

LC-MS/MS法测定脑微透析液中乙酰胆碱的浓度

彭娟, 范斌*, 于友华, 王丹巧, 焦玥, 吴晓霞

(中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700)

摘要 目的: 建立能够灵敏、特异、准确、可靠地测定脑微透析液中乙酰胆碱浓度的分析方法, 用于药物干预下脑神经递质变化的研究。方法: 建立乙酰胆碱液质联用检测方法, 条件是ESI(+)离子源, MRM扫描检测离子对为乙酰胆碱 m/z 146⁺ 87 氘代乙酰胆碱 - d₅ (内标) m/z 155⁺ 87。开展方法学考察, 以验证新建分析方法的准确性、精密性等, 在此基础上将该方法用于分析大鼠脑微透析手术后的实际样品, 以验证新建分析方法的适用性。结果: 乙酰胆碱浓度在 0.0292 ~ 1.46 ng · mL⁻¹ 范围内线性良好 ($r = 0.9979$), 检测限为 0.00292 ng · mL⁻¹; 高、中、低浓度的准确度为 96.1% ~ 111.7%; 日内精密度 ($n = 6$) 为 1.8% ~ 7.8%, 日间精密度 ($n = 3$) 为 2.0% ~ 19.2%。结论: 应用 LC-MS/MS 技术建立不使用胆碱酯酶抑制剂测定大鼠脑微透析液中乙酰胆碱的方法迅速、灵敏、可靠。

关键词: 乙酰胆碱; 内标氘代乙酰胆碱 - d₅; 液质联用

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)09-1470-05

HPLC-MS/MS determination of acetylcholine in microdialysates from rats brain

PENG Juan, FAN Bin*, YU You-hua, WANG Dan-qiao, JIAO Yue, WU Xiao-xia

(Experimental Research Center China Academy of China Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract Objective To develop a sensitive and reliable method for determination of acetylcholine in microdialysates from rats brain. **Methods** 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 acetylcholine is m/z 146⁺ 87 with internal standard (acetylcholine-d₅) at m/z 155⁺ 87. The optimal ionization and fragmentation conditions as well as liquid chromatographic ones to detect acetylcholine were developed and validated. The new developed analytical method was further applied in determination of acetylcholine in microdialysates from rats brain after intracerebral perfusion of 6-hydroxydopamine (6-OHDA). **Results** The method was linear over the concentration range of 0.0292-1.46 ng · mL⁻¹ ($r = 0.9979$); The limit of quantification is 0.00292 ng · mL⁻¹; The accuracy was 96.1% - 111.7%; The intra- and inter-day precision values were 1.8% - 7.8% ($n = 6$) and 2.0% - 19.2% ($n = 3$), respectively. **Conclusion** The fully validated LC-MS/MS method has been successfully applied to determination of acetylcholine in microdialysates from rats brain.

Key words acetylcholine; internal standard (acetylcholine-d₅); LC-MS/MS

乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 是一种经典的兴奋性神经递质, 通过结合特异受体, 在神经细胞之间或神经细胞与效应器细胞之间起着信息传递作用。乙酰胆碱及其受体存在于从细菌到人类、从神经细胞到其他多种非神经细胞中, 提示它是一类与系统发生相关的古老分子, 可能不仅仅具有作为生理性递质的传递功能。

多种人类疾病与乙酰胆碱及其受体相关^[1], 而脑中的乙酰胆碱尤为重要, 它是传导联络大脑神经元的一种主要物质, 是多重神经系统学习和记忆过程的重要神经递质。人体缺少乙酰胆碱则会加速脑细胞的衰老, 使记忆力显著下降, 甚至导致老年痴呆^[2]。

液质联用技术在现代药物分析研究中发挥着越

* 通讯作者 Tel: (010) 64014411-3324 E-mail: bin@263.net

来越重要的作用。液相色谱是最常用的分离分析工具,与质谱联用则可以更灵敏、特异、高效、快速地完成从分离到分析的一整套操作。作者将液质联用应用到不使用胆碱酯酶抑制剂检测脑微透析液中乙酰胆碱的浓度,为展开在药物干预下脑神经递质变化的研究打下了坚实的基础。

