

柱前衍生高效液相色谱-质谱法测定 血浆中的氨基葡萄糖浓度

陈继涛, 刘国柱, 陈 波*

(化学生物学及中药分析教育部重点实验室 湖南师范大学化学化工学院, 中国 长沙 410081)

摘 要 采用柱前衍生高效液相色谱-电喷雾质谱法 (HPLC-ESI-MS) 测定了人血浆中的氨基葡萄糖浓度. 该方法以氨基半乳糖为内标, 用丙酮沉淀蛋白后, 加入 5 μ L 三乙胺和 10 μ L 异硫氰酸苯脂后, 在 60 $^{\circ}$ C 的恒温水浴中反应 1 h 用氮气吹干, 流动相溶解后于离心机上以 12 000 r/min 离心 5 min 后进样 20 μ L 分析; 以甲醇与水作流动相, 经过 Ultimate-XB C₁₈ 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m, Welch Materials) 在梯度模式下分离后 1:4 分流, 以 0.2 mL/min 的流速进质谱分析. 实验结果表明: 氨基葡萄糖的回归方程为 $Y = 6.70 \times 10^{-4}X + 1.11 \times 10^{-2}$ ($r^2 = 0.996$), 在 0.10 ~ 5.00 μ g/mL 范围内线性关系良好; 最低定量限为 0.10 mg/L; 氨基葡萄糖和内标的萃取回收率分别为 88.3% ~ 92.1% 和 85.2%; 日内、日间精密度的 RSD 值分别为 < 6.0%、< 5.0%, 稳定性的 RSD < 7.5%. 所建立的方法准确度高、灵敏度高、稳定性好, 适合于血浆中的氨基葡萄糖的含量测定.

关键词 高效液相色谱-电喷雾质谱法; 氨基葡萄糖; 血浆; 柱前衍生

中图分类号 O621

文献标识码 A

文章编号 1000-2537(2010)02-0077-06

Determination of Glucosamine in Human Plasma by HPLC-ESI-MS with Pre-Column Derivatization

CHEN Ji-tao, LIU Guo-zhu, CHEN Bo

(Key Laboratory of Chemical Biology and Traditional Chinese Medicine Research Ministry of Education,
Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract A high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) method with pre-column derivatization was established and validated for the determination of glucosamine in human plasma. In this paper D-(+)-Galactosamine was selected as internal standard (IS) for the quantification of target compound. Plasma samples were deproteinized by acetone, and the supernatant was transferred into a clean polyethylene tube, then 5 μ L triethylamine and 10 μ L phenylisothiocyanate was added and allowed to react for 1 h in the constant temperature water bath about 60 $^{\circ}$ C. After derivatization, the sample solution was dried by nitrogen, dissolved with mobile phase and centrifuged at 12 000 r/min for 5 min. The supernatant was transferred into separate vials, sequentially 20 μ L was injected onto the column for analysis. The chromatographic separation was performed on an Ultimate-XB C₁₈ column (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m, Welch Materials) with a mobile phase containing methanol and water eluting on the gradient mode. The outlet of column was split by the ratio of 1:4 and only 0.2 mL/min was delivered into the MS. The results showed equation of linear regression was $Y = 6.70 \times 10^{-4}X + 1.11 \times 10^{-2}$ ($r^2 = 0.996$) which showed a good linearity in the range of 0.10 ~ 5.00 mg/L. The limit of quantification (LOQ) was 0.10 μ g/mL. Extraction recoveries of glucosamine and IS in plasma were 88.3% ~ 92.1% and

* 收稿日期: 2010-03-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20875028); 国家“973”资助项目 (2006CB504701); 湖南省科技计划资助项目 (2008FJ3063)

* 通信作者, E-mail: dj-chenp@vip.sina.com

85.2%, respectively. The coefficient variations were less than 6.0%, 5.0%, and 7.5% for the precision of intra-day, inter-day and stability respectively. The method with good accuracy, high sensitivity and good stability was applied to the determination of glucosamine in human plasma.

