



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104020241 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 03

(21) 申请号 201410257438. 8

(22) 申请日 2014. 06. 11

(71) 申请人 中国烟草总公司郑州烟草研究院
地址 450001 河南省郑州市高新区枫杨街 2
号

(72) 发明人 毛健 张太平 卢斌斌 孙世豪
李鹏 张建勋 宗永立 曾世通
柴国璧

(74) 专利代理机构 郑州中民专利代理有限公司
41110
代理人 姜振东

(51) Int. Cl.
G01N 30/88 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

动物血、脑样品中痕量烟碱及其主要代谢物的同步分析方法

(57) 摘要

一种动物血、脑样品中痕量烟碱及其主要代谢物的同步分析方法,其特征在於:利用微透析系统同步收集动物血透析液及脑组织透析液样品于不同的色谱进样瓶内衬管中,分别加入 NIC- d_3 、COT- d_3 混合内标溶液,混匀后,直接采用 UPLC-MS/MS 分析检测微透析样品中烟碱和可替宁的含量。本发明的优点在於:无需沉淀蛋白、纯化等样品前处理步骤,实现了烟碱及其代谢物在动物体内多位点的同步、准确分析,与现有技术相比具有操作简便,灵敏度高,结果可靠等特点,开创了一种新的用于动物体内烟碱代谢研究的方法。

1. 一种动物血、脑样品中痕量烟碱及其主要代谢物的同步分析方法,其特征在于:利用微透析系统同步收集动物血透析液及脑组织透析液样品于不同的色谱进样瓶内衬管中,分别加入 NIC- d_3 、COT- d_3 混合内标溶液,混匀后,直接采用 UPLC-MS/MS 分析检测微透析样品中烟碱和可替宁的含量。

2. 根据权利要求 1 所述的动物血、脑内痕量烟碱及其主要代谢物的同步分析方法,其特征在于:该方法具体包括以下步骤:

a. 同步且分别收集动物摄入烟碱后的血液微透析样品和脑微透析样品;

b. 混合内标工作溶液配制:以稳定同位素 NIC- d_3 、COT- d_3 作为内标物,配制浓度均为 40ng/mL 的混合内标工作溶液;

c. 混合标准溶液配制:分别准确称取烟碱、可替宁标准品,配制浓度梯度的系列混合标准溶液,并各加入 25.0mL 浓度为 40ng/mL 的混合内标工作溶液,使内标物的浓度均为 10ng/mL,混合标准溶液的浓度为 0.025、0.10、0.50、1.00、2.50、5.00、10.0 和 25.0ng/mL;

d. 标准曲线绘制:将烟碱、可替宁系列混合标准溶液按由低到高的浓度顺序进行 UPLC-MS/MS 分析,以各目标分析物的色谱峰面积与内标峰面积之比(Y)对其相应的浓度(X)进行线性回归,得到标准曲线回归方程及相关系数;

e. 样品检测及数据处理:将步骤 a 收集的微透析样品 30 μ L 置于色谱进样瓶内衬管中,加入 10 μ L 浓度为 40ng/mL 的混合内标工作溶液,混匀后直接进行 UPLC-MS/MS 分析,利用标准曲线法计算透析液样品中各目标物的含量,揭示烟碱在大鼠体内的代谢规律。

3. 根据权利要求 1 所述的动物血、脑内痕量烟碱及其主要代谢物的同步分析方法,其特征在于:在 UPLC-MS/MS 分析中,其色谱条件、质谱条件具体如下:

色谱条件:

色谱柱:Waters Atlantis HILIC Silica, 规格 2.1 \times 150 mm, i. d., 1.7 μ m,

柱温:30 $^{\circ}$ C;流动相:A:10 mmol/L 乙酸铵水溶液,B:乙腈(含 0.1% 甲酸,体积分数);流速:0.5 mL/min;梯度洗脱;进样量:10 μ L;柱平衡时间为 1 min;