1 材料

1.1 药物及试剂 氯化乙酰胆碱 (acetylcholine chloride)对照品 (纯度 > 99%), 购于 Sigma公司; 内标溴化氘代乙酰胆碱 - d₉对照品 (acetylcholine - d₉ bromide 氘代率 99.7%), 购于 CDN 公司。乙腈 (农残级)、异丙醇 (色谱纯)、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。复方氯化钠注射液 (含氯化钠 0.85%、氯化钾 0.03%、氯化钙 0.033%), 购于双鹤药业。

1.2 仪器 Agilent 6410 QQQ LC-MS分析系统, 由美国 Agilent RRLC 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 arim 61316/611VF 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, 体重 (200 ± 20) g 由中国药品生物制品检定所实验中心提供, 许可证编号 SCXK(京) 2005-004

2 样品分析方法的建立与验证

2.1 液质分析条件 液相色谱条件: 采用 Atlantis HILIC Silica (2.1 mm × 150 mm, 3 μm) 色谱柱, 流动相为 25 mmol·L⁻¹甲酸铵水溶液 (pH = 3) - 乙腈 (0.1%甲酸) (18:82), 流速 0.4 mL·min⁻¹, 柱温 36 °C, 进样体积 20 μL。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 300 °C, 干燥气流量 10 L·min⁻¹, 雾化器压力 0.413 MPa 毛细管电压 1.8 kV; 乙酰胆碱 m/z 146⁺→87, 氘代乙酰胆碱 - d₉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 精密称取溴化氘代乙酰胆碱 - d₉适量, 以水为溶剂配制浓度为 0.155 mg·mL⁻¹的储备液。以异丙醇 - 乙腈 (40:60 含 0.1%甲酸)为溶剂配制 0.155 ng·mL⁻¹内标溶液。

2.3 供试品溶液 取样品 20 μL, 加入 5 倍体积量的 0.155 ng·mL⁻¹内标溶液, 混匀, 即得。超出线

性范围的样品采用稀释的方法, 以复方氯化钠注射液为溶剂稀释至线性范围内, 再取稀释液 20 μL, 加入 5 倍体积量的 0.155 ng·mL⁻¹内标溶液, 测得浓度, 再以稀释比例计算出实际样品浓度。

2.4 方法专属性考察 在本文的试验条件下, 复方氯化钠注射液不经处理直接进样进行 LC-MS/MS分析, 未检测到乙酰胆碱及内标, 说明本方法具有较好的专属性。乙酰胆碱及氘代乙酰胆碱 - d₉ LC-MS/MS分析的质谱图见图 1, 色谱图见图 2。

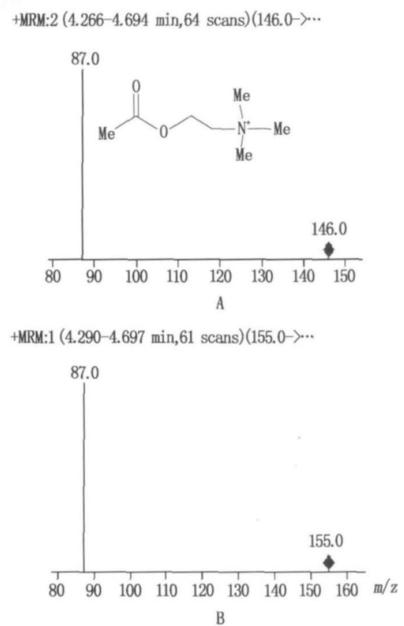


图 1 乙酰胆碱 (A)及氘代乙酰胆碱 - d₉ (B)的二级质谱图

Fig 1 MRM mass spectra of acetylcholine(A) and acetylcholine - d₉ (B)

