

大鼠血液和脑组织液中游离型青藤碱、川芎嗪、加巴喷丁、扑热息痛、普瑞巴林和阿米替林的微透析液取样及HPLC-MS/MS定量方法研究

李涛^{1*}, 赵小亮¹, 高天乐², 焦玥¹, 高文雅³, 刘洋¹, 张美玉¹,
王志国¹, 王丹巧^{1*}

(1. 中国中医科学院医学实验中心, 北京市中医药防治重大疾病基础研究重点实验室, 北京 100700; 2. 中国医学科学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050; 3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

摘要: 建立大鼠血液和脑组织液中游离型青藤碱、川芎嗪、加巴喷丁、扑热息痛、普瑞巴林和阿米替林的微透析液取样及HPLC-MS/MS检测方法。大鼠的颈静脉和脑纹状体植入微透析探针, 分别以枸橼酸缓冲溶液和林格氏液为灌流液, 以 $1.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的灌流速度, 以20 min的间隔收集血液和脑组织液微透析液样品, 连续收集至给药后24 h。液相色谱分离采用C18反相色谱柱(HSS T3 $2.5 \mu\text{m}$, $2.1 \text{ mm}\times 50 \text{ mm}$), 流动相为甲醇/水(含0.05%甲酸), 流速为 $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 梯度洗脱; 质谱检测采用电喷雾离子源, 正离子模式, 多反应监测方式。定量离子对青藤碱、川芎嗪、加巴喷丁、扑热息痛、普瑞巴林、阿米替林和内标纳洛酮分别为330/181、137/80、172/154、152/110、160/142、278/233和328/310。方法经选择性、线性范围、基质效应、准确度、精密度、稳定性和探针回收率等考察确证适合大鼠血液和脑组织液微透析液中以上药物的测定。计算的微透析探针体内回收率在19.38%~25.88%之间。以 $40\sim 50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量大鼠股静脉注射给药, 测定的血液微透析液中峰浓度在 $0.2\sim 10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内; 脑组织液微透析液峰浓度在 $0.1\sim 6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 但各时间点浓度水平均低于血液微透析液。总之, 该方法成功用于大鼠给药青藤碱、川芎嗪、加巴喷丁、扑热息痛、普瑞巴林和阿米替林的微透析液取样和游离型药物浓度定量研究。

关键词: 青藤碱; 川芎嗪; 镇痛药; 微透析; HPLC-MS/MS

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)09-2198-09

Microdialysis sampling and HPLC-MS/MS quantification of sinomenine, ligustrazine, gabapentin, paracetamol, pregabalin and amitriptyline in rat blood and brain extracellular fluid

LI Tao^{1*}, ZHAO Xiao-liang¹, GAO Tian-le², JIAO Yue¹, GAO Wen-ya³, LIU Yang¹,
ZHANG Mei-yu¹, WANG Zhi-guo¹, WANG Dan-qiao^{1*}

(1. Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Basic Research on Prevention and Treatment of Major Diseases, Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. State Key Laboratory of Bioactive Substances and Function of Natural Medicine, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China; 3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract: The treatment plan for chronic pain often proceeds from a single drug to drug combination therapy.

收稿日期: 2020-04-13; 修回日期: 2020-05-12.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81503278); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(ZZ2019008, ZZ2018009); 中国中医科学院优秀青年基金资助项目(ZZ13-YQ-078).

*通讯作者 Tel: 86-10-64089529, E-mail: hndxlitao@163.com;

Tel: 86-10-64089530, E-mail: dq_wang96@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0537

Sinomenine and ligustrazine, natural alkaline substances derived from traditional Chinese medicines, are expected to provide a new choice for combination analgesic therapy strategies. Here we establish a microdialysis sampling and HPLC-MS/MS quantification method for sinomenine, ligustrazine, gabapentin, paracetamol, pregabalin and amitriptyline in rat blood and brain extracellular fluid. Blood and brain microdialysis probes were implanted in the jugular vein toward the right atrium and left corpus striatum zone (AP +0.2 mm, ML 3.0 mm, DV 3.5 mm) in rats. The blood and brain microdialysis probes were perfused with citric acid buffer solution and Ringer's solution, respectively. Blood and brain extracellular fluid microdialysate were collected at intervals of 20 min at a perfusion rate of $1.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, and continuously collected for 24 h after administration. The liquid chromatographic separation used a C18-reversed phase chromatographic column (HSS T3 $2.5 \mu\text{m}$, $2.1 \text{ mm}\times 50 \text{ mm}$), the mobile phase was methanol/water (containing 0.05% formic acid), and gradient elution was carried out at a flow rate of $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Mass spectrometric detection used an electrospray ion source, positive ion mode and multi-reaction monitoring method. The selected quantitative ions for sinomenine, ligustrazine, gabapentin, paracetamol, pregabalin, amitriptyline and internal standard naloxone were 330/181, 137/80, 172/154, 152/110, 160/142, 278/233 and 328/310 respectively. The specificity, linear range, matrix effect, accuracy, precision, stability and probe recovery were investigated and confirmed to be suitable for the determination of the above drugs in rat blood and brain extracellular fluid microdialysate. The calculated *in vivo* recovery of microdialysis probes ranged from 19.38% to 25.88%. After intravenous administration of sinomenine ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), ligustrazine ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), gabapentin ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), paracetamol ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), pregabalin ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and amitriptyline ($40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) to rats, the peak concentration in the blood microdialysate was in the range of $0.2\text{--}10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Drug concentrations could also be detected in brain extracellular fluid microdialysate, however with lower levels (peak concentration: $0.1\text{--}6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) than those of blood microdialysates at each time point. In conclusion, this method can be applied to microdialysis sampling and quantification of sinomenine, ligustrazine, gabapentin, paracetamol, pregabalin and amitriptyline in rats. The method will promote research in identifying herb-drug pharmacokinetic interactions, as well as safety concerns in combination-therapy strategies.

