人血浆中替曲朵辛血药浓度测定方法的初步建立与药动学应用

葛庆华[1]，项苗苗[1]，宣坚钢[2]，李　周[1]，康修远[1]
(1. 中国医药工业研究总院医药先进制造国家工程研究中心，上海 201203；2. 江苏宏锦天药业有限公司，江苏泰州 225316)

摘要：建立了 LC-MS/MS 法测定人血浆中的替曲朵辛（**1**）。采用 Waters Atlantis HILIC Silica 色谱柱（2.1 mm×100 mm，3 μm），流动相由乙腈、水和乙酸组成，流速为 0.40 mL/min，柱温为 40 ℃，进样量为 10 μL。该方法的线性范围为 0.02 ～ 5 ng/mL，LLOQ 为 0.02 ng/mL。首次进行注射用 **1** 的人体药代动力学研究，经验证，符合人体药动学研究要求。5、10、20 μg 3 个剂量组单次给药的主要药动学参数分别为 c_{max}（0.129 2±0.041 9）、（0.253 7±0.036 9）、（0.530 8±0.162 6）ng/mL；t_{max}（0.321±0.144）、（0.510±0.313）、（0.541±0.275）h；$t_{1/2}$（6.589±2.018）、（7.047±2.560）、（6.956±3.225）h，为注射用 **1** 的开发和临床应用提供了参考。

关键词：替曲朵辛；液质联用；固相萃取；药代动力学
中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)06-0844-07
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.06.015

Preliminary Establishment of the Method for Determination of Tetrodotoxin in Human Plasma and the Pharmacokinetics Application

GE Qinghua[1], XIANG Miaomiao[1], XUAN Jiangang[2], LI Zhou[1], KANG Xiuyuan[1]
(*1. National Advanced Medical Engineering Research Center, China State Institution of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. Jiangsu Hongjintian Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 225316*)

ABSTRACT: A LC-MS/MS method was established to determine the tetrodotoxin (**1**) in human plasma. The Waters Atlantis HILIC Silica chromatography column (2.1 mm×100 mm, 3 μm) was used, with the mobile phase of acetonitrile-water-acetic acid. The flow rate was 0.40 mL/min, the column temperature was 40 ℃, and the injection volume was 10 μL. The linear range of this method was 0.02 – 5 ng/mL, and the LLOQ was 0.02 ng/mL. The human pharmacokinetic study of **1** injection was conducted for the first time, and the results were validated to meet the requirements of human pharmacokinetic research. The main pharmacokinetic parameters for a single dose of 3 dose groups (5, 10, and 20 μg) were as follows: the c_{max} of (0.129 2±0.041 9), (0.253 7±0.036 9) and (0.530 8±0.162 6) ng/mL, the t_{max} of (0.321±0.144), (0.510±0.313) and (0.541±0.275) h, and the $t_{1/2}$ of (6.589±2.018), (7.047±2.560) and (6.956±3.225) h, respectively, which provided a reference for the development and clinical application of **1** injection.

Key Words: tetrodotoxin; LC-MS/MS; solid-phase extraction; pharmacokinetics

替曲朵辛（tetrodotoxin，**1**），又名河豚毒素，是 1909 年由日本学者田原良纯首先从河豚鱼中提取并命名的，存在于河豚的卵巢、肝脏等部位，毒性比氰化物还要强 1 250 倍[1]。研究[2]表明，**1** 具有镇痛、局麻、解痉等多方面的药理作用，其中较具临床应用前景的是戒毒和镇痛。**1** 的优势在于作为高选择性的钠离子通道阻滞剂，与其他通道无接触，不影响 Na^+ 通道的门控机制，也不影响 Na^+ 电流的时程和闸门电流，因此不具有成瘾性。**1** 的镇痛效力相当于吗啡的 3 200 倍[3]，尤其适合对注射吗啡无效

