

- [4] 高科攀, 王峰, 蒋新国, 等. 大鼠血浆和脑脊液中甲氨蝶呤浓度测定及其应用[J]. 中国临床药理学杂志, 2005, 14(1): 23-26.
- [5] 霍晶, 袁盛华, 方芸, 等. 反相高效液相色谱法测定人血浆中甲氨蝶呤的浓度[J]. 药学与临床研究, 2007, 15(5): 390-392.
- [6] Samoto K, Perng GC, Ehteshami M, et al. A herpes simplex virus type 1 mutant deleted for gamma 34.5 and LAT kills glioma cells in vitro and is inhibited for in vivo reactivation[J]. Cancer Gene Ther, 2001, 8(4): 269-277.
- [7] 王宁生, 梁美蓉, 刘启德, 等. 冰片“佐使则有功”之实验研究[J]. 中医杂志, 1994, 35(1): 46-47.
- [8] 许碧莲, 王晖, 许卫铭. 冰片对盐酸川芎嗪促透作用的研究[J]. 中成药, 2001, 23(12): 864-867.
- (编辑: 梁进权)

LC-MS/MS 法同时测定大鼠血浆中士的宁及其代谢物

苏晓纯, 余丹, 邱昆成, 何倩梅, 林爱华(广州中医药大学附属广东省中医院, 广东 广州 510120)

摘要: **目的** 建立 LC-MS/MS 法同时测定士的宁及其代谢物士的宁氮氧化物在大鼠血浆中的浓度。**方法** 以盐酸麻黄碱为内标, 甲醇沉淀法处理血浆样品。采用 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 柱(2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm)分离, 以甲醇-10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵(用甲酸调 pH=4)为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.2 mL·min⁻¹, 用电喷雾离子化和正离子多离子反应监测(MRM)模式检测士的宁和士的宁氮氧化物。**结果** 士的宁及其氮氧化物的线性范围分别为 0.510~306.3 ng·mL⁻¹ 和 0.102~306.0 ng·mL⁻¹, 定量下限分别为 0.510, 0.102 ng·mL⁻¹, 日内、日间相对标准偏差(RSD)均 < 15%, 准确度分别为 (89.44 ± 3.43)%~(97.45 ± 6.25)% 和 (95.86 ± 5.19)%~(106.41 ± 7.43)%。**结论** 该方法准确、灵敏、特异、简便, 适用于血浆中士的宁及其代谢物士的宁氮氧化物含量的同时测定。

关键词: 士的宁; 士的宁氮氧化物; 血药浓度; 液相-质谱联用法

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2015)01-0077-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.019

Simultaneous Determination of Strychnine and Its Metabolite in Rat Plasma by LC-MS/MS

SU Xiaochun, SHE Dan, QIU Kuncheng, HE Qianmei, LIN Aihua (Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To establish a liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the simultaneous analysis of strychnine and strychnine N-oxide in rat plasma. **Methods** Ephedrine hydrochloride was used as the internal standard (IS). The protein precipitation by methanol was used to extract the analytes from plasma. Chromatographic separation was carried out on ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ column (2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm) by gradient elution with phase A 10 mmol·L⁻¹ ammonium acetate (adjusted to pH 4.0 with formic acid) and phase B methanol. The flow rate was 0.2 mL·min⁻¹. The quantification of the analytes was performed by mass spectrometry with electrospray ionization (ESI) inlet and positive ion multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results** The calibration curves of strychnine and strychnine N-oxide in the plasma were linear in the range of 0.510~306.3 ng·mL⁻¹ and 0.102~306.0 ng·mL⁻¹, respectively. The lower limit of quantitation was 0.510 ng·mL⁻¹ for strychnine and 0.102 ng·mL⁻¹ for strychnine N-oxide. The inter-day and intra-day relative standard deviation (RSD) was less than 15%. The accuracy of strychnine was (89.44 ± 3.43)%~(97.45 ± 6.25)% and that of strychnine N-oxide was (95.86 ± 5.19)%.

