ng/ml,盐酸巴马汀在1.240~30.541 ng/ml,盐酸药根碱在1.248~30.647 ng/ml,吴茱萸碱在28.432~553.314 ng/ml范围内均呈良好线性关系。日内、日间RSD均小于15%(n=5)。结论:本方法操作简单、灵敏度高、分析时间短,适用于黄连-吴茱萸药对生物碱血药浓度监测及药代动力学研究。

关键词:液质联用;盐酸小檗碱;盐酸巴马汀;盐酸药根碱;吴茱萸碱;血药浓度

中图分类号:R 284.1 **文献标识码:**A

LC-MS/MS Rapid Determination of the Alkaloid for Coptis-Evodia couplet medicines in Plasma

SUN Dong-mei, LUO Wen-hui, LI Su-mei, BI Xiao-li, LI Yang-xue

Guangdong Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, 510095

Abstract: Objective: To determine the content of Alkaloid for Coptis-Evodia couplet medicines in plasma by LC-MS/MS. Methods: A high performance liquid chromatography electrospray mass spectrometry method for rapid determination of Berberine hydrochloride, Palmatine hydrochloride, Jatrorrhizine hydrochloride and Evodiamine for Coptis-Evodia couplet medicines in plasma has been established. The analysis was carried on a Hypersil GOLD C18 (50 mm×2.1 mm, 3 μm) column. The column temperature was 35℃, with linear gradient elution using water and methanol, and the flow rate was 0.2 ml/min. The quantitation was done by selected reaction recording (SRM) mode of heater electrospray ionization (HESI), with phenytoin as internal standard. Plasma was deposited by acetonitrile directly. Results: The linear range were 1.243~30.578 ng/ml for Berberine hydrochloride, 1.240~30.541 ng/ml for Palmatine hydrochloride, 1.248~30.647 ng/ml for Jatrorrhizine hydrochloride and 28.432~553.314 ng/ml for Evodiamine; both intra- and inter-day RSD were less than 15% (n=5). Conclusion: The method is accurate, sensitive, simple, and suitable for study of therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic.

Key words: LC-MS/MS; Berberine hydrochloride; Palmatine hydrochloride; Jatrorrhizine hydrochloride; Evodiamine; Plasma concentration

药对是中药配伍应用的基本形式,虽组成简单,却有着严谨的配伍规律和特定的药理作用。开展中药药对配伍的物质基础和作用机理研究对探讨中药配伍规律具有重要意义,同时也为更有效地指导临床用药和中药新药研制提供科学依据。黄连与吴茱

萸配伍是中医寒热配伍药对的代表之一,亦是现代临床的常用药对之一,有着良好的临床疗效和使用范围。具有泻火、疏肝、和胃、止痛等功效,屡经历代临床应用至今不衰^[1-2]。本文建立了同时测定血浆中黄连-吴茱萸药对中四种生物碱浓度的高效液相

* 基金项目:国家自然科学基金(30873369);广东省自然科学基金(8151009501000001)

色谱-质谱联用(LC-MS/MS)方法,并进行了方法学考察。结果表明,该方法灵敏度高,准确性好,样品处理简单,适合于黄连-吴茱萸药对中生物碱的血药浓度监测及药代动力学研究。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Accela 高效液相色谱仪、TSQ Quantum Access Max 三重四极杆质谱检测器(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);TDL-5-L 台式离心机(上海安亭);HSC-12A 氮吹仪(天津 Hengao);XW-80A 旋涡混合器(上海青浦沪西);Advantage A10 超纯水处理系统(美国 Millipore 公司)。

1.2 试剂

盐酸小檗碱对照品(批号:110713-200609)、盐酸药根碱(批号:110733-200806)、盐酸巴马汀(批号:110732-200506)、吴茱萸碱(批号:110802-200606)购于中国药品生物制品检定所;甲醇、冰乙酸(MERCK 色谱纯);高纯氮气(纯度>99.999%);高纯氩气(纯度>99.999%);水为超纯水。

2 测定方法

2.1 对照品储备液的配制

用40%甲醇溶液配制含盐酸小檗碱(397.72 μg/ml)、盐酸巴马汀(396.94 μg/ml)、盐酸药根碱(399.36 μg/ml)和吴茱萸碱(395.28 μg/ml)的生物碱对照储备液,置4℃冰箱中保存,使用时用40%甲醇水溶液稀释至所需浓度。

2.2 样品的处理

密吸取血浆样品0.4 ml,加甲醇1 ml,摇匀,离心(3000 r/min,15 min),离心后倾出上清液,上清液加甲醇1 ml,摇匀,离心(3000 r/min,15 min),倾出上清液,上清液用氮吹仪吹干,残渣加40%甲醇水溶液溶解并定容于1 ml 容量瓶中,过0.45 μm 的微孔滤膜,滤液作为供试品溶液。