2.5 线性关系及检测限 精密称定氯化乙酰胆碱对照品, 以水为溶剂配制成乙酰胆碱浓度为 1.46 mg·mL⁻¹的储备溶液, 再以水为溶剂, 稀释储备液至乙酰胆碱为 14.6 ng·mL⁻¹, 标记为“A液”, 精密量取不同体积的 A液至 5 mL量瓶中, 以复方氯化钠溶液定容, 配成相当于乙酰胆碱浓度为 0.0292, 0.0730, 0.146, 0.292, 0.730, 1.460 ng·mL⁻¹的对照品溶液。取各浓度对照品溶液 20 μL, 加入 5 倍体积量的 0.155 ng·mL⁻¹内标溶液, 混匀, 进行 LC-MS/MS分析。以乙酰胆碱与氘代乙酰胆碱 - d₉的峰面积之比 (Y)对浓度 (X)进行线性回归, 回归方程为:

$$Y = 1.748X + 0.0490 \quad r = 0.9979$$

线性范围为 0.0292 ~ 1.46 ng·mL⁻¹。检测限为 0.00292 ng·mL⁻¹ (S/N ≥ 3)。

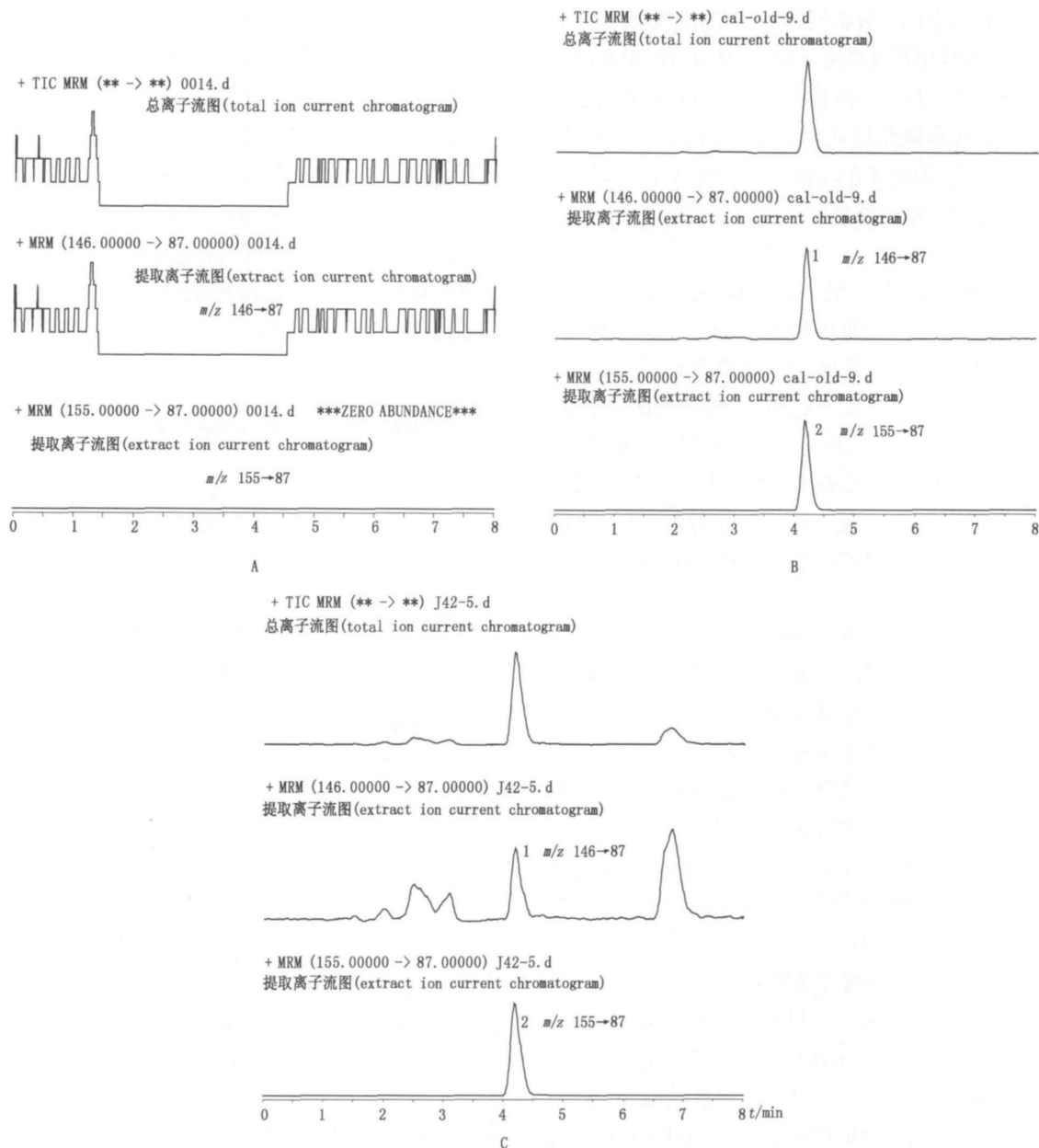


图 2 不同样品中乙酰胆碱及其氘代乙酰胆碱 - d₉ 的总离子流图及提取离子色谱图

Fig 2 Total ion current and extract ion current chromatograms of acetylcholine and acetylcholine- d₉

A. 复方氯化钠注射液 (compound sodium chloride injection) B. 对照品氯化乙酰胆碱 (1.46 ng· mL⁻¹) 及内标溴化氘代乙酰胆碱 - d₉ [compound sodium chloride spiked with acetylcholine chloride(1.46 ng· mL⁻¹) and acetylcholine- d₉ bromide] C. 大鼠微透析样品, 80 min 收集的样品 (microdialysates sample from rats brain, collected at 80 min)
 1 乙酰胆碱 (acetylcholine) 2 氘代乙酰胆碱 - d₉ (acetylcholine- d₉)

2.6 准确性 同“2.5”项下方法制备高、中、低浓度分别为 1.460, 0.730, 0.0292 ng· mL⁻¹ 的质控 (QC) 样品各 6 份, 加入 5 倍体积量的 0.155 ng· mL⁻¹ 内标溶液, 混匀, 进行 LC-MS/MS 分析。由实测浓度与质控样品标示浓度之比评价准确性。结果见表 1。