收稿日期: 2014-07-11

作者简介: 苏晓纯, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药新剂型与新技术。Email: 365880344@qq.com。通讯作者: 林爱华, 博士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 药物制剂及其生物有效性。Email: linah76@163.com。

基金项目: 广东省科技厅资助项目(2011B010500016); 2014 广东省中医院拔尖人才科研专项“中药马钱子有效成分在毒性剂量下体内代谢动力学研究”。

%~(106.41 ± 7.43) %。 **Conclusion** The established assay method is accurate, sensitive, specific and convenient, which is suitable for the measurement of plasma strychnine and strychnine N-oxide concentration in rats.

Keywords: Strychnine; Strychnine N-oxide; Plasma concentration; Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS)

土的宁又名番木鳖碱,是马钱子的有效成分,同时也是其主要的毒性成分,具有显著的抗炎、抗肿瘤和中枢神经系统兴奋等作用^[1]。土的宁可在体内代谢为土的宁氮氧化物^[2]。土的宁氮氧化物具有和土的宁相似的药理活性,但毒性仅为土的宁的 1/10,具有重要研究价值。目前,关于土的宁及其氮氧化物在生物样品中的主要检测方法为高效液相色谱法,存在样品处理繁琐耗时、灵敏度低等问题。本文旨在建立灵敏、快速和准确的高效液相-质谱联用法(LC-MS/MS)测定土的宁及其氮氧化物在大鼠血浆中的浓度,为土的宁及其氮氧化物在生物体内的代谢动力学研究提供测定方法依据。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂及仪器 土的宁对照品(纯度>98 %,成都普菲德生物技术有限公司,批号:131030);土的宁氮氧化物对照品(纯度>98 %,Sigma-Aldrich 公司,批号:S450162);盐酸麻黄碱对照品(纯度>98 %,中国药品生物制品检定所,批号:0714-9402);马钱子总生物碱,南京中医药大学药剂学实验室;磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4),北京鼎国昌盛生物技术有限公司;甲醇、乙酸铵、甲酸,为色谱纯;乙醇为分析纯;水为实验室超纯水。

API4000+ 型液相色谱-三重四级杆质谱联用仪,配有 Turbo Ionspray 离子源(ESI),美国 AB 公司;LC-20A 型高效液相色谱仪,日本岛津仪器公司;AB135-S 型电子天平(十万分之一),瑞士梅特勒公司;台式微量离心机,美国贝克曼库尔特公司;BF2000-30A 型氮气吹干仪器,北京八方世纪科技有限公司。

SD 大鼠,雄性,SPF 级,体质量 300~350 g,合格证号:(粤)44007200008985,广东省医学实验动物中心提供。

1.2 测定条件

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 柱(2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm);流动相 A 为 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵(用甲酸调 pH=4),流动相 B 为甲醇,梯度洗脱:B 相 0~1 min, 5%;1~6.5 min, 5%~70%;6.5~7.5 min, 70%;7.5~7.6 min, 70%~5

%;7.6~11 min, 5%;流速 0.2 mL·min⁻¹;柱温 30 ℃;进样量 5 μL。

1.2.2 质谱条件 离子源为电喷雾(ESI)源;喷雾电压(IS)为 5500 V;雾化温度为 350 ℃;帘气(CUR)为 40;碰撞气(CAD)为 12;雾化气(GAS1)为 20;检测方式为正离子多离子反应检测(MRM),用于定量分析的离子对 *m/z* 分别为 335.3→184.1(土的宁),351.4→334.1(土的宁氮氧化物),166.2→148.3(内标:盐酸麻黄碱)。

1.3 溶液配制 对照品溶液:精密称取土的宁对照品 1.05 mg 和土的宁氮氧化物对照品 1.06 mg,分别置于 10 mL 容量瓶,用纯甲醇溶解并定容,配制成 105 μg·mL⁻¹ 的土的宁储备液和 106 μg·mL⁻¹ 的土的宁氮氧化物储备液,4 ℃冰箱保存备用。

内标溶液:精密称取盐酸麻黄碱对照品 1.39 mg,置于 10 mL 容量瓶,用纯甲醇溶解并定容,配制成 139 μg·mL⁻¹ 的内标储备液,用纯甲醇稀释得到终浓度为 139 ng·mL⁻¹ 的内标工作液,4 ℃冰箱保存备用。

