

LC-MSMS法测定针刺穴位给药大鼠血清中氯贝胆碱的浓度

彭娟¹, 王玉敏¹, 逯波¹, 高俊虹², 喻晓春¹, 范斌^{1*}

(1. 中国中医科学院医学实验中心 北京 100700 2 中国中医科学院针灸研究所, 北京 100700)

摘要 目的: 建立能够灵敏、特异、准确、可靠的测定血清中氯贝胆碱浓度的分析方法。用于针刺穴位药物增效机理的研究。方法: 优化氯贝胆碱及内标氘代乙酰胆碱离子化及断裂方式, 确定相关液相色谱条件; 开展方法学考察, 以验证新建分析方法的准确性、精密度等, 在此基础上将该方法用于分析大鼠给药后所得的实际血清样品, 以验证新建分析方法的适用性。同时测定了大鼠穴位给药及静脉给药后血清样品中氯贝胆碱的浓度。结果: ESI(+) 为氯贝胆碱提供最佳的离子化条件, 采用 MRM 工作模式, 用 m/z 161.0⁺ 101.9 来检测氯贝胆碱, 同时, 以氘代乙酰胆碱 - d_9 m/z 155⁺ 87 为内标化合物。氯贝胆碱及氘代乙酰胆碱 - d_9 色谱保留时间分别为 5.4 min 和 5.0 min, 氯贝胆碱在 50~300 ng·mL⁻¹ 范围内线性良好, 回归方程为 $Y = 0.00239X + 0.0266$, $r = 0.9944$, 检测限为 0.0025 ng·mL⁻¹。高、中、低浓度的绝对回收率为 96.4% ~ 102.1%, 方法回收率为 100.6% ~ 108.9%。日内精密度 ($n = 6$) 为 2.6% ~ 5.7%, 日间精密度 ($n = 3$) 为 4.1% ~ 8.4%。结论: 应用 LC-MS/MS 技术建立测定血清中氯贝胆碱的新方法灵敏可靠, 为针药联合干预后血药浓度的比较研究以及针药联合干预后靶器官药物浓度的检测等研究工作打下了重要的分析方法学基础。

关键词: 氯贝胆碱; 高效液相色谱串联质谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2009-12-2010-04)

HPLC-MSMS determination of bethanechol chloride in serum of rats

PENG Juan¹, WANG Yu-min¹, LU Bo¹, GAO Jun-hong², YU Xiao-chun¹, FAN Bin^{1*}

(1. Experimental Research Center China Academy of China Medical Sciences Beijing 100700 China

2. Institute of Acupuncture and Moxibustion China Academy of China Medical Sciences Beijing 100700 China

Abstract Objective To develop a sensitive and reliable method for determination of bethanechol chloride in serum of rats. **Methods** The optimal ionization and fragmentation conditions as well as liquid chromatographic ones to detect bethanechol chloride were developed and validated. The newly-developed analytical method was further applied in determination of bethanechol chloride in blood serum after administration of bethanechol chloride. **Results** The detection was performed by MRM mode via electrospray ionization (ESI) source operating in the positive ionization mode. The precursor-to-product ion transitions of the analyte bethanechol chloride is m/z 161.0⁺ 101.9 with internal standard (IS) acetylcholine- d_9 m/z 155⁺ 87. The method was linear over the concentration range of 50~300 ng·mL⁻¹ ($r = 0.9944$). The limit of quantification was 0.0025 ng·mL⁻¹. The absolute recovery was 96.4% ~ 102.1%, the recovery of the method was 100.6% ~ 108.9%. The intra- and inter-day precision values were 2.6% ~ 5.7% ($n = 6$) and 4.1% ~ 8.4% ($n = 3$), respectively. **Conclusion** The fully validated LC-MS/MS method has been successfully applied to determination of bethanechol chloride in serum of rats.

