

LC-MS/MS 同时测定大鼠血浆中 4 种黄连生物碱的含量

陈健龙^{1,2}, 张玉玲^{1,2}, 董宇², 蔡广知¹, 王虎³, 贡济宇^{1*}, 崔翰明^{2*}

(1. 长春中医药大学, 长春 130117; 2. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053;
3. 广州中一药业有限公司, 广州 510140)

[摘要] 目的: 建立 LC-MS/MS 同时测定大鼠血浆中黄连碱、药根碱、巴马汀和小檗碱含量的方法。方法: 采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 流动相乙腈-水 (含 2 mmol/L 乙酸铵和 0.05% 甲酸), 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 以土的宁为内标, 血浆样品用 4 倍量乙腈萃取并沉淀蛋白, 用电喷雾离子化 (ESI) 和正离子多离子反应监测 (MRM) 模式检测, 选择离子对为药根碱 m/z 338.227 → m/z 322.824; 黄连碱 m/z 320.244 → m/z 291.996; 巴马汀: m/z 352.243 → m/z 308.016; 小檗碱: m/z 336.227 → m/z 277.981; 土的宁: m/z 335.264 → m/z 184.017。结果: 药根碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱的线性范围分别为 1.01 ~ 505, 1.06 ~ 530, 1.13 ~ 565, 1.07 ~ 535 μg·L⁻¹; 定量下限分别为 0.539 2, 0.646 3, 0.761 5, 0.197 1 μg·L⁻¹; 平均回收率分别为 103.90%, 101.50%, 101.58%, 115.54%; 日内和日间精密度、稳定性的 RSD 均 < 10%。结论: 建立的方法准确、灵敏、特异、简便, 适用于大鼠血浆中黄连碱、药根碱、巴马汀和小檗碱的同时测定及药动学研究。

[关键词] LC-MS/MS; 药根碱; 黄连碱; 巴马汀; 小檗碱; 血浆浓度

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0174-05

[doi] 10.11653/syfy2013130174

Simultaneous Determination of Four Kinds of Alkaloid from Rhizoma Coptidis in Rat Plasma by LC-MS/MS

CHEN Jian-long^{1,2}, ZHANG Yu-ling^{1,2}, DONG Yu², CAI Guang-zhi¹,
WANG Hu³, GONG Ji-yu^{1*}, CUI Han-ming^{2*}

(1. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China;

3. Guangzhou Zhongyi Pharmaceutical Co. Ltd, Guangzhou 510140, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a LC-MS/MS method for simultaneous determination of jatrorrhizine, coptisine, palmatine and berberine in rat plasma. **Method:** Taking ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) with mobile phase of acetonitrile-water (2 mmol/L ammonium acetate and 0.05% formic acid), flow rate was 0.3 mL·min⁻¹, column temperature was 30 °C. Strychnine was adopted as the internal standard, plasma samples were pretreated by protein precipitation with 4 times the amount of acetonitrile, electrospray ionization (ESI) was applied and operated in positive ionmode, quantification was performed by multiple reaction monitoring (MRM) of jatrorrhizine m/z 338.227 → m/z 322.824, coptisine m/z 320.244 → m/z 291.996, palmatine m/z 352.243 → m/z 308.016, berberine m/z 336.227 → m/z 277.981 and the internal standard m/z 335.264 → m/z 184.017, respectively. **Result:** Calibration curve of jatrorrhizine, coptisine, palmatine and berberine in plasma were linear in the range of 1.01-505, 1.06-530, 1.13-565, 1.07-535 μg·

[收稿日期] 20130205(002)

[基金项目] 国家重大新药创制专项(2009ZX09103-312;2011ZX09102-011-08)

[第一作者] 陈健龙, 硕士, 从事中药药物分析和药物代谢研究, Tel:13596446180, E-mail:418295735@qq.com

[通讯作者] * 贡济宇, 教授, 从事中药药物分析研究, Tel:0431-86172207, E-mail: gjy0431@126.com; * 崔翰明, 副研究员, 从事中药药效物质、质量分析和新制剂研究, Tel:010-88001470, E-mail: cui-yaoshi@163.com

