

稳定同位素编码衍生-分散液液微萃取-超高效液相色谱-三重四极杆质谱检测大鼠脑微透析液中左旋多巴和多巴胺

亓伟梅¹, 赵先恩^{2*}, 亓永¹, 孙志伟², 陈光², 尤进茂^{2,3*}, 索有瑞³

(1. 莱芜职业技术学院化工教研室, 山东 莱芜 271100; 2. 山东省生命有机分析重点实验室, 山东省高校绿色天然产物与医药中间体重点实验室, 曲阜师范大学化学与化工学院, 山东 曲阜 273165; 3. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001)

摘要 帕金森病 (PD) 大鼠脑微透析液中左旋多巴 (L-DOPA) 和多巴胺 (DA) 的高灵敏检测技术, 是 PD 相关的临床医学及 L-DOPA 减毒增效协同药物筛选必不可少的手段。采用 d_0/d_3 -10-甲基-吡啶酮-2-磺酰氯 (d_0/d_3 -MASC) 作为稳定同位素编码衍生试剂, 联合超声波辅助-分散液液微萃取 (UA-DLLME) 技术, 建立并验证了超高效液相色谱-串联质谱 (UHPLC-MS/MS) 快速检测 L-DOPA 和 DA 的分析方法。分别使用 d_0 -MASC 和 d_3 -MASC 衍生微透析液样品和混合对照品, 将衍生溶液混合后采用 UA-DLLME 技术富集净化, 继而进行 UHPLC-MS/MS 检测 (多反应监测模式), 以 d_3 -MASC 衍生物作为 d_0 -MASC 衍生物的内标物进行定量。实验表明, 在乙腈/水 (pH 10.8 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液) 溶液中 37 °C 下反应 3.0 min 后衍生化反应完成, 梯度洗脱条件下 2.0 min 可完成分离检测, 线性范围为 0.20 ~ 1 500.0 nmol/L, 相关系数大于 0.994, L-DOPA 和 DA 的检出限 ($S/N=3$) 分别为 0.005 和 0.009 nmol/L。分析方法评价结果良好, 与已报道方法相比在灵敏度、分析速度和抗基质干扰等方面具有优势, 本方法已成功应用于测定中药方剂首乌方对 PD 大鼠脑微透析液中 L-DOPA 和 DA 浓度波动的影响。

关键词 大鼠活体微透析; 质谱增敏分析; 超高效液相色谱; 首乌方; 药物筛选; 帕金森病

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713 (2015) 09-0981-07

Determination of L-dopa and dopamine in rat brain microdialysate by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using stable isotope-coded derivatization coupled with dispersive liquid-liquid microextraction

QI Weimei¹, ZHAO Xian-en^{2*}, QI Yong¹, SUN Zhiwei²,
CHEN Guang², YOU Jinmao^{2,3*}, SUO Yourui³

(1. Chemical Department, Laiwu Vocational and Technical College, Laiwu 271100, China; 2. Shandong Provincial Key Laboratory of Life-organic Analysis, Key Laboratory of Pharmaceutical Intermediates and Analysis of Natural Medicine, College of Chemistry and Chemical Engineering, Qufu Normal University, Qufu 273165, China; 3. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

Abstract: The sensitive detection method of levodopa (L-DOPA) and dopamine (DA) in rat brain microdialysate of Parkinson's disease (PD) is an essential tool for the clinical study and attenuated synergistic drug screening for L-DOPA from traditional Chinese medicines. Using d_0/d_3 -10-methyl-acridone-2-sulfonyl chloride (d_0/d_3 -MASC) as stable isotope derivatization reagent, a novel ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) method was developed and validated for L-DOPA and DA by stable isotope-coded derivatization coupled with ultrasonic-assisted dispersive liquid-liquid microextraction (UA-DLLME). d_0 -MASC (light) and d_3 -MASC (heavy) were used as derivatization reagents for microdialysate samples and standards, respectively. Mixtures of the two solutions were

* 通讯联系人. Tel: (0537) 4458501, E-mail: xianenzhao@163.com (赵先恩); E-mail: jmyou6304@163.com (尤进茂).

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81303179).

收稿日期: 2015-04-28

prepared by UA-DLLME for UHPLC-MS/MS analysis with multiple reaction monitoring (MRM) mode. With d_3 -MASC heavy derivatives as internal standards for corresponding light derivatives from samples, the stable isotope internal standard quantification for L-DOPA and DA was carried out. The stable derivatives were obtained in aqueous acetonitrile (pH 10.8 sodium carbonate-sodium bicarbonate buffer) at 37 °C for 3.0 min, and then were separated within 2.0 min using gradient elution. Linear range was 0.20–1 500.0 nmol/L ($R > 0.994$). LODs were 0.005 and 0.009 nmol/L for DA and L-DOPA ($S/N = 3$), respectively. This method was validated, and it showed obvious advantages in comparing with the reported methods in terms of sensitivity, analysis speed and anti-matrix interference. This method has been successfully applied to the study of effect of Shouwu Fang on L-DOPA and DA concentration fluctuations in PD rat brain microdialysate.

