

LC-MS/MS 法测定人尿液中索法酮的浓度及其尿药排泄研究

陈安九,李浩,王源园,孙鲁宁,唐茜,张宏文,方云茜,王永庆*

(南京医科大学第一附属医院临床药理研究室,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:建立测定人尿液中索法酮浓度的 LC-MS/MS 方法,用于研究健康受试者口服索法酮后药物在体内的尿药排泄特征。方法:尿液经甲醇处理后,进行 LC-MS/MS 分析。色谱柱为 Poroshell 120 SB-C18 柱,柱温为 30℃。流动相为甲醇:2 mmol/L 醋酸铵(85:15),流速为 0.20 ml/min。负离子模式下使用电喷雾离子化和多反应离子监测。2 名健康志愿者单次口服索法酮胶囊 200 mg 后,测定尿药浓度并研究尿药排泄特征。结果:索法酮的最低定量限为 1 ng/ml,在 1~500 ng/ml 范围内线性关系良好,高中低 3 个浓度的批内、批间差均小于 6%,基质效应在 93.1%~114.8% 范围内,提取回收率为 84.7%~93.6%。尿液中索法酮的累积排泄率小于 0.01%。结论:所建立的 LC-MS/MS 分析方法能快速、准确地测定尿液中索法酮的浓度。

[关键词] 索法酮;LC-MS/MS;尿药排泄

[中图分类号] R969.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)05-676-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20140530

Determination of sofalcone by LC-MS/MS in human urine and its application to kinetic study of urinary excretion

Chen Anjiu, Li Hao, Wang Yuanyuan, Sun Luning, Tang Qian, Zhang Hongwen, Fang Yunqian, Wang Yongqing*
(Research Division of Clinical Pharmacology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an LC-MS/MS method for determination of sofalcone in urine samples, and to investigate its urinary excretion characteristics in healthy Chinese volunteers. **Methods:** The urine samples were treated with methanol and separated on a Poroshell 120 SB-C18 column, with a mobile phase of methanol and 2 mmol/L Ammonium acetate (85:15, v/v). The rate was 0.20 mL/min and the temperature was 30°C. Electrospray ionization source was applied and operated in the negative ion mode using SRM. Two healthy Chinese volunteers were given single oral dose of sofalcone capsule (200 mg) for urinary excretion and characteristics. **Results:** The lower limits of quantitation for sofalcone were 1 ng/mL, and the linear range was 1~500 ng/mL. The data of intra and inter-run precision were all less than 6%. The matrix effects were between 93.1% and 114.8%. The extraction recovery was 84.7%~93.6%. The accumulated excretion rates of sofalcone in urine were lower than 0.01%. **Conclusion:** The developed method can be applied to evaluate the urinary excretion of the sofalcone with a very short running time.

[Key words] sofalcone; LC-MS/MS; urinary excretion

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(05): 676-679]

索法酮(图 1)分离自中药材柔枝槐的根^[1-2],临床上作为黏膜保护剂用于治疗胃炎及消化性溃疡。索法酮能够通过抑制前列腺素代谢酶引起胃黏膜前列腺素含量的升高,通过升高硫化黏蛋白修复胃黏膜;提高胃黏膜的血流量;抑制幽门螺旋杆菌生长;

抑制炎症因子产物阻止幽门螺旋杆菌及其诱导的胃炎^[3-5]。据报道索法酮能够通过胃上皮细胞的 Nrf2-血红素加氧酶通路提高血管内皮生长因子^[6]。故临床上索法酮用于治疗胃黏膜损伤,如由急性胃炎或慢性胃炎急性发作引起的糜烂、出血、发红、肿胀等。

目前,人血浆中索法酮浓度的检测主要运用(HPLC-UV)及(LC-MS/MS)方法^[7-8],但未见中国人体内尿药浓度测定方法及尿药排泄的相关报道。本研究建立了高灵敏、快速、准确的测定人尿液样本中索法酮浓度的 LC-MS/MS 分析方法,并将其应用于

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81273593);江苏省卫生厅面上项目(H201108);南京市科技发展计划基金资助(2011YX001)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wyqjosph@163.com

