

UPLC-MS/QAMS 测定小鼠血浆中石斛碱及其代谢产物 M-250、M-280 的浓度^Δ

鲁艳柳*, 黄思, 刘浩, 曾瑶, 王建秋, 徐亚沙, 陆远富, 何芋岐[#](遵义医学院基础药理教育部重点实验室/特色民族药教育部国际合作联合实验室, 贵州遵义 563003)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)11-1476-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.11.09

摘要 目的:首次建立测定小鼠血浆中石斛碱及其代谢产物 M-250、M-280 浓度的方法。方法:小鼠灌胃石斛碱 60 mg/kg, 1 h 后收集血浆处理后,以盐酸伪麻黄碱为内标,以石斛碱对照品为对照,采用超高效液相色谱-质谱/一测多评法测定石斛碱及其代谢产物 M-250、M-280 的血药浓度。色谱柱为 Hypersil Gold C₁₈, 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为 0.3 mL/min,柱温为 40 ℃,进样量为 5 μL;采用可加热电喷雾离子源,全扫描/正离子模式,雾化温度为 300 ℃,离子传输管温度为 350 ℃,鞘气流速为 35 arb,辅助气流速为 15 arb,喷雾电压为 3.5 kV,碰撞电压为 30、40、50 eV,质荷比检测范围为 100~1 500。结果:小鼠血浆中内源性物质对石斛碱及其代谢产物 M-250、M-280 浓度测定无干扰;石斛碱检测质量浓度线性范围为 9.13~912.94 ng/mL($r=0.999 6$);定量下限为 3.04 ng/mL,日内、日间精密度的 RSD $\leq 7.5\%$ ($n=5$ 或 $n=3$);准确度为 96.8%~107.5%($n=5$);基质效应为 97.1%~106.0%(RSD=1.8%~4.7%, $n=5$);质控血浆样品溶液 15 ℃ 保存 24 h、-70 ℃ 保存并反复冻融 3 次以及 -70 ℃ 保存 15 d 后浓度的 RSD $\leq 12.8\%$ ($n=3$)。小鼠血浆样品中石斛碱质量浓度为(41.3 \pm 5.7) ng/mL($n=12$),以相对校正因子(RCF)按 1.0 计,代谢产物 M-250、M-280 的质量浓度分别为(493.0 \pm 73.1)、(41.4 \pm 3.0) ng/mL($n=12$)。结论:该方法灵敏、准确,可用于小鼠血浆中石斛碱及其代谢产物 M-250、M-280 的浓度测定。

关键词 石斛碱;代谢产物;M-250;M-280;小鼠;超高效液相色谱-质谱法;一测多评法

Determination of Dendrobine and Its Metabolites M-250 and M-280 in Mice Plasma by UPLC-MS/QAMS