2.7 精密度 在同一天内取“2.5”项下制备的高、中、低浓度分别为 1.460, 0.730, 0.0292 ng· mL⁻¹ 的

表 1 乙酰胆碱浓度测定方法的准确性 (n = 6)

Tab 1 Accuracy values for acetylcholine from the assay QC standards

标示浓度 (label concentration) /ng· mL ⁻¹	实测浓度 (measured concentration) /ng· mL ⁻¹	准确性 (accuracy) %	RSD %
1.460	1.402 ± 0.026	96.1	1.8
0.730	0.704 ± 0.014	96.5	1.9
0.0292	0.0326 ± 0.0027	111.7	7.8

对照品溶液 20 μL 各 6 份, 加入 5 倍体积量的 0.155 ng·mL⁻¹ 内标溶液, 混匀, 进行 LC-MS/MS 分析, 考察分析方法的日内精密度的。取“2.5”项下制备的高、中、低 3 种浓度的对照品溶液 20 μL, 各 3 份, 连续 3 d 进行测定, 求得每天 3 份平行样的平均值, 以 3 d 的平均值求 RSD (n = 3), 考察分析方法的日间精密度。结果见表 2。

表 2 乙酰胆碱浓度测定方法的日内精密度及日间精密度

Tab 2 Intra-day and inter-day precision for acetylcholine from the assay QC standards

标示浓度 (label concentration) /ng·mL ⁻¹	日内 (intra-day) (n = 6)		日间 (inter-day) (n = 3)	
	实测浓度 (measured concentration) /ng·mL ⁻¹	RSD %	实测浓度 (measured concentration) /ng·mL ⁻¹	RSD %
1.460	1.402 ± 0.026	1.8	1.391 ± 0.067	2.0
0.730	0.704 ± 0.014	1.9	0.713 ± 0.052	2.9
0.0292	0.0326 ± 0.0027	7.8	0.0326 ± 0.020	19.2