收稿日期：2023-07-26
作者简介：葛庆华（1963—），女，研究员，从事药物分析及药动学研究。
E-mail：geqinghua@sina.com

的晚期恶性肿瘤患者。

1 的化学名为八氢-12-(羟甲基)-2-亚氨基-5,9:7,10a-二甲撑基-10aH-[1,3]二氧桥[6,5-*d*]-嘧啶-4,7,10,11,12-戊醇[4]，分子式为 $C_{11}H_{17}N_3O_8$，相对分子质量为319.2，化学结构如图1所示。**1** 为白色结晶性粉末，不溶于无水乙醇、乙醚、苯等有机溶剂，但在稀酸水溶液中极易溶解，呈弱碱性(pK_a=8.76)。文献[5]报道，溶液中存在缩醛型 **1** 和内酯型 **1** 的动态平衡。**1** 对热稳定，煮沸后仍具有活性，但在强酸和碱性条件下不稳定[6]。

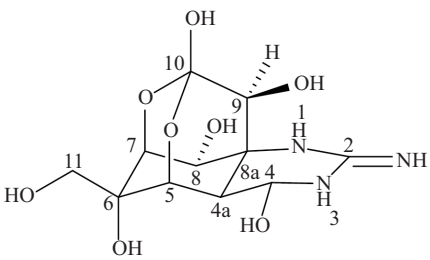


图1 1的化学结构

Fig.1 Chemical Structure of **1**

作为一个颇具潜力的戒毒、镇痛类新药，**1** 的药代动力学研究未见报道。本研究旨在建立LC-MS/MS法测定人血浆中的 **1**，并应用于注射用 **1** 的人体药代动力学研究，以期为注射用 **1** 的开发和临床应用提供参考。

1 仪器与试药

UPLC-Waters Xevo TQ型MS系统和Waters ACQUITY UPLC型液相系统(配备Xevo TQ型MS检测器和MassLynx4.1数据处理系统，美国Sample Manager & Binary Solvent Manager公司)；BT-25S型电子天平(德国Sartorius公司)。

1 对照品(含量98.84%，批号110426)和注射用 **1**(规格10 μg，批号201110012)均购于江苏宏锦天药业有限公司；乙腈和甲醇均为色谱纯，乙酸、乙酸铵均为分析纯，水为超纯水。人空白血浆为健康受试者采集。

2 方法与结果

2.1 溶液和血浆样品的配制

1 对照品溶液：精密称取 **1** 对照品适量，用水溶解、稀释成质量浓度为100 μg/mL的贮备液；精密量取 **1** 贮备液适量，用水稀释成质量浓度为1 μg/mL的溶液；精密量取上述1 μg/mL的 **1** 溶液，以乙腈、水和乙酸(体积比75∶25∶0.2)混合溶液稀释至质量浓度为10 ng/mL，即得 **1** 对照品溶液。

高、中、低浓度基质效应用溶液：精密吸取上述1 μg/mL的 **1** 溶液，以水(含0.8%乙酸)稀释至质量浓度为80 ng/mL，得高浓度基质效应用溶液；取上述溶液，以水逐级稀释得质量浓度分别为20、1 ng/mL的中、低浓度基质效应用溶液。

高、中、低浓度基质效应对照品溶液：分别取上述高、中、低浓度基质效应用溶液50 μL，分别加入乙腈150 μL混匀，得 **1** 质量浓度分别为20、5、0.25 ng/mL的基质效应高、中和低浓度对照品溶液。

血浆标准曲线样品：精密量取 **1** 溶液(1 μg/mL)100 μL，置20 mL量瓶中，以空白血浆定容，得5 ng/mL的血浆标准曲线样品(ULOQ)；取上述ULOQ溶液，以空白血浆依次稀释制得质量浓度分别为2.5、1、0.5、0.2、0.05和0.02 ng/mL的血浆标准曲线样品。

血浆质控(QC)样品：精密量取 **1** 溶液(1 μg/mL)100 μL，置25 mL量瓶中，以空白血浆定容，得高浓度血浆质控样品(HQC，4 ng/mL)；取该血浆样品，以空白血浆逐级稀释，分别得中浓度血浆质控样品(MQC，0.4 ng/mL)、低浓度血浆质控样品(LQC，0.04 ng/mL)、最低定量限样品(LLOQ，0.02 ng/mL)。以上血浆样品均保存在 -80 ℃冰箱中。