Key words : rat in vivo microdialysis ; mass spectrometry sensitization analysis ; ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) ; Shouwu Fang ; drug screening ; Parkinson's disease (PD)

左旋多巴 (L-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA) 是多巴胺 (dopamine, DA) 体内合成的前体物质, 主要通过血脑屏障转运入脑, 经体内代谢转化为药效成分 DA, 从而发挥其“替代疗法”作用, 是目前临床方面改善帕金森病 (PD) 症状最有效的药物之一。但是, 长期使用 L-DOPA 疗效会降低且会给病人带来严重的副作用, 包括症状波动、运动障碍、开关反应及精神症状等, 给 PD 中晚期的治疗带来严重的困难。已有研究报道 L-DOPA 副作用的产生与其脑内浓度、所转化的 DA 浓度波动具有密切相关性^[1-3]。因此, 同时监测脑内 L-DOPA 和 DA 浓度的动态变化, 能够为提高 L-DOPA 对 PD 的临床疗效以及药物筛选提供重要依据。

已报道的 L-DOPA 和 DA 的检测方法有荧光光度法、化学发光法、电化学法、HPLC、CE、LC-MS 等^[4-6]。因为脑微透析液样本量少、L-DOPA 和 DA 含量低且基质复杂, 直接检测时荧光或质谱响应信号弱。衍生化 LC-MS/MS 法因其选择性、灵敏度、抗基质干扰、多成分同时检测等优势成为一类重要方法^[4, 7-10]。最近, 稳定同位素衍生化 LC-MS/MS 法相继被报道, 结果表明其具有较好的灵敏度和抗基质干扰能力^[11-15]。同时, 超声辅助-分散液液微萃取 (ultrasonic-assisted dispersive liquid-liquid microextraction, UA-DLLME) 联合衍生化的样品前处理技术已在分析化学的交叉学科研究中展现出明显的优势^[16-19]。

本文采用 d_0/d_3 -10-甲基-吡啶酮-2-磺酰氯 (d_0/d_3 -MASC) 作为稳定同位素衍生化试剂^[13], 联合 UA-DLLME 技术, 建立并验证了帕金森病大鼠脑微透析液中 L-DOPA 和 DA 的超高效液相色谱-三重

四极杆质谱 (UHPLC-MS/MS) 检测方法, 为左旋多巴的临床疗效及减毒增效药物筛选提供了一种良好的技术手段, 具有活体、连续、灵敏、快速、准确等特点。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

美国 Waters Xevo TQ 三重四极杆质谱仪 (Waters 公司); 瑞典 CMA 微透析取样系统, 包括 CMA 402 双通道微透析泵、MAB85 双通道冷却收集器、MAB6 脑探针及导引管, 以及动物五通道清醒活动装置 (美国 Instech 公司); 动物手术设备: CMA450 动物体温控制器、美国 ASI SAS-4100 单臂脑立体定位仪、颅钻 (深圳沃瑞德科技有限公司); BS 110S 分析天平 (北京赛多利斯有限公司); Milli-Q 超纯水仪; Eppendorf 5810R 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); 超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司); XW-80A 漩涡混匀器 (上海精科实业有限公司); 雷兹 pH 计。

L-DOPA 和 DA (Sigma 公司); 乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯 (Sigma 公司); 碳酸钠、碳酸氢钠等为分析纯; 同位素衍生化试剂 d_0/d_3 -MASC (纯度 99%) 自主合成^[13], 水为 Millipore 纯水系统制备。

1.2 溶液配制

按实验要求称取适量 d_0/d_3 -MASC, 用乙腈配成 1.0×10^{-3} mol/L 的溶液。分别称取适量 L-DOPA 和 DA 标准品, 用 50% (v/v) 乙腈水溶液配成 0.01 mol/L 储备液, 稀释得系列工作液。Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液 (0.1 mol/L) 经纯水配制后用 NaOH 溶液精密调节 pH 至 10.8。