2.8 定量限 以 S/N ≥ 10 为定量限, 并考察其质控样品准确性及精密度, 检测结果表明准确性及精密度均符合要求, 定量限为 0.03 ng·mL⁻¹。

2.9 稳定性 取“2.5”项下制备的浓度为 0.292 ng·mL⁻¹ 的对照品溶液, 加入 5 倍体积量的 0.155 ng·mL⁻¹ 内标溶液, 混匀, 于配制后第 0, 1, 2 h 以及第 2, 3, 4 d 进行 LC-MS/MS 分析。结果表明质控样品的溶液在 4 d 内稳定 (RSD 为 3.5%)。取大鼠微透析样品 20 μL, 按“2.3”项所述方法制备供试品溶液, 于配制后立即测定, 并于第 2, 3 d 进行 LC-MS/MS 分析, 结果表明供试品溶液在 3 d 内稳定 (RSD 为 3.1%)。

3 动物试验

对照组大鼠以 1% 戊巴比妥, 按 40 mg·kg⁻¹ 体重剂量腹腔注射麻醉, 立体定位仪定位, 于大鼠脑纹状体内埋入探针套管 (定位坐标 A: + 0.02 cm; L: - 0.30 cm; V: - 0.35 cm), 次日, 在清醒状态下插入微透析探针。以复方氯化钠注射液 2.5 μL·min⁻¹ 的速度灌流, 平衡 80 min 后开始收集样品, 以该时间点为 0 时间点, 每 20 min 收集 1 管透析液。检测于 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400 min 收集的样品。以对照组大鼠微透析样品乙酰胆碱浓度对时间作图, 见图 3-A。

给药组大鼠以 1% 戊巴比妥, 按 40 mg·kg⁻¹ 体重剂量腹腔注射麻醉, 立体定位仪定位, 于大鼠脑纹状体内埋入探针套管 (定位坐标 A: + 0.02 cm; L: - 0.30 cm; V: - 0.35 cm), 次日, 在清醒状态下插

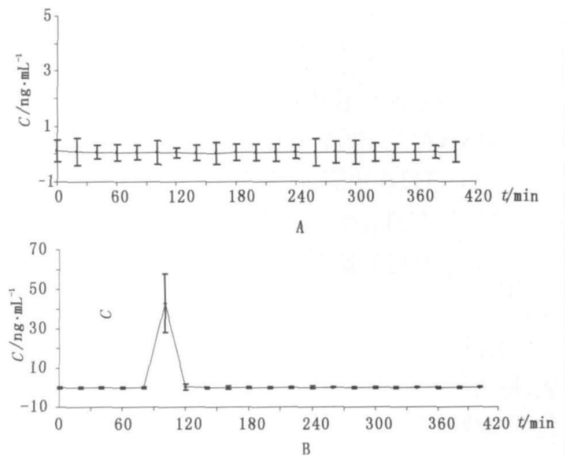


图 3 对照组大鼠微透析样品 (A) 及模型大鼠微透析样品 (B) 的乙酰胆碱浓度-时间曲线图

Fig 3 Concentration time profiles of Ach in microdialysates from rats brain of control group (A), and Ach in microdialysates from rats brain after intracerebral perfusion of 6-OHDA (B)

入微透析探针。以复方氯化钠注射液 2.5 μL·min⁻¹ 的速度灌流, 平衡 80 min 后开始收集样品, 以该时间点为 0 时间点, 每 20 min 收集 1 管透析液, 于收集第 5 管结束后, 5 min 内灌流 6-羟基多巴 (6-OHDA 2%, 以含 2% 维生素 C 的生理盐水配制) 10 μL, 再继续以 2.5 μL·min⁻¹ 的速度灌流复方氯化钠注射液^[3]。按“2.3”项所述方法进行样品处理后, 于 -25 °C 保存, 待测。检测于 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400 min 收集的样品, 以给药大鼠微透析样品乙酰胆碱浓度对时间作图, 见图 3-B。

5 讨论

5.1 质谱条件考察 考察使乙酰胆碱母离子 m/z 146 及氘代乙酰胆碱-d₉ m/z 155 信号强度最强的离子源条件。考察不同的毛细管电压 (1.5, 1.8, 2, 3 kV), 结果以 1.8 kV 最优; 考察不同的干燥气流量 (8, 10, 12 L·min⁻¹), 结果以 10 L·min⁻¹ 最优; 考察不同的雾化器压力 (0.379, 0.413 MPa), 结果以 0.413 MPa 最优; 考察不同的干燥气温度 (280, 300, 320 °C), 结果以 300 °C 最优。考察使乙酰胆碱及氘代乙酰胆碱-d₉ 二级质谱母离子/子离子 m/z 146⁺ 87 及 m/z 155⁺ 87 信号最强的碎裂电压 (80, 90, 95, 100 V) 及碰撞能量 (5, 10, 12, 20 V), 两者分别均以 90 V 和 12 V 最优。