2.2 色谱和质谱条件

色谱条件：色谱柱Waters Atlantis HILIC Silica柱(2.1 mm×100 mm，3 μm)；流动相乙腈、水和乙酸(体积比75∶25∶0.2，含2 mmol/L乙酸胺)；流速0.40 mL/min；柱温40 ℃；样品室温度4 ℃；进样量10 μL。

质谱条件：扫描类型MRM positive；电离模式ESI$^+$；毛细管电压2.50 kV；二级锥孔萃取电压3 V；碰撞电压38 V；离子源温度150 ℃；脱溶剂气温度500 ℃；碰撞气流量0.2 mL/min；脱溶剂气流量1 200 L/h；驻留时间200 ms；锥孔电压36 V；监测离子对 *m/z* 320.2→*m/z* 162.0。

2.3 血样前处理

精密吸取血浆样品 500 μL，加至活化的 SiO_2 固相萃取柱（分别用甲醇 1 mL、水 1 mL 活化）上，离心（1 744×*g*）2 min，用干净的玻璃管收集流出液。Oasis® MCX 固相萃取柱分别用甲醇 1 mL、水 1 mL 活化。倾倒出 SiO_2 固相柱的流出液，加至 Oasis® MCX 固相柱上进行萃取，上柱后离心（1 744×*g*）2 min，再依次用水 1 mL、30%甲醇 1 mL 洗涤，离心（1 744×*g*）5 min。然后用甲醇 1 mL（含 5 mmol/L 乙酸胺）洗脱，离心（1 744×*g*）2 min。洗脱液在室温下氮气挥干，残渣以流动相 200 μL 复溶。

2.4 方法学验证

2.4.1 专属性试验

取“**2.1**”项下的 **1** 对照品溶液、人空白血浆样品、0.02 ng/mL 的血浆标准溶液、受试者给予 20 μg 注射用 **1** 4 h 后的血浆样品，经预处理后按“**2.2**”项下色谱和质谱条件进样测定，以色谱保留时间和离子对定性确定 **1** 的色谱峰。结果如图 2 所示，在上述条件下，**1** 的保留时间为 6.82 min。内源性物质不干扰主峰，专属性试验符合要求。

2.4.2 线性试验

取“**2.1**”项下质量浓度分别为 5、2.5、1、0.5、0.2、0.05 和 0.02 ng/mL 的血浆标准曲线样品，按“**2.3**”项下方法处理后，按“**2.2**”项下色谱和质谱条件进样测定，以样品质量浓度 *c* 对峰面积 *A* 进行加权最小二乘法线性拟合（不包括零点），权重为 1/*c*，得回归方程 *A*=912 7*c*+62.40，*R*=0.999 7。结果表明，**1** 质量浓度在 0.02～5 ng/mL 与峰面积线性关系良好。

2.4.3 准确度试验

取“**2.1**”项下 **1** 质量浓度为 0.04、0.4 和 4 ng/mL 的血浆 QC 样品各 5 份，按“**2.3**”项下方法处理后，按“**2.2**”项下色谱和质谱条件进样测定，计算测定方法的回收率。结果如表 1 所示，表明本方法的准确度符合要求。

