

液相色谱-串联质谱法测定大鼠血浆中福斯克林

郭继芬¹ 陆兵² 孟繁华¹ 赵毅民^{* 1}¹(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850) ²(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 建立了测定大鼠血浆中福斯克林的液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)。血浆样品经液-液萃取后,以 $V(\text{甲醇}):V(10\text{ mmol/L 醋酸铵}):V(\text{甲酸}) = 75:25:0.1$ 为流动相,用 Hypersil ODS 柱分离,流速 0.8 mL/min (柱后分流 50%),通过电喷雾离子化四极杆串联质谱,以多反应监测方式(MRM)检测。用于定量分析的离子分别为 m/z 428/375(福斯克林)和 m/z 494/369(格列本脲,内标)。福斯克林血浆浓度测定方法的线性范围为 $0.8\sim 800\ \mu\text{g/L}$; 日内、日间精密度(RSD)均小于 10%; 准确度(RE)小于 $\pm 9\%$ 。每个样品测试时间 4.5 min 。应用此法测试了大鼠口服或静注福斯克林后的血药浓度。

关键词 福斯克林, 液相色谱-串联质谱法, 药代动力学

1 引言

福斯克林(forskolin)是从热带植物毛喉鞘蕊花中提取分离出的一种二萜类化合物^[1, 2](结构式见图 1A 插图)。药理学实验表明,福斯克林具有扩张血管、增强心肌收缩力、降低血压、抗炎、抗肿瘤等活性^[3, 4]。福斯克林的测定方法有高效液相色谱法(HPLC)^[5, 6]和酶联免疫法(ELISA)^[7]等。但这些分析方法主要集中在体外分析方面,目前尚未见有关福斯克林体内药代动力学方面的研究报道。为了研究该化合物在动物体内的药代动力学特性,本实验建立了测定大鼠血浆中福斯克林浓度的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法,测定了 8 只雄性大鼠口服或静脉注射给予福斯克林后的血药浓度。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

API 3000 液相色谱-质谱-质谱联用仪(美国应用生物系统公司),配有 Turbo Ion Spray 离子化源及 Analyst 1.1 数据处理系统; Agilent 1100 四元梯度泵和自动进样器(美国安捷伦公司)。

福斯克林原料药由北京曼海斯生物技术开发有限公司提供; 格列本脲(内标)购自中国药品生物制品检定所; 甲醇、叔丁基甲醚为色谱纯(美国 Fisher 公司); 水为 Millipore 去离子水; 其它试剂均为分析纯。

Wistar 大鼠, 雄性, 体重为 $(200 \pm 20)\text{ g}$ 由军事医学科学院实验动物中心提供, 实验前禁食 12 h。

2.2 LC-MS/MS 分析条件

液相色谱条件: Hypersil ODS 色谱柱 $(150\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}, 5\ \mu\text{m})$; 流动相为 $V(\text{甲醇}):V(10\text{ mmol/L 醋酸铵}):V(\text{甲酸}) = 75:25:0.1$, 流速为 0.8 mL/min (柱后分流 50%); 柱温为室温 $(25\ ^\circ\text{C})$ 。

质谱检测条件: 离子源为 ESI 源; 喷射电压为 4500 V ; 离子源温度为 $300\ ^\circ\text{C}$; 干燥气(N_2)的流速为 5.5 L/min 正离子方式检测; 扫描方式为多反应监测(MRM), 用于监测的离子为 m/z 428/375(福斯克林), m/z 494/369(格列本脲, 内标)。

2.3 血浆样品处理

取大鼠血浆样品 0.2 mL 置带塞玻璃试管中, 依次加入内标溶液 $(800\ \mu\text{g/L}$ 格列本脲) $50\ \mu\text{L}$, 流动相溶液 $50\ \mu\text{L}$ 。混匀后, 加入提取溶剂叔丁基甲醚 2 mL , 涡流 3 min , 离心 10 min (3000 r/min), 分取有机相于 $40\ ^\circ\text{C}$ 氮气流下吹干。残余物用 $100\ \mu\text{L}$ 70% 甲醇溶解后, 进样 $20\ \mu\text{L}$ 。