LU Yanliu, HUANG Si, LIU Hao, ZENG Yao, WANG Jianqiu, XU Yasha, LU Yuanfu, HE Yuqi (Key Lab of Basic Pharmacology/International Joint Research Lab of Ethnomedicine, Ministry of Education, Zunyi Medical University, Guizhou Zunyi 563003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of dendrobine and its metabolites M-250 and M-280 in mice plasma for the first time. METHODS: Mice were given dendrobine 60 mg/kg by intragastric administration, 1 h later plasma were collected and treated. Using pseudoephedrine hydrochloride as internal standard and dendrobine reference substance as control, the plasma concentrations of dendrobine and its metabolites M-250 and M-280 were determined by UPLC-MS combined with quantitative analysis of multi-components by single marker. The separation was performed on Hypersil Gold C₁₈ column with 0.1% formic acid-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was set at 40 ℃, and sample size was 5 μL. Heatable electrospray ionization (HESI) source, scan/ESI⁺ were applied and operated in positive ion mode with atomization temperature of 300 ℃, ion transmission tube temperature of 350 ℃, the sheath gas velocity of 35 arb, the auxiliary air velocity of 15 arb, the spray voltage of 3.5 kV, the collision voltage of 30, 40, 50 eV. The mass-to-charge ratio of detection range were 100-1 500. RESULTS: The endogenous substances of mice plasma had no interference with the content determination of dendrobine and its metabolites M-250 and M-280. The linear range of dendrobine were 9.13-912.94 ng/mL ($r=0.999 6$). The limit of quantitation was 3.04 ng/mL. RSDs of intra-day and inter-day were all less than 7.5% ($n=5$ or $n=3$). The accuracy were 96.8%-107.5% ($n=5$). Matrix effects were 97.1%-106.0% (RSD=1.8%-4.7%, $n=5$). RSDs of the content of sample at 15 ℃ for 24 h, at -70 ℃ after three times freeze-thaw, at -70 ℃ for 15 d were lower than 12.8% ($n=3$). The content of dendrobine in plasma sample of mice was (41.3 \pm 5.7) ng/mL ($n=12$). The contents of its metabolites M-250 and M-280 were (493.0 \pm 73.1) and (41.4 \pm 3.0) ng/mL ($n=12$) with Relative correction factor of 1.0. CONCLUSIONS: The method is sensitive and accurate, and can be used for content determination of dendrobine and its metabolites M-250 and M-280 in mice plasma.

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81660685, 81560673, 81402985);贵州省科技计划课题(No.黔科合重大专项字[2015]6010);贵州省科学技术基金项目(No.黔科合J字[2015]2158号,黔科合JZ字[2015]2010号);贵州省教育厅自然科学研究项目(No.黔教合KY字[2015]373号)

* 副教授,博士。研究方向:药物代谢与毒理学。电话:0851-28642303。E-mail:yanliu.lu@foxmail.com

[#] 通信作者:教授,博士。研究方向:药物分析与系统生物学。电话:0851-28642303。E-mail:hyqJeff@hotmail.com

KEYWORDS Dendrobine; Metabolites; M-250;M-280; Mice; UPLC-MS; Quantitative analysis of multi-components with single marker

金钗石斛(*Dendrobium nobile* Lindl.)为兰科石斛属(*Dendrodium* SW.)植物,是《中国药典》明确规定的药用石斛的植物来源,又名扁金钗、扁黄草、扁草、黄草等^[1]。《神农本草经》中将其列为上品,素有“千金草”之称^[2],具有滋阴清热、益胃生津、润肺止咳、明目强身等功效^[1]。现代药理学研究表明,金钗石斛总生物碱是金钗石斛的主要活性成分,具有止痛、解热作用,可以降低心率、血压,减慢呼吸,并且缓解巴比妥引起的中毒症状^[3],还具有降血糖^[4]、抗白内障^[5]、抗肿瘤^[6]、减少细胞凋亡^[7]、抗氧化^[8]和抗老年痴呆^[9]等作用。而石斛碱(Dendrobine)是金钗石斛总生物碱中最主要的特征性成分^[11-3],开发应用前景广阔。本课题组前期鉴定出石斛碱在人肝微粒体中的主要代谢产物有M-250、M-280^[10],本文在此基础上,采用超高效液相色谱-质谱/一测多评法(UPLC-MS/QAMS),首次建立了测定小鼠血浆中石斛碱及其代谢产物M-250、M-280浓度的方法,为进一步研究石斛碱的药动学提供了实验依据。石斛碱及其代谢产物M-250、M-280的结构图见图1。

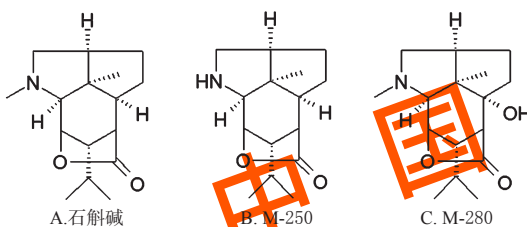


图1 石斛碱及其代谢产物M-250、M-280的结构图

Fig 1 Structures diagrams of dendrobine and its metabolites M-250 and M-280

1 材料

1.1 仪器

Thermo Scientific Q Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨MS系统和Thermo Ultramate 3000 UPLC系统(美国Thermo Fisher公司);Genius 1022液氮发生器(英国Peak公司);Milli-Q超纯水系统(美国Millipore公司);XS205电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);XW-80A漩涡混合仪(海口市其林贝尔仪器制造有限公司);Microfuge 20R高速离心机(美国Beckman Coulter有限公司)。