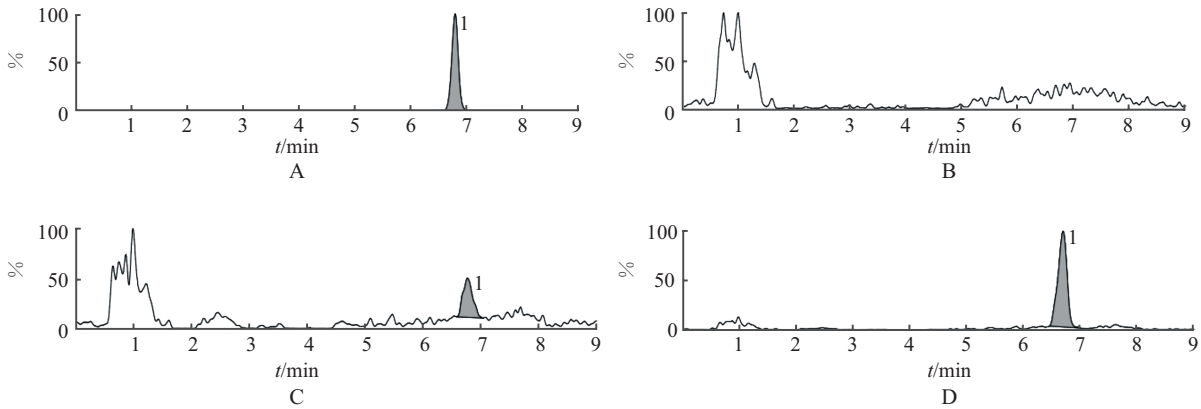
2.4.4 精密度试验

取“**2.1**”项下 **1** 质量浓度为 0.04、0.4 和 4 ng/mL 的血浆 QC 样品各 5 份，按“**2.3**”项下方法处理后，按“**2.2**”项下色谱和质谱条件进样测定，计算方法的日内 RSD。按上述方法在试验的不同自然日共测定 3 个连续分析批，将结果分别进行统计计算，得

表 1　精密度与准确度的试验结果 /%

Tab.1　Test Results of Precision and Accuracy/%

质量浓度 /(ng·mL^{-1})	日内 RSD/%	日间 RSD/%	方法回收率 /%
0.04	8.5	10.6	107.2±9.10
0.4	3.1	4.6	96.14±3.02
4	5.2	7.6	92.82±4.80



A—**1** 对照品溶液；B—空白血样；C—LLOQ 血样；D—受试者给予 20 μg **1** 后 4 h 的血样。1—**1**。

图 2　1 的典型色谱图

Fig.2　Typical Chromatograms of **1**

日间 RSD。结果如表 1 所示，表明本法的精密度符合要求。

2.4.5 灵敏度试验

取“**2.1**”项下质量浓度为 0.02 ng/mL 的血浆标准曲线溶液共 5 份，按“**2.3**”项下方法处理后，按“**2.2**”项下色谱和质谱条件进样测定，测得 **1** 的质量浓度为（0.018 32±0.003 207）ng/mL，代表图谱如图 2C 所示。说明本法血浆中 **1** 的最低定量限（LLOQ）为 0.02 ng/mL。

2.4.6 稳定性研究

取“**2.1**”项下质量浓度为 100 μg/mL 的 **1** 贮备液，于 4 ℃放置 61 d 后，与当天配制的贮备液进行稳定性比较，测定结果表明贮备液于 4 ℃放置 61 d 稳定。

分别考察 HQC 和 LQC 样品于室温放置 4 h、循环冻融 3 次、－80 ℃贮存 30 d 的稳定性。结果表明血浆样品在上述条件下稳定。

将 HQC 和 LQC 样品处理后于 4 ℃放置 72 h 再进样测定，与新鲜处理后立即测定的样品进行比较，结果显示稳定性良好。

2.4.7 基质效应和提取回收率研究

参考文献[7—9]，采用萃取后添加待测成分的方法评价基质效应。取 6 个不同来源的人空白血浆，每个来源各 3 份，按“**2.3**”项下方法操作至氮气挥干，分别用“**2.1**”项下的高、中、低浓度基质效应对照品溶液 200 μL 混匀，旋涡振荡 1 min，按“**2.2**”项下色谱和质谱条件进样测定，各组分的峰面积记作 *A*。取高、中、低浓度基质效应对照品溶液，进样分析，各组分的峰面积记作 *B*。取 HQC、MQC、LQC 样品，按“**2.3**”项下方法操作，按“**2.2**”项下色谱和质谱条件进样测定，各组分的峰面积记作 *C*。照下式计算绝对基质效应［absolute matrix effect（aME）］、相对基质效应［relative matrix effect（rME/%），为绝对基质效应的相对标准偏差］和提取回收率（extraction recovery），试验结果如表 2 所示，可见本方法的基质效应影响小，提取回收率精密、稳定，符合要求。

$$aME = A/B \times 100\%$$

$$提取回收率 = C/A \times 100\%$$

2.4.8 血浆稀释效应的验证试验

配制 **1** 质量浓度为 16 ng/mL 的血浆样品，精密吸取上述血浆样品 500 μL，加入人空白血浆 2 mL，混匀，血浆稀释倍数为 5 倍。取稀释后的血浆样品，按“**2.3**”项下方法处理后按“**2.2**”项下色谱和质谱条件进样测定，平行测定 5 份。测得 **1** 的质量浓度为（16.23±1.61）ng/mL，表明稀释血浆样品对测定结果不影响。