3 结果与讨论

3.1 分析方法的选择

2008-07-24 收稿; 2008-10-21 接受

本文系国家自然科学基金(N_o 30672508)和北京市自然科学基金(N_o 7072061)资助项目

* E-mail: zhaoyan@nic.hmi.ac.cn

在本实验中曾对含有甲醇-水或乙腈-水的多种流动相体系进行了比较,在在 $V(\text{甲醇}):V(\text{水}):V(\text{甲酸}) = 75:25:0.1$ 的流动相体系中,福斯克林的质谱响应较强,但内标峰拖尾。将流动相中的水换为等体积的醋酸铵缓冲液时,福斯克林的信号响应未见变化,而内标峰形得到改善。

在甲醇-水-甲酸的流动相体系中,在正离子检测模式下,福斯克林一级全扫描质谱中的基峰为 $[M + Na]^+$ (m/z 433),而以 $[M + Na]^+$ 为母离子进行二级质谱分析时,很难获得碎片离子。在含有醋酸铵缓冲液的流动相体系中,福斯克林一级全扫描质谱中的基峰为 $[M + NH_4]^+$ (m/z 428),以 $[M + NH_4]^+$ 为母离子进行二级质谱分析时产生的碎片离子与 $[M + H]^+$ 峰 (m/z 411) 的碎片离子相一致(图 1A)。在 MRM 扫描方式下,比较 m/z 428/375 和 m/z 411/375 的色谱峰面积,发现前者的信噪比约为后者的 2 倍,因此,选取 m/z 428/375(脱去一分子氨和两分子水)作为监测的离子。图 1B 为内标格列本脲 $[M + H]^+$ 准分子离子 m/z 494 的二级全扫描质谱图,生成的主要碎片离子 m/z 369 用于定量分析。

本研究考察了叔丁基甲醚、乙酸乙酯、乙醚-二氯甲烷 (2:1 V/V) 等多种提取溶剂,发现叔丁基甲醚的提取回收率高于其它溶剂,而且提取率比较稳定。而酸化或碱化试剂对提取率影响不大,所以本实验最后确定用 2 mL 叔丁基甲醚直接提取血浆样品。由于采取了液-液萃取的提取方法,有效避免了基质效应。

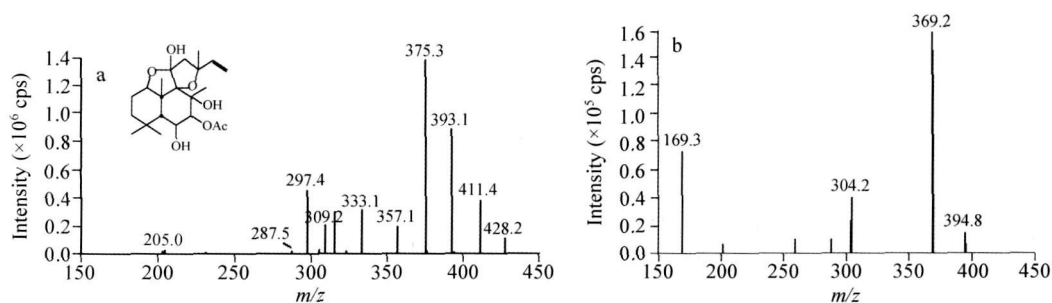


图 1 福斯克林 (A) 和内标格列本脲 (B) 的二级质谱图

Fig 1 Product ion mass spectra of (A) forskolin and (B) glibenclamide (internal standard, IS)

3.2 方法的专属性

分别取 6 只大鼠空白血浆 0.2 mL,按 2.3 节操作,进行 HPLC-MS/MS 分析,获得空白血浆样品的色谱图(图 2A);将一定浓度的福斯克林标准溶液和内标溶液加入空白血浆中,得色谱图 2B。取大鼠给药后收集的血浆样品,得色谱图 2C。结果表明,空白血浆中内源性物质不干扰福斯克林及内标的测定。