1.3 活体大鼠脑微透析取样及动物分组

雄性 SD 大鼠 (200 ~ 220 g), 购自山东鲁抗医药有限公司实验动物中心, 动物手术、PD 动物模型和微透析探针手术技术按照王丹巧研究组^[3]报道的方法开展实验, 脑内注射 6-羟基多巴胺 (6-OH-DA) 造模, 分为正常组、PD 模型组、PD+L-DOPA 组、PD+L-DOPA+首乌方高剂量组 (PD+L-DOPA+high SWF, 生药量 18 g/(kg·d)), PD+L-DOPA+首乌方低剂量组 (PD+L-DOPA+low SWF, 生药量 8 g/(kg·d)), 每组 6 只。微透析灌注速度 2.0 μL/min, 平衡 60 min 后开始收集透析液, 每 15 min

自动收集 1 管用于后续检测。

1.4 同位素编码衍生

在 1.5 mL 离心管中加入 100 μL d₀-MASC 溶液、适量混合标准溶液 (或大鼠脑微透析液样本, 20 ~ 50 μL)、100 μL Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液, 混匀后 37 °C 下恒温衍生反应 3.0 min 即可完全标记, 加入 10 μL 25% (v/v) 甲酸水溶液调 pH 至弱酸性。在第二支离心管中, 采取同样的方式, 用 d₃-MASC 标记另一份混合标准溶液或微透析液样品, 标记流程示意图见图 1。

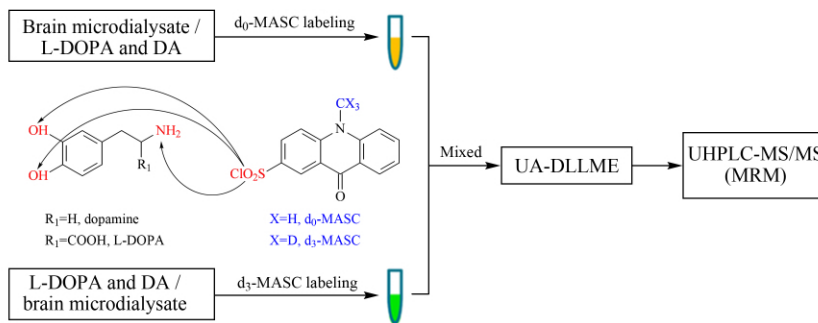


图 1 L-DOPA 和 DA 的稳定同位素编码衍生和分散液液微萃取示意图
Fig. 1 Procedure scheme of stable isotope-coded derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction of L-DOPA and DA

1.5 超声辅助-分散液液微萃取

将上述两支离心管中的标记产物合并至一支 10 mL 尖底离心管中, 加水至 8 mL, 以 400 μL 甲醇为分散剂, 160 μL 氯仿为萃取剂, 室温下超声振荡萃取 3.0 min, 10 000 r/min 高速离心 3.0 min, 吸取下层有机相, 氮吹至干, 50% (v/v) 甲醇水复溶后用于检测。

1.6 色谱-质谱条件

色谱柱为 UPLC BEH Shield RP 18 柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm, Waters 公司)。流动相 A 为甲

醇, 流动相 B 为 0.1% (v/v) 甲酸水溶液。梯度洗脱条件: 0 ~ 2.0 min, 65% A ~ 100% A。流速 0.5 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 5 μL。采用三重四极杆质谱的多反应监测 (MRM) 模式, 电喷雾电离 (ESI) 源正离子模式, 离子源温度 150 °C, 毛细管电压 3.0 kV, 脱溶剂气 (氮气) 流速 800 L/h、温度 350 °C, 锥孔气 (氮气) 流速 50 L/h, 碰撞气 (氮气) 流速 0.16 mL/min, 锥孔电压、碰撞能、定量和定性离子对参数见表 1。

表 1 L-DOPA 和 DA 的 d₀/d₃-MASC 衍生物的质谱 MRM 采集参数

Table 1 Conditions of d₀/d₃-MASC derivatives of L-DOPA and DA in mass spectrometric MRM analysis

Compound	Retention time/min	Cone voltage/V	Quantitation transition (m/z) (collision energy/eV)	Confirmation transition (m/z) (collision energy/eV)
d ₀ -MASC-L-DOPA	0.896	58	1011.35>208.10 (S4)	1011.35>224.25 (S6)
d ₃ -MASC-L-DOPA	0.896	58	1020.35>211.10 (S4)	1020.35>227.25 (S6)
d ₀ -MASC-dopamine	1.322	55	967.34>208.10 (S2)	967.34>224.25 (S4)
d ₃ -MASC-dopamine	1.322	55	976.34>211.10 (S2)	976.34>227.25 (S4)

1.7 定量方式

参考许国旺研究组^[20]和本研究组^[15]的同位素编码标记定量法: 两份等浓度混合标准溶液分别用 d₀-MASC 和 d₃-MASC 标记, 将两份衍生溶液按体积比 1/10、1/5、1/2、1/1、2/1、5/1、10/1 混合之后进