质谱条件

离子源:电喷雾离子源(ESI);扫描模式:正离子扫描(扫描范围为 m/z 50 ~ 500);监测方式:多反应监测(MRM);毛细管电压:3.2 kV,离子源和气化温度分别为 100 $^{\circ}$ C 和 350 $^{\circ}$ C;脱溶剂气(N_2)和气帘气(N_2)流速分别为 600 L/h 和 50 L/h。

4. 根据权利要求 1 所述的动物血、脑内痕量烟碱及其主要代谢物的同步分析方法,其特征在于:梯度洗脱条件见表 1:

表 1 梯度洗脱条件

时间(min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	5	95
5	30	70
5.1	5	95
6	5	95

动物血、脑样品中痕量烟碱及其主要代谢物的同步分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及动物血、脑样品中痕量烟碱及其主要代谢物的同步分析方法,本方法针对动物微透析液样品,以稳定同位素标记物作为内标物,利用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)对样品中痕量烟碱及可替宁进行检测,揭示烟碱在动物体内的代谢规律。

背景技术

[0002] 烟碱(Nicotine, NIC)是烟草的重要特征成分。由吸烟所导致的烟碱依赖,是持续吸烟进而危害健康的深层次原因。烟碱依赖的发生与个体对烟碱的代谢密切相关。研究烟碱在体内尤其是中枢神经系统内的代谢特征,可为烟碱依赖的形成机理提供依据。

[0003] 大多数情况下,烟碱在体内可代谢为 9 种化合物。其中,大部分的烟碱通过 C-氧化代谢为可替宁(Cotinine, COT)。因此,烟碱及其主要代谢物可替宁可作为衡量机体烟气暴露程度的生物标志物,用来区分吸烟者和非吸烟者。目前,关于这方面的研究已成为环境与健康领域中的热点。

[0004] 目前国内外关于烟碱代谢的报道中所采用的分析方法有气相色谱-质谱(GC-MS)法、高效液相色谱(HPLC)法、液相色谱-串联质谱(LC-MSⁿ)法等。近年来, HPLC-MSⁿ 尤其是 UPLC-MSⁿ 在生物样品分析方面具有很大的优势,已经成为烟碱及其代谢物分析的重要手段 [参考文献 1: Maria Dobrinás, Eva Choong, Muriel Noetzli, Jacques Cornuz, Nicolas Ansermot, Chin B. Eap. Quantification of nicotine, cotinine, trans-3'-hydroxycotinine and varenicline in human plasma by a sensitive and specific UPLC-tandem mass-spectrometry procedure for a clinical study on smoking cessation. Journal of Chromatography B, 2011, 879: 3574-3582. 参考文献 2: Koen De Cremer, Ilse Van Overmeire, Joris Van Loco. On-line solid-phase extraction with ultra performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry for the detection of nicotine, cotinine and trans-3'-hydroxycotinine in urine to strengthen human biomonitoring and smoking cessation studies. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013, 76: 126-133.]. 然而,这些研究也存在一定的不足,比如仅注重采集外周系统中单一位点样品进行分析测定,较少研究烟碱在其靶器官——脑组织内的代谢特征;而且,收集到的生物样品都属于复杂基质样品,分析检测时往往需要进行沉淀蛋白、离心、纯化等前处理步骤,不仅操作繁琐,还影响了定量分析的准确性。最近,微透析技术的发展体现出了很大的优势 [参考文献 3: Yuh-Lih Chang, Pi-Lo Tsai, Yueh-Ching Chou, *et al.* Simultaneous determination of nicotine and its metabolite, cotinine, in rat blood and brain tissue using microdialysis coupled with liquid chromatography: pharmacokinetic application[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1088: 152-157. 参考文献 4: Anna Czubak, Elzbieta Nowakowska, Krystyna Golembiowska, *et al.* Effect of venlafaxine and nicotine on the level of

neurotransmitters and their metabolites in rat brains. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2010, 61(3): 339-346.]. 利用微透析技术不仅可以实现多位点样品的同步、动态收集,而且样品中还不含蛋白质,可以实现直接进样分析。生物样品中烟碱及其代谢物的含量仅为 ng 级甚至更低,采用微透析样品进行 LC-MSⁿ 分析,可以极大地消减基质效应,同时选用同位素标记物作为内标物,还可以提高定量分析的准确度。