1.2 药品与试剂

石斛碱对照品(北京华迈科生物技术有限责任公司,批号:D990100,纯度:≥99.0%);盐酸伪麻黄碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号:171237-201208,纯度:≥99.9%);乙腈、甲醇、甲酸均为质谱纯,其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

健康SPF级C57BL/6J小鼠24只,♂,体质量18~

22 g,由重庆第三军医大实验动物中心提供,实验动物生产合格证号:SCXK(渝)2012-0005,饲养温度21~22℃,湿度56%~65%,明暗交替时间12/12 h。本实验符合遵义医学院实验动物伦理委员会的伦理学标准。

2 方法与结果

2.1 分组与给药

将小鼠随机分为空白对照组和给药组,每组12只,实验前禁食12 h,自由饮水。根据本课题组前期试验结果,给药组小鼠按60 mg/kg灌胃石斛碱[以0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液助悬],空白对照组小鼠灌胃等体积的0.5%CMC-Na溶液,1 h后,眼眶取血0.2 mL至肝素化的离心管中,1 856×g离心15 min,分离血浆待测。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取石斛碱对照品15.52 mg,置于10 mL量瓶中,加乙腈溶解至刻度,混匀,即得对照品贮备液,于4℃保存,备用。使用前以乙腈稀释,得到含石斛碱质量浓度分别为51.73、15.52、7.76、1.55、0.78、0.16 μg/mL的对照品溶液。

2.2.2 内标溶液 精密称取盐酸伪麻黄碱对照品10.01 mg,置于10 mL量瓶中,加乙腈溶解至刻度线,混匀,即得内标贮备液,于4℃保存,备用。使用前以乙腈稀释,得到含盐酸伪麻黄碱质量浓度为0.4 μg/mL的内标溶液。

2.3 标准血浆样品的制备

分别取100 μL空白血浆,加入不同质量浓度的石斛碱对照品溶液20 μL,涡旋30 s,再依次加入内标溶液20 μL和乙腈200 μL,涡旋30 s,15 493×g离心10 min,取上清液,即得含石斛碱质量浓度分别为912.94、456.47、91.29、45.65、9.13、3.04、0.91 ng/mL的标准血浆样品。其中,质量浓度为912.94、91.29、9.13 ng/mL的标准血浆样品为高、中、低质量浓度的质控血浆样品,均平行制备5份。

2.4 血浆样品的处理

取100 μL血浆样品,加入乙腈20 μL,涡旋30 s,再依次加入内标溶液20 μL和乙腈200 μL,涡旋30 s,15 493×g离心10 min,取上清液50 μL,进样分析。

2.5 色谱条件与质谱条件

2.5.1 色谱条件 色谱柱:Hypersil Gold C₁₈(150 mm×2.1 mm,1.9 μm);流动相:0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~0.5 min,5% B;0.5~15 min,5%→95% B;15~17 min,95% B);流速:0.3 mL/min;柱温:40℃;进样量:5 μL。