L^{-1} ; Lower limit of quantitation were 0.539 2, 0.646 3, 0.761 5 and 0.197 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively; Average recoveries were in order of 103.90%, 101.50%, 101.58% and 115.54%, respectively. RSD of intra-and inter-day, stability were less than 10%. **Conclusion:** This assay method was accurate, sensitive, specific and suitable for simultaneous determination and pharmacokinetic study of jatrorrhizine, coptisine, palmatine and berberine in rat plasma.

[Key words] LC-MS/MS; jatrorrhizine; coptisine; palmatine; berberine; plasma concentration

黄连具有清热燥湿、泻火解毒等功效^[1],主要用于治疗慢性腹泻、呼吸道感染、急性胃肠炎等症。药理研究表明,黄连具有抗肿瘤、抗心率失常、降血糖等作用^[2],主要有效成分为原小檗碱型生物碱,如小檗碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀和药根碱等。目前,小檗碱血浆药物浓度的测定多采用 HPLC 和液质联用法^[3-5],但血浆中4种生物碱同时测定的报道罕见。本实验旨在建立灵敏、快速、准确、简便的液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)同时测定4种生物碱在大鼠血浆中浓度,为黄连中原小檗碱型生物碱的药代动力学研究提供参考。

1 材料

Waters XEVO 型三重四级杆液质联用仪和 Masslynx V4.1 型化学工作站(美国 Waters 公司), ME 215P 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司), RS-1 型涡旋混合器(北京吴诺斯科技有限公司), HGC-24A 型氮气吹干仪和 BCNG-5LA 型氮气发生器(杭州宾锐科技有限公司), CT15RE HITACHI 型冷冻离心机(日本日立公司)。

盐酸药根碱、盐酸小檗碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 115851, 110713-200609),盐酸黄连碱对照品[阿拉丁试剂(上海)有限公司,批号 1125876,纯度 >98%],盐酸巴马汀对照品(Sigma 公司,批号 361615,纯度 >98%),土的宁(中国食品药品检定研究院,批号 8501,纯度 >98%),乙腈、甲酸和乙酸铵为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 对照品溶液的配制 精密称取药根碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱对照品适量,置于 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,得质量浓度依次为 10.1, 10.6, 11.3, 10.7 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品储备液,备用。

2.2 内标溶液的制备 精密称取土的宁适量,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,得 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 储备液,用甲醇稀释成 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的内标工作液。

2.3 色谱与质谱方法

2.3.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱

(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 流动相乙腈-水(含 2 mmol/L 乙酸铵和 0.05% 甲酸)(28:72), 流速 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 5 μL 。

2.3.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI), 进行正离子扫描, 检测方式为正离子多离子反应监测(MRM), 毛细管电压 3.2 kV, 去溶剂气温度 500 $^{\circ}\text{C}$, 去溶剂气流量 850 $\text{L}\cdot\text{Hr}^{-1}$ 。①药根碱 m/z 338.227 → m/z 322.824, 锥孔电压 22 V, 碰撞电压 22 V; ②黄连碱 m/z 320.244 → m/z 291.996, 锥孔电压 48 V, 碰撞电压 30 V; ③巴马汀: m/z 352.243 → m/z 308.016, 锥孔电压 46 V, 碰撞电压 28 V; ④小檗碱: m/z 336.227 → m/z 277.981, 锥孔电压 32 V, 碰撞电压 40 V; ⑤土的宁: m/z 335.264 → m/z 184.017, 锥孔电压 56 V, 碰撞电压 34 V。

2.4 血浆样品的预处理 取血浆样品 0.1 mL, 加入乙腈 0.4 mL, 加内标液(1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 10 μL , 旋涡振荡 2 min, 离心(13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 15 min, 吸取上清液转移至离心管中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中 N_2 吹干。残留物用乙腈-水(1:1) 100 μL 充分溶解, 离心(13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 10 min, 吸取上清液 5 μL 进样, 进行 LC-MS/MS 分析。