马钱子总生物碱溶液:精密称取 3.00 mg 的马钱子总碱,用新配制的 PBS(pH7.4)-乙醇(80:20)混合溶液溶解并定容于 10 mL 容量瓶中,配制成 0.3 mg·mL⁻¹ 的马钱子总碱溶液。

1.4 血样处理 精密移取 100 μL 血浆样品,加入内标工作液(139 ng·mL⁻¹)20 μL,涡旋 30 s 混匀,加入 500 μL 甲醇,涡旋 2 min,离心(13000 r·min⁻¹)10 min,移取上清液至干净试管中,氮气吹干,残留物用 200 μL 流动相(甲醇-10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵(用甲酸调 pH=4, 40:60)复溶,涡旋 2 min,移入 0.2 μm 滤膜,高速离心(14000 r·min⁻¹)15 min 过滤,取上清液进样分析,进样量 5 μL。

1.5 方法学考察

1.5.1 专属性 分别取来自 6 个不同个体的大鼠空白血浆,空白血浆加土的宁、土的宁氮氧化物和盐酸麻黄碱(内标)标准品,以及大鼠给药后的血浆样品按 1.4 项下进样分析。

1.5.2 标准曲线与定量下限 分别精密吸取 286 μL 土的宁储备液和 283 μL 土的宁氮氧化物储备液于同一 10 mL 容量瓶中,氮气吹干后,加入空白血浆溶

解定容, 配制成浓度为 $3003.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的宁和 $2999.8 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的宁氮氧化物的标准血样, 再用空白血浆逐级稀释, 依次配制成浓度为 306.3, 102.1, 30.6, 10.2, 3.06, 1.02, $0.510 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的宁和 306.0, 102.0, 30.6, 10.2, 3.06, 1.02, 0.306, $0.102 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的宁氮氧化物的系列标准血样, 按 1.4 项下操作, 以待测物与内标峰面积比值(Y)对血药浓度(X)作加权线性回归(权重 $1/X^2$), 得到标准曲线方程。定量下限为标准曲线浓度的最低点。

1.5.3 精密度和准确度 配制低、中、高 3 个浓度(土的宁 1.02, 30.6, $275.7 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和土的宁氮氧化物 0.306, 30.6, $275.4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)的质控样品, 每个浓度各 5 份, 按 1.4 项下操作, 同 1 d 内测定, 连续进行 3 d。根据当天的标准曲线测定质控样品浓度, 以日内和日间相对标准偏差(RSD)考察方法精密度, 以实测浓度与真实浓度相比得到相对回收率表示准确度。

1.5.4 提取回收率 配制低、中、高 3 个浓度(土的宁 1.02, 30.6, $275.7 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和土的宁氮氧化物 0.306, 30.6, $275.4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)的质控样品, 每个浓度各 5 份, 按 1.4 项下操作, 进样分析得峰面积 A_1 ; 另取空白血浆按 1.4 项下操作, 氮气吹干后残渣分别加入溶液(土的宁 $0.510, 15.3, 137.8 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和土的宁氮氧化物 $0.153, 15.3, 137.7 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)复溶, 进样分析得峰