Key words HPLC-ESI/MS; glucosamine; human plasma; pre-column derivatization

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种多发于老年人的慢性退行性骨关节疾病, 以关节软骨退变和关节周围骨质增生为主要病理特征, 发病部位多为膝关节^[1]. 根据流行病学调查, 65 岁以上的人群中的 OA 发病率男性为 60%, 女性为 70%, 随着世界老龄化人口的增加, OA 的发病率也呈现逐年上升趋势^[2]. 而目前抗炎和镇痛药物是治疗骨关节炎最常使用的药物, 但它们的主要作用是减轻疾病的疼痛, 并不能减慢和阻止疾病的发展.

氨基葡萄糖是一种天然的氨基单糖 (结构式见图 1), 同时也是人体及动物体内关节组织中糖蛋白的天然成分, 因此当体内的氨基葡萄糖合成能力减弱时, 则体内的蛋白多糖合成不足, 进而引发骨关节炎等疾病. 目前骨关节炎疾病尚无比较有效的治疗药物, 而氨基葡萄糖因为具有修复和维持软骨及关节的作用, 可以延缓骨性关节炎的病理过程而被开发为治疗骨关节炎的各类药物及保健品. 近年来国内外已成功地将其引入到全身骨关节炎的治疗和预防^[3-5].

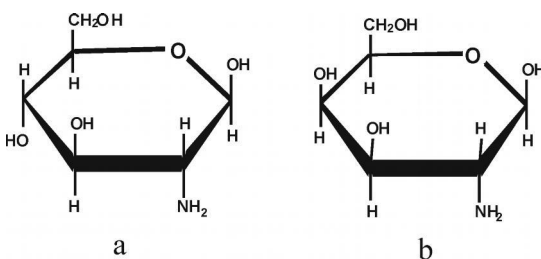


图 1 氨基葡萄糖 (a) 和氨基半乳糖 (b) 的结构式

作为治疗药物, 氨基葡萄糖的质量研究国内外均有广泛的报道, 但其药代动力学研究国内开展的较少. 文献报道的氨基葡萄糖的含量测定方法一般有 HPLC-UV, HPLC-ELSD^[6-7] 等, 虽然这些方法已成功应用于氨基葡萄糖的质量控制, 但由于这些方法的检测限高, 为 μg 级别, 并且对生物样品的抗干扰能力差而不适用于药代动力学研究. 目前药代动力学研究中, 文献报道较多的是采用 HPLC-MS 对其血药浓度进行测定并评价其药代动力学的相关参数, 近几年来采用更多的是 HPLC-MS/MS 方法^[8-12]. 虽然 HPLC-MS/MS 法简便、灵敏度高, 但成本较高且一般的实验室不具备串联质谱. 本文作者采用柱前衍生高效液相色谱-质谱联用法 (HPLC-ESI/MS) 测定了血浆中氨基葡萄糖的浓度, 采用的是简单、普遍的单四极杆质谱仪, 检测限为 $30 \mu\text{g/L}$, 明显高于文献中 HPLC-UV, HPLC-ELSD 等方法. 尽管灵敏度不如 HPLC-MS/MS 高, 但本文建立的 HPLC-ESI/MS 方法同样具有较高的灵敏度, 可以满足药代动力学的研究要求.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 2695-MicroMass ZQ 2000 液质联用系统 (美国 Waters 公司), 含四元低压泵、自动进样器、单级四极杆质谱检测器、Masslynx 4.0 色谱工作站, 离心机, 氮吹仪, 快速涡旋仪.

氨基葡萄糖和氨基半乳糖标准品 (纯度大于 99%, 中国药品生物制品检定所生产), 甲醇、乙腈为色谱纯 (江苏汉邦科技有限公司生产), 水为 millipore 超纯水, 异硫氰酸苯脂 (纯度大于 99%, 上海金山亭新化工试剂厂生产)、乙酸、丙酮、三乙胺 (长沙天恒科学仪器设备有限公司生产) 等其他试剂均为分析纯.