2.5.2 MS条件 采用可加热电喷雾离子源(HESI)的离子化方式;雾化温度:300℃;离子传输管温度:350℃;鞘气流速:35 arb;辅助气流速:15 arb;喷雾电压:3.5 kV;

碰撞电压:30、40、50 eV;质荷比(m/z)检测范围:100~1 500;扫描模式:全扫描/正离子模式;全扫描模式下分辨率:70 000 FWHM。

2.6 专属性考察

取100 μL 空白血浆,加入200 μL 乙腈,涡旋30 s,15 493 $\times g$ 离心10 min,取上清液即得空白血浆样品。取空白血浆样品、标准血浆样品和按“2.4”项下方法处理得到的血浆样品,按“2.5”项下方法进样测定。结果显示,石斛碱($[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 264.195 9)及其代谢产物M-250($[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 250.180 1)、M-280($[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 280.190 6)的保留时间分别为7.76、7.73、8.11 min,空白血浆中的内源性物质不干扰石斛碱及其代谢产物M-250、M-280的测定。石斛碱及其代谢产物M-250、M-280的选择离子图见图2。

2.7 线性关系、定量下限和检测限考察

取“2.3”项下对应样品进样测定后,采用加权($1/X^2$)最小二乘法,以石斛碱与内标的峰面积之比为纵坐标(y),石斛碱质量浓度为横坐标(x)进行回归分析,得回归方程为 $y = -10^{-5}x^2 + 0.0432x + 0.4309$ ($r = 0.9996$)。结果表明,石斛碱检测质量浓度的线性范围为9.13~912.94 ng/mL,定量下限为3.04 ng/mL,检测限为0.91 ng/mL。

2.8 基质效应考察

取“2.3”项下高、中、低质量浓度的质控血浆样品,进样测定,记录石斛碱和内标峰面积,分别记为 A_1 和 B_1 。将空白血浆换为水,同法制备高、中、低质量浓度的石斛碱+内标溶液,均平行制备5份,进样测定,记录石斛碱和内标峰面积,分别记为 A_2 和 B_2 。按 $A_1/A_2 \times 100\%$ 计算石斛碱的基质效应, $B_1/B_2 \times 100\%$ 计算内标的基质效应,结果见表1。

表1 基质效应考察结果($n=5$)

Tab 1 Results of matrix effect ($n=5$)

成分	质量浓度,ng/mL	基质效应	
		平均值,%	RSD,%
石斛碱	912.94	106.0	3.3
	91.29	98.7	1.8
	9.13	97.1	4.7
内标	23.50	104.1	2.2

2.9 精密度和准确度考察

取“2.3”项下高、中、低质量浓度的质控血浆样品,分别连续进样测定5次,计算日内精密度和准确度,连续测定3 d,计算日间精密度和准确度,结果见表2。

2.10 稳定性试验

取“2.3”项下高、中、低质量浓度的质控血浆样品,分别考察15 $^{\circ}\text{C}$ 保存24 h,-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存并反复冻融3次,以及-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存15 d后样品的稳定性,结果见表3。