2.5 特异性试验 在选定的检测条件下, 药根碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱和土的宁生成的基峰离子为其离子 M^+ , 将其基峰离子作为母离子进行子离子扫描分析, 得到子离子扫描图(图 1)。

药根碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱和内标的保留时间分别为 1.73, 1.83, 2.77, 3.04, 0.64 min, 血浆中内源性物质不干扰样品的测定, 空白血浆、空白血浆加 4 种生物碱及内标的色谱图见图 2。

2.6 标准曲线和定量下限 精密吸取 4 种生物碱混合对照品溶液, 加入空白血浆配制系列标准血样, 其中黄连碱终质量浓度为 1.06, 10.6, 53, 106, 212, 530 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 药根碱终质量浓度为 1.01, 10.1, 50.5, 101, 202, 505 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 巴马汀终质量浓度为 1.13, 11.3, 56.5, 113, 226, 565 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 小檗碱终质量浓度为 1.07, 10.7, 53.5, 107, 214, 535 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。按 2.4 项下方法处理, 按 2.3.1 项下分析条件测定, 以

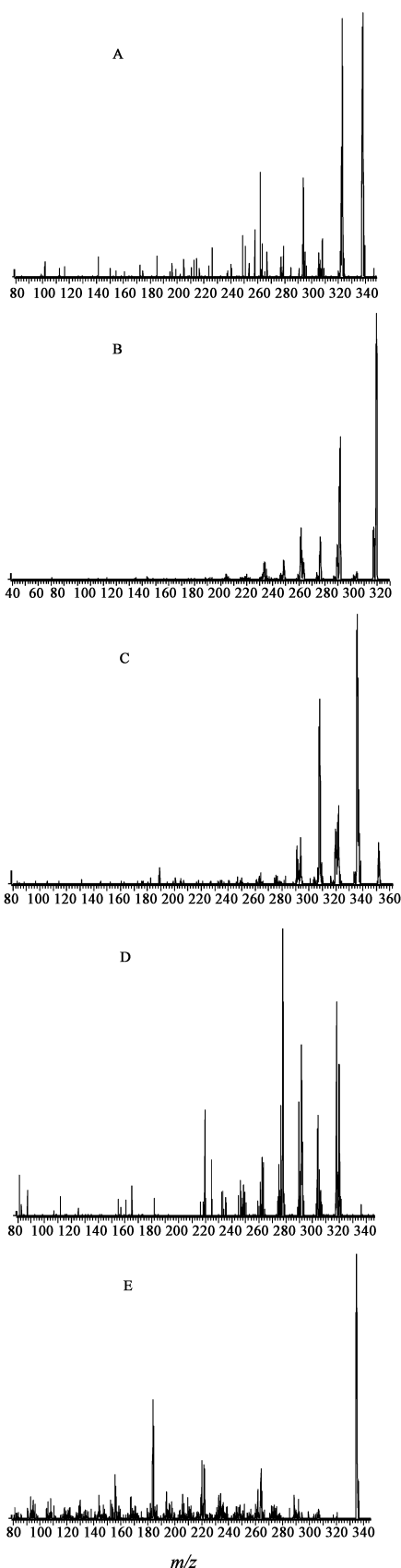


图 1 药根碱(A)、黄连碱(B)、巴马汀(C)、小檗碱(D)和内标(E)的子离子扫描

待测物峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标,血药浓度为横坐标,作加权线性回归,结果见表 1,四者的定量下限(LLOQ, $S/N = 10$)分别为 0.539 2, 0.646 3, 0.761 5, 0.1971 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 1 4 种生物碱的线性方程、相关系数和线性范围