1.2 实验条件

1.2.1 色谱条件 色谱柱: Ultimate-XB C_{18} 柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, Welch Materials). 流动相 w(A): 甲醇, 流动相 w(B): 0.16% 的乙酸水溶液, $0 \sim 8.5 \text{ min}$ $\varphi(\text{A}): 31\%$, $\varphi(\text{B}): 69\%$; $9.5 \sim 15 \text{ min}$ 为 $\varphi(\text{A}): 95\%$, $\varphi(\text{B}): 5\%$; $15.5 \sim 20 \text{ min}$ $\varphi(\text{A}): 31\%$, $\varphi(\text{B}): 69\%$. 流速为 1.0 mL/min ; 柱温为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$; 进样量 $20 \mu\text{L}$, 柱后分流, 质谱进样流速为 0.2 mL/min .

1.2.2 质谱条件 采用 ESI^+ 选择离子模式进行监测, 毛细管电压: 3.5 kV , 锥孔电压: 35 V , 萃取电压: 4 V , 离子源温度: $105 \text{ }^\circ\text{C}$, 脱溶剂温度, $300 \text{ }^\circ\text{C}$, 锥孔气流速: 50 L/h , 脱溶剂气流速: 300 L/h , 射频电压: 0.5 V . 监测氨基葡萄糖和氨基半乳糖的 $m/z = 297$ 的选择离子.

1.3 标准液的配制

内标溶液: 称取氨基半乳糖 12.0 mg 置于 50 mL 容量瓶中, 用 $V(\text{甲醇}):V(\text{水}) = 1:1$ 的甲醇水溶解并定容至刻度得 240.00 mg/L 的内标液, 放于 4 °C 的冰箱中备用。

氨基葡萄糖标准溶液: 称取 0.50 g 氨基葡萄糖对照品, 置于 50 mL 容量瓶中, 用 $V(\text{甲醇}):V(\text{水}) = 1:1$ 的甲醇水溶解并定容至刻度, 得 10.00 g/L 氨基葡萄糖的标准溶液; 将氨基葡萄糖的标准溶液用空白血浆稀释成一系列含氨基葡萄糖分别为 0.10, 0.20, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00 mg/L 的标准曲线血浆样品, 放于 -40 °C 的冰箱备用。

1.4 血浆样品的处理

取血浆 0.50 mL, 依次加入 10 μL 内标氨基半乳糖 (120.00 mg/L) 和 0.5 mL 丙酮, 振荡混匀 2 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 转移上清液 0.8 mL 至另一 1.5 mL 的 PV 管中, 依次加入 5 μL 的三乙胺和 10 μL 的异硫氰酸苯酯, 混匀, 放于 60 °C 的恒温水浴中衍生反应 1 h, 50 °C 下氮气吹干, 再用 200 μL 的流动相溶解、离心并转移至进样瓶, 进样 20 μL 分析。

1.5 基质效应

用空白血浆按标准曲线的配制方法, 分别配制 0.20, 1.00, 3.00 mg/L 3 种浓度水平的氨基葡萄糖样品, 按“1.4”样品处理方法处理; 另配制 3 种同样浓度水平的氨基葡萄糖水溶液, 处理方法同上, 进样分析后, 以血浆样品中的目标物响应面积与水溶液中响应面积的比值来衡量基质效应的影响, 实验结果显示低、中、高浓度的基质效应均小于 10%, 不影响实验测定。

2 结果与讨论

2.1 色谱柱的选择及流动相的优化

试验中对色谱柱进行了考察, 由于氨基葡萄糖在 C_8 、 C_{18} 柱上基本无保留, 所以我们首先选用了氨基柱, 用标准品优化时响应较好, 但当其用于血浆中氨基葡萄糖的含量测定时, 由于氨基葡萄糖是小分子化合物, 相对分子质量只有 179, 血浆中有很多内源性物质干扰其测定, 基于我们现有的实验条件根本不能测定, 故我们选择了将其衍生后用 C_{18} 柱分析, 用单极四极杆质谱作为检测器, 实验结果令人满意。