面积 A_2 , 以 A_1 与 A_2 的比值计算提取回收率。

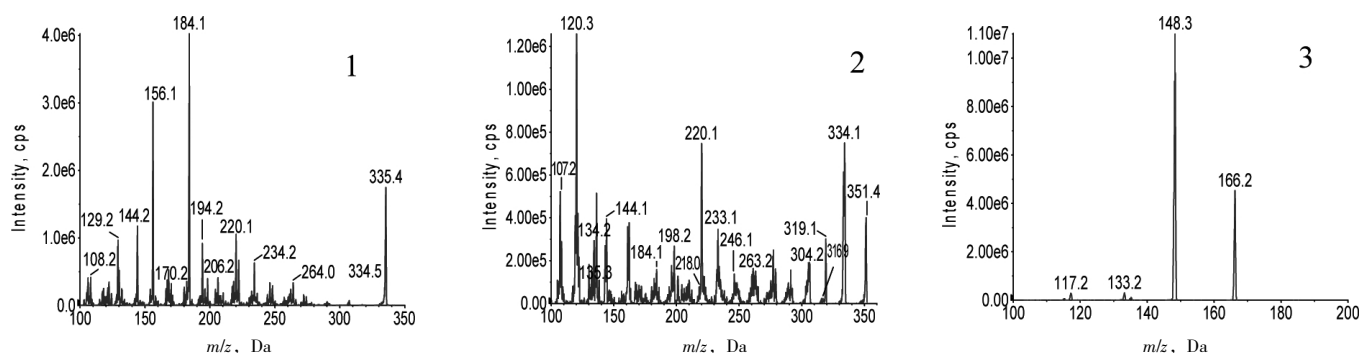
1.5.5 基质效应 分别配制含有土的宁 $0.510, 15.3, 137.8 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和土的宁氮氧化物 $0.153, 15.3, 137.7 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合标准品溶液, 直接进样得峰面积 A_3 , 以“提取回收率”项下 A_2 与峰面积 A_3 比值计算基质效应。

1.5.6 稳定性 配制低、中、高 3 个浓度(土的宁 1.02, 30.6, $275.7 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和土的宁氮氧化物 0.306, 30.6, $275.4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)的质控样品, 每个浓度各 5 份, 考察在下述条件中各成分的稳定性: 血样经反复冻融 3 次后处理并测定(冻融稳定性); 制备好的待测液 4°C 放置 36 h 后进样分析(待测液 4°C 稳定性); 血样在室温放置 6 h 后处理并测定(室温稳定性); 血样在 -80°C 冰箱中放置 30 d 后处理并测定(长期稳定性)。

2 结果

2.1 方法学评价

2.1.1 专属性 在本实验条件下, 土的宁、土的宁氮氧化物和盐酸麻黄碱(内标)的 MRM 扫描图谱见图 1。土的宁、土的宁氮氧化物和内标的离子对 m/z 分别为 $335.3 \rightarrow 184.1$, $351.4 \rightarrow 334.1$, $166.2 \rightarrow 148.3$ 。土的宁、土的宁氮氧化物和盐酸麻黄碱(内标)的保留时间分别为 8.00, 8.59, 7.21 min, 3 者峰形良好, 分离完全, 不受血浆中内源性物质的干扰, 见图 2。



1. 土的宁; 2. 土的宁氮氧化物; 3. 内标

图 1 土的宁、土的宁氮氧化物和内标盐酸麻黄碱的 MRM 扫描图谱

Figure 1 Scan chromatograms of strychnine, strychnine N-oxide and internal standard

2.1.2 标准曲线与定量下限 土的宁标准曲线回归方程为 $Y=5.28 \times 10^{-3}X+1.36 \times 10^{-3}$ ($r=0.9954$), 线性范围为 $0.510 \sim 306.3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 土的宁氮氧化物标准曲线回归方程为 $Y=6.90 \times 10^{-3}X+8.49 \times 10^{-4}$ ($r=0.9969$), 线性范围为 $0.102 \sim 306.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。二者的定量下限(LLOQ)分别为 $0.510, 0.102 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其准确度分别

为 87.31 %和 82.59 %, 精密度(RSD)分别为 8.52 %和 0.83 %, 均符合方法学要求。

2.1.3 精密度与准确度 土的宁和土的宁氮氧化物的日内和日间精密度(RSD)均 $<15\%$, 准确度分别为 $(89.44 \pm 3.43)\% \sim (97.45 \pm 6.25)\%$ 和 $(95.86 \pm 5.19)\% \sim (106.41 \pm 7.43)\%$, 见表 1。