发明内容

[0005] 本发明的目的正是针对目前烟碱代谢研究方法的不足,而专门开发的一种动物体内烟碱及其代谢物的分析方法。本方法通过选用同位素标记物作为内标物,相较于微透析样品的直接进样分析提高了定量分析的准确性,还免除了常规方法收集生物样品后需要进行沉淀蛋白、固相萃取纯化等繁琐步骤,实现了烟碱在外周血和中枢神经系统内的同步、动态分析。

[0006] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:一种动物血、脑样品中痕量烟碱及其主要代谢物的同步分析方法,利用微透析系统同步收集动物血透析液及脑组织透析液样品于不同的色谱进样瓶内衬管中,分别加入 NIC-*d*₃、COT-*d*₃ 混合内标溶液,混匀后,直接采用 UPLC-MS/MS 分析检测微透析样品中烟碱和可替宁的含量。

[0007] 该方法具体步骤如下:

a. 微透析样品收集:a. 同步且分别收集动物摄入烟碱后的血液微透析样品和脑微透析样品,使得每管中样品为 30 μL。

[0008] b. 混合内标工作溶液配制:以稳定同位素 NIC-*d*₃、COT-*d*₃ 作为内标物,配制浓度均为 40ng/mL 的混合内标工作溶液。具体方式为:准确称取 NIC-*d*₃、COT-*d*₃ 各 10mg,分别置于 2 个 100mL 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得浓度各为 100 μg/mL 的 NIC-*d*₃、COT-*d*₃ 内标储存溶液;分别移取 2.0mL 内标储存溶液于同一支 100mL 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得浓度为 2 μg/mL 的一级混合内标溶液;准确移取 20.0mL 一级混合内标溶液置于 1000mL 容量瓶中,用复方氯化钠注射液稀释至刻度,摇匀,配制得浓度均为 40ng/mL 的混合内标工作溶液。

[0009] c. 混合标准溶液配制:分别称取烟碱、可替宁标准品,配制具有浓度梯度的系列混合标准溶液,并加入混合内标工作溶液,使内标物的浓度均为 10ng/mL。具体方式为:准确称取烟碱、可替宁各 10mg,分别置于 2 个 100mL 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得浓度各为 100 μg/mL 的烟碱、可替宁标准储备溶液;分别移取 10.0mL 的标准储备溶液,置于同一支 100mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得一级混合标准溶液;移取 1.0mL 的一级混合标准溶液,置于另一 100mL 容量瓶中,用复方氯化钠注射液稀释至刻度,摇匀,得浓度为 100ng/mL 二级混合标准溶液;准确移取 0.025、0.10、0.50、1.00、2.50、5.00、10.0 和 25.0mL 二级混合标准溶液,分别置于不同的 100mL 容量瓶中,各加入 25.0mL 混合内标工作溶液,用复方氯化钠注射液稀释至刻度,摇匀,得到浓度均为 0.025、0.10、0.50、1.00、2.50、5.00、10.0 和 25.0ng/mL 的烟碱、可替宁系列混合标准溶液。

[0010] d. 标准曲线绘制:将烟碱、可替宁系列混合标准溶液按由低到高的浓度顺序进行 UPLC-MS/MS 分析,以各目标分析物的色谱峰面积与内标峰面积之比(*Y*)对其相应的浓度(*X*)进行线性回归,得到标准曲线回归方程及相关系数。