2.3 液相色谱-质谱条件^[3-4]

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Hypersil GOLD C18 柱(50 mm×2.1 mm,3 μm);柱温:30℃;流动相:甲醇(A)-0.01%乙酸(B)按表1中的规定进行梯度洗脱;流速0.2 ml/min;进样量:10 μl。

表1 流动相梯度表

时间/min	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0→6	20→80	80→20
6→8	80	20
8→9	80→20	20→80
9→11	20	80

2.3.2 质谱条件 高温电喷雾离子源(HESI 源);正离子选择反应监测(SRM);喷雾电压:2.8kV;喷雾温度:350℃;毛细管温度:300℃;鞘气压力:

35psi;辅助气流速:5arb;用于定量分析的离子对为336.122→320.135(26Hz)、352.163→336.181(29Hz)、338.170→307.215(39Hz)和303.114→286.965(42Hz)。

2.4 测定方法

测试样品直接注入色谱仪中,按上述液-质条件采用 inject/waste 的方式进样检测。

3 结果

3.1 方法可行性考察

空白血浆、对照品、血浆样品的三个选择反应监测的离子流色谱图见图1-3。动物体内内源性物质及其他杂质不干扰样品的分离测定。(见图1-3)

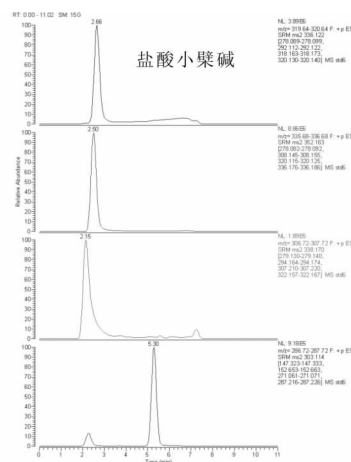


图1 对照品 HPLC-MS 色谱图

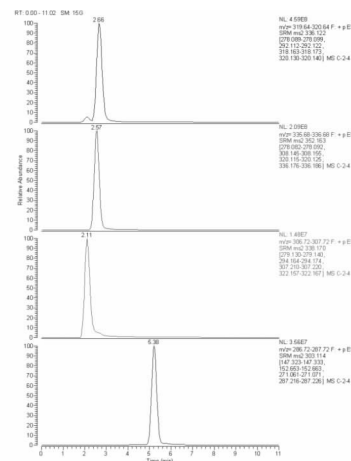


图2 血浆样品 HPLC-MS 色谱图

3.2 标准曲线的制备

用40%甲醇水溶液将对照储备液稀释成含盐酸小檗碱(1.243、4.971、9.943、15.486、22.886、30.578 ng/ml)、盐酸巴马汀(1.240、4.962、9.924、15.481、22.847、30.541 ng/ml)、盐酸药根碱(1.248、4.992、9.984、15.496、22.968、30.647 ng/ml)和吴茱萸碱(28.432、80.271、160.434、272.374、384.652、553.314 ng/ml)系列质量浓度的生物碱对照品溶

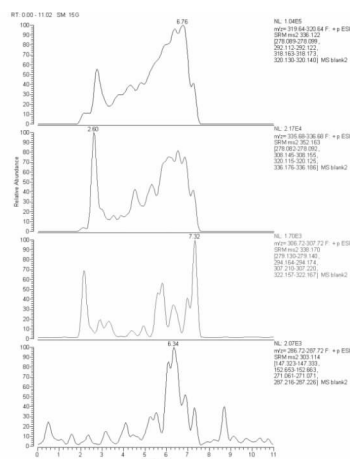


图3 空白血浆 HPLC-MS 色谱图

液,按“2.3”项下的测定条件进行分析、对待测物浓度 C 为自变量(X),峰面积 A 为因变量(Y),进行线性回归分析,得到的直线回归方程为:

盐酸小檗碱: $Y = 9.039\ 47 \times 10^5 + 2.526\ 9 \times 10^6 X$, $r = 0.999\ 4$,线性范围为 $1.243 \sim 30.578\ \text{ng/ml}$;盐酸巴马汀: $Y = 1.270\ 13 \times 10^6 + 5.222\ 99 \times 10^6 X$, $r = 0.999\ 5$,线性范围为 $1.240 \sim 30.541\ \text{ng/ml}$;盐酸药根碱: $Y = 3.009\ 34 \times 10^3 + 1.650\ 52 \times 10^5 X$, $r = 0.999\ 2$,线性范围为 $1.248 \sim 30.647\ \text{ng/ml}$;吴茱萸碱: $Y = 2.792\ 74 \times 10^4 X$, $r = 0.999\ 4$,线性范围为 $28.432 \sim 553.314\ \text{ng/ml}$ 。