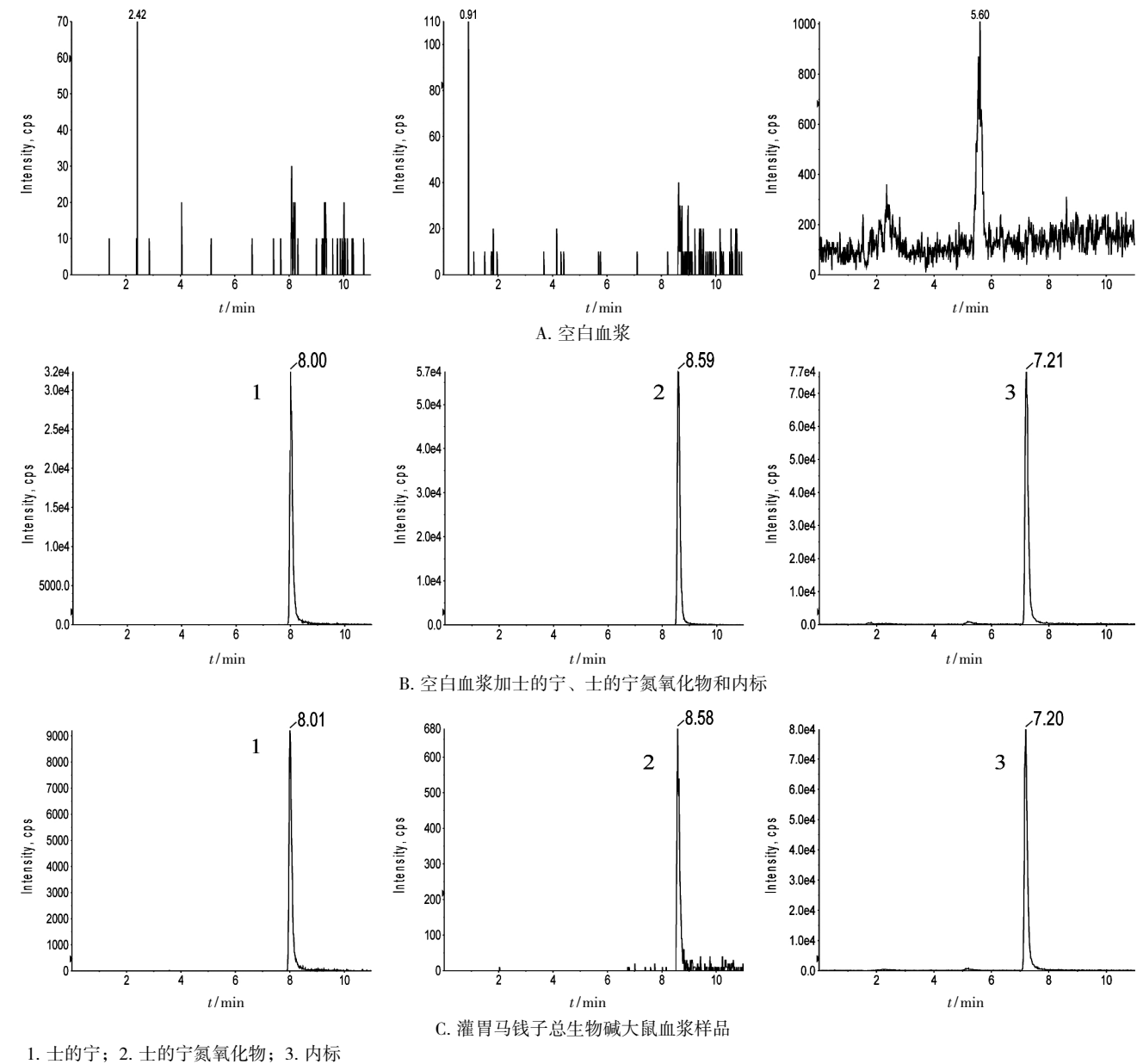


图 2 血浆中士的宁、士的宁氮氧化物和内标盐酸麻黄碱的色谱图

Figure 2 Chromatograms of strychnine, strychnine N-oxide and internal standard in rat plasma

表 1 士的宁及其氮氧化物的精密度和准确度测定结果(n=5)
Table 1 The precision and accuracy of strychnine and strychnine N-oxide