Key words: sinomenine; ligustrazine; analgesic; microdialysis; HPLC-MS/MS

慢性疼痛,尤其是神经病理性疼痛,严重危害人类身心健康。钙通道调节剂加巴喷丁和普瑞巴林、抗抑郁药阿米替林等被推荐为周围或中枢神经病理性疼痛一线治疗用药^[1,2]。另外,解热镇痛药扑热息痛等也常用于术后慢性疼痛综合征的治疗^[2]。但这些药物单一使用时多出现不良反应或耐受性问题,常常不能满足大多数患者的治疗要求。临床上对慢性疼痛的治疗方案也常常从单一药物发展到药物组合法^[3]。

中药青藤碱和川芎历来就用于疼痛治疗,有“青藤散风寒湿痹之药也”,“头痛须用川芎”之说。青藤碱和川芎嗪等生物碱是其活性成分^[4,5],研发的现代制剂如青藤碱和川芎嗪注射液均用于临床多年,安全性较为明确。在前期研究中^[6-9],作者使用青藤碱或川芎嗪合并加巴喷丁、扑热息痛等用于周围性和中枢性神经病理性疼痛以及术后疼痛的治疗。结果显示,相比单一药物,组合药物的镇痛效果大大提高;长期使用,未发现耐受性和成瘾性问题,也无明显的镇静、过敏等不良反应。已证实青藤碱和川芎嗪能通过血脑屏障,且脑通透性良好^[10],但与以上镇痛药组合使用时靶器官(包括外周循环系统和中枢神经系统)的药物浓度,特别是决定药效的游离型药物浓度是否发生改变目前还

不清楚。为了能同时了解这些药物在血液和脑组织液内游离型药物的动力学过程,本文利用微透析技术建立青藤碱、川芎嗪、加巴喷丁、普瑞巴林、扑热息痛和阿米替林等游离型药物在大鼠血液和脑组织同步微透析液的取样方法;同时利用高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS/MS)技术建立血液和脑组织微透析液中游离型青藤碱、川芎嗪、加巴喷丁、扑热息痛、普瑞巴林和阿米替林等药物快速、灵敏的检测方法。鉴于含青藤碱或川芎嗪的中药制剂在临床使用的广泛性以及和现有镇痛药联用的普遍性,建立的方法也必将为揭示中药-西药是否发生药代动力学相互作用,以及药物组合使用的安全性评价提供帮助。

材料与方法

仪器 HPLC-MS/MS系统(美国AB Sciex公司),包括ExionLC-20AC高效液相色谱仪、Ion Drive™ Turbo V离子源、Sciex 6500+三重四极杆检测器和Analyst 1.7数据采集系统。微透析系统(瑞典CMA公司),包括CMA120微透析清醒动物活动装置、CMA402双通道微量注射泵、CMA130体外固定支架和CMA470微量低温分步收集器。68002双臂脑立体定位仪、78001

微型手持式颅钻、R580动物麻醉机和 ThermoStar 体温维持仪(深圳市瑞沃德生命科技有限公司)。

药品与试剂 青藤碱(盐酸青藤碱,批号:DT201803-19,纯度>98%)和川芎嗪(盐酸川芎嗪,批号:DT201806-22,纯度>98%),陕西大田生物科技有限公司。加巴喷丁(批号:Y14J10C79373,纯度>98%)、扑热息痛(批号:B14A9E58584,纯度>99%)和阿米替林(盐酸阿米替林,批号:X14S6H3201,纯度>99%),上海源叶生物科技有限公司。普瑞巴林(批号:295422,纯度>98%),北京百灵威科技有限公司。内标纳洛酮(盐酸纳洛酮注射液,批号:1302007,0.4 mg·mL⁻¹),山东新华制药股份有限公司。异氟烷(批号:217180801),深圳市瑞沃德生命科技有限公司。实验用水由 Milli-Q Integral 5超纯水机制备,甲醇、甲酸和其他试剂等均为色谱纯(北京迪马公司)。

实验动物 所有动物实验得到中国中医科学院医学实验中心伦理委员会的批准。雄性SD大鼠,SPF级,6~7周龄,实验动物质量合格证号1100111911062008,购自北京维通利华实验动物技术有限公司(许可证号:SCXK(京)2016-0006)。所有动物饲养于独立通气笼具(长×宽×高:461 mm×274 mm×229 mm),保持实验室环境温度为22℃,湿度为50%左右,并提前喂养1~2周适应饲养环境,自由饮水和食用商业饲料。给药前,动物禁食12~16 h,自由饮水。

HPLC-MS/MS条件 色谱条件:色谱柱为XSelect® HSS T3 色谱柱(2.5 μm, 2.1 mm×50 mm,美国 Waters 公司);流动相为A(水,含0.05%甲酸):B(甲醇,含0.05%甲酸),梯度洗脱程序:0~1.5 min, 15% B; 1.5~3.0 min, 15% B~100% B; 3.0~4.5 min, 100% B; 4.50~4.51 min, 100% B~15% B; 4.51~6.0 min, 15% B。流速为0.3 mL·min⁻¹;柱温为30℃;样品室温度为6℃;

进样量为1 μL。质谱条件:电喷雾离子源(ESI),气帘气(N₂)为40 psi(1 psi≈6.9 kPa),碰撞气(N₂)为9 psi,喷雾电压为+5.5 kV,雾化温度为550℃,雾化气(N₂)和辅助气(N₂)均为55 psi。采用多反应监测(MRM)模式正离子扫描,离子对其驻留时间、去簇电压、碰撞能量等质谱参数结果见表1。

药物制备 称取各药物适量,用生理盐水配制质量浓度为12.5 mg·mL⁻¹的青藤碱、川芎嗪、加巴喷丁、扑热息痛、普瑞巴林溶液和10.0 mg·mL⁻¹的阿米替林溶液。使用前,各药物溶液过0.22 μm滤膜。

微透析探针灌流液配制

血液探针灌流液 使用枸橼酸缓冲溶液(anti-coagulant citrate dextrose solution, ACDs)作为血液探针的灌流液,含枸橼酸3.50 mmol·L⁻¹、枸橼酸钠7.50 mmol·L⁻¹和葡萄糖13.60 mmol·L⁻¹。使用前,过0.22 μm滤膜,超声除去气泡。

