

向于苯并吡喃双环进入 β -环糊精空腔。 R_5 和 R_6 为 $-\text{OCH}_3$ 时,可能由于甲氧基活动空间较大,分子两种模式包含概率都较大。从受体包含配体的结合能来看, R_5 和 R_6 为 $-\text{H}$ 有利于包含, $-\text{OH}$ 和 $-\text{OCH}_3$ 两者对包含没有差异。

当 R_6 为 $-\text{H}$ 时,D模式和S模式分别出现23和17个,平均结合能为 -97.0 kJ/mol 。当 R_6 为 $-\text{OH}$ 时,D模式和S模式分别出现0和7个,平均结合能为 -111.2 kJ/mol ,表明为 $-\text{OH}$ 时更有利于结合,主要有利于苯环进入 β -环糊精空腔。 R_8 与 R_9 一样,只有多取代时出现,由于只有2个含羟基对接成功,其他含羟基与甲氧基的结构都没有对接成功,没有进行统计。

当 R_7 是苯环对位的取代基,通常认为对包含成功没有决定性的影响,比较有意义的是,当 R_7 为 $-\text{H}$ 时,D模式和S模式分别出现0和9个,平均结合能为 -106.2 kJ/mol 。当 R_7 为 $-\text{OH}$ 时,D模式和S模式分别出现23和15个,平均结合能为 -97.4 kJ/mol ,结果表明 R_7 为 $-\text{H}$ 时更有利于结合,主要有利于苯环进入 β -环糊精空腔。

3 讨论

通过利用理论对接计算,研究了 β -环糊精对黄酮类结构的包合作用,可以发现:黄酮母核的 R_1 和 R_4 基团大小直接影响包含的成功率,较小的氢有利于包含,较大的甲氧基使包含失败。 R_5 或 R_9 有一定的取代有利于包含形成。 R_6 或 R_8 取代越大越不利

于形成包合物。

黄酮类结构中的苯并吡喃双环和苯环都可以被 β -环糊精的空腔包含。 R_1 和 R_4 体积较小有利于苯并吡喃双环进入 β -环糊精空腔,增大为 $-\text{OH}$ 时,使分子倾向于苯环进入 β -环糊精空腔。 R_5 和 R_9 体积较小时,有利于苯环进入 β -环糊精空腔, R_5 和 R_9 为 $-\text{OH}$ 时,使分子倾向于苯并吡喃双环进入 β -环糊精空腔。当 R_6 为 $-\text{OH}$ 时有利于苯环进入 β -环糊精空腔。 R_7 为 $-\text{H}$ 时有利于苯环进入 β -环糊精空腔。因此,不同的取代基既可以影响包含的形成也可以改变包含的模式,在实验中考虑以 β -环糊精包合黄酮结构时需要根据取代情况进行仔细分析。以理论计算为基础,也进行了试验研究,包含效果有一定的价值,有待于进一步动物试验验证。

参考文献:

- [1] 裴利宽,郭宝林.黄酮类化合物吸收和代谢研究进展[J].中国药理学杂志,2005,41(8):568-572.
- [2] 王从品,吕承哲.影响黄酮类药物口服吸收的因素[J].中国医院药学杂志,2006,26(11):1395-1396.
- [3] 宋晓虹,刘晓红,陈荣礼,等.黄酮类化合物与 β -环糊精包合物的光谱学表征[J].分析学报,2004,23(1):36-38.
- [4] 王茹林,杨都,双少敏,等. β -环糊精衍生物对黄酮类药物的增溶作用[J].应用化学,2002,19(7):702-704.
- [5] 梁永革,朱建芬,张媛媛.依普黄酮 β -环糊精包合物的制备[J].医药导报,2006,25(8):817-818.
- [6] 蔡源源,宁二娟.醋柳黄酮 β -环糊精包合物的制备、鉴别与测定[J].河南大学学报,2006,25(4):30-32.
- [7] 詹国平,韩军伟,黄乐松.黄芩苷-环糊精包合物的制备与表征[J].合成化学,2006,14(4):413-415.