5.2 动物实验结果 SD 大鼠给予 6-羟基多巴后, 脑内神经递质乙酰胆碱的浓度有一个非常剧烈

的上升下降过程,说明 6-羟基多巴可明显影响胆碱能系统。

5.3 讨论

微透析系统是通过透析原理对细胞间隙小分子物质活体取样及靶器官直接给药的新手段。因其实实验损伤小,可以在清醒、自由活动的生物个体上同时进行多个位点的取样分析,并可长时间、动态地观察各部位化学物质的动态变化,具有整体和动态的特点。

乙酰胆碱是一种中枢胆碱能神经系统的重要递质,检测药物干预前后动物脑内乙酰胆碱水平的变化可反映药物对胆碱能系统的影响。乙酰胆碱是一种小分子、大极性化合物,无共轭结构因此无紫外吸收。贾兴元等采用了电化学检测器检测其浓度^[4],但是电化学检测器对使用环境要求苛刻较复杂。乙酰胆碱结构中带有正电荷的季铵氮原子,是最佳的适用于质谱 ESI正离子模式检测的化合物,且液质联用较电化学检测器使用方便快捷,How s ME 等应用液质联用检测了乙酰胆碱,但是为了增强响应在样品中加入了胆碱酯酶抑制剂^[5,6]。Zhang MY 等应用液质联用检测生物样品中乙酰胆碱浓度,但未使用胆碱酯酶抑制剂^[7]。本研究将液相色谱-质谱联用应用到检测脑微透析液中乙酰胆碱的浓度,且不使用胆碱酯酶抑制剂,从而保证在尽可能接近正常生理、病理及药效改变的状态下反映动物脑内乙酰胆碱变化,为展开在药物干预下脑神经递质变化的研究打下了坚实的基础。

参考文献

- 1 LIU Mei(刘梅), YANG Sheng-li(杨胜利). The relationship between tumor and the non- neurotransmitter actions of acetylcholine and its receptors(乙酰胆碱及其受体的非神经递质作用和肿瘤). *Tumor(肿瘤)*, 2006, 26(1): 98
- 2 WANG Qiao(王俏). Research progress on brain acetylcholine analysis(脑乙酰胆碱分析技术研究进展). *Northwest Pharm J(西北药学杂志)*, 2007, 22(1): 43
- 3 WANG Wei(王巍), CAO Chun-yu(曹春雨), WANG Dan-qiao(王丹巧), *et al* Effect of prepared Polygonum multiflorum on striatum extracellular acetylcholine and choline in rats of intracerebral perfusion with sodium azide(制首乌对叠氮钠脑内灌注大鼠纹状体细胞外液乙酰胆碱和胆碱水平的影响). *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2006, 31(9): 751
- 4 JIA Xing-yuan(贾兴元), WU An-shi(吴安石), YUE Yun(岳云), *et al* Microbore high performance liquid chromatographic method for measuring acetylcholine and choline in microdialysates from rat brain(微柱高效液相色谱法测定大鼠微透析液中的乙酰胆碱和胆碱). *Chin J Chromatogr(色谱)*, 2004, 22(1): 33
- 5 Hows ME, Ongan AJ, Murray S *et al* High- performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the rapid high sensitivity measurement of basal acetylcholine from microdialysates. *J Neurosci Methods* 2002, 121(1): 33
- 6 Fu B, Gao X, Zhang SP, *et al* Quantification of acetylcholine in microdialysate of subcutaneous tissue by hydrophilic interaction chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22(10): 1497
- 7 Zhang MY, Hughes ZA, Kems EH, *et al* Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantitation of acetylcholine and related neurotransmitters in brain microdialysis samples. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(2): 586

(本文于 2008 年 10 月 16 日收到)