生物碱	线性方程	R^2	线性范围 $/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
药根碱	$Y = 0.008\ 1X + 0.000\ 011\ 24$	0.999 1	1.01 ~ 505
黄连碱	$Y = 0.008\ 4X + 0.020\ 8$	0.998 9	1.06 ~ 530
巴马汀	$Y = 0.011\ 4X + 0.025\ 0$	0.998 4	1.13 ~ 565
小檗碱	$Y = 0.011\ 3X + 0.160\ 6$	0.998 4	1.07 ~ 535

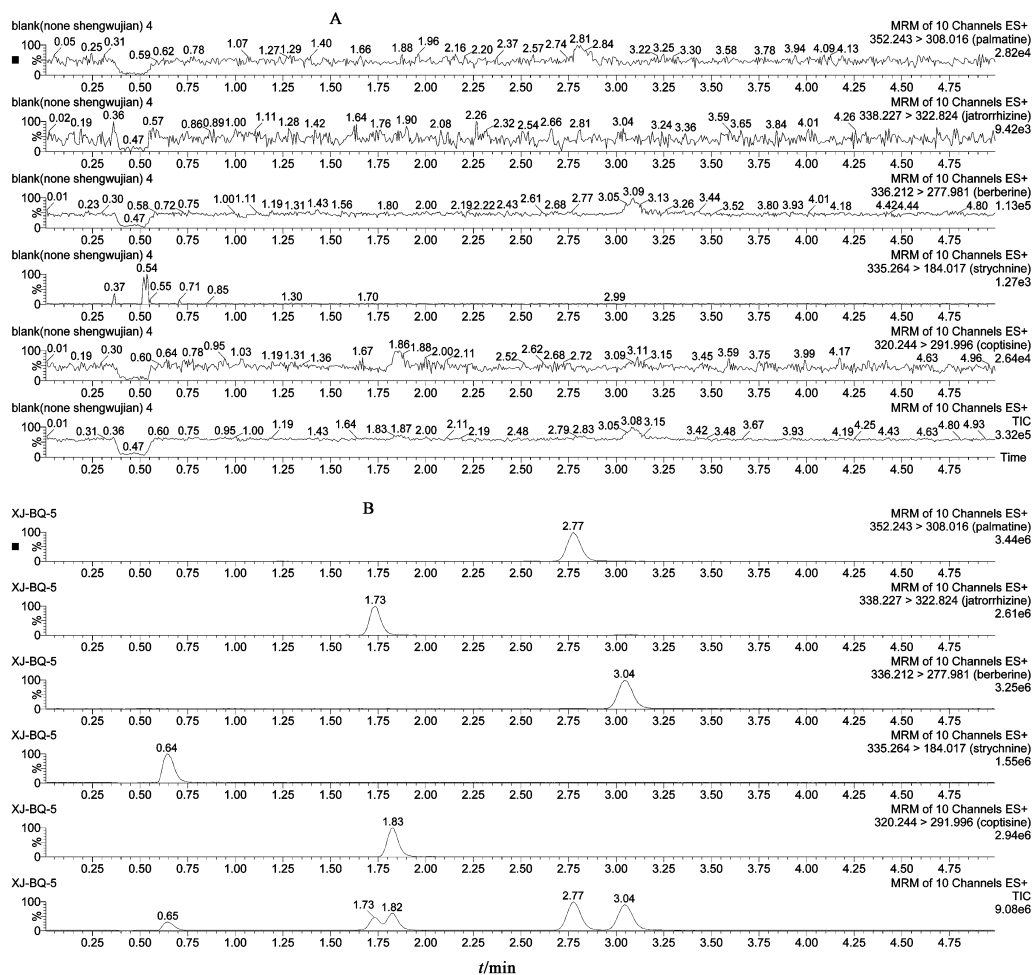
2.7 精密度试验 精密吸取 4 种生物碱混合对照品溶液,加入空白血浆配制高($500\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、中($100\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、低($10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)质量浓度的标准血样,按 2.4 项下方法处理,按 2.3.1 项下分析条件测定,结果盐酸药根碱日内精密度的 RSD 分别为 0.49% ,1.51% ,5.31% ;盐酸黄连碱的 RSD 分别为 0.67% ,1.59% ,3.20% ;盐酸巴马汀的 RSD 分别为 0.70% ,1.40% ,5.57% ;盐酸小檗碱的 RSD 分别为 1.05% ,1.57% ,1.93% 。盐酸药根碱日间精密度的 RSD 分别为 6.17% ,3.66% ,1.15% ;盐酸黄连碱的 RSD 分别为 7.28% ,1.83% ,1.85% ;盐酸巴马汀的 RSD 分别为 4.44% ,3.51% ,1.52% ;盐酸小檗碱的 RSD 分别为 5.39% ,4.42% ,2.95% 。