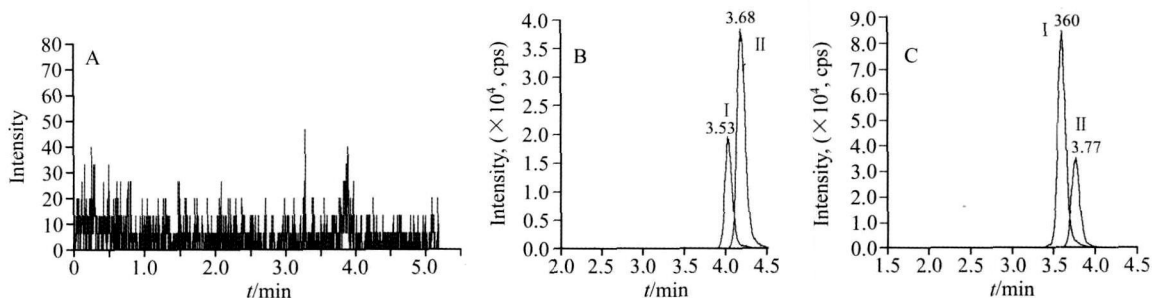


图 2 福斯克林和格列本脲(内标)在多反应监测(MRM)扫描方式下的 HPLC-MS/MS 色谱图

Fig 2 Representative MRM chromatograms of forskolin (I) and IS (II) in rat plasma

A. 空白血浆 (a blank rat sample); B. 含有 40.0 $\mu\text{g/L}$ 福斯克林和内标的空白血浆 (a sample spiked with forskolin (40 $\mu\text{g/L}$) and IS); C. 灌胃给予 20 mg/kg 福斯克林后 3.0 h 的血浆样品 (a plasma sample from a rat 3 h after an oral administration of 20 mg/kg forskolin). 峰 I (peak I): 福斯克林 (forskolin); 峰 II (peak II): 格列本脲 (glibenclamide) (内标, IS)。

3.3 标准曲线和线性范围

取空白血浆 0.2 mL,加入福斯克林标准系列溶液 50 μL ,配制成福斯克林浓度为 0.8, 1.6, 4.0, 16, 40, 160, 400 和 800 $\mu\text{g/L}$ 的血浆样品,除不加入 50 μL 流动相外,按 2.3 节操作,建立标准曲线。以待测物浓度为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标,用加权最小二乘法进行回归运算,得福斯克林线性回归方程为 $y = 0.0129x + 0.00447$, $r = 0.9969$ 。根据标准曲线,福斯克林的线性范围为 0.8~800 $\mu\text{g/L}$ 。

3.4 精密度与准确度

取空白血浆 0.2 mL, 按 3.3 节操作, 制备福斯克林的质量控制 (QC) 样品 1.6、16、160 和 800 μg/L, 每一浓度分析 6 个样本, 连续进行 3 d 并与标准曲线同时进行, 计算 QC 样品的测得浓度, 将 QC 样品的结果进行方差分析^[8], 求算本法的精密度与准确度, 结果见表 1。

3.5 提取回收率和样品稳定性考察

取空白血浆 0.2 mL, 按 3.3 节方法制备低、中、高 (1.6、60 和 800 μg/L) 3 个浓度的样品; 同时另取空白血浆 0.2 mL, 除不加标准系列溶液和内标外, 按 2.3 节操作, 向获得的上清液中加入相应浓度的标准溶液和内标各 50 μL, 涡流混合, 40 °C 氮气流下吹干。残余物用 100 μL 70% 甲

表 1 血浆中福斯克林 HPLC-MS/MS 测定方法的准确度与精密度
Table 1 Accuracy and precision for the analysis of forskolin in rat plasma

浓度 Concentration (mg/L)	加入值 Added	测得值 Found	RSD(%, n=18)		相对偏差 Relative error (% , n=18)
			日内精密密度 Intra-day	日间精密密度 Inter-day	
1.60	1.63	1.63	8.0	8.1	2.0
16.0	17.2	17.2	6.6	5.9	7.7
160	168.7	168.7	6.0	7.6	5.4
800	733.0	733.0	5.5	9.0	-8.4