我们比较了流动相甲醇、乙腈与水及不同的流动相添加剂, 结果显示甲醇和 $\varphi(\text{乙酸}) 0.1\%$ 的乙酸水作流动相明显优于其他流动相。另外, 因为血浆中有很多内源性的氨基酸均可以在此条件下与异硫氰酸苯酯反应, 故衍生产物十分复杂, 内源性的干扰物会干扰测定。在分析时, 分析物及内标在 11 min 内全部出峰, 但若分析时间恰好定为 11 min 则前一样品 11 min 后还有一些强保留物质滞留在色谱柱上, 当进行下一样品分析时, 前一样品滞留在色谱柱中的强保留物质会影响测定的准确性和重现性, 所以本实验中采用了梯度洗脱的方式避免各样品间的交叉干扰。

2.2 衍生化实验条件的优化

因为氨基葡萄糖和内标氨基半乳糖的结构中都有一个氨基, 均可与异硫氰酸苯酯 (PITC) 衍生化试剂反应。所以在实验中我们采用了 PITC 作为衍生试剂, 并对衍生反应时间、反应温度、衍生化试剂的浓度、碱化试剂的浓度进行了考察。反应时间考察了从 0~120 min, 反应温度考察了从 25~100 °C, 衍生试剂和碱化试剂的浓度考察均以固定的浓度, 以不同的量来优化实验条件, 异硫氰酸苯酯的量从 5~60 μL , 三乙胺的量从 0~60 μL 。

影响因素的考察实验结果见图 2 结果表明: 衍生时间和反应温度对实验有较大的影响。反应时间对衍生反应的影响见图 2(a), 随反应时间增加物质响应先增加后减小, 当反应时间过长时, 可能是因为血浆中更多的其他内源性物质与衍生试剂反应使得干扰测定的物质增加; 如图 2(d) 所示, 目标物的质谱响应随着温度的升高而增大, 但当温度超过 60 °C 后响应有所下降, 其原因可能是因为过高温会使体系中的有机溶剂挥发而导致衍生结果变差; 碱化试剂三乙胺的浓度对衍生反应影响不大, 见图 2(b); 衍生化试剂 PITC 的浓度增加对衍生反应影响见图 2(c), 可能是因为 10 μL 的 PITC 量已经可以与目标物完全反应, 当 PITC 的量继续增加时, 目标物的响应不再增加, 但体系中的内源性物质会与 PITC 反应而干扰检测。综上所述, 实验的最佳衍生反应条件为: 异硫氰酸苯酯 10 μL , 三乙胺 5 μL , 60 °C 下水浴反应 60 min。