脑组织探针灌流液 使用林格氏液(Ringer solution, Ringers)作为脑组织探针的灌流液,含氯化钠145.30 mmol·L⁻¹、氯化钾4.01 mmol·L⁻¹和氯化钙2.97 mmol·L⁻¹。使用前,过0.22 μm滤膜,超声除去气泡。

对照品溶液和质量控制样品的配制 分别称取各药物对照品约20 mg,精密称定,加适量甲醇溶解后定容,得到1 mg·mL⁻¹作为对照品储备液备用。然后准确吸取各对照品溶液适量,用甲醇配制成含青藤碱、川芎嗪、加巴喷丁、扑热息痛、普瑞巴林和阿米替林的混合对照品系列溶液。取混合对照品系列溶液,分别用空白大鼠ACDs和Ringers灌流液稀释10倍,得到4、40、400和4 000 ng·mL⁻¹的质量控制(QC)样品,-80℃冰箱中保存备用。

内标溶液配制 取0.4 mg·mL⁻¹盐酸纳洛酮注射液

Table 1 Ions and fragmentations used in multiple-reaction monitoring mode for each component

Component	MRM (transition)	Dwell time/ms	Declustering potential/V	Collision energy/eV	Retention time/min
Sinomenine	330/223	80	158	37	1.19
Sinomenine quantifier	330/181	80	158	44	
Ligustrazine	137/122	80	74	41	3.89
Ligustrazine quantifier	137/80	80	74	41	
Gabapentin	172/137	80	50	22	1.59
Gabapentin quantifier	172/154	80	50	19	
Paracetamol	152/93	80	30	30	1.25
Paracetamol quantifier	152/110	80	30	24	
Pregabalin	160/83	80	28	21	1.53
Pregabalin quantifier	160/142	80	28	16	
Amitriptyline	278/91	80	21	32	4.15
Amitriptyline quantifier	278/233	80	21	25	
Internal standard (naloxone)	328/253	80	50	38	1.05
Internal standard (naloxone) quantifier	328/310	80	50	28	

作为内标储备液备用。使用前,用纯水稀释成 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内标工作液。

生物样品处理 精密吸取血液微透析液样品或脑组织微透析液样品 $30 \mu\text{L}$, 加入内标 $3 \mu\text{L}$, 涡旋 1 min , $6 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $20\ 000 \times g$ 下离心 10 min , 取上清液待测。

方法学考察

选择性 取 6 只空白大鼠的血液微透析液和脑组织微透析液, 除不加内标 (等体积纯水替代) 外, 按“生物样品处理”项下方法操作, 进行 HPLC-MS/MS 分析, 并记录相应的色谱图。通过比较大鼠空白微透析样品、定量下限 (lower limit of quantification, LLOQ) 样品和大鼠给药后微透析液样品, 考察该方法的选择性。

线性范围及定量限 取混合对照品系列溶液, 分别用空白大鼠 ACDs 和 Ringers 灌流液稀释 10 倍, 得到 0.5 、 1.0 、 2.0 、 5.0 、 10 、 20 、 50 、 100 、 200 、 500 、 $1\ 000$ 、 $2\ 000$ 和 $5\ 000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的模拟生物样品, 按“生物样品处理”项下方法操作, 进行 HPLC-MS/MS 分析。以生物样品中待测物的浓度为横坐标 X , 待测物与内标的峰面积比值为纵坐标 Y , 用加权最小二乘法 (权重系数为 $1/X$) 进行回归分析, 得到各成分的标准曲线和线性范围。以信噪比 10 计算各成分的 LLOQ, 并以 LLOQ 作为标准曲线的最低浓度点。

基质效应、准确度与精密度 取混合对照品系列溶液及内标, 用纯水配制成 LLOQ 样品和 QC 各浓度样品, 进样分析得到各成分色谱峰面积 A ; 另取 6 只空白大鼠的 ACDs 和 Ringers 灌流液, 按“生物样品处理”项下方法操作 (内标用纯水替代), 上清液中加入一定量的混合对照品溶液及内标配制成等浓度的以上样品, 进样分析色谱峰面积 B ; B 与 A 的比值即基质效应。LLOQ 样品和 QC 样品 1 日之内测定 6 次, 以及连续 3 天测定, 计算日内、日间精密度和准确度。

残留 取定量上限样品, 按“生物样品处理”项下方法操作, 然后进样空白样品, 连续 3 个循环, 分析各待测物的残留。

稀释可靠性 配制相当于 QC 样品浓度 20 倍 ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的模拟生物样品, 配制 6 份, 用空白大鼠 ACDs 和 Ringers 灌流液稀释 10 倍得到 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 样品, 按“生物样品处理”项下方法操作, 进样分析, 计算稀释后样品的准确度和精密度。

稳定性 取 QC 样品, 每一浓度配制 3 份, 并按“生物样品处理”项下方法操作, 在 $6 \text{ }^\circ\text{C}$ (模拟微透析收集器、离心机和进样室) 放置 24 h , 考察后期稳定性; 经历 3 次冻融 ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻存 24 h , 室温融化), 考察冻融稳定性; 在 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下冷冻 3 个月, 考察长期稳定性。

动物实验

大鼠股静脉置管 大鼠称重后, 麻醉 (异氟烷, 5.0% 诱导和 2.5% 维持), 将股静脉管 (C19PU, 美国 Instech Laboratories 公司) 植入大鼠左侧股静脉中, 然后顺着皮下从颈背部引出管路, 缝合。大鼠股静脉置管手术在微透析取样前 1 天进行。

大鼠血液和脑组织微透析探针植入 大鼠恢复后, 麻醉 (异氟烷, 5.0% 诱导和 2.5% 维持), 将 CMA20 血液微透析探针 (分子截留量 $20\ 000 \text{ Da}$, 有效探针膜长 4 mm , 瑞典 CMA 公司) 朝着大鼠右心房方向植入并固定于右侧颈静脉, 从背部引出探针管路, 缝合。大鼠头部固定于脑立体定位仪, 测量前后凶使颅骨处于水平位。参考大鼠脑立体定位图谱^[1], 先将微透析导管固定于大鼠脑左侧纹状体 (以前凶为坐标原点的定位坐标为: 前凶后 0.2 mm , 左 3.0 mm , 深 3.5 mm), 然后将 CMA12 脑部微透析探针 (分子截留量 $20\ 000 \text{ Da}$, 有效探针膜长 4 mm , 瑞典 CMA 公司) 顺着导管植入。手术过程中, 用体温维持仪维持动物体温在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 左右。最后, 将完成探针植入手术的大鼠放于微透析清醒动物活动装置中恢复。