[0011] e. 样品检测及数据处理 :将 10 μ L 浓度为 40ng/mL 的混合内标工作溶液分别加入到 30 μ L 透析液样品中,混匀后直接进行 UPLC-MS/MS 分析。利用标准曲线法计算透析液样品中各目标物的含量,分别绘制血、脑内烟碱和可替宁的浓度 - 时间变化曲线,揭示烟碱在大鼠体内的代谢规律。

[0012] 本发明依据的测试原理在于 :同步并且连续收集动物血液和脑微透析样品,加入同位素标记物内标溶液后,进行 UPLC-MS/MS 分析,测定不同时间点动物样品中烟碱及其主要代谢物的含量,揭示烟碱在动物体内尤其是中枢神经系统内的代谢特征。

[0013] 本发明能够直接而准确地测定动物样品中烟碱及其代谢产物的含量,实现了对烟碱在外周及中枢神经系统内代谢特征的同步、动态监测,与现有技术相比具有操作简单快捷,灵敏度高,结果可靠等特点,开创了一种新的用于动物体内烟碱代谢分析的方法。

附图说明

[0014] 图 1 为实施例 1 中的大鼠血、脑内烟碱的浓度随时间变化趋势图。

[0015] 图 2 为实施例 1 中的大鼠血、脑内可替宁的浓度随时间变化趋势图。

[0016] 图 3 为实施例 2 中的大鼠血、脑内烟碱的浓度随时间变化趋势图。

[0017] 图 4 为实施例 2 中的大鼠血、脑内可替宁的浓度随时间变化趋势图。

具体实施方式

[0018] 本发明结合以下实施例做进一步描述,但并不限制本发明。

[0019] 实施例 1

雄性成年 SD 正常大鼠,10 周龄,体重(200 \pm 20) g,采用独立隔离饲养笼具饲养,自由进水,标准颗粒进食。大鼠以 1% 戊巴比妥,按 50 mg/kg 剂量腹腔注射麻醉。借助立体定位仪定位,于大鼠脑纹状体内埋入探针套管。24 h 后,在大鼠清醒自由活动状态下插入微透析探针 (CMA/12)。对于血液微透析样品收集,需将微透析探针 (CMA/20) 植入大鼠右心房颈静脉。采用复方氯化钠注射液以 2.0 μ L/min 的速度灌流,平衡 120 min 后开始收集样品,4 $^{\circ}$ C 下每 15 min 各同步收集 1 管脑、血透析液。于第 4 管收集结束时开始计时,按 1.0 mg/kg 剂量腹腔注射烟碱溶液(0.2 mg/mL,采用复方氯化钠注射液配制),继续在 4 $^{\circ}$ C 下按每 15 min 收集透析液。收集好的每管透析液样品加入 10 μ L 浓度为 40ng/mL 的混合内标工作溶液,混匀后上样 UPLC-MS/MS 检测。

[0020] 色谱条件

色谱柱 :Waters Atlantis HILIC Silica (2.1 \times 150 mm, i. d., 1.7 μ m)。

[0021] 柱温 :30 $^{\circ}$ C ;流动相 :A :10 mmol/L 乙酸铵水溶液, B :乙腈(含 0.1% 甲酸,体积分数);流速 :0.5 mL/min ;梯度洗脱条件见表 1 ;进样量 :10 μ L ;柱平衡时间为 1 min。

[0022] 表 1 梯度洗脱条件

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	5	95
5	30	70
5.1	5	95
6	5	95

质谱条件

离子源:电喷雾离子源(ESI);扫描模式:正离子扫描(扫描范围为 m/z 50 ~ 500);监测方式:多反应监测(MRM);毛细管电压:3.2 kV,离子源和气化温度分别为 100 °C 和 350 °C;脱溶剂气(N_2)和气帘气(N_2)流速分别为 600 L/h 和 50 L/h;各目标物及内标的 MRM 参数见表 2。