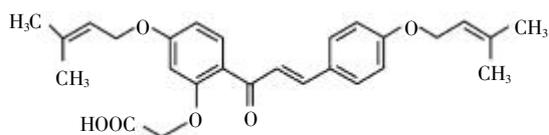


图 1 索法酮化学结构式

Figure 1 The chemical structure of sofalcone

索法酮的尿药排泄研究。

1 材料和方法

1.1 材料

索法酮对照品由浙江药品生物制品检定所提供(纯度>99.9%,批号:110601);吡哌美辛对照品由国家药品生物制品检定所提供(纯度>99.9%,批号:100258-200904);甲醇(色谱纯,默克公司,德国);醋酸铵(色谱纯,Tedia公司,美国);纯水由 Milli-Q 纯水系统制备。索法酮胶囊(100 mg/粒,浙江永宁药业有限公司)。

LC-MS/MS 仪器 (Thermo Electron Corporation 公司,美国)包括 Surveyor LC 泵, Surveyor 自动进样器, Finigan TSQ(Ultra EMR)质谱仪,电喷雾离子源等。

1.2 方法

1.2.1 分析条件

色谱条件: 色谱柱为 Poroshell 120 SB-C18 (2.7 μm , 2.1 mm \times 100 mm; Agilent Technologies, 美国), 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$ 。流动相为甲醇:2 mmol/L 醋酸铵 (85:15, v/v), 流速为 0.2 ml/min。质谱条件: 负离子模式下使用电喷射离子化源和多反应离子监测方式 (SRM); 离子化喷雾电压: 3 500 V; 鞘气压力: 35 U; 辅助气压力: 30 U; 毛细管温度: 275 $^{\circ}\text{C}$; 碰撞压力: 1.5 mTorr; 碰撞电压: 20 V。SRM 离子对索法酮为 m/z 449.2~391.0, 内标 (吡哌美辛) 为 m/z 357.0~313.0。

1.2.2 尿液样品的处理

取 25 μl 内标甲醇溶液 (吡哌美辛 25 ng/ml) 于塑料离心管, 氮气吹干后加入 0.2 ml 尿样 (-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存至分析前取出), 涡旋 30 s, 再加入 400 μl 甲醇涡旋 60 s, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 进样 5 μl , 进行 LC-MS/MS 分析。

1.2.3 临床试验方案

2 名健康受试者 (男女各 1 名, 表 1), 经体检证明肝、肾功能和心电图均正常, 符合入选条件。所有受试者自愿参加试验并签署知情同意书, 试验方案经南京医科大学第一附属医院国家药物临床试验机

构伦理委员会批准。受试者于试验前 1 周和试验期间禁止吸烟、饮酒或含药物、酒精的饮料, 在试验前 2 周及试验期间未服用其他任何药物, 试验期间统一饮食。入选受试者于试验前 1 d 进入 I 期临床试验监护病房, 禁食 10 h。于次日早晨空腹口服受试药物, 用 200 ml 温开水送服, 4 h 后进行统一标准餐。收集给药前及给药后 0~1、1~2、2~3、3~5、5~8 h 尿样。记录每一时间段总尿量, 于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存至分析前取出。

用 LC-MS/MS 测定尿液中索法酮的浓度, 并计算尿药排泄量 (Ae) 及排泄速率 (ER)。

表 1 受试者基本资料

Table 1 Demographic characteristics of the subjects

No.	性别	年龄(岁)	体质指数	索法酮(mg)
A	女	41	23.5	200
B	男	25	21.6	200

2 结果

2.1 方法学评价结果

2.1.1 特异性考察

在本试验色谱条件下, 索法酮的保留时间约为 1.27 min, 内标 (吡哌美辛) 的保留时间约为 1.23 min, 索法酮及内标的峰形及分离良好, 本方法具有较高的特异性。

2.1.2 线性范围

于 1.5 ml 塑料离心管中, 分别精密加入 40 μl 不同浓度的索法酮甲醇对照品溶液 (5、25、50、100、250、500、1 250 和 2 500 ng/ml) 和 25 μl 吡哌美辛甲醇溶液 (吡哌美辛 25 ng/ml), 氮气吹干后加入 200 μl 空白尿样, 涡旋混匀, 配成含索法酮浓度分别为 1、5、10、20、50、100、250 和 500 ng/ml 的标准含药尿液, 按“1.2.2”操作。按“1.2.1”测定, 计算索法酮峰面积 A_s 和内标峰面积 A_i 的比值 $f (f = A_s/A_i)$ 。以 f 值对索法酮尿药浓度 C 作权重回归计算, 得回归方程为 $f = 0.002 5C - 0.000 71$, 相关系数 $r = 1.000 0$ (权重系数: $1/C^2$)。结果表明, 尿液中索法酮在 1~500 ng/ml 范围内线性良好, 本方法的最低定量限为 1 ng/ml, 尿样中索法酮浓度标准曲线散点图见图 2。