大鼠给药和微透析样品收集 血液和脑组织微透析探针分别用 ACDs 和 Ringers 以 $1.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度进行灌流平衡 1 h , 然后收集空白微透析液样品各 3 份, 之后从股静脉分别注射给予青藤碱 ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、川芎嗪 ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、加巴喷丁 ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、扑热息痛 ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、普瑞巴林 ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和阿米替林 ($40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 给药体积均为 $5 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重, 药物溶液在 1 min 内注射完成。微透析液样品收集于微量低温分步收集器 ($6 \text{ }^\circ\text{C}$) 中, 每 20 min 收集一次, 至给药后 24 h 。然后微透析样品转存至 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存待测。每种药物实验 1 只大鼠。根据探针出口端管路的长度调整微量低温分步收集器的开始时间 (滞后给药时间约 10 min), 确保收集到的微透析液为给药后的样品。由于每份样品均为一个时间段收集的, 本实验具体的采样时间点是由时间段中点进行校正得来的。

微透析探针回收率的校正 血液和脑组织细胞外液中待测物的浓度校正公式^[12]: $C_{\text{blood or } C_{\text{BEF}}} = C_{\text{dialyze}} / R_{\text{in vivo}} = (C_{\text{dialyze}} / R_{\text{in vitro}}) \times (D_{\text{in vitro}} / D_{\text{in vivo}})$ 。 C_{blood} 或 C_{BEF} 是血液或脑组织细胞外液中药物浓度, C_{dialyze} 是血液或脑组织微透析液样品中药物浓度, $R_{\text{in vivo}}$ 是微透析探针植入血液或脑组织时的回收率, $R_{\text{in vitro}}$ 是微透析探针体外回收率, $D_{\text{in vitro}}$ 是微透析探针体外传递率, $D_{\text{in vivo}}$ 是微透析探针植入血液或脑组织时的传递率。

微透析探针体外回收率与传递率 将微透析探针依次浸入到含不同浓度药物 (0.05 、 8 、 $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $C_{\text{perfusate}}$)

的ACDs和Ringers中,分别用空白ACDs和Ringers以 $1.5\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速进行灌流,收集各个浓度下的微透析液样品,每个浓度收集3份,每份20 min。分析微透析液样品中待测物浓度(C_{dialyate}),计算微透析探针体外回收率: $R_{\text{in vitro}}=C_{\text{dialyate}}/C_{\text{perfusate}}\times 100\%$ 。将微透析探针浸入到空白ACDs和Ringers中,依次用含不同浓度药物(0.05、8和 $40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $C_{\text{perfusate}}$)的ACDs和Ringers以 $1.5\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速进行灌流,收集各个浓度下的微透析液样品,每个浓度收集3份,每份20 min。分析微透析液样品中的药物浓度(C_{dialyate}),计算微透析探针体外传递率: $D_{\text{in vitro}}=(C_{\text{perfusate}}-C_{\text{dialyate}})/C_{\text{perfusate}}\times 100\%$ 。

微透析探针体内传递率 取大鼠3只,按“动物实验”项下方法操作,依次用含不同浓度药物(0.05、8和 $40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $C_{\text{perfusate}}$)的ACDs和Ringers以 $1.5\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速灌流血液和脑组织微透析探针,收集各个浓度下的微透析液样品,每个浓度收集3份,每份20 min。分析微透析液样品中的药物浓度(C_{dialyate}),计算微透析探针体内传递率: $D_{\text{in vivo}}=(C_{\text{perfusate}}-C_{\text{dialyate}})/C_{\text{perfusate}}\times 100\%$ 。

统计学分析 数据处理软件为MultiQuant数据处理系统(Ver.3.0.3,美国AB Sciex公司),绘图软件为Origin Pro 2016(Ver.b9.3.226,美国OriginLab公司)和ChemBioDraw Ultra(Ver.14.0,美国PerkinElmer公司),数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。

结果

1 质谱分析

选择低分子质量模式下进行各成分的质谱分析,优先选择正离子监测模式,在此模式下,青藤碱、川芎嗪、加巴喷丁、扑热息痛、普瑞巴林、阿米替林和内标纳洛酮主要生成 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 峰,分别为 m/z 330.14、137.15、172.20、152.09、160.19、278.22和328.20。对 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 峰的主要碎片离子进行扫描分析,并推测其可能的裂解方式,结果见图1。选择丰度最高且稳定性好的离子对作为定量离子对用于各成分的定量分析,另选一对丰度高且稳定性好的离子对共同作为定性离子对用于各成分的确证。在MRM模式下,各成分离子对优化后的主要质谱参数如驻留时间、碰撞能量和去簇电压等结果见表1。

2 方法学验证

2.1 选择性 在MRM模式下,血液和脑组织细胞外液微透析液样品典型总离子流图、提取离子流图见图2,从左至右依次是空白微透析液样品(图2A和图2D)、LLOQ样品(图2B和图2E)和大鼠给药后样品(图2C和图2F),其中给药后样品是6只大鼠0~20 min样品的等比例混合。各成分及内标保留时间见表1和图2。