高效液相色谱串联电喷雾质谱法测定大鼠血浆中山莨菪碱

马小红,王新立,陈勇*,韩凤梅

(湖北大学 中药生物技术省重点实验室,湖北 武汉 430062)

摘要:目的 建立大鼠血浆中山莨菪碱的测定方法,并研究山莨菪碱的大鼠药理学。方法 采用液相色谱串联电喷雾离子阱质谱法测定大鼠血浆中山莨菪碱。大鼠血浆样品经甲醇2次沉淀蛋白并萃取后,以甲醇-2 mmol/L 醋酸铵缓冲液(用甲酸调 pH 3.5)(70:30)为流动相,用 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱分离,通过电喷雾离子阱质谱,以选择离子反应监测方式进行检测。用于定量分析的离子反应分别为 m/z 306 $\rightarrow$ 140 (山莨菪碱)和 m/z 290 $\rightarrow$ 124 (内标,阿托品)。结果 山莨菪碱线性范围为 10~5 000 $\mu\text{g/L}$, $r=0.999\ 0$,最低检测限为 2 $\mu\text{g/L}$,日内、日间测定值 RSD 小于 4.2%。结论 该法快速灵敏,准确度高,适用于大鼠体内山莨菪碱的药理学研究。

关键词:山莨菪碱;液相色谱串联电喷雾质谱;血药浓度

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)09-1312-04

收稿日期:2008-01-19

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(30630075);湖北省杰出青年基金资助项目(2002AC004)

作者简介:马小红(1968—),女,湖北武汉人,实验师,1989年毕业于武汉大学化学系分析化学专业,一直从事药物分析及开发工作。

* 通讯作者 陈勇 Tel/Fax:(027)88663590 E-mail:cy101610@npc.gov.cn

Determination of anisodamine in plasma of rat by HPLC-MS

MA Xiao-hong, WANG Xin-li, CHEN Yong, HAN Feng-mei

(Hubei Key Laboratory of Bio-Technology of Traditional Chinese Medicine,
Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract; Objective To establish a sensitive and specific method for the determination of anisodamine in plasma of rat and to study pharmacokinetics of anisodamine in plasma of rat. **Methods** HPLC-MS was used to determine the concentration of anisodamine in plasma of rat with atropine as the internal standard. The atropine was isolated from plasma by protein precipitation and extraction with methanol twice, then chromatographed by using an Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column. The mobile phase consisted of methanol-2 mmol/L ammonium acetate solution (adjusted pH value to 3.5 with formic acid) 70 : 30. Electrospray ionization (ESI) source was applied and operated in the positive ion mode. Selected reaction monitoring (SRM) mode with the transitions of m/z 306→140 and m/z 290→124 was used to quantify anisodamine and the internal standard, respectively. **Results** The linear range for anisodamine was 10—5 000 $\mu\text{g/L}$ ($r=0.999\ 0$), the limit of detection for anisodamine was 2 $\mu\text{g/L}$, inter- and intra-day RSD was less than 4.2%. **Conclusion** The method offers the advantages of high sensitivity and accuracy for the determination of anisodamine compared with the previously reported methods and is suitable for the pharmacokinetic study on anisodamine in rat *in vivo*.

Key words: anisodamine; HPLC-MS; plasma concentration

山莨菪碱是从茄科植物山莨菪 *Scopolia tangutica Maxim.* 中分离出来的一种生物碱,由于其结构和阿托品相似但对中枢神经的副作用较小而常被用作 M-胆碱受体阻断剂^[1],用于感染中毒休克、急性肾炎、风湿性关节炎、肠胃炎症、惊厥和肺损伤等疾病的治疗^[2],甚至用来治疗非典 (severe acute respiratory syndrome, SARS)。文献报道了采用 TLC 和 HPLC 法分析山莨菪碱在家兔、小鼠和人体内的药动学^[3~6],但灵敏度和专属性不够高,不适合用于血液及生物组织中痕量山莨菪碱的定量分析。本研究建立了一种灵敏度与专属性更高,且快速简便的测定大鼠血浆中山莨菪碱的液相色谱串联电喷雾离子阱质谱 (LC/ESI-ITMS) 法,该方法适合用于山莨菪碱的药动学研究。

1 材料与试剂

美国 Finnigan 公司 LCQ^{Duo} 型液相色谱-离子阱质谱仪,包括电喷雾电离源 (ESI), TSP P4000 泵, TSP AS3000 自动进样器, LCQ Xcalibur 数据处理系统和 LCQuan1.2 定量软件; TGL-16C 高速离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