2.1.3 精密度和准确度试验

按标准曲线的配制方法制备含索法酮质量浓度分别为 5、50 和 250 ng/ml 的标准含药尿液样品, 每个浓度各配制 5 份样品, 同时绘制标准曲线 1 条。按“1.2.2”操作, 并按“1.2.1”进行 LC-MS/MS 分析。共

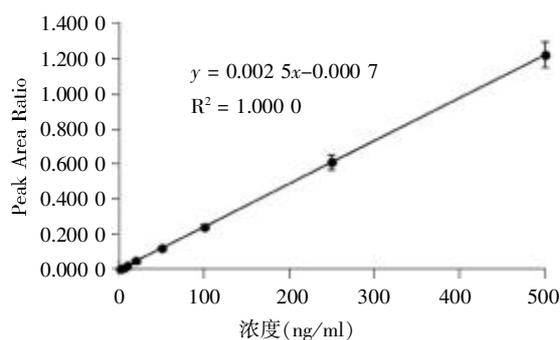


图2 尿样中索法酮浓度标准曲线散点图

Figure 2 The calibration curve of sofalcone in urine

表2 索法酮尿样浓度批内及批间精密度的结果

Table 2 Results of accuracy, the within-assay and between-assay precision evaluation experiments of sofalcone (5, 50 and 250 ng/ml) in urine samples (n=5)

尿样	索法酮(ng/mL)		
	5	50	250
Intra-day determination			
Determined conc.	4.99 ± 0.11	51.44 ± 2.20	261.82 ± 5.20
Accuracy (%)	99.82	102.88	104.73
Inter-day determination			
Determined conc.	4.80 ± 0.24	49.03 ± 2.84	259.52 ± 11.49
Accuracy (%)	95.93	98.06	103.81

表3 索法酮尿样浓度回收率及基质效应

Table 3 Analyte recovery and matrix effect of sofalcone and indometacin in urine (5, 50 and 250 ng/ml, n=5)

药物	浓度(ng/ml)	回收率(%)	基质效应(%)
索法酮	5	84.67	114.77
	50	86.69	102.22
吲哚美辛	250	93.56	93.13
	25 000	91.96	98.12

对照样品,经处理后进样分析,比较含药血浆样品与对照样品的峰面积。计算求得尿液中索法酮回收率为84.67%~93.56%,内标的平均回收率为92.0%。

2.1.6 稳定性

分别考察索法酮浓度分别为5、50和250 ng/ml的标准尿液样品于进样器中放置24 h、室温下放置5 h、反复冻融3次、冰冻放置5 d及1个月条件下的稳定性。分析结果在准确度的可接受范围内(15%)则视为稳定。索法酮在进样器放置24 h或室温下放置5 h没有明显降解。索法酮标准尿液样品冻存5 d和1个月,以及冻融3个循环保持稳定。

2.2 尿样排泄结果

索法酮在尿液中代谢的累积量根据尿浓度及体积计算而得。索法酮尿中的累积排泄量和排泄率见

做3个分析批,计算精密度和准确度,结果见表2。

2.1.4 基质效应

用5份不同来源的尿样评估索法酮和内标可能存在的基质效应。按“1.2.2”操作,并按“1.2.1”用MS检测出绝对基质效应为93.13%~114.77%,结果表明,在本实验条件下索法酮和吲哚美辛没有明显的基质效应(表3)。

2.1.5 提取回收率

按标准曲线的配制方法制备含索法酮质量浓度分别为5、50和250 ng/ml的标准含药尿液样品及

图3和图4。相应的数据在表4中列出。

空腹口服索法酮胶囊后8 h,索法酮累计排泄量分别为2.48 μg(受试者A)和1.70 μg(受试者B),结果显示只有不到0.1%的索法酮以原形药物的形式由肾脏经尿液排泄。生物转化可能是人体清除索法酮的主要途径。由此可知,由肾脏经尿液排泄不是索法酮在体内的主要排泄途径。