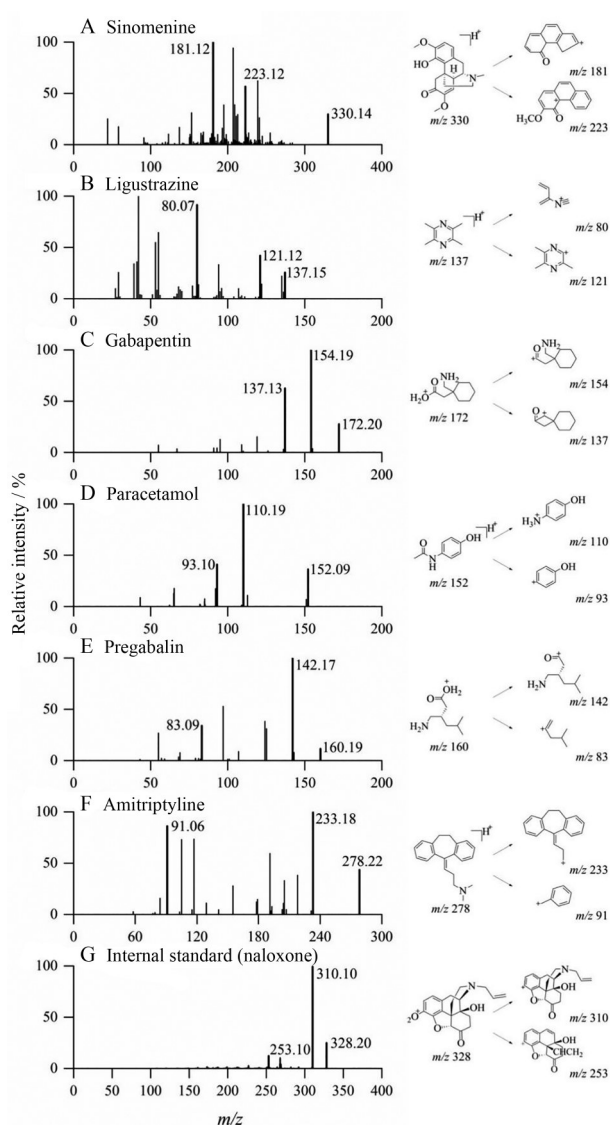


Figure 1 Product ion spectra and chemical structures with the fragmentation pattern of each compound (A: Sinomenine; B: Ligustrazine; C: Gabapentin; D: Paracetamol; E: Pregabalin; F: Amitriptyline) and internal standard (G: Naloxone). The precursor ion and the major product ions are marked with a thick bar in the figure. All chromatograms have been normalized to the largest peak

通过分析比较保留时间处的基质响应、定性离子与定量离子丰度比等,微透析液中内源性物质、其他药物及其代谢物等不干扰以上待测物的检出,表明本方法选择性良好,6种药物可同时进行分析。

2.2 标准曲线与定量限 血液微透析液和脑组织微透析液中各成分典型的标准曲线回归方程、相关系数、线性范围及LLOQ如表2所示。可知,各成分在相应浓度范围内线性关系良好。

2.3 基质效应、准确度与精密度 LLOQ样品及各浓度QC样品的基质效应为95%~105%,准确度在-9.48%~

8.54%, 日内、日间精密密度 0.68%~3.07%; 内标的基质效应为 95%~105%, 准确度在 -1.20%~2.17%, 精密密度 0.64%~2.33%, 表明分析方法准确、稳定可行, 符合有关生物样品分析方法验证的要求^[13]。