醇溶解后, 进样分析, 获得相应峰面积。提取后的峰面积与之相比, 根据比值计算提取回收率 (绝对回收率)。3 种浓度下福斯克林的提取回收率分别为 58.1%、62.9% 和 60.3%。

结果表明, 福斯克林血浆样品室温放置 2 h 内稳定 (RSD 小于 4.5%), 经历 3 次冷冻-解冻循环后稳定 (RSD 小于 3.3%), 处理后的血浆样品室温放置 24 h 内稳定 (RSD 小于 8.9%)。

3.6 基质效应考察

取 6 只大鼠的空白血浆 0.2 mL, 除不加内标外, 按 2.3 节操作, 向吹干后的残留物中加入低、中、高 3 个浓度 (1.6、160 和 800 μg/L) 的标准溶液 100 μL, 进行 HPLC-MS/MS 分析, 获得相应峰面积; 另取相应浓度的标准溶液 100 μL, 进行 HPLC-MS/MS 分析, 获得相应峰面积, 提取后的峰面积与之相比, 比值计算基质效应。结果比值均在 85% ~ 115% 之间, 表明不存在明显的基质效应。

3.7 分析方法在药动学研究中的应用

8 只雄性 Wistar 大鼠随机分成两组, 分别灌胃 (20 mg/kg) 或尾静脉注射 (5 mg/kg) 福斯克林。灌胃给药大鼠, 分别于给药前和给药后 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0 和 12.0 h 于大鼠眼底静脉丛采血 0.5 mL; 静脉注射给药大鼠, 分别于给药前和给药后 2 min、10 min、30 min、1.0 h、2.0 h、4.0 h、6.0 h、8.0 h 及 12.0 h 于眼底静脉丛采血 0.5 mL, 肝素抗凝, 离心 10 min (3000 r/min), 分离出血浆, 于 -20 °C 冷冻保存待测。

8 只雄性大鼠口服和静注福斯克林后的平均血药浓度-时间曲线见图 3。主要药代动力学参数见表 2。

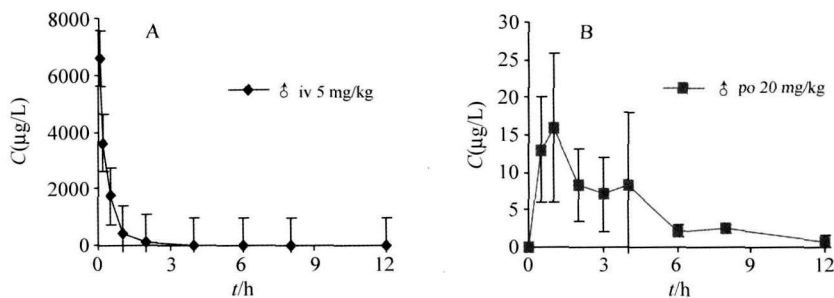


图 3 雄性大鼠静脉注射 (A) 和口服 (B) 福斯克林后的平均血药浓度-时间曲线

Fig 3 Mean plasma concentration-time curves of forskolin in male rat after (A) an intravenous dose of 5 mg/kg and (B) an oral dose of 20 mg/kg forskolin (mean ± SD, n = 4)

在大鼠血浆样品测定过程中, 每天建立一条标准曲线, 同时配制低、中、高 (双样本) 的 QC 样品, 实际血浆样品测定按 2.3 节操作并检测。主要药代动力学参数达峰浓度 (C_{max}) 和达峰时间 (t_{max}) 为实测值; 以半对数作图法, 由消除相末端的浓度点计算消除速率常数 (K_e), 消除半衰期为 $t_{1/2} = 0.693/K_e$ 。采用梯形法计算血药浓度-时间曲线下面积 AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_t/K_e$ 。由受试大鼠分别口服与静注福斯克林的 $AUC_{0-\infty}$, 经剂量校正, 计算出口服给药后的绝对生物利用度 (F), D 为给药剂量。

$$F = \frac{AUC_{口服}}{AUC_{静注}} \times \frac{D_{静注}}{D_{口服}} \times 100\%$$

表 2 雄性大鼠静注和口服福斯科林后的药代动力学参数

Table 2 Pharmacokinetic parameters of forskolin in male rat after an intravenous dose of 5 mg/kg and an oral dose of 20 mg/kg forskolin (mean \pm SD, $n = 4$)