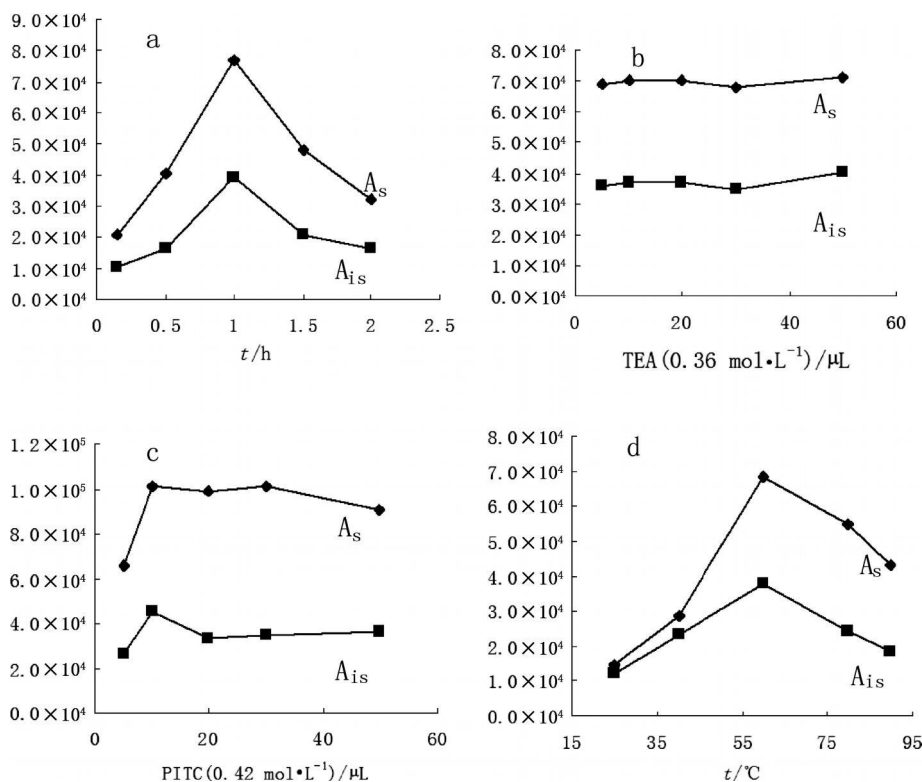


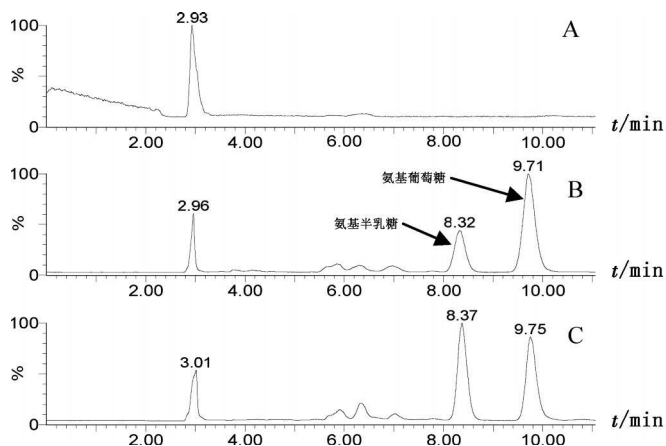
图 2 衍生反应时间 (a)、三乙胺的量 (b)、衍生试剂 (c) 及温度 (d) 对氨基葡萄糖衍生反应的影响

2.3 衍生后离子化机理的探讨

氨基葡萄糖离子化效率不好, 原因是因为 ESI 电喷雾过程中氨基葡萄糖的分子是溶剂化的, 倾向于位于液滴内部, 不易离子化。但当与异硫氰酸苯酯反应后, 在其原有结构上增加了一个大的疏水结构基团, 增加了氨基葡萄糖的表面活性, 进而增加了其从液滴内部向液滴表面转移的趋势, 使其更容易形成气相离子而被质谱检测。另外, 氨基葡萄糖在 C_{18} 上基本无保留, 但衍生后, 增加了其疏水性, 根据“相似相溶”原理, 其在 C_{18} 色谱柱上的容量因子变大, 保留增强, 使其可以用 C_{18} 分析检测。

2.4 方法学验证

2.4.1 方法的专属性 按“1.4”样品处理方法和“1.2”检测条件, 考察该方法对空白血浆和加标 (加入目标物氨基葡萄糖和内标) 血浆样品的专属性。从图 3 中可以看出在氨基葡萄糖出峰时间 9.73 min 左右和内标出峰时间 8.35 min 左右没有杂质峰干扰且峰形较好, 该方法具有良好的专属性。



A 为空白血浆; B 为加标血浆 (加了氨基葡萄糖和氨基半乳糖); C 为实际血浆样品

图 3 HPLC-MS 色谱图

2.4.2 标准曲线和线性范围 将储备液用血浆按梯度稀释成一系列含氨基葡萄糖浓度分别为 0 10 0.20

0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 按 1.4 样品处理方法处理后分析, 分别以氨基葡萄糖的峰面积与内标的峰面积比值 (Y) 为纵坐标, 以浓度 (X) 为横坐标作加权 ($1/x$) 线性回归, 得氨基葡萄糖的线性方程为: $Y = 6.70 \times 10^{-4} X + 1.11 \times 10^{-2}$ ($r^2 = 0.996$), 结果显示线性关系良好, 线性范围为 0.10 ~ 5.00 mg/L , 最低定量限为 0.10 mg/L ($\text{RSD} = 8.6\%$).