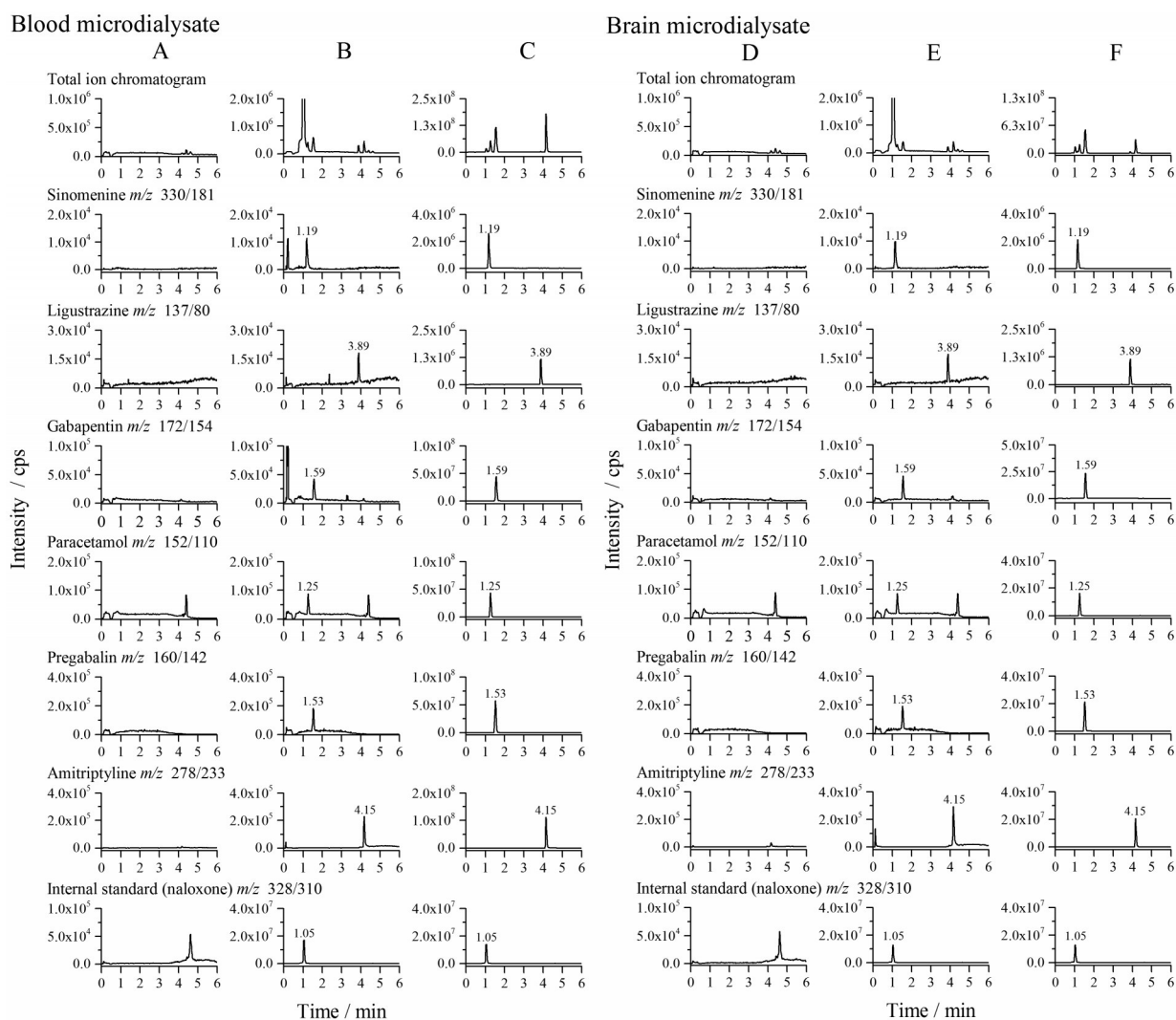


Figure 2 Representative total ion chromatograms and extraction ion chromatograms of rat blank blood and brain microdialysate samples (A and D), rat blank blood and brain microdialysate spiked with LLOQ and internal standard (naloxone) (B and E), and the blood and brain mixtures of six microdialysate samples (C and F) collected from 0-20 min after the intravenous administration of sinomenine (50 mg·kg⁻¹), ligustrazine (50 mg·kg⁻¹), gabapentin (50 mg·kg⁻¹), paracetamol (50 mg·kg⁻¹), pregabalin (50 mg·kg⁻¹) and amitriptyline (40 mg·kg⁻¹) to rats. The quantifier multiple-reaction monitoring transition and retention time is indicated and shown for each compound

Table 2 Calibration curve parameters of each component in rat blood and brain microdialysate samples. LLOQ: Lower limit of quantification

Biomatrix	Component	Regression equation	<i>r</i>	Linearity range/ng·mL ⁻¹	LLOQ/ng·mL ⁻¹
Blood microdialysate	Sinomenine	$Y = 16\ 880 X + 68\ 600$	0.992	2.0 - 5 000	2.0
	Ligustrazine	$Y = 4\ 419 X + 41\ 600$	0.996	10.0 - 5 000	10.0
	Gabapentin	$Y = 298\ 009 X + 111\ 820$	0.991	0.5 - 5 000	0.5
	Paracetamol	$Y = 106\ 898 X + 232\ 110$	0.999	2.0 - 5 000	2.0
	Pregabalin	$Y = 163\ 030 X + 252\ 147$	0.997	4.0 - 5 000	4.0
	Amitriptyline	$Y = 326\ 479 X + 611\ 878$	0.997	0.5 - 5 000	0.5
	Brain microdialysate	Sinomenine	$Y = 18\ 223 X + 61\ 700$	0.995	2.0 - 5 000
Ligustrazine		$Y = 4\ 500 X + 40\ 400$	0.994	10.0 - 5 000	10.0
Gabapentin		$Y = 29\ 0064 X + 123\ 042$	0.992	0.5 - 5 000	0.5
Paracetamol		$Y = 102\ 617 X + 212\ 460$	0.998	2.0 - 5 000	2.0
Pregabalin		$Y = 156\ 553 X + 178\ 182$	0.998	4.0 - 5 000	4.0
Amitriptyline		$Y = 344\ 383 X + 1\ 000\ 310$	0.993	0.5 - 5 000	0.5

2.4 残留与稀释效应 进样高浓度QC样品后,空白样品的残留均低于LLOQ样品的13.44%,低于内标响应的0.24%;稀释后样品准确度为-4.57%~4.78%,精密密度为3.11%。表明分析方法的残留及稀释可靠性良好,符合有关生物样品分析方法验证的要求^[13]。

2.5 稳定性 各浓度QC样品在6℃(模拟微透析收集器、离心机和进样室)放置24h的准确度为-6.11%~6.60%,经过3次冻融的准确度为-1.29%~4.74%,在-80℃条件下储存3个月的准确度为-9.65%~8.52%,说明样品在这些条件下稳定性良好。

3 微透析探针回收率

微透析探针 $R_{in vitro}$ 、 $D_{in vitro}$ 和 $D_{in vivo}$ 结果见表3。血液中青藤碱、川芎嗪、加巴喷丁、普瑞巴林、扑热息痛和阿米替林的 $R_{in vitro}$ 分别为21.31%、20.61%、25.88%、23.83%、24.73%和23.89%,脑组织中青藤碱、川芎嗪、加巴喷丁、普瑞巴林、扑热息痛和阿米替林的 $R_{in vivo}$ 分别为19.38%、20.11%、23.49%、21.24%、25.33%和21.31%。

4 方法学应用

利用所建立的血液和脑组织微透析液同步取样及HPLC-MS/MS定量方法,进行了大鼠静脉注射青藤碱、川芎嗪、加巴喷丁、扑热息痛、普瑞巴林和阿米替林的初步取样和检测研究。每只动物在24h取样期间,均未观察到明显的不良反应。分析了24h内所有微透析液样品,微透析液中各药物浓度-时间曲线见图3,可知在40~50 mg·kg⁻¹的给药剂量范围内,微透析液中药物浓度差别比较明显,血液微透析液中川芎嗪和普瑞巴林浓度在0~10 μg·mL⁻¹内,加巴喷丁和扑热息痛在0~5 μg·mL⁻¹内,青藤碱在0~2 000 ng·mL⁻¹内,而阿米替林则在0~200 ng·mL⁻¹内;脑组织微透析液中均可检测到各药物(峰浓度在100~6 000 ng·mL⁻¹内),各时间点浓度均低于相应的血液微透析液(峰浓度的脑/血比值在0.04~0.73内)。本实验建立的微透析取样-HPLC-MS/MS方法可适用于大鼠血液和脑组织液中游离型青藤碱、川芎嗪、加巴喷丁、扑热息痛、普瑞巴林和阿米替林的微透析取样和定量研究。