药理学参数 Parameter	静脉给药 (5 mg/kg) Intravenous dose	口服给药 (20 mg/kg) Oral dose	药理学参数 Parameter	静脉给药 (5 mg/kg) Intravenous dose	口服给药 (20 mg/kg) Oral dose
C_{max} (μ g/L)	6593.33 \pm 700.38	1608 \pm 9.91	$t_{1/2}$ (h)	2.28 \pm 0.61	2.50 \pm 0.98
t_{max} (h)	NA	0.83 \pm 0.29	K_e	0.32 \pm 0.07	0.31 \pm 0.14
AUC _{0-t} (μ g \cdot h/L)	2927.21 \pm 486.54	59.68 \pm 37.05	F (%)		0.53
AUC _{0-∞} (μ g \cdot h/L)	2928.76 \pm 486.99	62.62 \pm 39.36			

对于静脉给药 C_{max} 以 C_0 值计算 (C_{max} was calculated from C_0 in intravenous dose); NA: 不适用 (not suitable).

References

- Geng Shuo(耿 硕), Sun Bo(孙 波), Wang Jing-Ze(王敬泽). *J. Hebei Normal University*. (河北师范大学学报), **2006**, 30(6): 702~705
- Saleem A M, Dhasan P B, Rafiullah M R. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1101(1-2): 313~314
- Duamu De-Qiang(端木德强), Li Zhong-Hai(李中海), Wang Jing-Ze(王敬泽). *J. Shaanxi Normal University* (陕西师范大学学报), **2002**, 30(3): 96~100
- Wang Cong-Rong(王从容), Gu Li-Yan(顾丽燕), Liu Ya-Bing(刘亚兵), Wang Chun-Yong(王春勇), Liang Wei(梁 巍). *J. Beijing University of Physical Education*. (北京体育大学学报), **2000**, 23(3): 330~331
- Schaneberg B T, Khan I A. *Pharmazie*, **2004**, 59(11): 819~823
- Schaneberg B T, Khan I A. *J. Aoac Int*, **2003**, 86(3): 467~470
- Yanaqihara H, Sakata R, Shoyan A Y, Murakami H. *Planta Med.*, **1996**, 62(2): 169~172
- Kames H T, March C. *J. Pharm. Res.*, **1993**, 10(10): 1420~1426

Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometric Assay for the Determination of Forskolin in Rat Plasma

GUO Ji-Fen¹, LU Bing², MENG Fan-Hua¹, ZHAO Yi-Min¹¹(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)²(Institute of Bioengineering, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Abstract A rapid sensitive and specific high performance liquid chromatography tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) method was developed for the determination of forskolin in rat plasma. Forskolin and internal standard, glibenclamide, were extracted from rat plasma using liquid-liquid extraction, then separated on a Hypersil ODS column (150 mm \times 4.6 mm i.d., with 5 μ m particle size). The mobile phase consisted of methanol-10 mmol/L ammonium acetate-formic acid (75:25:0.1), at a flow-rate of 0.8 mL/min. An API 3000 tandem mass spectrometer equipped with electrospray ionization source was used as detector and was operated in the positive ion mode. Multiple reactions monitoring (MRM) mode with the transitions of m/z 428/375 and m/z 493/369 was used to quantify forskolin and internal standard, respectively. A limit of quantification 0.8 μ g/L for forskolin was achieved in rat plasma. The chromatographic run time was 4.5 min and the weighted ($1/x^2$) calibration curve was linear in the range from 0.8 to 800 μ g/L for forskolin. The intra- and inter-day precision was measured to be below 10%. The relative error was within $\pm 9\%$. From the intra- and inter-day precision and accuracy, the present method satisfies the accepted criteria for bioanalytical method validation. The method is shown to be suitable for investigation of forskolin pharmacokinetics.

Keywords Forskolin, liquid chromatography tandem mass spectrometry, pharmacokinetics

(Received 24 July 2008; accepted 21 October 2008)