成分	理论浓度 / ng·mL ⁻¹	日内 RSD/%	日间 RSD/%	准确度 /%
士的宁	1.02	6.99	14.14	97.45 ± 6.25
	30.6	5.10	8.37	96.75 ± 3.17
	275.7	5.35	4.08	89.44 ± 3.43
士的宁氮氧化物	0.306	11.54	14.88	106.41 ± 7.43
	30.6	4.40	7.50	104.75 ± 5.40
	275.4	4.96	9.32	95.86 ± 5.19

2.1.4 提取回收率 士的宁的提取回收率为(78.8 ± 3.03)%~(90.50 ± 1.64)%, 士的宁氮氧化物的提取回收率为(73.60 ± 9.70)%~(80.00 ± 5.14)%, 见表 2。

2.1.5 基质效应 士的宁和士的宁氮氧化物低、中、高 3 个浓度的基质效应基本一致, 见表 2。

2.1.6 稳定性 士的宁、士的宁氮氧化物血样在反复冻融、室温放置 6 h 和 -80 ℃放置 1 个月等条件下均能保持稳定, 见表 3。

2.2 方法学应用 取 SD 大鼠 6 只, 禁食不禁水 12 h 以上。按 1.2 mg·kg⁻¹ 剂量给大鼠灌胃马钱子总生物碱溶液, 于灌胃后 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 300, 480, 720 min 自眼眶取血并于 3000 r·min⁻¹ 离心 15 min 分离血浆, 用本文建立的方法对血浆士的宁及其氮氧化物浓度进行测定, 绘制两者的平均血药浓度-时间曲线, 见图 3, 图 4。

表 2 士的宁及其氮氧化物的提取回收率和基质效应测定结果($n=5$)

Table 2 The recovery and The matrix effect of strychnine and strychnine N-oxide

成分	理论浓度 / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	提取回收率 / %	RSD(%)	基质效应 / %	RSD(%)
士的宁	1.02	90.40 ± 5.71	6.32	91.20 ± 7.38	8.09
	30.6	90.50 ± 1.64	1.81	89.90 ± 1.79	2.00
	275.7	78.80 ± 3.03	3.84	92.90 ± 6.52	7.02
士的宁氮氧化物	0.306	73.60 ± 9.70	13.2	103.00 ± 8.39	8.13
	30.6	80.00 ± 5.14	6.43	102.00 ± 4.37	4.29
	275.4	77.80 ± 3.43	4.41	101.00 ± 9.37	9.24

表 3 士的宁及其氮氧化物的稳定性测定结果($n=5$)

Table 3 The stability of strychnine and strychnine N-oxide

成分	理论浓度 / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	准确度 / %			
		冻融稳定性	待测液 4℃稳定性	室温稳定性	长期稳定性
士的宁	1.02	98.05 ± 10.97	106.30 ± 15.61	106.07 ± 9.71	97.99 ± 5.07
	30.6	101.24 ± 2.69	104.42 ± 4.04	99.77 ± 5.04	102.10 ± 5.06
	275.7	95.70 ± 4.81	91.55 ± 2.93	94.46 ± 3.45	94.73 ± 5.04
士的宁氮氧化物	0.306	91.29 ± 9.86	99.72 ± 13.68	116.90 ± 3.30	109.14 ± 14.64
	30.6	102.89 ± 1.48	98.84 ± 3.00	104.78 ± 4.45	101.21 ± 4.33
	275.4	96.08 ± 3.87	88.92 ± 2.92	98.60 ± 1.81	94.48 ± 4.29

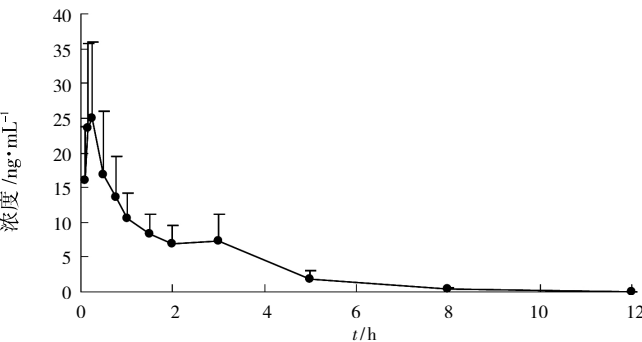


图 3 大鼠灌胃马钱子总碱溶液后士的宁平均血药浓度-时间曲线($n=6$)