Key words bethanechol chloride; internal standard (acetylcholine- d_9); HPLC-MSMS

穴位注射等针药结合的治疗方法多年来在临床上应用相当广泛, 针药结合与常规肌肉注射药物比较, 具有用药量小、作用快、作用强等特点。体现了针刺对药物的增效作用 (而增效即蕴含了减毒)。

是一种非常值得提倡的方法。由于针刺有改善胃肠功能的作用, 采用针刺加用药或针刺后穴位注射药物的方法, 就有可能产生协同作用, 即针刺有可能对药物产生增效减毒的作用, 从而取得比单独用药或

* 通讯作者 Tel: 13001120660 E-mail: bin@263.net

针刺更好的临床疗效,并减少药物副作用的产生。

氯贝胆碱为拟胆碱药, Jankovic SM 等对氯贝胆碱进行了药效-时间研究,且离体实验表明该药能引起胃底强直性收缩^[1,2]。尚未见氯贝胆碱含量质谱测定方法的报道。

氯贝胆碱为季铵盐类化合物,作者建立了特异、灵敏、快速的液质联用分析方法,为全面展开针刺穴位给药后氯贝胆碱体内分析研究奠定基础,也为季铵盐类化合物的定量分析提供了较新颖的思路。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂 氯贝胆碱对照品 [bethanechol chloride, 纯度 > 99% (TLC)], 购于 Sigma 公司。溴化氘代乙酰胆碱- d_9 对照品 (acetylcholine- d_9 bromide, 氘代率为 99.7%, 购于 CDN 公司。乙腈 (农残级)、甲酸铵 (色谱纯)、甲酸 (色谱纯) 均购于北京迪科马科技有限公司,超纯水为自制。氯化钠注射液,双鹤药业。

1.2 仪器 Agilent 6410 QQQ LC-MS 分析系统,由美国 Agilent RR LC 液相色谱仪及 Agilent 6410 QQQ 三重四级杆质谱检测器组成,工作站为 Masshunter 赛多利斯 arium 61316/611 VF 超纯水处理器、赛多利斯 BT25S 分析天平、Anke TGL-16G 离心机,上海安亭科学仪器厂。

1.3 动物 SD 大鼠,雄性,由中国医学科学院实验动物中心提供,许可证编号 SCXK(京 2004-0001)。

2 方法的建立与验证

2.1 分析条件 液相条件:色谱柱 Atlantis HILIC Silica (2.1 mm × 150 mm, 3 μ m; 流动相, A: 25 mmol · L⁻¹ 甲酸铵溶液 (pH = 3), B: 乙腈 (0.1% 甲酸, 梯度洗脱 (0~5 min, B: 85% → 60%; 流速 0.4 mL · min⁻¹, 柱温: 36 °C, 进样体积: 10 μ L。质谱条件: ESI 离子源, 正离子检测方式, 选择 MRM 模式进行二级质谱分析。离子源条件: 干燥气温度: 320 °C, 干燥气流量: 8 L · min⁻¹, 雾化器压力: 0.240 MPa, 毛细管电压: 1 kV。氯贝胆碱 (m/z : 161.0⁺ 101.9 最优碎裂电压为 110 V, 最优碰撞能量 (CE 为 10 V。氘代乙酰胆碱内标 (m/z : 155⁺ 87, 最优碎裂电压均为 90 V, 最优碰撞能量 (CE 均为 12 V。

2.2 内标溶液的配制 称取适量溴化氘代乙酰胆碱, 水为溶剂定容配制得内标储备液, 浓度为 0.155 mg · mL⁻¹。以乙腈稀释得到 4.65 μ g · mL⁻¹ 内标溶液。

2.3 样品处理 精密吸取血清样品 200 μ L, 置离心管中, 精密加入内标 (4.65 μ g · mL⁻¹ 10 μ L, 加

入乙腈 800 μ L, 涡旋 30 s 沉淀蛋白, 离心 (10000 r · min⁻¹ 10 min, 取上清液, 过滤, 即得供试液。

2.4 方法专属性考察 取空白血清 200 μ L, 按“2.3”所述方法进行样品处理, 进行 LC-MS/MS 分析。空白样品未检测到氯贝胆碱及内标, 说明本方法具有较好的专属性。氯贝胆碱及内标 (S) LC-MS/MS 分析的质谱图见图 1, 色谱图见图 2。

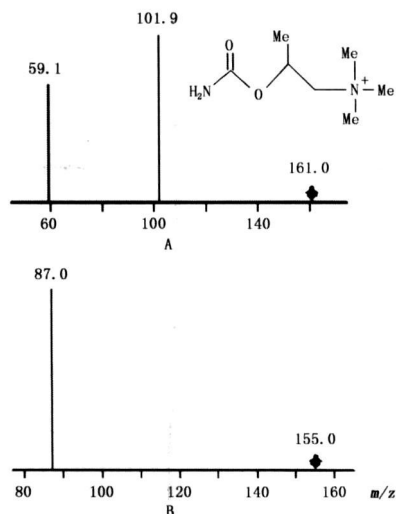


图 1 氯贝胆碱 (A) 及内标氘代乙酰胆碱- d_9 (B) 的二级质谱图

Fig 1 MRM mass spectra of bethanechol chloride (A) and ACh- d_9 (B)