2.11 血浆样品中石斛碱的浓度

按“2.4”项下方法处理给药组小鼠的血浆样品,按

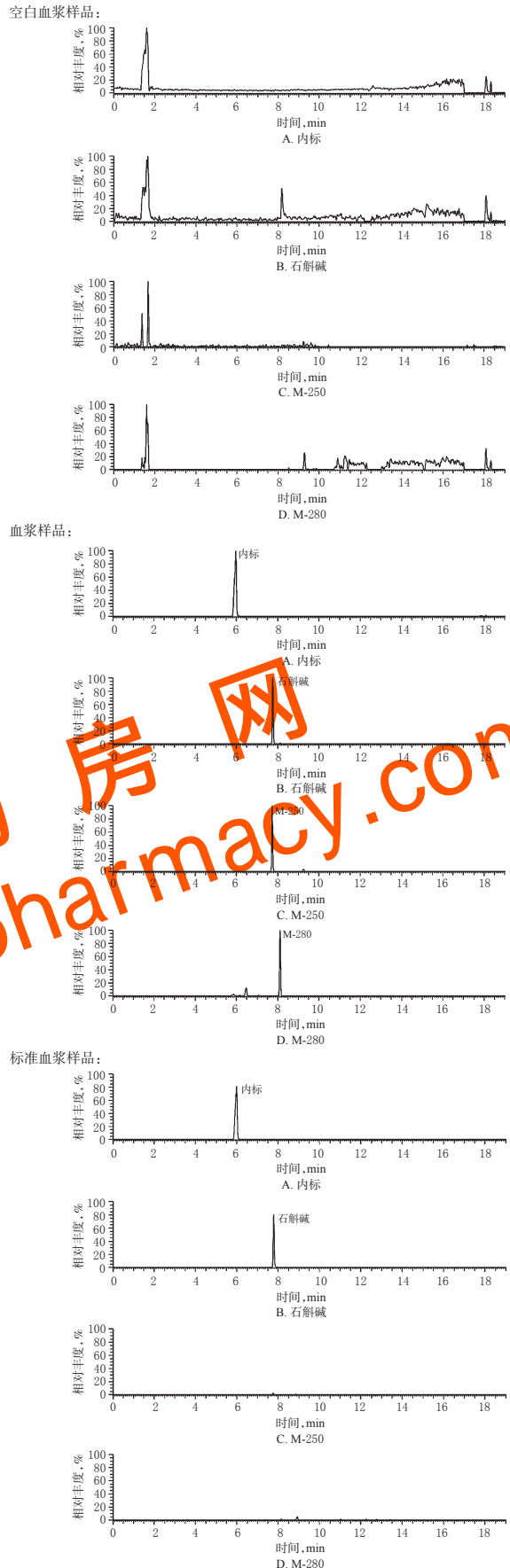


图2 石斛碱及其代谢产物M-250、M-280的选择离子图
Fig 2 Selected ion chromatogram of dendrobine and its metabolites M-250 and M-280

“2.5”项下方法进样测定,计算血浆样品中石斛碱的质量浓度为(41.3±5.7) ng/mL($n=12$)。

表2 精密度和准确度考察结果

Tab 2 Results of precision and accuracy tests

项目	质量浓度, ng/mL	测定值($\bar{x} \pm s$), ng/mL	精密度RSD, %	准确度, %
日内($n=5$)	912.94	981.7±70.9	7.2	107.5
	91.29	97.3±4.4	4.5	106.5
	9.13	8.8±0.3	2.8	96.8
日间($n=3$)	912.94	975.3±62.8	6.4	106.8
	91.29	91.5±6.5	7.1	100.2
	9.13	9.3±0.7	7.5	101.9

表3 稳定性考察结果($n=3$)

Tab 3 Results of stability tests($n=3$)

保存条件	质量浓度, ng/mL	测定值($\bar{x} \pm s$), ng/mL	RSD, %
15℃保存24h	912.94	981.1±66.3	6.8
	91.29	97.2±5.1	5.2
	9.13	8.7±0.4	4.6
-70℃保存并反复冻融3次	912.94	907.5±61.0	6.7
	91.29	89.4±7.2	8.1
	9.13	8.6±1.1	12.8
-70℃保存15d	912.94	922.3±57.9	6.3
	91.29	99.5±6.7	6.7
	9.13	8.9±0.7	7.9

2.12 一测多评法计算血浆样品中石斛碱代谢产物M-250、M-280的浓度

按一测多评法,取“2.11”项下给药组小鼠的血浆样品,以石斛碱对照品为对照,按“2.5”项下条件进样测定,按 $W_k = f_{sk} \times [(W_s \times A_k) / A_s]$ 计算其代谢产物M-250、M-280的浓度。式中, W_k 为待测物质量浓度; f_{sk} 为相对校正因子,此处为1.0; W_s 为石斛碱对照品质量浓度; A_s 为石斛碱对照品峰面积; A_k 为待测物峰面积。结果显示,血浆样品中石斛碱代谢产物M-250、M-280的质量浓度分别为(493.0±73.1)、(41.4±3.0) ng/mL($n=12$)。