山莨菪碱 (质量分数 98% 以上) 购于中国药品生物制品检定所,阿托品 (质量分数 98% 以上) 购于美国 Sigma 公司。甲醇、乙腈为色谱纯 (美国 Fisher 公司),甲酸为分析纯,水为超纯水。

Wistar 大鼠,体质量 (200±20) g,雌雄兼用,由湖北省实验动物研究中心提供,合格证:SCXK (鄂) 2003-2005。ig 给药前禁食 12 h,全程不禁饮水。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×2.1 mm, 5 μm), 并配有 Agilent 公司相同柱填料的保护柱 (12.5 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-2 mmol/L 醋酸铵缓冲液 (用甲酸调 pH 3.5) (70 : 30); 体积流量: 0.2 mL/min; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

ESI 离子源; 扫描范围 m/z 100~1 000; 离子源喷射电压 4.5 kV; 毛细管电压 13 V; 毛细管温度 175 $^{\circ}\text{C}$; 鞘气 (N_2) 流速 40 个单位; 碰撞诱导解离 (CID) 能量为 30%; 自动进样器直接进样, 正离子检测; 扫描方式为选择反应检测 (SRM), 用于定量分析的离子反应分别为 m/z 306→140 (山莨菪碱) 和 m/z 290→124 (内标, 阿托品)。单次扫描时间 0.3 s, 含 3 次微扫描。

2.2 血浆样品处理: 大鼠 ig 给药 60 mg/kg 后, 眼球静脉丛取血, 肝素抗凝, 3 000 r/min 离心 10 min, 抽取血浆样品 0.1 mL 置 1.5 mL Ep 管中, 依次加入 0.1 mL 甲醇, 0.1 mL 内标 (阿托品 500 $\mu\text{g/L}$) 涡旋振荡 1 min 后, 加入 1.0 mL 甲醇, 涡旋振荡 1 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 将上层离心液转

移至另一试管中,重复上述操作 1 次,合并离心液。将离心液在 35 ℃ 氮气流下挥干,残渣用 0.1 mL 流动相溶解,12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液置进样小瓶中。自动进样器吸取 20 μL 进行 LC/MS/MS 分析。

2.3 质谱分析:对山莨菪碱进行一级质谱正离子全扫描,准分子离子为 m/z 306,对其进行碰撞诱导解离,失去托品酸($C_9H_{10}O_3$, m/z 166)生成主要碎片 m/z 140,用于定量分析。对内标阿托品进行一级质谱正离子全扫描,准分子离子为 m/z 290,对其进行碰撞诱导解离,脱去托品酸($C_9H_{10}O_3$, m/z 166)生成主要碎片离子 m/z 124,用于定量分析。山莨菪碱和内标阿托品的二级质谱全扫描图见图 1。

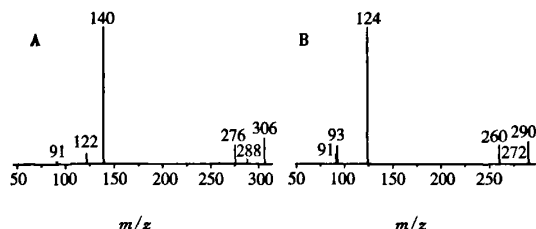


图 1 山莨菪碱(A)和阿托品(B)的[M+H]⁺二级质谱全扫描图

Fig. 1 MS² Spectra of [M+H]⁺ for anisodamine (A) and atropine (B)

2.4 方法专属性:分别取 6 只大鼠的空白血浆,进样分析,几乎没有物质响应;将一定质量浓度的山莨菪碱对照品溶液加入空白血浆中,同法处理,结果山莨菪碱的保留时间为 1.99 min,内标的保留时间为 2.01 min,色谱图见图 2。取大鼠单剂量 ig 60 mg/kg 山莨菪碱 9 h 后收集的血浆样品,同法处理,结果血浆中的内源性物质不干扰山莨菪碱及内标的测定,见色谱图 2。通过对比分析含 10 μg/L 山莨菪碱与 500 μg/L 内标水溶液和血浆溶液的质谱响应,在血浆溶液中的山莨菪碱和内标的色谱峰面积分别比在水溶液中的降低 5.6%和 4.8%,说明血浆基质对山莨菪碱和内标没有明显的电离抑制。