行 UHPLC-MS/MS 分析, 以轻/重衍生化产物的质谱峰面积比值对体积比值进行线性回归曲线制作, 获得轻/重衍生物的相对响应因子。微透析液和适宜浓度的标准溶液经轻/重编码标记后, 按一定比例混合之后进行 UHPLC-MS/MS 分析, 利用相对响应

因子计算微透析液中两种分析物的含量。

2 结果与讨论

2.1 色谱-质谱条件的优化

L-DOPA 和 DA 分子本身极性强,采用直接 LC-MS 检测时色谱保留弱、分离度较差,采用本研究实验部分梯度洗脱条件时,二者的保留时间均小于 0.5 min。采用 MASC 衍生化技术,能够显著改善二者在反相色谱柱上的保留行为。经优化不同色谱柱(Agilent 公司的 Eclipse、Zorbax 系列的 50、100 mm 长的超高效液相色谱柱,以及 Waters BEH 系列的 50 mm 超高效液相色谱柱)和流动相条件(甲醇、乙腈、水相是否有甲酸调节剂),发现酸性的甲醇/水体系配合 Waters UPLC BEH Shield RP 18 超高效液相色谱柱有较好的分离效果。如要在 1.0 min 左右完成分离检测,两种分析物的峰形、分离度欠佳,影响定量准确度。进一步优化梯度洗脱程序,当采用 1.6 节中梯度洗脱程序时,L-DOPA 和 DA 衍生物在 2.0 min 内实现了完全分离,峰形良好,保留时间见表 1。经实验对比发现,正离子模式的灵敏度显著高于负离子模式。在正离子模式下,发现毛细管电压在 1.2~3.0 kV 内逐渐增加时检测信号逐渐增强,实验选用 3.0 kV。质谱仪脱溶剂气流速和温度影响不明显,采用脱溶剂气流速 800 L/h、温度 350 °C 能获得较好的实验结果。采用实验部分的质谱条件,优化了两种衍生产物的 MRM 参数(见表 1)。L-DOPA 和 DA 衍生物都能特异性地产生 208.10 Da (重标 211.10 Da)的产物离子,在酸性乙腈/水流动相体系中,该产物离子结构通过酮式-烯醇式互变,极易产生带一个正电荷的季铵型结构,因此产生 L-DOPA 和 DA 吡啶酮衍生物的质谱增敏结果。代表性的 d_0 -MASC-L-DOPA 衍生物的 MS/MS 图、裂解模式及质谱增敏产物离子见图 2。

2.2 衍生条件的优化

采用 MASC 试剂标记 L-DOPA 和 DA 分子中的氨基和酚羟基,该衍生化反应的主要影响因素包括缓冲溶液 pH、衍生化温度、时间、衍生化试剂倍数。参照以往 MASC 衍生化环境雌激素分子中酚羟基基团的方法与条件^[13]进行单因素法优化。首先考察缓冲液 pH 在 8.0~11.0 范围内对衍生反应的影响,pH 8.0~9.0 时目标衍生化产物的仪器信号极低,pH>9.0 时信号随 pH 增大而逐渐提高,pH 10.8 时达到最大值,之后仪器信号下降,这可能是由于强碱性导致衍生试剂和衍生物的分解更甚。因此实验选用 pH 10.8 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液。同样考

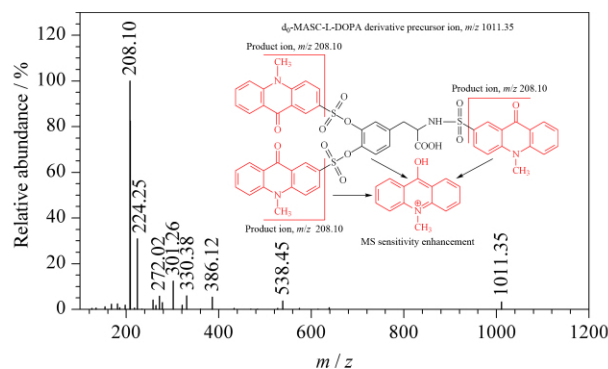


图 2 d_0 -MASC-L-DOPA 的 MS/MS 图、特异性产物离子裂解模式及 MS 增敏机理

Fig. 2 MS/MS spectrum, specific fragmentation scheme and MS sensitivity enhancement mechanism of d_0 -MASC-L-DOPA

察 MASC 用量、衍生时间、温度变化规律。随 MASC 用量增加,衍生物的仪器信号逐渐增大;当 MASC 用量为两种分析物总物质的量的 8 倍时仪器信号最高。在衍生时间和温度方面,37 °C 下衍生 3 min 产物的信号最大。总之,实验最佳衍生化条件为:Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液 (pH 10.8),37 °C 下衍生反应 3 min,MASC 物质的量为两种分析物总量的 8 倍。