表 2 血浆中 **1** 的基质效应与提取回收率 /%

Tab.2 Matrix Effects and Extraction Recovery of **1** in Plasma/%

1 浓度 /（ng·mL^{-1}）	aME /%	rME /%	提取回收率 /%
0.1	90.96±4.12	5.7	80.61±6.53
2	90.11±3.58	3.9	68.74±2.98
8	90.25±5.49	5.5	71.41±3.10

2.5 在Ⅰ期临床试验中的应用

本临床试验由湖南脑科医院新药临床试验机构按 GCP 要求完成。临床试验方案经由湖南脑科医院新药临床试验机构医学伦理委员会批准，伦理号为（2012）伦审［药］（2）号。

2.5.1 试验设计及试验对象

试验方案为随机、开放、单次给药条件下的人体药代动力学研究，受试对象为阿片类依赖、经过脱毒治疗后的康复期受试者。试验分为 3 个剂量组（5、10、20）μg，每组 8 人，男女各半。低剂量组：年龄（32.5±4.9）岁，身高（165.5±5.8）cm，体质量（57.5±10.0）kg；中剂量组：年龄（31.3±9.9）岁，身高（163.1±7.3）cm，体质量（58.0±9.6）kg；高剂量组：年龄（29.4±7.7）岁，身高（161.4±4.6）cm，体质量（55.4±9.7）kg。以上受试者既往及试验期间均无过敏史、嗜酒史、吸烟史、其他病史、体格检查异常史。受试者试验前均自愿签署知情同意书。

2.5.2 给药方法及血样采集

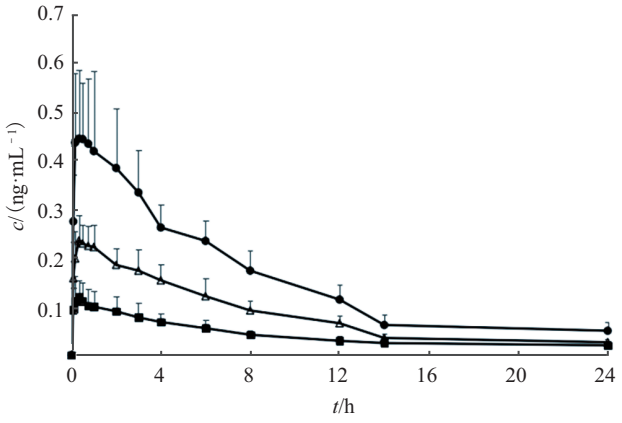
24 名受试者被随机分配到给予低、中、高 3 个剂量组中的任一组中，进行单次给药试验。受试者试验前夜禁食（不禁水）10 h 以上，于试验当日早晨空腹接受相应剂量的注射用 **1**。给药方法为肌内注射。给药 2 h 后方可饮水、进食标准餐。

给药前在受试者肘静脉处安放一留置针，每次采血前抽取血液 0.5 mL，弃去后采样。分别于给药前和给药后 0.083、0.17、0.33、0.50、0.75、1、2、

3、4、6、8、12、14、24 h 时抽血 6 mL，置事先已经贴好标签并含有肝素钠抗凝剂的试管内，离心(1 744×*g*) 10 min。所得血浆转移至 1.5 mL 塑料试管中，于 －80 ℃冰箱中保存，待测。

2.5.3 血药浓度测定及药动学结果

采用已验证的 LC-MS/MS 法测定上述人血浆中 **1** 的浓度。受试者单次给予 5、10、20 μg 注射用 **1** 后的平均药 - 时曲线如图 3 所示。



■—5 μg；△—10 μg；●—20 μg。

图 3　受试者单剂量注射 5、10、20 μg 注射用 1 后的平均药 - 时曲线 (*n*=8)