2.5 线性关系及检测限 向大鼠空白血清中加入已知量的氯贝胆碱对照品, 配成相当于氯贝胆碱血清浓度为 600, 500, 300, 100, 50 ng · mL⁻¹ 的血清对照品, 按“2.3”所述方法进行样品处理后, 进行 LC-MS/MS 分析。以被测化合物氯贝胆碱与内标的峰面积之比 (Y) 对浓度 (X) 进行线性回归, 并以浓度的倒数 (1/X) 为加权系数, 回归方程为:

$$Y = 2.397 \times 10^3 X + 0.0266 \quad r = 0.9944$$

线性范围: 50~300 ng · mL⁻¹。取信噪比 (S/N ≥ 3) 为检测限, 最低检测浓度为 0.0025 ng · mL⁻¹。

2.6 绝对回收率 向大鼠空白血清中加入已知量的氯贝胆碱对照品, 制成高、中、低浓度的质控样品, 按“2.3”所述方法进行样品处理后, 进行 LC-MS/MS 分析。另分别配制与高、中、低浓度待测质控样品相同浓度的氯贝胆碱及内标对照品溶液, 同时进行 LC-MS/MS 分析。绝对回收率由待测质控样品的氯贝胆碱与内标的峰面积之比与相应浓度对照品溶液的氯贝胆碱与内标的峰面积之比的比值计算而得, 结果见表 1。高、中、低浓度绝对回收率在 96.4%~102.1% 之间, 表明该测定方法没有明显的基质干扰。

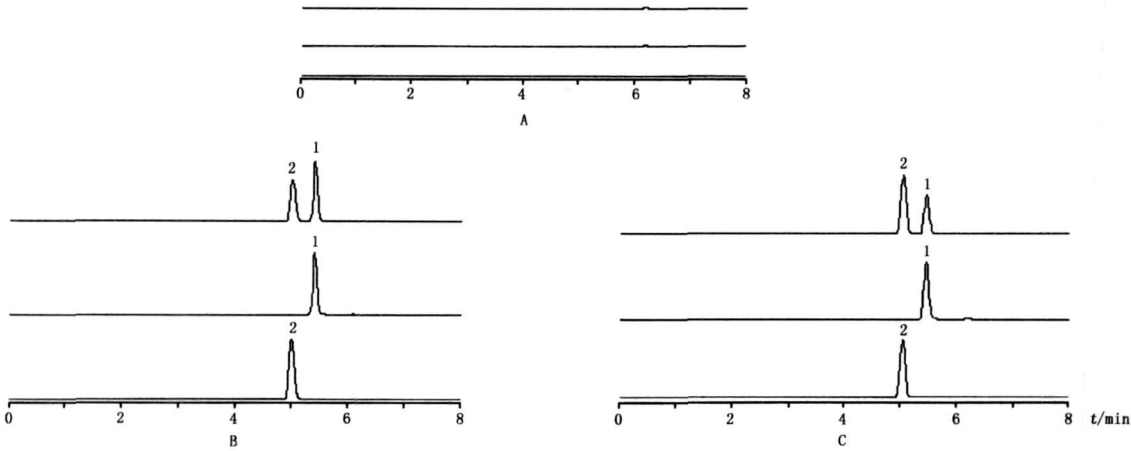


图 2 应用 LC-MS/MS 检测样品中氯贝胆碱及其内标 (IS) 的总离子流图及提取离子色谱图

Fig 2 TIC and extract ion chromatograms of bethanechol chloride and ACh-_d₉ (IS)

A. 空白血清 (blank serum) B. 空白血清加氯贝胆碱 (600 ng•mL⁻¹) 及内标 (blank serum spiked with bethanechol chloride and IS) C. 静脉给药 5 min 后大鼠血清样品 ((serum sample from rats by intravenous injection of bethanechol chloride at 5 min