2.3 UA-DLLME 条件的优化

UA-DLLME 实验的主要影响因素包括萃取剂、分散剂的种类、用量以及超声时间。经实验优化发现,萃取剂、分散剂的种类和用量是影响萃取效率的最重要因素。选取 5 种萃取剂(氯苯、二氯乙烷、四氯化碳、三氯甲烷、二氯甲烷)和 4 种分散剂(甲醇、乙醇、乙腈、丙酮)进行分别交叉组合考察。实验结果表明,三氯甲烷作为萃取剂、甲醇作为分散剂时,不但易于离心分层,而且沉积相中萃取物的仪器响应信号最高,且分析方法回收率较好。因此,实验选择三氯甲烷作为萃取剂,甲醇作分散剂。考察萃取剂和分散剂的用量,当三氯甲烷 160 μL、甲醇 400 μL 时,沉积相中萃取物的仪器信号响应值最高。采用以上最佳条件进行超声萃取时间的优化,发现超声振荡 3.0 min 可获得最高的仪器响应值。采用以上优化条件进行一次 UA-DLLME 后,吸净下层沉积相,再对上层溶液重复进行一次 UA-DLLME 和检测,未检出 L-DOPA 和 DA 衍生物。实验结果表明,建立的 UA-DLLME 条件对 L-DOPA 和 DA 衍生物的萃取效率满足分析方法要求。

2.4 分析方法的评价

2.4.1 线性关系、检出限及定量限

采用优化的衍生化、UA-DLLME 和色谱-质谱

分析条件及定量方式,在 0.20 ~ 1 500.0 nmol/L 浓度范围内进行线性回归曲线制作 L-DOPA 和 DA 衍生物的线性回归系数大于 0.994,线性关系良好。L-DOPA、DA 的检出限 ($S/N = 3$) 分别为 0.005、0.009 nmol/L,定量限 ($S/N = 10$) 分别为 0.020、0.036 nmol/L。

2.4.2 稳定性、精密度和准确度

在上述实验条件下,在 PD 症大鼠脑微透析液中加标浓度分别为 0.10、10.0 nmol/L 时制备 MASC 的衍生物,用于稳定性、精密度及准确度的考察。上述两个浓度水平的混合标准 MASC 衍生化产物溶液在室温下放置 7 天,分别于第 1、3、5、7 天测定峰面积,计算峰面积的 RSD,在 4.1% ~ 8.9% 之间,表明 L-DOPA 和 DA 的 MASC 衍生产物稳定性良好,能够满足实验要求。同一日内连续进样 5 次、连续 3 日每日进样 5 次分别用于日内和日间精密度、准确度的考察,峰面积的 RSD 为 3.0% ~ 9.1% 精密度良好,添加物的检出浓度和理论浓度比值在 89.5% ~ 104.9% 之间,准确度良好。

2.4.3 基质效应和回收率

考察 PD 症大鼠脑微透析液在 0.10、10.0 nmol/L 加标水平下的回收率,结果为 94.8% ~ 103.8% 表明方法回收率良好。按照 (微透析液中添加的 L-DOPA 或 DA 质谱检测峰面积/纯水中等量添加物峰面积) × 100% 计算基质效应,结果为 97.5% ~ 103.8% 表明同位素编码衍生化与 DLLME 联合使用的方法具有良好的抗基质干扰能力。

2.5 方法比较

用本方法与神经递质分析方法领域的代表性研究^[7,10,20-22]进行比较。第一,与 2 种未经衍生的代表性的直接检测方法 HPLC-电化学法^[20]和亲水作

用色谱-质谱 (HILIC-MS/MS)^[21]相比,本方法中两种分析物的 LOD 是其 1/55 ~ 1/10 944,分析时间短 10 或 18 min。第二,与 3 种典型的衍生化 LC-MS/MS 检测方法相比,本方法的 LOD 是文献^[7,10]的 1/3 ~ 1/80,LOQ 是文献^[22]的 1/1 265,而且本方法的衍生化反应温度适合生物样本,衍生化时间缩短为原来的 1/8 ~ 1/20,分离时间与文献相当^[10,22]或更短^[7]。第三,在基质效应方面,用本方法与不采用同位素编码衍生技术 (具体方法如下:只使用 d_0 -MASC 衍生,UA-DLLME 和质谱分析基本条件与本方法相同,定量方式采用文献^[17]中常规的外标法)进行对比,结果表明,本方法基质效应的平均值为 98.9%、标准偏差为 3.4%,显著优于只用 d_0 -MASC 衍生的实验结果 (基质效应的平均值为 94.6%、标准偏差为 11.8%),这说明同位素编码衍生化联合 UA-DLLME 技术能够显著降低基质干扰。