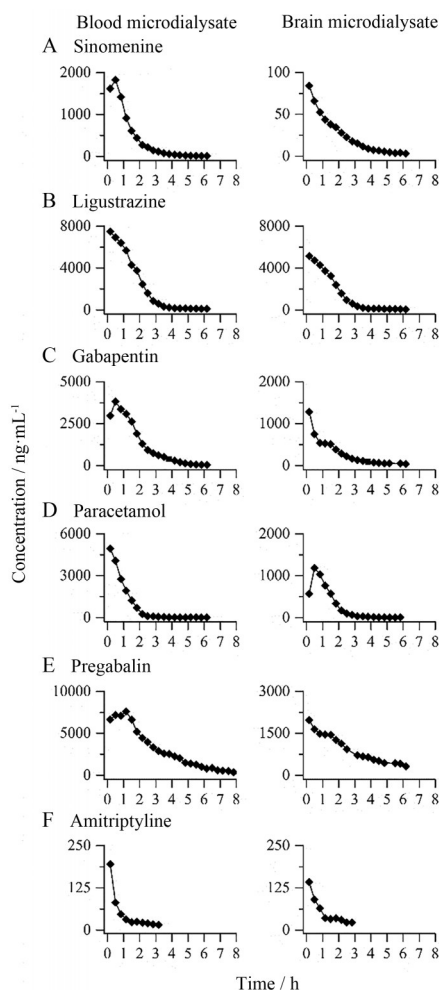


Figure 3 Concentration-time profiles of blood and brain microdialysate samples after intravenous administration of sinomenine (A, 50 mg·kg⁻¹), ligustrazine (B, 50 mg·kg⁻¹), gabapentin (C, 50 mg·kg⁻¹), paracetamol (D, 50 mg·kg⁻¹), pregabalin (E, 50 mg·kg⁻¹) and amitriptyline (F, 40 mg·kg⁻¹) at a perfusate flow rate of 1.5 μL·min⁻¹ using blood and brain microdialysis probes (4 mm-effective membrane length and 20 000 molecular weight cut-off) in rats

讨论

微透析技术用于临床前药代动力学研究的生物样品收集有诸多优势^[14,15]: ①样品可在动物清醒自由活动状态下收集,收集过程中动物几乎不损失体液,可实

Table 3 Recovery *in vitro* ($R_{in vitro}$), diffusion *in vitro* ($D_{in vitro}$), diffusion *in vivo* ($D_{in vivo}$) and recovery *in vivo* ($R_{in vivo}$) of microdialysis probes (4 mm-effective membrane length and 20 000 molecular weight cut-off) for each component at a perfusate flow rate of 1.5 μL·min⁻¹ in tubes and rats. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Component	Blood				Brain			
	$R_{in vitro}$	$D_{in vitro}$	$D_{in vivo}$	$R_{in vivo}$	$R_{in vitro}$	$D_{in vitro}$	$D_{in vivo}$	$R_{in vivo}$
Sinomenine	21.66 ± 1.91	21.17 ± 0.93	20.82 ± 1.47	21.31	20.43 ± 4.19	21.65 ± 0.79	20.54 ± 4.68	19.38
Ligustrazine	21.09 ± 4.23	27.70 ± 3.41	27.07 ± 6.77	20.61	18.04 ± 1.8	24.10 ± 7.71	26.86 ± 3.49	20.11
Gabapentin	26.19 ± 6.46	16.96 ± 2.61	16.76 ± 6.12	25.88	26.81 ± 8.74	19.68 ± 1.08	17.24 ± 0.99	23.49
Paracetamol	26.27 ± 0.77	23.56 ± 2.11	21.37 ± 0.63	23.83	24.31 ± 2.49	23.34 ± 1.86	20.39 ± 1.09	21.24
Pregabalin	24.20 ± 4.85	18.69 ± 1.06	19.10 ± 0.99	24.73	23.14 ± 6.18	20.60 ± 1.32	22.56 ± 2.44	25.33
Amitriptyline	26.62 ± 2.55	29.16 ± 0.33	26.17 ± 4.55	23.89	21.42 ± 0.47	30.72 ± 4.96	30.56 ± 3.19	21.31

现在动物体内的长时间重复取样; ②可实现同一只动物体内多部位同时取样, 如常用的血液和脑同步取样; ③样品中的药物形式是游离性药物, 而游离型药物浓度是决定药效的关键, 并且只有游离型药物才能通过血脑屏障; ④选用合适分子截留量的微透析探针, 样品可省去蛋白沉淀或提取等复杂的前处理操作。但使用微透析技术样品收集的时间分辨率偏低(5~30 min/样品)、样品体积偏少(5~30 μL)、药物成分回收率偏低(10%~30%)等, 需配合更为灵敏和高效的分析检测仪器^[15]。已有报道青藤碱、川芎嗪、加巴喷丁、普瑞巴林、扑热息痛和阿米替林等均可能具有中枢性镇痛作用机制^[2,6,16,17], 因此本研究选择能同步监测血液和脑组织液中游离型药物的微透析技术用于以上药物的取样研究。对血液探针和脑组织探针的回收率进行了考察, 结果各成分的 $R_{in vivo}$ 在 19.38%~25.88% 内, 这是药物适用于微透析技术取样的前提, 也是准确校正血液和脑组织液中实际浓度的关键。增加微透析灌注的速度, 可提高样品收集的时间分辨率, 但同时药物的回收率会降低^[15]。前期考察了不同灌注速度下的体外回收率, 回收率和流速基本呈线性负相关 (Pearson's R , -0.89~-0.99), 本文最终选择 $1.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度进行灌注。总之, 建立的大鼠血液和脑组织液同步微透析液取样方法可行。

微透析液中青藤碱、川芎嗪、加巴喷丁、普瑞巴林、扑热息痛和阿米替林的检测方法已有报道^[18-23], 鉴于临床镇痛药联用的普遍性, 两个或多个以上药物同时定量的分析方法急需建立。本文建立 6 种药物同时检测的 HPLC-MS/MS 方法, 能监测所有可能的药物组合, 检测范围宽; 含不同成分的样品可混合后进行集约式检测, 检测效率高。由于各成分结构中均含有氮原子, 样品检测前加入含氮且与青藤碱结构类似的纳洛酮作为内标, 以减小不同样品在离子源中离子化的差异性。各成分在质谱正离子模式扫描下信号强, 且主要生成 $[M+H]^+$ 峰, 因此在水相和有机相中加入 0.05% 甲酸以提高离子化效率和离子化稳定性。在选择性考察时, 各成分同时监测定性离子对和定量离子对, 以离子丰度比和保留时间确认各成分。通过液相色谱的分离, 样品中多数成分可在 6 min 内分离, 加巴喷丁 (1.59 min) 和普瑞巴林 (1.53 min) 的保留时间较接近, 但监测的离子对所在的通道不同, 所以其定量基本不受影响。微透析灌注液中常含有无挥发性的无机盐离子等, 可通过减少进样量或切换样品进入质谱的时间点, 以减少无机盐在质谱内的持续沉积。本方法所用色谱柱的柱体积约 50~100 μL , 在流速 $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时洗脱 1 个柱体积约需 0.17~0.33 min, 在首个分析物