2.5 标准曲线:取空白血浆 0.10 mL,分别加入不同质量浓度山莨菪碱 0.10 mL 和 500 μg/L 内标阿托品,配制成含山莨菪碱分别为 10、50、100、500、1 000、5 000 μg/L 的血浆样品,进样测定。以血浆样品质量浓度为横坐标,待测物与内标峰面积比为纵

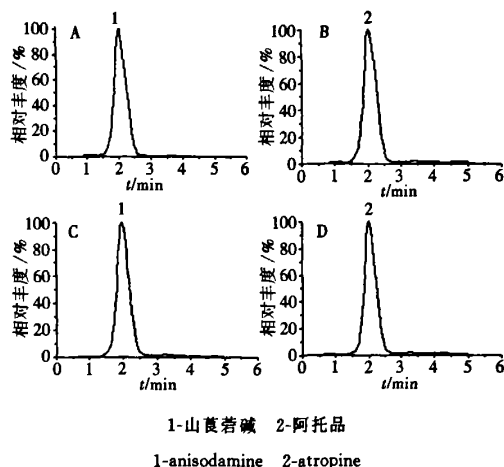


图 2 含 10 μg/L 山莨菪碱血浆样品(A)、含 500 μg/L 内标的血浆样品(B)、单剂量 ig 60 mg/kg 山莨菪碱 9 h 后大鼠血浆样品(C)和含内标大鼠血浆样品(D)的选择离子色谱图

Fig. 2 Chromatograms in selective ion monitoring mode of plasma sample spiked 10 μg/L anisodamine (A) and 500 μg/L atropine (B), plasma sample 9 h after ig administered anisodamine (60 mg/kg) (C), and plasma containing atropine (D)

坐标,用加权最小二乘法进行线性回归,结果山莨菪碱的线性范围为 10~5 000 μg/L,回归方程为 $Y = 5.407 \times 10^{-4}X + 3.680 \times 10^{-3}$, $r = 0.999\ 0$,最低检测限为 2 μg/L。

2.6 回收率与精密度试验:制备含山莨菪碱 20、200、2 000 μg/L 样品各 6 份,制备供试品溶液,进样测定,根据回归方程计算样品中山莨菪碱的质量浓度与实际配制样品中山莨菪碱的质量浓度的比值,求得方法回收率,并计算 RSD。同样方法连续测定 3 d,计算 RSD。结果见表 1。

制备含山莨菪碱 20、200、2 000 μg/L 样品各 6

表 1 大鼠血浆样品中山莨菪碱分析的准确度与精密度 ($n=6$)

Table 1 Accuracy and precision for analysis of aniso-damine in plasma of rats ($n=6$)

标准加入量/ (μg · L ⁻¹)	测定值/ (μg · L ⁻¹)	RSD/%		方法回 收率/%	提取回 收率/%
		日内	日间		
20.0	19.0	1.8	2.2	95.2	74.6
200.0	197.7	0.5	1.5	98.9	75.6
2 000.0	1 911.6	3.1	4.1	95.6	72.4

份,进样测定,以沉淀蛋白并萃取后的待测物色谱峰面积与未经沉淀蛋白直接进样获得的色谱峰面积之比,考察样品提取回收率,结果见表 1。内标经同样处理,其回收率为 72.8%。

2.7 稳定性试验:取含山莨菪碱 20、200、2 000 $\mu\text{g/L}$ 样品各 5 份,考察了在 3 次冷冻-解冻循环、血浆样品放置 24 h、血浆样品处理后室温放置 8 h 条件下山莨菪碱的稳定性,结果山莨菪碱的方法回收率的 RSD 均在 $\pm 10\%$ 以内,见表 2。

表 2 大鼠血浆样品中山莨菪碱的稳定性 ($n=5$)

Table 2 Stability of anisodamine in plasma of rats ($n=5$)

条件	测得的质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率/%	RSD/%
3 次冷冻- 解冻循环	19.0	99.5	3.6
	197.7	105.5	3.2
	1911.6	101.2	4.7
血浆样品 放置 24 h	19.0	100.3	2.7
	197.7	99.7	2.4
	1 911.6	107.3	6.5
血浆样品 处理后室 温放置 8 h	19.0	98.4	4.5
	197.7	99.5	3.6
	1 911.6	99.8	5.2