3 讨论

在本课题组前期研究中,通过精确相对分子质量和二级碎片离子信息,鉴定了石斛碱在人肝微粒体中I相代谢的4个主要代谢产物M-250、M-262、M-280和M-296,以及II相代谢的1个主要代谢产物M-440^[10]。本文检测了小鼠灌胃石斛碱后,血浆中石斛碱及其主要代谢产物M-250、M-280的浓度。但获得石斛碱代谢产物的标准品,以及对其进行准确定量还存在比较大的困难。因此,本研究借鉴了天然药物质量评价中的一测多评法,以其进行两种主要代谢产物M-250、M-280的定量研究。

一测多评法对于对照品难以得到的多指标测定有其特殊的优势^[11],目前在天然药物及其制剂的质量评价中应用已较成熟,如《美国药典》34版中有25个天然药物及制剂、《欧洲药典》7.0版中有9个天然药物、2015年版《中国药典》(一部)中黄连及银杏叶提取物等的质量评价均采用该方法^[12]。在多指标检测中,以某一组分的

对照品为对照,建立与其他待测组分之间的 f_{sk} (即RCF),计算其他组分的含量,公式为: $f_{sk} = (W_k \times A_s) / (W_s \times A_k)$ 。式中, W_k 为待测物质量浓度; A_s 为对照品峰面积; W_s 为对照品质量浓度; A_k 为待测物峰面积。

结构类型相同的化合物,RCF的值往往接近1,如2015年版《中国药典》(一部)中黄连药材各生物碱的RCF值均为1.0,可直接以盐酸小檗碱对照品的峰面积为对照,分别计算小檗碱、表小檗碱、黄连碱和巴马汀的含量。考虑到石斛碱代谢产物M-250、M-280的结构与石斛碱十分相似,如图1,故暂定这两个代谢产物的RCF值均为1.0,并以峰面积相当的石斛碱对照品质量浓度进行计算。但上述推测还需要进一步的试验证实。

综上所述,本研究建立了一种灵敏、准确,可用于小鼠血浆中石斛碱及其代谢产物M-250、M-280的浓度测定的方法,为研究石斛碱的药动学奠定了基础。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社,2015:92.
- [2] 马继兴. 神农本草经辑注[S]. 北京:人民卫生出版社,1995:37.
- [3] 王亚芸, 任建武. 石斛碱的研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2015, 46(1): 152-158.
- [4] 陶凤, 金麟, 杨贵忠, 等. 金钗石斛水提物对糖尿病大鼠肾组织非酶糖基化及氧化的影响[J]. 山东大学学报(医学版), 2012, 50(10): 11-15, 22.
- [5] 白金丽, 温淑香. 金钗石斛提取物抗白内障的体外实验研究[J]. 云南中医中药杂志, 2009, 30(9): 57-59.
- [6] 刘名昆, 李国庆. 石斛提取物抗肿瘤作用研究进展[J]. 现代医药卫生, 2015, 31(23): 3571-3574.
- [7] YANG S, GONG QH, WU Q, et al. Alkaloids enriched extract from *Dendrobium nobile* Lindl. attenuates tau protein hyperphosphorylation and apoptosis induced by lipopolysaccharide in rat brain[J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(5): 712-716.
- [8] 宾捷, 胡余明, 尹进, 等. 金钗石斛对老龄小鼠抗氧化作用的实验研究[J]. 实用预防医学, 2010, 17(6): 1063-1064.
- [9] 姚寅. 金钗石斛生物碱对老年痴呆症的保护作用和机制的研究进展[J]. 医药前沿, 2013, 2(4): 47-48.
- [10] 鲁艳柳, 黄思, 汪敏, 等. UPLC/LTQ-Orbitrap-MS技术鉴定石斛碱在人肝微粒体中的代谢产物[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(4): 32-37.
- [11] 左岚, 孟胜男. 一测多评法在中药药物分析中的应用进展[J]. 中国药房, 2016, 27(18): 2589-2592.
- [12] 王欣, 覃瑶, 王德江, 等. 一测多评法在中药质量控制中的应用进展[J]. 中成药, 2016, 38(2): 395-402.

(收稿日期:2017-12-28 修回日期:2018-04-02)

(编辑:邹丽娟)