(内标: 1.00 min) 流入质谱之前有足够的洗脱时间, 样品脱盐完成后再切换入质谱。川芎嗪和扑热息痛的部分样品浓度高于线性范围上限 ($5\ 000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 所以考察了稀释可靠性 (可稀释 10 倍), 超过线性范围的样品可通过稀释后检测。总之, 建立的 HPLC-MS/MS 检测血液和脑组织液微透析液中各药物成分的分析方法可行。

综上, 本研究建立了大鼠血液和脑组织液各成分同步微透析液取样及 HPLC-MS/MS 定量方法, 经过全面的分析方法验证, 符合生物样品分析方法指导原则的要求^[13], 且成功用于大鼠给药青藤碱、川芎嗪、加巴喷丁、扑热息痛、普瑞巴林和阿米替林的微透析液取样和游离型药物浓度定量。后期, 本方法也可用于以上药物的脑通透性评价及药动力学相互作用研究, 并且还可用于含青藤碱或川芎嗪的中药制剂与加巴喷丁、扑热息痛、普瑞巴林和阿米替林等组合使用的合理性和安全性评价等。

References

- [1] Chinese Expert Group on Diagnosis and Treatment of Neuropathic Pain. Chinese expert consensus on diagnosis and treatment of neuropathic pain [J]. Chin J Pain Med (中国疼痛医学杂志), 2013, 19: 705-710.
- [2] Huang YG, Xu JG. Neuropathic Pain From Basic Research to Clinical Practice (神经病理性疼痛临床诊疗学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2010: 374-396.
- [3] Finnerup NB, Sindrup SH, Jensen TS. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain [J]. Pain, 2010, 150: 573-581.
- [4] Chu JH, Lo SY, Chou YL. The alkaloids of Chinese drug, *Ching-Feng-Teng*, *Sinomenium acutum* Rehd. et Wils [J]. Acta Chim Sin (化学学报), 1964, 30: 265-269.
- [5] Cao FY, Liu WX, Wen YS, et al. Studies on the chemical constituents of *Ligusticum chuanxiong* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 1983, 14: 1-2.
- [6] Wang Y, Wang DQ, Cui Y, et al. Analgesic effect of CQM on prosopalgia model rats and its impact on exciting amino acid neurotransmitters [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2013, 38: 3554-3559.
- [7] Gao TL, Shi T, Wiesenfeld-Hallin Z, et al. Sinomenine facilitates the efficacy of gabapentin or ligustrazine hydrochloride in animal models of neuropathic pain [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 854: 101-108.
- [8] Gao TL, Li T, Jia W, et al. Exploratory study data for determining the adverse effects of sinomenine plus gabapentin or ligustrazine hydrochloride and the pharmacokinetic insights of sinomenine in plasma and CNS tissue [J]. Data Brief, 2019, 27:

- 1-7.
- [9] Jiang W, Fan WM, Gao TL, et al. Analgesic mechanism of sinomenine against chronic pain [J]. *Pain Res Manage*, 2020, 2020: 1-10.
- [10] Li T, Zhao XL, Nie YL, et al. UHPLC quantification and brain permeability study of sinomenine and ligustrazine in CQM after single intravenous administration [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 2308-2315.
- [11] Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* [M]. 3rd Ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005.
- [12] Sun Y, Dai J, Hu Z, et al. Oral bioavailability and brain penetration of (-)-stepholidine, a tetrahydroprotoberberine agonist at dopamine D [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 158: 1302-1312.
- [13] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Guiding Principles for Quantitative Analysis of Biological Samples* [S] // *Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典)*. Volume IV. 2015 Ed. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 363-368.
- [14] Wu ZE, Wang DQ. Application of sites-microdialysis technology in pharmacokinetic studies [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2010, 35: 1765-1768.
- [15] Tsai TH. *Applications of Microdialysis in Pharmaceutical Science* [M]. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2011: 39-75.
- [16] Li P, Zhang MY, Wang DQ, et al. Effects of sinomenine on analgesia and exciting amino acid neurotransmitters in brain of SSNI rat model [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2012, 28: 1365-1369.
- [17] Pickering G, Lorient MA, Libert F, et al. Analgesic effect of acetaminophen in humans: first evidence of a central serotonergic mechanism [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2006, 79: 371-378.
- [18] Zheng H, Shi LF, Hu JH. Pharmacokinetic study of free-form sinomenine in rat skin by microdialysis coupled with liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21: 101-106.
- [19] Lv YF, Hu X, Cheng WM, et al. Determination of gastrodin and ligustrazine hydrochloride in plasma and brain dialysate by LC-tandem MS [J]. *Chromatographia*, 2008, 68: 105-110.
- [20] Wang YF, Welty DR. The simultaneous estimation of the influx and efflux blood-brain barrier permeabilities of gabapentin using a microdialysis-pharmacokinetic approach [J]. *Pharm Res*, 1996, 13: 398-403.
- [21] Feng MR, Turluck D, Burleigh J, et al. Brain microdialysis and PK/PD correlation of pregabalin in rats [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2001, 26: 123-128.
- [22] Scott DO, Sorensen LR, Lunte CE. *In vivo* microdialysis sampling coupled to liquid chromatography for the study of acetaminophen metabolism [J]. *J Chromatogr A*, 1990, 506: 461-469.
- [23] Patel S, Shukla C, Patel G, et al. Pharmacokinetics of amitriptyline in rabbit skin and plasma following iontophoretic administrations [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2010, 36: 379-384.