1. 氯贝胆碱 (bethanechol chloride) 2. IS

表 1 大鼠血清样品中氯贝胆碱浓度测定的绝对回收率、方法回收率及日内精密度、日间精密度

Tab 1 Absolute recovery and relative recovery value and precision of intra-day and inter-day for bethanechol chloride from the assay QC standards

加入 (added) /ng•mL ⁻¹	实测 (found) /ng•mL ⁻¹	绝对回收率 (absolute recovery) % (n = 6)		方法回收率 (relative recovery) % (n = 6)		精密度 (precision) RSD % (n = 3)	
		平均值 (average value)	RSD	平均值 (average value)	RSD	日内 (intra-day)	日间 (inter-day)
600	623.4 ± 6.2	99.5	6.3	103.9	5.7	4.6	4.1
300	326.1 ± 4.3	96.4	3.9	108.7	3.8	3.2	7.6
50	50.3 ± 2.7	102.1	2.1	100.6	2.6	6.4	8.4

2.7 方法回收率 向大鼠空白血清中加入已知量的氯贝胆碱对照品,制成高、中、低浓度分别为 600、300、50 ng•mL⁻¹的质控样品(标示浓度),按“2.3”所述方法进行样品处理后,进行 LC-MS/MS 分析。以实测浓度与质控样品标示浓度之比计算方法回收率,结果见表 1。高、中、低浓度绝对回收率在 100.6% ~ 108.7% 之间,表明该测定方法准确度符合要求。

2.8 精密度 向大鼠空白血清中加入已知量的氯贝胆碱对照品,制成高、中、低浓度的质控样品,按“2.3”所述方法进行样品处理后,进行 LC-MS/MS 分析。进行日内及日间精密度试验,结果见表 1。

2.9 稳定性

取 - 25℃ 冰箱保存的高、低浓度的给药大鼠血清样品,考察冻融次数对方法的影响,反复冻融 3 次,按“2.3”所述方法进行样品处理后,进行 LC-MS/MS 分析,高、低浓度的给药大鼠血清 RSD 分别为 2.4% 和 0.15%,结果表明高、低浓度的给药大鼠血清样品冻融 3 次基本稳定。

取 - 25℃ 冰箱保存的给药大鼠血清样品,按“2.3”所述方法进行样品处理后,得到待测样品溶液于第 0、4、8、12、15 h 及第 2、3、4 d 进行 LC-MS/MS 分析, RSD 为 5.1%,结果表明待测样品溶液在 4 d 内稳定。

3 动物试验

SD 大鼠共 64 只,雄性 (250 ± 50 g) 随机分为 2 组。以 10% 乌拉坦,按 10 mL•kg⁻¹ 体重剂量腹腔注射麻醉,采用气囊法检测胃内压的改变。动物在手术操作完成后静息 30 min,各指标稳定后再开始进行实验。一组大鼠静脉注射注入氯贝胆碱,注射剂量为 100 μg•kg⁻¹,氯贝胆碱以超纯水配制成浓度为 1 μg•μL⁻¹,动物试验时,按 100 μg•kg⁻¹ 用微量进样器抽取母液,再抽取生理盐水补足,使其注射时总体积为 300 μL。注药时间控制在 10 s 内完成。于给药后的 2.5、15、30 min 后分别于腹主动脉取血,每个时间点各 8 只动物。另一组大鼠于针刺内关穴位 30 min 后穴位注射氯贝胆碱,注射剂量及取血同前一组。全血于 - 4℃ 冰箱放置 4 h,离心

(3000 r• min⁻¹ 10 min 取血清, 于 - 25 ℃ 冰箱保存, 待测。

4 动物试验结果

对 2 组大鼠各时间点血清进行氯贝胆碱浓度测定, 结果见图 3 及表 2。实验结果表明静脉注射氯贝胆碱血药浓度即时达到了峰值, 随后下降, 氯贝胆碱随血液分布到机体各组织、器官中, 被消除代谢。穴位注射氯贝胆碱血药浓度 2 min 及 5 min 相差不多, 说明氯贝胆碱经历了一个吸收的过程, 随后血药浓度下降, 比静脉注射血药浓度下降过程缓慢。比较各个时间点血药浓度, 除了 2 min 时, 穴位注射大鼠体内氯贝胆碱血药浓度均高出静脉注射 20% 以上, 说明穴位注射较静脉注射血药浓度能较平缓地达到峰值, 而且较长时间将血药浓度维持在一定的水平, 从物质基础水平说明了针刺穴位给药增效减毒的原因。