2.4.3 提取回收率 在 0.10 ~ 5.00 mg/L 范围内分别用空白血浆和水配制两组低、中、高 3 种浓度水平 (0.20, 1.00, 3.00 mg/L) 的氨基葡萄糖, 每种浓度平行制备 5 份, 按“1.4”操作, 将空白血浆组氨基葡萄糖和内标的峰面积除以水组峰面积即得方法的萃取回收率, 氨基葡萄糖和内标的回收率分别为 88.3% ~ 92.1% 和 85.2%.

2.4.4 方法的精密度与准确度 在 0.10 ~ 5.00 mg/L 范围内, 配制低、中、高 3 种浓度水平 (0.20, 1.00, 3.00 mg/L), 每个浓度水平下平行处理 6 份, 按“1.4”操作, 日内精密度将配制的低、中、高溶液连续进样分析即得, 而日间精密度则要连续考察 3 d 实验结果显示日内、日间精密度的 RSD 分别为 1.9% ~ 6.0% 和 4.4% ~ 4.5%, 精密度与准确度的实验结果见表 1.

表 1 HPLC-ESI/MS 法测定血浆中氨基葡萄糖的精密度和准确度

	质控样品浓度 $/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	测定的浓度 $/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	准确度 /%	$\text{RSD} / \%$
日内精密度	200	212.9 ± 12.7	106.5 ± 6.4	6.0
	1000	981.8 ± 23.7	98.2 ± 2.4	2.4
	3000	2717.8 ± 51.1	90.6 ± 1.7	1.9
日间精密度	200	214.0 ± 9.4	107.0 ± 4.7	4.4
	1000	1022.4 ± 45.3	102.2 ± 4.5	4.4
	3000	2821.2 ± 127.7	94.0 ± 4.3	4.5

平行实验次数 $n = 6$

2.4.5 稳定性考察 (1) 短期稳定性考察 (24 h): 用空白血浆配制低、中、高 3 种浓度水平 (0.20, 1.00, 3.00 mg/L) 的氨基葡萄糖, 平行制备 5 份, 24 h 后取样, 按“1.4”操作, 结果与 0 h 的相比较, 低、中、高浓度的 RSD 值分别为 7.3%, 4.7%, 3.3%.

(2) 冻融稳定性考察 (3 c): 用空白血浆配制低、中、高 3 种浓度水平 (0.20, 1.00, 3.00 mg/L) 的氨基葡萄糖, 平行制备 5 份, 放于 -40°C 冰箱中冰冻后取出, 室温自然解冻后取样按“1.4”操作, 如此反复冻溶 3 次, 低、中、高浓度的 RSD 值分别为 4.9%, 3.6%, 6.0%.

(3) 长期稳定性考察 (30 d): 用空白血浆配制低、中、高 3 种浓度水平 (0.20, 1.00, 3.00 mg/L) 的氨基葡萄糖, 平行制备 5 份, 于 -40°C 放置 30 d 后, 取样, 按“1.4”操作, 结果与第一天相比较, 低、中、高浓度的 RSD 值分别为 6.6%, 2.9%, 4.9%.

3 应用与结论

本文作者建立的柱前衍生 HPLC-ESI/MS 方法被应用到一个生物等效性试验, 20 名健康受试者服用了硫酸氨基葡萄糖片剂 (1500 mg 用量), 在服药前 0 h 与服药后 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 采取肘静脉血 5 mL, 血样采集后于肝素化离心管中, 0.5 h 内离心分离血浆 (3000 r/min), 分离后的血浆保存于 -40°C 的冰箱中. 采用本文建立的方法检测上述血浆中氨基葡萄糖的浓