Figure 3 Mean plasma concentration-time curve of strychnine in rats following intragastric administration of alkaloids from semen strychni

3 讨论

目前,士的宁及其氮氧化物在生物样品中同时检测的报道尚不多,士的宁检测方法以液相色谱法^[3-4]为主。我们建立 LC-MS/MS 法同时测定士的宁及其氮氧化物,以甲醇-10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵(用甲酸调 pH=4)为流动相进行梯度洗脱,能有效排除生物样品中内源性杂质的干扰,峰形对称,分离度及质谱响应好,灵敏度高。

士的宁生物样品的处理方法有多步液液萃取^[5-6]、固相萃取^[7-8]等。由于多步液液萃取操作复杂,不适用于大量生物样品的处理。有毒有机试剂氯仿还存在

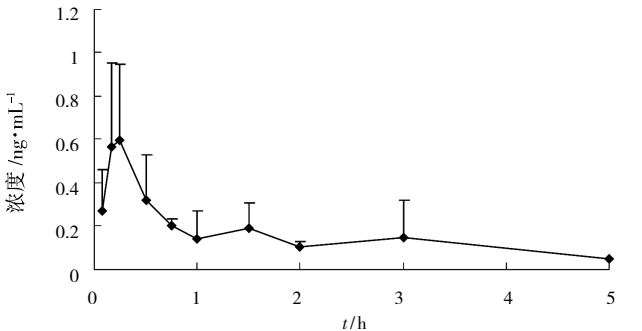


图 4 大鼠灌胃马钱子总碱溶液后士的宁氮氧化物平均血药浓度-时间曲线($n=6$)

Figure 4 Mean plasma concentration-time curve of strychnine N-oxide in rats following intragastric administration of alkaloids from semen strychni

麻醉性、有致癌可能性等问题。使用固相萃取小柱萃取耗费高,操作同样繁琐。本实验曾试用对比了氯仿液液萃取法、甲醇沉淀法提取血浆中的士的宁及其氮氧化物,发现甲醇沉淀法与氯仿液液萃取法的提取回收率接近,士的宁及其氮氧化物的提取回收率均超过 70%,而甲醇沉淀法还具有较安全、操作过程简单等优点,故选择甲醇沉淀法。

本实验建立了有毒成分士的宁及其氮氧化物在大鼠血浆中含量测定的方法学,为进一步研究士的宁及其氮氧化物的体内动力学过程奠定了基础,同时也可

参考文献:

[1] 屈艳格,陈军,蔡宝昌. 士的宁的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 247-251.

[2] 马骋,何亚维,蔡宝昌,等. 士的宁和马钱子碱及其氮氧化物的毒性比较[J]. 南京中医学院学报, 1994, 10(2): 37-38.

[3] 高颖,陈军,蔡宝昌,等. HPLC 法测定大鼠血浆中马钱子碱的浓度[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(12): 2036-2039.

[4] Chen J, Hou T, Fang Y, et al. HPLC determination of strychnine and brucine in rat tissue and the distribution study of processed semen strychni[J]. Yakugaku Zasshi, 2011, 131(5): 721-729.

[5] 蔡宝昌,徐晓月,潘扬,等. 马钱子生物碱在大鼠体内的组织分布[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(4): 421-424.

[6] 李晓天,陈西敬,王广基. 口服马钱子碱后小鼠体内的药动学研究[J]. 中国药理学杂志, 2004, 39(6): 452-454.

[7] 王朝虹,刑俊波,王志萍. LC/MS/MS 法测定全血中马钱子碱和士的宁的含量[J]. 中国法医学杂志, 2008, 23(4): 226-228.

[8] 郭继芬,陈笑艳,钟大放. 液相色谱-电喷雾离子阱质谱法检测液体中士的宁、马钱子碱及其主要代谢物[J]. 药物分析杂志, 2001, 21(3): 167-170.

(编辑:梁进权)