2.6 首乌方对 PD 大鼠脑微透析液中 L-DOPA 和 DA 浓度的影响

王丹巧研究组^[3]采用 PD 大鼠模型考察了中药方剂首乌方协同的 L-DOPA 药代动力学,发现在以较小剂量 L-DOPA 发挥较大药效作用方面,中药方剂首乌方具有良好的协同作用,但该报道未同时检测 DA 浓度受到的影响。本文利用该动物模型,进一步考察高、低剂量的首乌方与 L-DOPA 同时使用时对大鼠脑内纹状体 L-DOPA 和 DA 浓度的影响。按照实验部分的步骤,将采集得到的各组大鼠脑微透析液样本按照本法进行检测,结果表明,PD 模型组大鼠纹状体 DA 含量显著低于正常组 ($p < 0.01$),从生化分析层面证明本研究 PD 动物模型复制成功。表 2 为 3 组 PD 症大鼠给予西药、中西药结合 (首乌方高、低剂量组)干预后的脑纹状体 L-DOPA

表 2 L-DOPA 和 DA 在大鼠纹状体微透析液中浓度的动态变化 (n=6)

Table 2 Dynamic concentration changes of L-DOPA and DA in rat striatum microdialysate (n=6)

t/min	L-DOPA concentrations (mean±SD) / (μmol/L)			DA concentrations (mean±SD) / (μmol/L)		
	PD+L-DOPA group	PD+L-DOPA+ high SWF group	PD+L-DOPA+ low SWF group	PD+L-DOPA group	PD+L-DOPA+ high SWF group	PD+L-DOPA+ low SWF group
0	0.128±0.024	0.119±0.028	0.122±0.032	0.018±0.006	0.020±0.007	0.017±0.006
15	0.473±0.095	0.193±0.045	0.338±0.069	0.030±0.010	0.024±0.004	0.025±0.008
30	1.290±0.216	0.614±0.132	0.971±0.156	0.045±0.008	0.030±0.008	0.038±0.015
45	1.810±0.358	0.724±0.156	1.070±0.268	0.066±0.011	0.038±0.009	0.049±0.019
60	1.670±0.301	0.769±0.168	1.250±0.259	0.181±0.035	0.120±0.019	0.141±0.032
75	1.300±0.266	0.816±0.162	1.100±0.265	0.255±0.064	0.142±0.036	0.164±0.038
90	1.030±0.189	0.665±0.135	0.978±0.197	0.235±0.053	0.150±0.039	0.197±0.049
105	0.768±0.136	0.524±0.106	0.843±0.165	0.183±0.045	0.160±0.042	0.173±0.039
120	0.646±0.102	0.410±0.085	0.603±0.123	0.145±0.036	0.140±0.036	0.142±0.036
135	0.496±0.089	0.391±0.078	0.522±0.106	0.098±0.028	0.122±0.028	0.120±0.030
150	0.249±0.065	0.347±0.072	0.469±0.095	0.060±0.019	0.100±0.020	0.095±0.025
165	0.240±0.060	0.308±0.066	0.380±0.078	0.045±0.015	0.089±0.021	0.080±0.023
180	0.236±0.058	0.289±0.058	0.287±0.058	0.030±0.009	0.080±0.018	0.068±0.016

和 DA 的浓度结果。正常组、PD 模型组、PD+L-DOPA+首乌方高剂量组的大鼠脑微透析液样品 UHPLC-MS/MS (MRM) 分析结果见图 3, 峰形、分离度良好, 未发现干扰物质。实验结果表明, 与 PD+L-DOPA 组相比, PD+L-DOPA+首乌方高、低剂量组纹状体细胞外液中 L-DOPA 和 DA 二者的浓度达到的最大值更低, 且时间滞后, 而且可以稳定纹状体

L-DOPA 药物及活性成分 DA 的浓度, 使脑内二者浓度较长时间维持在有效水平, 这些实验结果与首乌方高、低剂量具有相关性。这提示首乌方中的中药成分可延缓 L-DOPA 的代谢和消除, 减小它们的浓度波动范围, 以提高 L-DOPA 的疗效, 减少副作用, 该实验结果与文献^[3]中探讨的首乌方协同 L-DOPA 治疗 PD 的机制相同。