Fig.3　Mean Plasma Concentration-time Curves of **1** after a Single Dose Injection of 5, 10 or 20 μg of **1** Injection in Subjects (*n*=8)

利用 DAS 软件（版本 2.0.1）的非房室模型对单次注射 **1** 的药物动力学参数进行计算。c_{max} 和 t_{max} 用实测值表示，$AUC_{0\to t}$ 用梯形法计算，继而计算 $AUC_{0\to\infty}$、MRT、$t_{1/2}$、清除率 / 生物利用度 (Cl/*F*) 和表观分布容积 / 生物利用度 (V_d/F)。

$$AUC_{0\to\infty}=AUC_{0\to t}+c_{tn}/\lambda_z$$

$$MRT=AUMC/AUC$$

$$t_{1/2}=0.693/\lambda_z$$

$$Cl/F=Dose/AUC_{0\to\infty}$$

$$V_d/F=(Cl/F)\times\lambda_z$$

式中：λ_z 是对数血药浓度 - 时间曲线末端直线部分求得的末端消除速率常数，可用对数血药浓度 - 时间曲线末端直线部分的斜率求得；t_n 是最后一次可测浓度的取样时间；c_{tn} 是测定的最后一点的血药浓度值；AUMC 为药时曲线下面积的一阶矩。

将每组 8 名受试者的测定数据列表，然后分别对各个受试者进行主要药动学参数计算，并求出各参数的算术平均值 ($\bar{x}$)、标准差 (s)。主要药动学参数如表 3 所示。

表 3　单次给予 1 的药动学参数 ($\bar{x}\pm s$, , *n*=8)

Tab.3　Pharmacokinetic Parameters of **1** after Single-dose Administration ($\bar{x}\pm s$, , *n*=8)

参数	**1** 给药剂量		
	5 μg	10 μg	20 μg
c_{max}/(ng·mL^{-1})	0.129 2±0.041 9	0.253 7±0.036 9	0.530 8±0.162 6
t_{max}/h	0.321±0.144	0.510±0.313	0.541±0.275
$AUC_{0\to t}$/(ng·h·mL^{-1})	0.744±0.287	1.833±0.446	3.661±0.744
$AUC_{0\to\infty}$/(ng·h·mL^{-1})	0.969±0.303	2.143±0.532	4.124±0.915
$t_{1/2}$/h	6.589±2.018	7.047±2.560	6.956±3.225
$MRT_{0\to t}$/h	4.888±1.306	6.317±1.216	7.043±0.976
$MRT_{0\to\infty}$/h	9.197±2.473	9.686±2.715	10.14±3.525
V_d/(f·L^{-1})	51.40±15.31	47.36±14.06	48.15±19.27
K_e/(1·h^{-1})	0.112±0.025	0.111±0.041	0.128±0.072
Cl/(f·L^{-1}·h^{-1})	5.571±1.577	4.892±1.055	5.101±1.353

3　讨论

截至 2012 年本试验开始前，国内外文献[10—13]报道的 **1** 血药浓度测定方法的 LLOQ 为 1 ～ 10 ng/mL，近年又有多篇文献[14—15]报道血浆中 **1** 的测定方法，最低的 LLOQ 为 0.1 ng/mL[14]，虽有提高，但仍不能满足人体药动学研究灵敏度的要求。**1** 测定的难度主要表现在：①给药剂量为“μg”级，血药浓度为“pg”级；② **1** 的强极性导致其不溶于常规的有机溶剂，难以提取、浓缩；③ **1** 不被常规反相柱保留，色谱行为差。本研究从以下几方面着手，逐一化解。

3.1　血样前处理的优化

1 是一种强极性、弱碱性的化合物，给药后在血浆中浓度仅为“pg/mL”级。而血浆中含有大量强极性的内源性物质，如血浆蛋白和 Na^+、Cl^- 等离子的含量都高达“mg/mL”级，葡萄糖、尿素和有机酸等的含量也高达“μg/mL”级。即使把其中 99% 的内源性杂质都除掉，剩下的 1% 仍高出 **1** 血药浓度的数百倍至数千倍。在进行 MS/MS 检测时，这些内源性成分会严重抑制 **1** 的质谱响应，降低测定方法的灵敏度和重现性。因此选用合适的前处理手段将血浆中的内源性物质尽可能去除，是本方法的关键。