2.8 体内药-时曲线:取 6 只 Wistar 大鼠,单剂量 ig 60 mg/kg 山莨菪碱,分别于不同时间取血约 0.3 mL,分离血浆,制备供试品溶液,进行 LC-MS² 测定,绘制药-时曲线(图 3),并用药动学软件 DAS2.0 进行曲线拟合,确定山莨菪碱血药浓度动态变化规律符合二室开放模型,主要药动学参数见表 3。

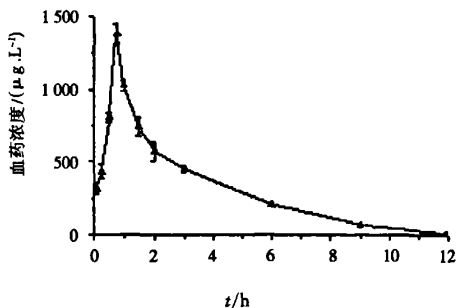


图 3 口服山莨菪碱后大鼠血浆中山莨菪碱的药-时曲线

Fig. 3 Mean plasma concentration-time curve of anisodamine in rats after a single oral dose

3 讨论

莨菪烷类生物碱无色,在紫外光区的吸收系数

表 3 山莨菪碱大鼠体内动力学参数

Table 3 Pharmacokinetic parameters of anisodamine in rats *in vivo*

参数	单位	数值
$t_{1/2\alpha}$	h	2.554
$t_{1/2\beta}$	h	2.555
V_1	$\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.036
CL	$\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}$	0.01
AUC(0-t)	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	1.992
AUC(0- ∞)	$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	2.085
K_{10}	h^{-1}	0.263
K_{12}	h^{-1}	0.008
K_{21}	h^{-1}	0.271

小,亦无荧光。因此,文献报道的方法^[3~6]灵敏度较低,不能满足生物样品中痕量莨菪烷类生物碱的测定。本实验建立的 LC-MS² 方法用于测定莨菪烷类生物碱,不仅灵敏度比文献报道的方法高 2 个数量级,而且方法的抗干扰能力更强,线性范围更广。

莨菪烷类生物碱均有自己的特征子离子,应用 LC-MS² 定量分析莨菪烷类生物碱,应采用选择反应检测模式。山莨菪碱的二级质谱特征碎片离子为 m/z 140,阿托品的为 m/z 124,故本实验分别选择 m/z 140、124 作为山莨菪碱和内标阿托品的定量选择反应检测离子,这样有利于提高分析方法的专属性。

应用 LC-MS² 进行定量分析,内标物的选择很重要。尽管 SRM 具有多窗口同时检测的特点,原则上只要求内标物具有特征性离子反应,而不必像 HPLC 那样需要内标与被分析物等严格分离。但为了保证分析方法回收率,一般选择结构类似物作为内标。因此,本实验选择山莨菪碱的结构类似物阿托品为内标。

参考文献:

- [1] 郑虎. 药物化学 [M]. 第 5 版. 北京:人民卫生出版, 2005.
- [2] 苑华,王焱,刘云. 山莨菪碱的药理研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(16): 2210-2211.
- [3] 詹丽芝,王瑛珏. 血药浓度法与毒效学方法测定山莨菪碱药动学参数的比较[J]. 中国医科大学学报, 1989, 18(4): 271-275
- [4] 詹丽芬,张玉芝,赫梅生. 用小鼠急性死亡率法测定山莨菪碱的表观药动学参数[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1987, 1(3): 224-228.
- [5] 马鹏. 胶束液相色谱法测定山莨菪碱的血药浓度和药代动力学参数[J]. 药学学报, 1992, 27(10): 763-767.
- [6] 周宏兵,何新. 高效液相色谱法测定家兔血清中盐酸山莨菪碱含量[J]. 色谱, 1996, 14(1): 60-61.