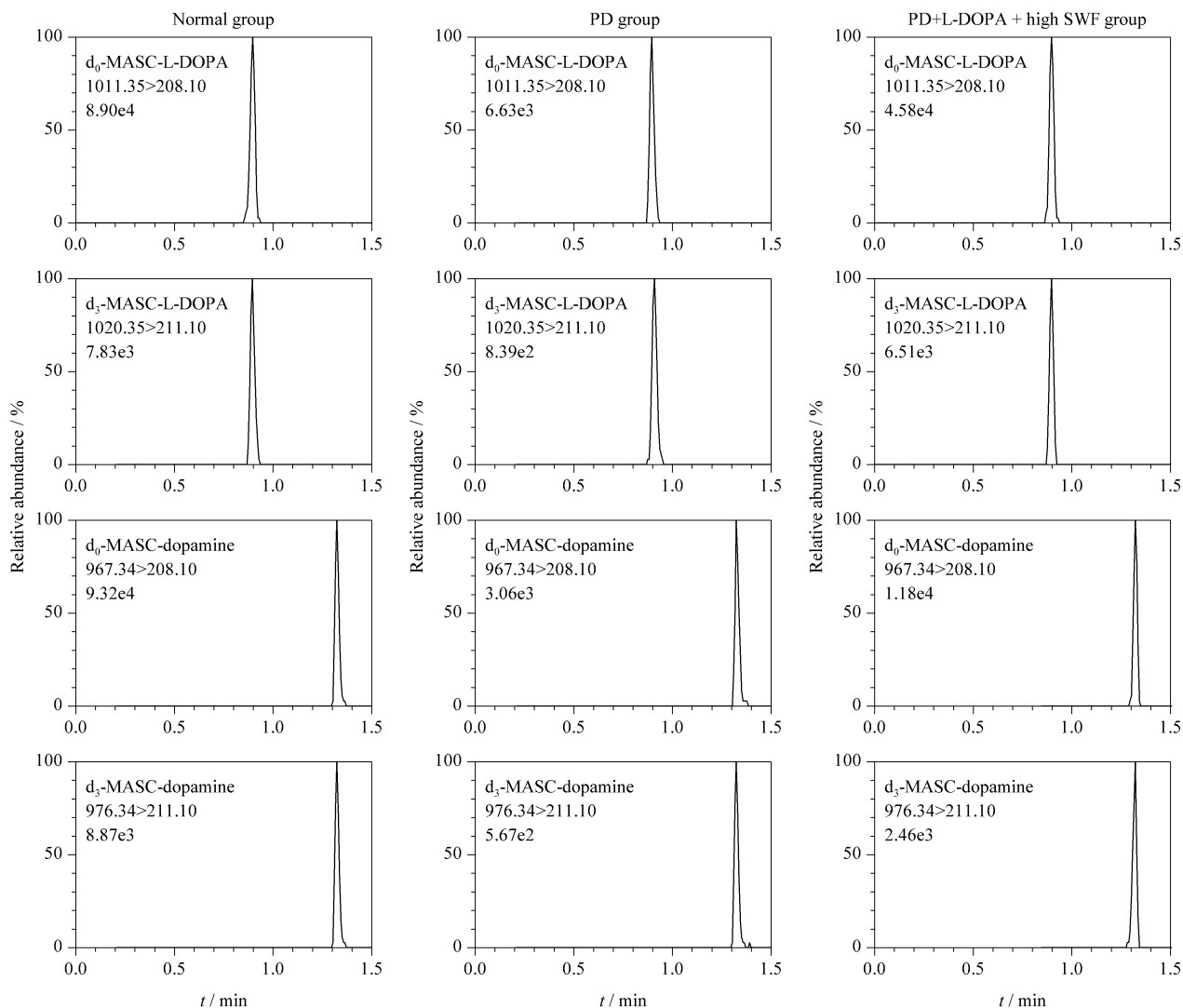


图 3 大鼠脑微透析液中 L-DOPA 和 DA d₀/d₃-MASC 衍生物的 UHPLC-MS/MS (MRM) 色谱图

Fig. 3 UHPLC-MS/MS (MRM) chromatograms of L-DOPA and DA derivatives of d₀/d₃-MASC in rat brain microdialysate

3 结论

建立并验证了同时测定 L-DOPA 和 DA 的稳定同位素编码衍生-分散液液微萃取 UHPLC-MS/MS 分析方法, 该方法具有灵敏、准确、快速、专属性强、抗基质干扰等特点, 能有效监控不同组 PD 大鼠脑微透析液中 L-DOPA 药物和生物活性成分 DA 的含量, 为 PD 相关的医学检验和药物筛选提供了一种技术手段。

参考文献:

[1] Zhou H H. Pharmacology. Beijing: Science Press (周宏灏. 药理学. 北京: 科学出版社), 2007: 115

[2] Wang D Q, Wang W, Jing F C, et al. Chinese Pharmacological Bulletin (王丹巧, 王巍, 景富春, 等. 中国药理学通报), 2007, 23 (11): 1527

[3] Sun X F, Wang D Q, Wu Z E, et al. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae (孙晓芳, 王丹巧, 吴兆恩, 等. 中国实验方剂学杂志), 2011, 17 (11): 111