[0023] 表 2 目标物及内标的 MRM 参数

目标物	MRM 离子 (m/z)	锥孔电压(V)	碰撞能量(V)
NIC	163.0 > 132.1	28	14
COT	176.9 > 80.0	36	28
	176.9 > 98.0	36	22
NIC- d_4	166.1 > 130.2	30	20
COT- d_4	180.1 > 79.7	30	25

标准曲线的建立

准确称取烟碱、可替宁各 10mg,分别置于 2 个 100mL 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得浓度各为 100 μ g/mL 的标准储备溶液;分别移取 10.0mL 的标准储备溶液,置于同一支 100mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得一级混合标准溶液;移取 1.0mL 的一级混合标准溶液,置于另一 100mL 容量瓶中,用复方氯化钠注射液稀释至刻度,摇匀,得浓度为 100ng/mL 二级混合标准溶液。同样方法,配制浓度均为 40ng/mL 的 NIC- d_3 、COT- d_3 混合内标工作溶液。准确移取 0.025、0.10、0.50、1.00、2.50、5.00、10.0 和 25.0mL 二级混合标准溶液,分别置于不同的 100mL 容量瓶中,各加入 25.0mL 混合内标工作溶液,用复方氯化钠注射液稀释至刻度,摇匀,得到浓度均为 0.025、0.10、0.50、1.00、2.50、5.00、10.0 和 25.0ng/mL 的烟碱、可替宁系列混合标准溶液。将烟碱、可替宁系列混合标准溶液按由低到高的浓度顺序进行 UPLC-MS/MS 分析,以各目标分析物的色谱峰面积与内标峰面积之比(Y)对其相应的浓度(X)进行线性回归,得到标准曲线回归方程及相关系数见表 3。

[0024] 表 3 各目标物的工作曲线回归方程及相关系数

目标物	线性回归方程	相关系数
NIC	$Y=0.1165X+0.2306$	0.9967
COT	$Y=0.1385X-0.118$	0.9964

测定结果

将血、脑微透析样品测定的目标物峰面积与内标峰面积比,与相应的工作曲线回归方程进行拟合,计算出各目标物的含量见表 4。

[0025] 表 4 单剂量烟碱注射后不同时间点大鼠体内 NIC 及 COT 的含量

时间	NIC (ng/mL)		COT (ng/mL)	
	脑	血	脑	血
0	0	0	0	0
30	46.8	96.2	38.4	74.5
60	219.6	156.6	82.7	119.0
90	180.7	129.9	134.8	148.5
120	148.5	108.3	114.3	120.5
150	113.2	84.7	102.5	104.6
180	86.4	66.5	90.1	98.2
210	69.1	59.5	85.4	95.3
240	52.9	44.8	81.4	93.1

实施例 2

本实施例基本同于实施例 1, 仅是对大鼠给药量不同, 为 0.8mg/kg 烟碱, 结果见表 5。

[0026] 表 5 单剂量烟碱注射后不同时间点大鼠体内 NIC 及 COT 的含量

时间	NIC (ng/mL)		COT (ng/mL)	
	脑	血	脑	血
0	0	0	0	0
30	43.2	86.2	34.6	58.4
60	183.3	126.1	70.7	100.9
90	150.7	101.9	103.1	117.6
120	124.8	88.3	83.4	95.3
150	93.1	67.9	75.2	86.4
180	64.6	55.4	71.0	79.2
210	49.5	43.6	68.3	74.6
240	32.3	30.7	64.5	69.1