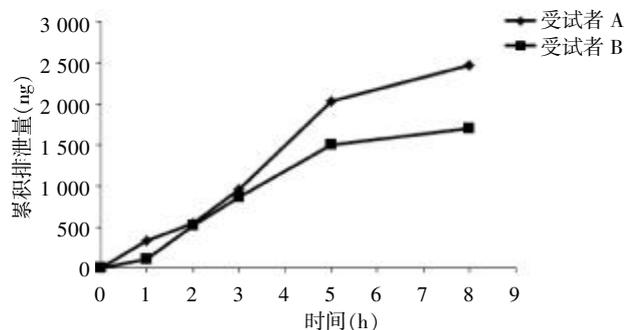


图3 2名受试者在口服索法酮胶囊200 mg后尿液中药物累积排泄量-时间曲线

Figure 3 The accumulated urinary excretion of sofalcone of 2 volunteers after taking 200 mg sofalcone

3 讨论

尽管LC-MS/MS方法进行索法酮尿液浓度研究已有报道^[7-8],但是操作比较繁琐,如样品制备的

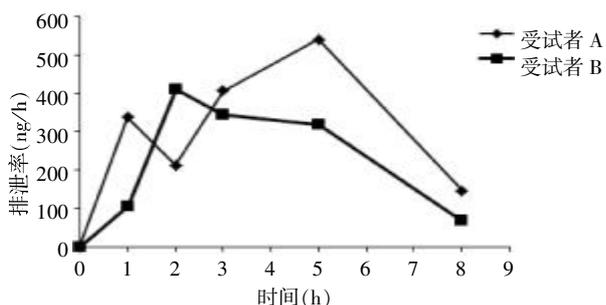


图 4 2 名受试者在口服索法酮胶囊 200 mg 后尿液中药物排泄速率-时间曲线

Figure 4 The urinary excretion rates of sofalcone of 2 volunteers after taking 200 mg sofalcone

表 4 索法酮各时间段尿样排泄量及排泄速率

Table 4 Urinary excretion characteristics of sofalcone in corresponding times

<i>i</i>	1	2	3	4	5
时间段(h)	0~1	1~2	2~3	3~5	5~8
T_i (h)	1	1	1	2	3
X_i (ng) (A)	337.58	213.32	406.43	1081.42	438.84
R_i (ng/h) (A)	337.58	213.32	406.43	540.71	146.28
X_i (ng) (B)	105.69	410.17	345.14	636.97	205.92
R_i (ng/h) (B)	105.69	410.17	345.14	318.49	68.64

[参考文献]

[1] Zayachkivska OS, Konturek SJ, Drozdowicz D, et al. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2005, 56(S1): 219-231

[2] Satomi A, Hashimoto T, Murakami S, et al. Tissue superoxide dismutase (SOD) activity and immunohistochemical staining in acute appendicitis: Correlation with degree of inflammation [J]. *J Gastroenterol*, 1996, 31(5): 639-645

[3] Han SB, Jang MS, Lee HJ, et al. Simultaneous Characterization of sofalcone and its metabolite in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Bull Korean Chem Soc*, 2005, 26(5): 729

[4] Tanaka H, Nakamura S, Onda K, et al. Sofalcone, an anti-ulcer chalcone derivative, suppresses inflammatory crosstalk between macrophages and adipocytes and adipocyte differentiation; implication of heme-oxygenase-1 induction [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 381(4): 566-571

[5] Higuchi K, Watanabe T, Tanigawa T, et al. Sofalcone, a

过程中需要进行离心分离、氮气流吹干等操作^[7];而且文献中没有详细的尿液排泄数据^[3]。本研究建立了一种改进的 LC-MS/MS 法,采用负离子电喷雾方法,具有选择性强,灵敏度较高,保留时间短等优点,可应用于索法酮在人体的尿药排泄研究。

Wang 等^[8]报道了服用 100 mg 索法酮 24 h 后索法酮回收率为 251.3 μg , 肾清除率平均为 182.1 ml/h。而本研究中,受试者在服用索法酮 8 h 后的回收率要低得多。因此未来仍然需要进行系统和详细的药代动力学研究。

gastroprotective drug, promotes gastric ulcer healing following eradication therapy for *Helicobacter pylori*: a randomized controlled comparative trial with cimetidine, an H₂-receptor antagonist [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25(S1): 155-160

[6] Shibuya A, Onda K, Kawahara H, et al. Sofalcone, a gastric mucosa protective agent, increases vascular endothelial growth factor via the Nrf2-heme-oxygenase-1 dependent pathway in gastric epithelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398(3): 581-584

[7] Wen A, Wang Z, Hang T, et al. Analysis of sofalcone in human plasma by high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 856(1-2): 348-352

[8] Wang L, Song L, Jiang X. Quantification of sofalcone in human plasma and urine by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55(5): 1179-1185

[收稿日期] 2013-07-29