3.3 回收率实验

分别精密吸取 $1\ \text{ml}$ 空白血浆,分别加入高、中、低三种不同浓度的对照品溶液 $1\ \text{ml}$,混匀,制得三种浓度的血浆样品,按血浆样品的处理与测定项下方法进行测定,由标准曲线方程计算出血浆中生物碱浓度,以测得值与加入值之比计算回收率,结果见表2。

表2 四种生物碱回收率测定结果

生物碱名称	加入对照品溶液后 血浆浓度/ $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$	实际测得的浓度 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
盐酸小檗碱	1.243	1.194	96.06	96.80	1.17
	9.943	98.10	98.10		
	30.578	29.425	96.23		
盐酸巴马汀	1.240	1.238	99.84	98.01	2.30
	9.924	9.476	95.49		
	30.541	30.143	98.70		
盐酸药根碱	1.248	1.195	95.75	97.07	1.35
	9.984	9.691	97.07		
	30.647	30.152	98.38		
吴茱萸碱	28.432	27.538	96.86	98.61	1.55
	272.374	270.355	99.26		
	553.314	551.641	99.70		

3.4 精密度试验

将生物碱对照储备液准确配制成低、中、高3个质量浓度[含盐酸小檗碱($1.243, 9.943, 30.578\ \text{ng/ml}$)、盐酸巴马汀($1.240, 9.924, 30.541\ \text{ng/ml}$)、盐酸药根碱($1.248, 9.984, 30.647\ \text{ng/ml}$)和吴茱萸碱($28.432, 272.374, 553.314\ \text{ng/ml}$)]的溶液,每个浓

度平行配制6份,按 HPLC-MS 条件进行分析,计算日内精密性,连续3天配制并测定上述浓度样品,每天随行做标准曲线,并以当日的标准曲线计算样品的浓度。将结果进行方差分析,计算日内精密性和日间精密性。低、中、高3个浓度日内精密性 RSD 分别为盐酸小檗碱:2.3%、3.2%、7.6%;盐酸巴马汀:2.6%、3.8%、6.5%;盐酸药根碱:2.5%、4.1%、8.2%;吴茱萸碱:1.7%、3.6%、6.8%。日间精密性分别为盐酸小檗碱:2.5%、3.7%、8.5%;盐酸巴马汀:2.9%、4.0%、7.1%;盐酸药根碱:2.8%、4.7%、9.1%;吴茱萸碱:2.2%、4.5%、7.4%。均 $<15\%$ 。

3.5 样品稳定性试验

用空白血浆配制3个不同质量浓度[含盐酸小檗碱($1.243, 9.943, 30.578\ \text{ng/ml}$)、盐酸巴马汀($1.240, 9.924, 30.541\ \text{ng/ml}$)、盐酸药根碱($1.248, 9.984, 30.647\ \text{ng/ml}$)和吴茱萸碱($28.432, 272.374, 553.314\ \text{ng/ml}$)]的样品,进行稳定性试验。结果表明在4℃条件下保存1周,样品中药物浓度无明显变化,稳定性良好。

3.6 质控样品

用空白血浆配制[含盐酸小檗碱($1.243, 9.943, 30.578\ \text{ng/ml}$)、盐酸巴马汀($1.240, 9.924, 30.541\ \text{ng/ml}$)、盐酸药根碱($1.248, 9.984, 30.647\ \text{ng/ml}$)和吴茱萸碱($28.432, 272.374, 553.314\ \text{ng/ml}$)]样品各3份,每份进样分析2次,在每批样品测试中作为质控样品和标准曲线进行随行测定,结果表明质控样品的实际测定结果与真实值接近。

4 讨论

黄连吴茱萸药对生物碱在血浆中的浓度低,定量分析难度较大,采用常规方法进行分析测定灵敏度均无法满足生物样品中微量药物测定的要求。本研究采用 LC-MS/MS 法进行血浆中黄连吴茱萸药对生物碱的测定,与 HPLC-UV 方法相比,本法的灵敏度高、专属性强,与已有报道的 LC-MS/MS 方法相比,本法具有预处理方法简单、分析时间短的优点,适用于药动学和生物利用度研究等生物样本的分析测定。

参考文献

- [1] 张红梅,范颖. 黄连与吴茱萸对药方的应用沿革及配伍内涵探析[J]. 陕西中医学院学报. 2010,33(6):107-108.
- [2] 杨宏博,肖小河,赵艳玲,等. 黄连、吴茱萸药对的研究进展[J]. 中国药房. 2010,21(15):1432-1434.
- [3] 邓雅婷,廖琼峰,毕开顺,等. 黄连-吴茱萸药对化学成分 HPLC-DAD-MS 分析[J]. 药学报. 2008,43(3):299-302.
- [4] 涂瑶生,刘法锦,孙冬梅,等. 黄连、吴茱萸配伍药对的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药. 2011,33(1):5-9.

(收稿日期:2012-01-07)