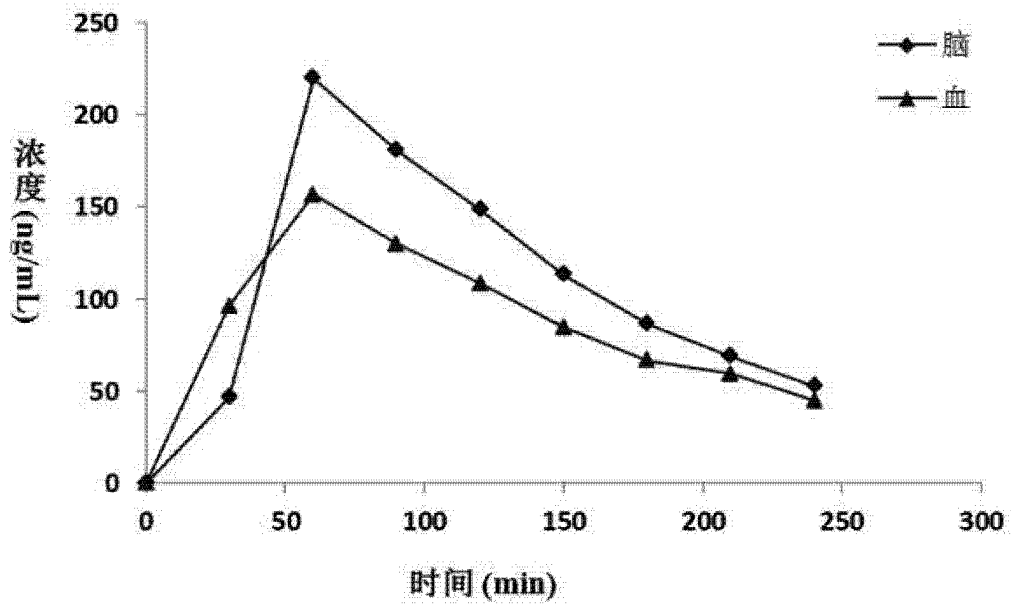


图 1

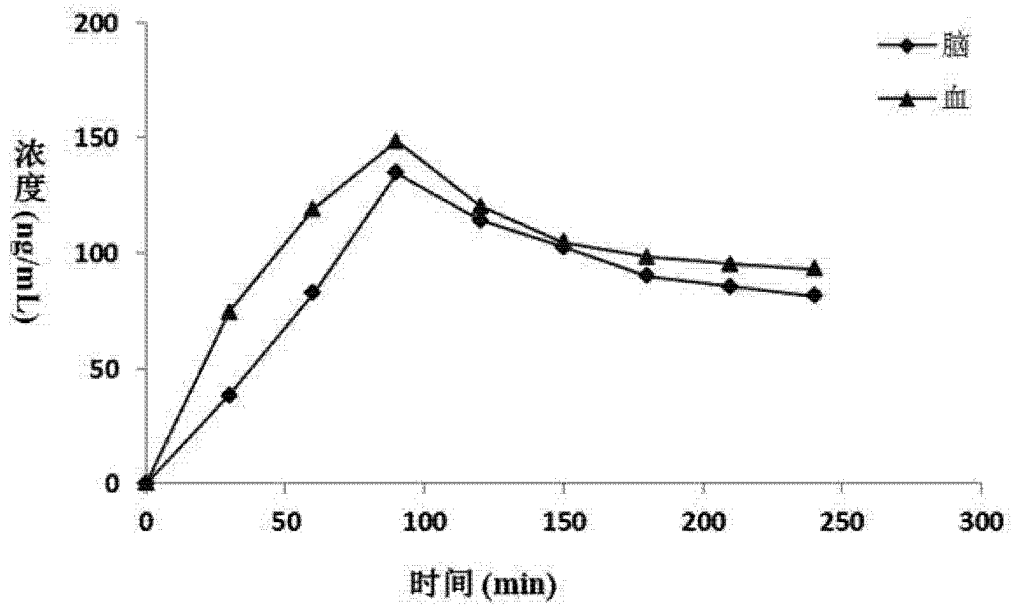


图 2