高效液相色谱串联电喷雾质谱法测定大鼠血浆中山莨菪碱

作者：[马小红](#)，[王新立](#)，[陈勇](#)，[韩凤梅](#)，[MA Xiao-hong](#)，[WANG Xin-li](#)，[CHEN Yong](#)，[HAN Feng-mei](#)
作者单位：[湖北大学中药生物技术省重点实验室, 湖北, 武汉, 430062](#)
刊名：[中草药](#) **ISTIC** **PKU**
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年，卷(期)：2008, 39 (9)
被引用次数：1次

参考文献(6条)

1. [郑虎](#) [药物化学](#) 2005
2. [苑华](#); [王焱](#); [刘云](#) [山莨菪碱的药理研究进展](#) [期刊论文] - [现代中西医结合杂志](#) 2004 (16)
3. [詹丽芝](#); [王瑛珏](#) [血药浓度法与毒效学方法测定山莨菪碱药动力学参数的比较](#) 1989 (04)
4. [詹丽芬](#); [张玉芝](#); [赫梅生](#) [用小鼠急性死亡事法测定山莨菪碱的表现药动力学参数](#) [期刊论文] - [中国药理学与毒理学杂志](#) 1987 (03)
5. [马鹏](#) [胶束液相色谱法测定山莨菪碱的血药浓度和药代动力学参数](#) 1992 (10)
6. [周宏兵](#); [何新](#) [高效液相色谱法测定家兔血清中盐酸山莨菪碱含量](#) [期刊论文] - [色谱](#) 1996 (01)

本文读者也读过(10条)

1. [刘兴超](#), [杨丽](#), [王学娅](#), [徐海燕](#), [赵怀清](#), [LIU Xing-chao](#), [YANG Li](#), [WANG Xue-ya](#), [XU Hai-yan](#), [ZHAO Huai-qing](#) [大鼠血浆中野黄芩苷的HPLC测定及其药动力学研究](#) [期刊论文] - [中国医药工业杂志](#) 2007, 38 (7)
2. [韩凤梅](#), [王新立](#), [陈勇](#) [高效液相色谱串联电喷雾质谱法测定大鼠血浆中山莨菪碱](#) [会议论文] - 2007
3. [张莉](#), [黄熙](#), [任平](#), [黄敬群](#), [王骊丽](#), [潘远江](#) [三维HPLC法同步测定犬血浆中的葛根素及阿魏酸](#) [期刊论文] - [沈阳药科大学学报](#) 2001, 18 (1)
4. [何盛江](#), [宋力](#), [栾立标](#) [RP-HPLC法测定大鼠血浆中苦参碱的含量](#) [期刊论文] - [中草药](#) 2004, 35 (9)
5. [吴建红](#), [李汉鑫](#), [吴嫦](#), [Wu Jianhong](#), [LI Hanxin](#), [WU Chang](#) [HPLC法测定导赤散及配伍组血浆中马兜铃酸A含量](#) [期刊论文] - [湖北中医药大学学报](#) 2010, 12 (4)
6. [祝晨](#), [郑志华](#), [陈知良](#), [梁曦](#) [HPLC/MS法测定大黄酸在大鼠的血药浓度](#) [期刊论文] - [中药材](#) 2002, 25 (9)
7. [陈小陆](#), [任斌](#), [李磊](#), [吴喜英](#), [陈孝](#) [HPLC测定人血浆中山莨菪碱的浓度](#) [会议论文] - 2008
8. [胡晓炜](#), [Hu Xiaowei](#) [超高效液相色谱法检测西红花中非法添加的染料金橙 II](#) [期刊论文] - [中国药业](#) 2011, 20 (14)
9. [朱孝芹](#), [臧亚如](#), [张欢](#), [刘翠哲](#), [ZHU Xiao-qin](#), [ZANG Ya-ru](#), [ZHANG Huan](#), [LIU Cui-zhe](#) [家兔血浆中北豆根碱的高效液相色谱法测定及药动力学研究](#) [期刊论文] - [时珍国医国药](#) 2008, 19 (3)
10. [廖正根](#), [梁新丽](#), [蒋且英](#), [平其能](#), [LIAO Zheng-gen](#), [LIANG Xin-li](#), [JIANG Qie-ying](#), [PING Qi-neng](#) [HPLC测定灌胃桂枝茯苓胶囊后Beagle犬血浆中的丹皮酚及其药物动力学研究](#) [期刊论文] - [华西药学杂志](#) 2007, 22 (6)

引证文献(1条)

1. [童俊](#), [韩凤梅](#), [陈勇](#) [荧光猝灭法研究马钱子碱、土的宁与人血清白蛋白的相互作用](#) [期刊论文] - [中草药](#) 2010 (9)

本文链接：http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200809012.aspx