2.8 稳定性试验

2.8.1 样品稳定性 精密吸取 4 种生物碱混合对照品溶液,加入空白血浆,按 2.4 项下方法处理,血样于 $4\ ^\circ\text{C}$ 分别放置 0,1,2,4,24 h 时,按 2.3.1 项下分析条件测定,结果盐酸药根碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱含量的 RSD 分别为 2.58% ,2.19% ,2.72% ,2.48% ,表明大鼠血浆样品在 24 h 内基本稳定。

2.8.2 冻融稳定性 精密吸取 4 种生物碱混合对照品溶液,加入空白血浆,按 2.4 项下方法处理,反复冻融 3 次,按 2.3.1 项下分析条件测定,结果盐酸药根碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱质量浓度的 RSD 分别为 3.26% ,0.69% ,3.52% ,3.28% ,表明大鼠血浆样品反复冻融 3 次基本稳定。

2.9 基质效应 将大鼠空白血浆按 2.4 项下方法处理,加入 4 种生物碱混合对照品溶液,另将 4 种生物碱混合对照品溶液用乙腈-水(1:1)稀释至相同质量浓度的混合对照品溶液,分别按 2.3.1 项下分析条件测定,计算前者质量浓度与后者质量浓度的比



A. 空白血浆; B. 空白血浆加4种生物碱和内标(自上至下分别为巴马汀、药根碱、小檗碱、土的宁、黄连碱)

图2 血浆中4种黄连生物碱的LC-MS/MS测定

值,盐酸药根碱 97.898%,盐酸黄连碱 91.314%,盐酸巴马汀 96.852%,盐酸小檗碱 99.539%。

2.10 回收率 精密吸取4种生物碱混合对照品溶液,加入空白血浆,涡旋混匀,按2.4项下方法处理,按2.3.1项下分析条件测定,计算药根碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱的回收率分别为(103.90 ± 7.222)%, (101.50 ± 10.092)%, (101.58 ± 6.688)%, (115.54 ± 5.124)%。

3 讨论

血浆的处理曾尝试采用SPEC₁₈固相萃取、甲醇沉淀蛋白、乙腈沉淀蛋白3种方法,通过比较,后者效果较好,分析方法专属性好,回收率比其他2种方法高,符合方法学要求,且简便易行,与HPLC和HPLC-MS方法^[6-7]相比,本法的灵敏度高、专属性强,需用血浆量少,可同时定量测定4种生物碱,样品在<3.1 min全部出峰,分析时间仅需5 min,可为黄连生物碱的药动力学研究提供可靠又便捷的检测手段。

尽管黄连生物碱具有广泛的药理活性,临床应

用时间较长,但迄今为止,其多种生物碱的体内药代动力学和代谢转化方面的研究依然有限。小檗碱属季铵型生物碱,分子极性较大,其体内口服吸收较差,口服给药后血药浓度极低^[8-10],常规LC难以准确测定,限制了其在生物体内的药代和药理学研究。本实验建立的LC-MS/MS同时测定血浆中黄连4种生物碱含量的方法,为进一步阐明黄连生物碱在体内的作用机制和药代学研究提供参考。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 285.
 [2] 赵保胜, 刘永刚, 王秀丽. 黄连解毒汤解热、抗炎作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(11): 55.
 [3] Lu T, Liang Y, Song J, et al. Simultaneous determination of berberine and palmatine in rat plasma by HPLC-ESI-MS after oral administration of traditional Chinese medicinal preparation Huang-Lian-Jie-Du decoction and the pharmacokinetic application of the method [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 40(5): 1218.