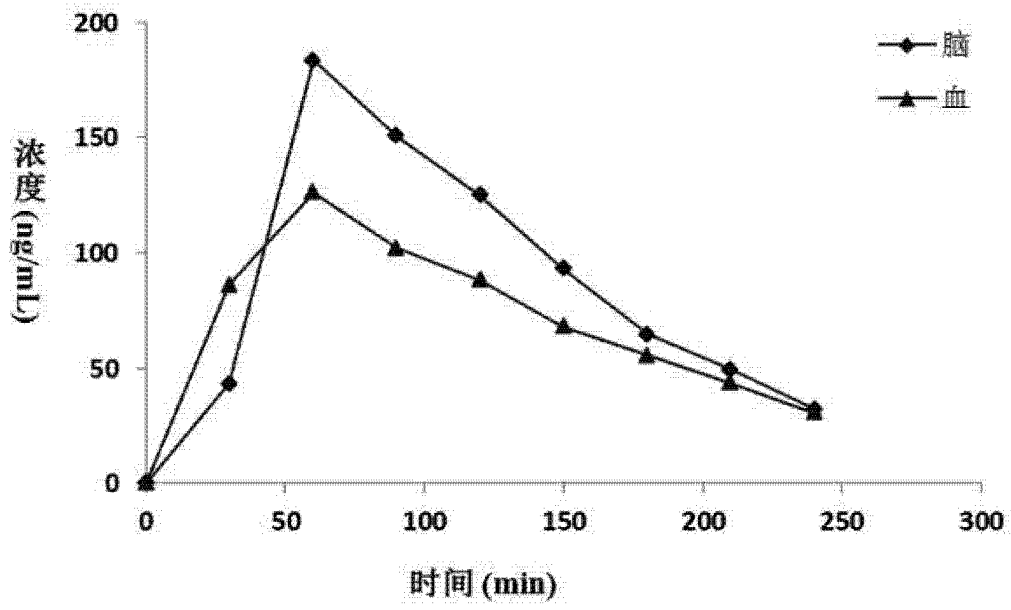


图 3

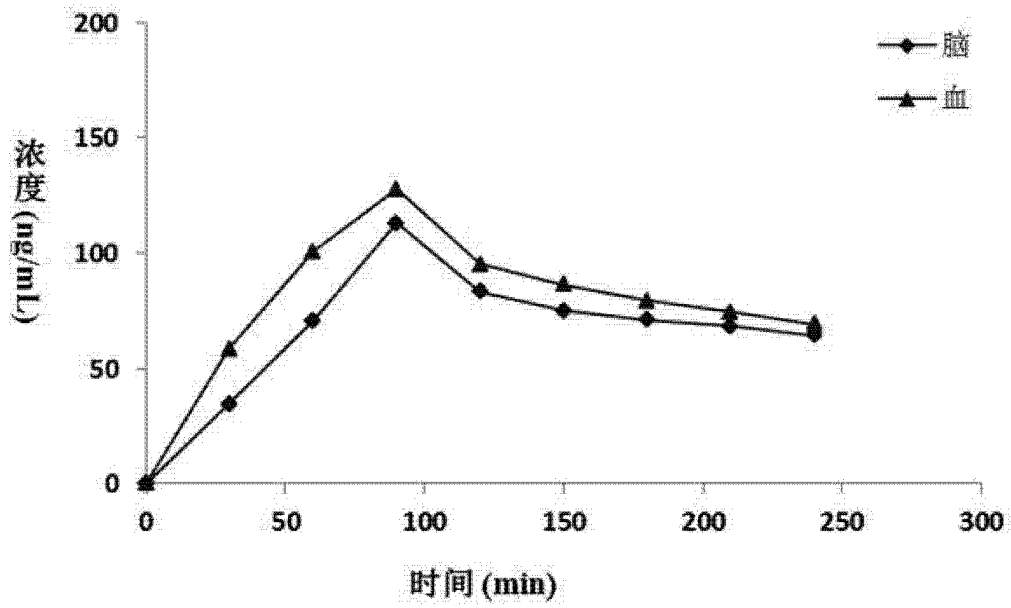


图 4