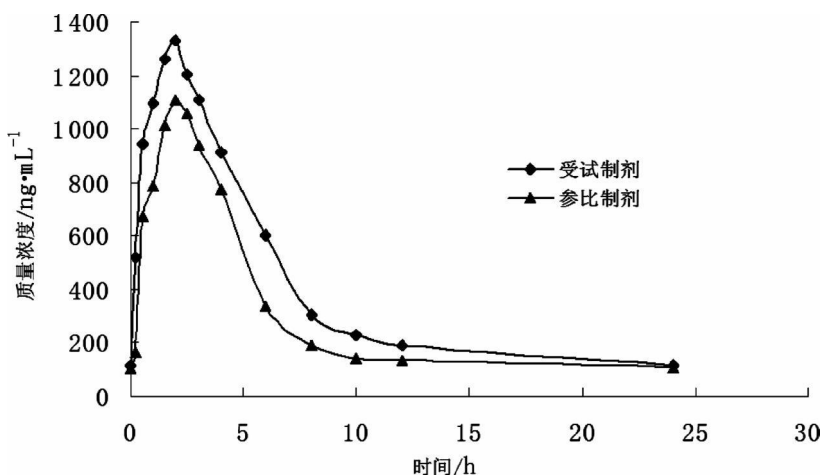


图 4 氨基葡萄糖的血药浓度-时间曲线

度,典型的血药浓度曲线见图 4 从整体来说,该方法在 0.10~5.0 mg/L 范围内线性良好、准确度和精密度高,同时简单、可行、灵敏度高,符合美国 FDA (Food and drug administration) 准则,适用于血浆中氨基葡萄糖的生物等效性实验及药代动力学研究.

参考文献:

- [1] FELSON D T, ZHANG Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention [J]. *Arthritis Rheumatism*, 1998, 41: 1343-1355
- [2] SARZ-PUTTINI P, CMMINO M A, SCARPA R, *et al*. Do physicians treat symptomatic osteoarthritis patients properly? Results of the AMICA experience [J]. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 2005, 35(1 Suppl1): 38-42
- [3] 王英瑛, 李俊, 曾苏. 反相高效液相色谱衍生化法测定氨基葡萄糖原料及其制剂的含量 [J]. *医药导报*, 2008, 27(7): 851-852
- [4] ANDERSON JW, NICOL R J, BORZELLECA J F. Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2005, 43(2): 187-201.
- [5] MCALINDON T E, LAVALLEY M P, GULIN J P, *et al*. Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis: a systematic quality assessment and meta-analysis [J]. *Journal of the American Medical Association*, 2000, 283(11): 1469-1475.
- [6] 杨岚, 李铜铃, 黄婷, 等. RP-HPLC测定盐酸氨基葡萄糖片的含量 [J]. *华西药学杂志*, 2005, 20(3): 259-260
- [7] 洪专, 黄宏南, 许晨, 等. HPLC-ELSD测定氨基葡萄糖含量 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17(6): 1025-1026
- [8] HUANG T M, CAILI, YANG B, *et al*. Liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry method for the assay of glucosamine sulfate in human plasma: validation and application to a pharmacokinetic study [J]. *Bio-medical Chromatography*, 2006, 20: 251-256
- [9] WANG X H, CHEN X, CHEN L J, *et al*. Optimizing high-performance liquid chromatography method for quantification of glucosamine using 6-aminoquinoly-N-hydroxysuccinimidyl carbamate derivatization in rat plasma: application to a pharmacokinetic study [J]. *Bio-medical Chromatography*, 2008, 22: 1265-1271.
- [10] BEAUDRY F, VACHON P. Determination of glucosamine in horse plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Bio-medical Chromatography*, 2008, 22: 1-4.
- [11] RODA A, SABATINI L, BARBIERIA, *et al*. Development and validation of a sensitive HPLC-ESI/MS/MS method for the direct determination of glucosamine in human plasma [J]. *Journal of Chromatography B*, 2006, 844: 119-126
- [12] 冷艳霞, 孙璐, 邱欣, 等. 盐酸氨基葡萄糖片的相对生物利用度及其生物等效性评价 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2006, 23(1): 6-9

(编辑 任楚威)