复方脑忆源片主要成分淫羊藿苷 在 Caco-2 细胞模型上的转运研究

周改莲¹, 单桂芝², 林励^{3*}, 王莲婧³

(1. 广西中医药大学药学院, 南宁 530001; 2. 河南省水利水电学校, 河南周口 466001;
3. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 对复方脑忆源片中主要成分淫羊藿苷进行转运研究, 阐明吸收特点。方法: 利用 Caco-2 细胞模型, 对复方脑忆源片中主要成分淫羊藿苷(ICA)进行体外转运, 并通过高效液相(Luna Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相乙腈: 水(30:70); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 270 nm;)测定单体、药材及复方中的淫羊藿苷转运后的含量。结果: 淫羊藿苷在小肠吸收转运过程随时间增长而增加, 可能会被 Caco-2 细胞中的 P-gp 转运蛋白外排。与淫羊藿单体和淫羊藿提取物中的淫羊藿苷比较, 脑忆源片可显著提高淫羊藿苷的转运, 同时可降低淫羊藿苷的外排作用。结论: 在脑忆源片中, 由于淫羊藿苷外排减少, 可认为通过复方配伍后, 方中的其他药物抑制了淫羊藿苷的外排, 使其可以更好的发挥药理作用。

[关键词] 脑忆源片; Caco-2 细胞模型; 转运; 淫羊藿苷

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0178-04

[doi] 10.11653/syfy2013130178

Membrane Transport of the Icariin, which is Main Component of Naoyiyuan Tables Across the Caco-2 Monolayer

ZHOU Gai-lian¹, SHAN Gui-zhi², LIN Li^{3*}, WANG Lian-jing³

(1. Faculty of Pharmacy, Guangxi Traditional Chinese Medical (TCM) University, Nanning 530001, China;
2. Henan Water Conservancy and Hydroelectric Power School, Zhoukou 466001, China;
3. College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China)

[收稿日期] 20121017(009)

[基金项目] 海南省重点科技计划项目(090603)

[第一作者] 周改莲, 副教授, 从事中药炮制与新药研究工作, Tel:13877103164, E-mail:zhgllhw@126.com

[通讯作者] * 林励, 研究员, 从事资源开发与新药研究工作, Tel:020-39358270, E-mail:LL766@126.com

- [4] Deng Y T, Liao Q F, Li S H, et al. Simultaneous determination of berberine, palmatine and jatrorrhizine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in rat plasma and its application in a pharmacokinetic study after oral administration of coptis-evodia herb couple [J]. J Chromatogr B, 2008, 863(2): 195.
- [5] 鲍天冬, 李玉洁, 杨庆, 等. LC/MS 测定大鼠灌胃黄连提取物后血浆中小檗碱、巴马汀及其药物动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 186.
- [6] 李艺, 蒋建东. LC-MS/MS 方法快速检测血浆中小檗碱的浓度[J]. 化学通报, 2010, 73(8): 757.
- [7] 盛美萍, 孙淇, 王宏. 盐酸小檗碱在 Beagle 狗静脉注射和口服药理学研究[J]. 中国药理学通报, 1993, 9(1): 64.
- [8] 李宝馨, 杨宝峰, 郝晓敏, 等. 黄连素单用及合用谷维素在家兔及健康者体内的药代动力学研究[J]. 中国药理学杂志, 2000, 35(1): 33.
- [9] Zuo F, Nakamura N, Akao T, et al. Pharmacokinetics of berberine and its main metabolites in conventional and pseudogerm-free rats determined by liquid chromatography ion trap mass spectrometry [J]. Drug Metab Dispos, 2006, 34(12): 2064.
- [10] 孙冬梅, 黄雪君, 罗文汇. 黄连与吴茱萸不同配比中黄连主要生物碱在家兔体内药动学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 170.

[责任编辑 全燕]