1 的强极性决定了常规液液萃取方法难以实现分离。本研究尝试用甲醇或乙腈蛋白沉淀的方法，

但由于血浆基质未经分离，基质效应大，无法满足。因此本研究选用能实现良好分离和富集目的的固相萃取法。先后尝试了多种固相萃取柱，发现 **1** 在 SiO_2 柱上不保留，在 Oasis® HLB 和 Oasis® WCX 柱上保留弱，而在混合型阳离子交换与反相保留机制的 Oasis® MCX 柱上能得到有效保留。SiO_2 柱的串联使用可最大限度地去除内源性物质，进一步提高方法的灵敏度和重现性。

3.2 监测离子对的选择

图 4 为 **1** 的二级质谱谱图，主要有 3 个碎片离子，即 *m/z* 302.0、*m/z* 284.1、*m/z* 162.0。*m/z* 302.0 是母离子丢失 1 个水分子而得（$[M+H-H_2O]^+$），*m/z* 284.1 是母离子丢失 2 个水分子而得（$[M+H-2H_2O]^+$），*m/z* 162.0 是 C8a—C9 和 C6—C11 键断裂后连续丢失水分子而得到的一个 2- 氨基氢化喹唑啉化合物（见图 4 中 *m/z* 162 的结构式）[8]。试验表明，*m/z* 162.0 子离子质谱响应最高且信号稳定，选择离子对 *m/z* 320.2→*m/z* 162.0 为定量监测通道；选择离子对 *m/z* 320.2→*m/z* 284.1 为定性监测通道。

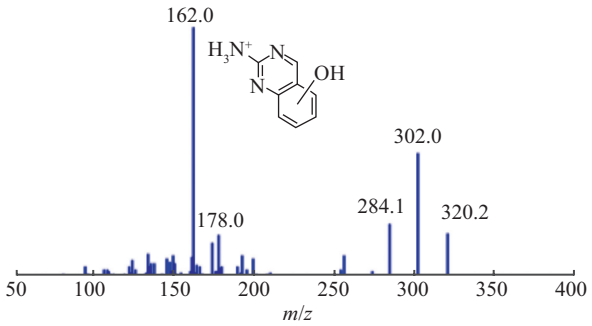


图 4 1 的二级质谱图

Fig.4 MS/MS Spectrum of **1**

3.3 色谱条件的优化

试验表明，血样中残留的内源性物质是影响 **1** 检测灵敏度和重复性的关键因素，将 **1** 与内源性物质尽可能分开，是提高灵敏度的一个重要途径。

由于 **1** 极性强，在 C_8、C_{18} 色谱柱上没有保留，而反相液相色谱中常用的增加色谱保留的离子对试剂又不适用于质谱检测。根据 **1** 的弱碱性，前后尝试了兼具强阳离子交换和反相分离特点的 Shiseido Capcell Pak CR 色谱柱以及 Waters Atlantis HILIC Silica 色谱柱。结果表明，前者 **1** 得以保留，但与基质依旧分不开，而后者对 **1** 的保留极佳。本法将 **1** 的保留时间设为 6.7 min 左右，可有效分离内源性物质。

1 在酸性条件下易发生质子化，有利于提高质谱响应。本研究考察了流动相中乙酸、甲酸及乙酸胺对 **1** 离子化效率的影响，最终选择 0.2% 的乙酸和 2 mmol/L 的乙酸铵。本法的绝对基质效应均大于 90%，相对基质效应≤ 5.7%。可见，本法采用的血样前处理手段和优化的色谱条件，能有效去除和分离内源性杂质，减少基质效应。

3.4 本法的局限和改进

本研究试验完成于 2013 年，生物样品分析方法的验证遵循《中华人民共和国药典》2010 年版（ChP 2010）“附录 XIX B 药物制剂人体生物利用度和生物等效性试验指导原则”。因此本法在基质效应的验证、精密度与准确度浓度的设置等方面与现今的指导原则不符合，后续临床研究还需按现行标准重新进行方法学验证。