[4] Perry M, Li Q, Kennedy R T. Anal Chim Acta, 2009, 653: 1

- [5] Zhao Y Y, Liu L Y, Han Y Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (赵燕燕, 刘丽艳, 韩媛媛, 等. 色谱), 2011, 29 (2): 146
- [6] Song Y Q, Li F Y, Li W, et al. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (宋彦强, 李凤云, 李玮, 等. 中国卫生检验杂志), 2013, 23 (5): 1339
- [7] Song P, Mabrouk O S, Hershey N D, et al. Anal Chem, 2012, 84: 412
- [8] Zhao X E, Suo Y R. Talanta, 2008, 76: 690
- [9] Zhao X E, Suo Y R. Chinese Journal of Analytical Chemistry (赵先恩, 索有瑞. 分析化学), 2008, 36 (1): 12
- [10] Ji C J, Li W L, Ren X D, et al. Anal Chem, 2008, 80: 9195
- [11] Liu P, Huang Y Q, Cai W J, et al. Anal Chem, 2014, 86: 9765
- [12] Leng J P, Wang H Y, Zhang L, et al. Anal Chim Acta, 2013, 758: 114
- [13] Zhang S J, You J M, Ning S J, et al. J Chromatogr A, 2013, 1280: 84
- [14] Dai W D, Huang Q, Yin P Y, et al. Anal Chem, 2012, 84: 10245
- [15] Sun Z W, Wang X X, Cai Y P, et al. Talanta, 2014, 120: 84
- [16] Yuan K, Kang H N, Yue Z F, et al. Anal Chim Acta, 2015, 866: 41
- [17] Zhao X E, Lü T, Wei N, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (赵先恩, 吕涛, 魏娜, 等. 分析化学), 2014, 42 (11): 1629
- [18] Wang X Y, Qi W M, Zhao X E, et al. Chinese Journal of Chromatography (王晓燕, 元伟梅, 赵先恩, 等. 色谱), 2014, 32 (6): 623
- [19] Wu C Q, Lei J M, Li Y L, et al. Chinese Journal of Chromatography (吴翠琴, 雷金妹, 李韵灵, 等. 色谱), 2014, 32 (12): 1362
- [20] Wu Z E, Niu X H, Zhang M Y, et al. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (吴兆恩, 牛晓红, 张美玉, 等. 药物分析杂志), 2012, 32 (2): 217
- [21] Tufi S, Lamoree M, Boer J D, et al. J Chromatogr A, 2015, 1395: 79
- [22] Junnotula V, Licea-Perez H. J Chromatogr B, 2013, 926: 47

2016年《中国无机分析化学》征稿征订启事

- 技术交流的平台
- 无机分析的阵地
- 企业联系的桥梁
- 同行朋友的纽带

《中国无机分析化学》是由北京矿冶研究总院主办的无机分析化学专业性学(技)术期刊。本刊包括岩矿分析、冶金分析、材料分析、环境分析、化工分析、生物医药分析、食品分析、仪器研制、综述评论、技术交流、信息之窗等栏目。读者对象为从事无机分析化学及相关技术的广大科研人员、工程技术人员、管理人员、大专院校师生、相关公司及企事业单位。本刊也是相关图书、情报等部门必不可少的信息来源。

《中国无机分析化学》2014年复合影响因子1.298,排在同类50种期刊中的第9,是美国“CA千种表”中我国化学化工类核心期刊,《中文科技期刊数据库》刊源,中国期刊网入网期刊,《中国科学引文数据库》刊源,《中国学术期刊》(光盘版)入编期刊,《中国核心期刊(遴选)数据库》刊源,《中国化学化工文摘》收录期刊。

《中国无机分析化学》一直秉承“读者第一,作者至上,以人为本,以质为根”的办刊理念,全方位为中国无机分析化学工作者服务,促进中国无机分析化学行业的发展!

《中国无机分析化学》在国内外公开发行,季刊,大16开,单价15.00元,全年60.00元。全国各地邮局发行,如有漏订的单位和读者,请直接与编辑部联系。

国内邮发代号 80-377

国内统一连续出版物号 CN 11-6005/O6

国外发行代号 Q9045

国际标准连续出版物号 ISSN 2095-1035

CODEN: ZWFHAZ

京西工商广字第 0425 号

★ 欢迎投稿 欢迎订阅 广告洽谈 精诚合作

电话 010-63299759

传真 010-63299754

E-mail: zgwjfxhx@163.com

邮政编码 100160

地址 北京市南四环西路 188 号总部基地十八区 23 号楼 905

投稿网址 <http://zgwjfxhx.bgrimm.cn>

中国无机分析化学编辑部 供稿