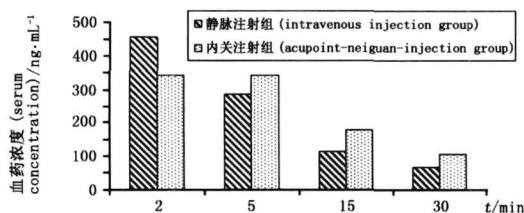


图 3 静脉注射组与内关穴位注射组血药浓度比较

Fig 3 The serum concentration of bethanechol chloride comparison of intravenous injection group and acupoint-neiguan-injection group

表 2 静脉注射与内关穴位注射给予大鼠氯贝胆碱后的血药浓度比较

Tab 2 The serum concentration of bethanechol chloride comparison of intravenous injection group and acupoint-neiguan-injection group

时间 (time /min)	静脉注射组 (intravenous injection group /ng• mL ⁻¹	穴位注射组 (acupoint-neiguan-injection group /ng• mL ⁻¹
	$\bar{X} \pm t_{0.05/2}(7)^{*}$ $\times SD \bar{X} \sqrt{1/2}$	$\bar{X} \pm t_{0.05/2}(7)^{*}$ $\times SD \bar{X} \sqrt{1/2}$
2	456.5 ± 19.0	343.8 ± 10.0
5	285.4 ± 13.0	342.8 ± 15.7
15	112.7 ± 11.5	179.5 ± 14.1
30	66.4 ± 14.6	107.0 ± 15.5

* $t_{0.05/2}(7) = 2.365$

5 讨论

5.1 质谱条件考察 考察使氯贝胆碱母离子 m/z 106.0 及氘代乙酰胆碱内标 (m/z 155.0 信号强度最强的离子源条件。选择毛细管电压: 1.0 1.5 1.8 2.0 2.5 kV, 以 1 kV 最优; 选择干燥气流量: 8 10 12 L• min⁻¹, 以 8 L• min⁻¹ 最优, 选择雾化器压力: 0.24 0.27 0.34 0.41 MPa 以 0.240 MPa 最优; 选择干燥气温度: 250 300 320 ℃, 以 320 ℃ 最优。氯贝胆碱二级质谱有 2 对母离子/子离子, 分别为 161.0⁺ 101.9(m/z), 161.0⁺ 59.1(m/z), 其中 161.0⁺ 101.9(m/z) 的信号强度较强, 故选择该离子对为检测对象。考察氯贝胆碱 161.0⁺ 101.9(m/z) 信号最强的碎裂电压 80 110 120 140 V 及碰撞能量 (CE) 5 10 15 20 V, 分别以 110 和 10 V 最优。

5.2 色谱条件考察 选择色谱柱 Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 该色谱柱对氯贝胆碱无保留^[3]。另选择色谱柱 Agilent HILIC Silica (2.1 mm × 150 mm, 3 μm), 该色谱柱对氯贝胆碱及内标均有保留, 考察了梯度洗脱条件, 最后确定了对氯贝胆碱及内标具有较好保留及分离的色谱条件。

5.3 小结 本文主要是建立液质联用分析方法, 为针药联合干预后血药浓度的比较研究以及针药联合干预后靶器官药物浓度的检测等研究工作打下重要的分析化学基础。实验结果表明本方法灵敏、特异、准确、可靠。

参考文献

- 1 Jankovic SM, Kouvelas D, Mirtsou-Filani V. Time course of isolated rat fundus response to muscarinic agonists: a measure of intrinsic efficacy. *Physiol Res* 1998; 47(6): 463
- 2 CHEN Shu-jie(陈淑杰), MO Zheng-ji(莫正纪), LIU Yi(刘诣), et al. Effects of penequinine hydrochloride on intestinal spasm by ACh/bethanechol chloride in vivo(盐酸戊乙奎醚对乙酰胆碱/氯贝胆碱所致家兔小肠痉挛的解痉作用). *West China J Pharm Sci* 华药杂志 2003; 18(5): 338
- 3 Allen LV Jr, Erickson MA. Stability of bethanechol chloride, pyrazinamide, quinidine sulfate, rifampin, and tetracycline hydrochloride in extemporaneously compounded oral liquids. *Am J Health Syst Pharm*, 1998; 55(17): 1804

(本文于 2009 年 8 月 17 日修改回