通常，LC-MS/MS 法均加入内标，可平抑、抵消测定过程中的误差。而 **1** 特殊的结构使得合成同位素内标的难度很大。本研究在方法探索时加入伏格列波糖、异丙托溴铵等多种强极性的物质作为内标，由于这些药物的结构与 **1** 相差极大，使得在样品提取、色谱分离、质谱响应等方面的行为与 **1** 极其不一致，甚至相反，导致经“内标校正”的精密度和准确度数据变得更差。因此，本研究采用外标法、标准曲线进行定量。经方法学验证及对 600 多个临床样品的连续测定，表明本法结果准确、系统稳定，符合 ChP 2010 附录 XIX B 的相关要求。然而，5 μg 剂量组的部分受试者末次采血点的血药浓度未满足峰浓度 1/10 的要求。因此，本法还需进一步改进、提高灵敏度以满足低剂量给药血药浓度测定的要求。

本研究首次报道了人体给予注射用 **1** 的药动学参数。本研究室还建立了人尿中 **1** 的测定方法，并研究受试者给予 **1** 后 24 h 的尿排泄率，将于后续论文发表。

致谢：丁存刚、吴静雯对本项研究给予帮助！

参考文献：

[1] 郑雍怡. 大鼠血浆中河豚毒素的定量检测研究 [D]. 上海：

上海交通大学硕士学位论文 , 2008.

[2] 陈素青 , 任雷鸣. 河豚毒素的药理作用及临床应用 [J]. 中国海洋药物 , 2001, (6): 50-55.

[3] 佚名. 制药业关注河豚毒素发展 [J]. 医药化工 , 2008, (5): 36.

[4] 邱芳龙. 一种室温稳定的注射用替曲朵辛组合物制剂 : 中国 , 101554368B [P]. 2013-06-12.

[5] YASUMOTO T, YOTSU M, MURATA M. New tetrodotoxin analogues form the newt *Cynops ensicauda* [J]. *J Am Chem Soc*, 1988, **110**: 2344-2345.

[6] MOSHER H S. The chemistry of tetrodotoxina [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1986, **479**: 32-43.

[7] 谢家树 , 葛庆华. LC/MS 测定中生物样品的基质效应问题 [J]. 药物分析杂志 , 2008, **28**(8): 1386-1389.

[8] CHAMBERS E, WAGROWSKI-DIEHL D M, LU Z, *et al*. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses [J]. *J Chromatogr B*, 2007, **852**(1/2): 22-34.

[9] PAUL J T. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry [J]. *Clin Biochem*, 2005, **38**(4): 328-334.

[10] JEN H C, LIN S J, TSAI Y H, *et al*. Tetrodotoxin poisoning evidenced by solid-phase extraction combining with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2008, **871**(1): 95-100.

[11] 王洪允 , 江　骥 , 胡　蓓. LC-MS-MS 测定血浆中河豚毒素 [J]. 分析测试学报 , 2004, **21**(S1): 18-20.

[12] 张秀尧 , 蔡欣欣. 亲水液相色谱三重四极杆质谱联用法快速检测尿液和血浆中河豚毒素 [J]. 分析化学 , 2009, **37**(12): 1829-1833.

[13] CHO H E, AHN S Y, SON I S, *et al*. Determination and validation of tetrodotoxin in human whole blood using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectroscopy and its application [J]. *Fore Sci Int*, 2012, **217**(1/3): 76-80.

[14] XIN L, LIANG Y, YANG S S, *et al*. Simple and fast determination of tetrodotoxin in human plasma based on hydrophilic-interaction/ion-exchange mixed-mode solid phase extraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectroscopy [J]. *J Chromatogr A*, 2022, **1684**: 463567.

[15] TSUJIMURA K, YAMANOUCHI K. A rapid method for tetrodotoxin determination by LC-MS/MS from small volumes of human serum, and confirmation of pufferfish poisoning by monitoring [J]. *Food Addit Contam*, 2015, **32**(6): 977-983.

