

LC-MS 法测定大鼠脑部海马区中苯巴比妥的含量

杨志宏, 刘晓东*, 谢林, 梁艳, 杨慧文

(中国药科大学药物代谢与动力学研究中心, 南京 210009)

摘要 目的: 建立大鼠脑部海马区中苯巴比妥的 LC-MS 测定方法。方法: 海马匀浆液中加入内标茶碱, 用乙醚/环己烷混合系统提取、挥干, 用甲醇复溶, 高速离心后, 取上清液进行 LC-MS 测定。色谱柱为 Shim-pack ODS C₁₈ (150 mm×2.0 mm ID, 5.0 μm), 离子源为 ESI, 检测离子为 [M-H]⁻; 苯巴比妥 (*m/z*): 231; 茶碱 (*m/z*): 179, 流动相 A 为超纯水+0.03% 甲酸+0.004% 三乙胺, 流动相 B 为甲醇, 以 0.2 mL/min 的流速进行梯度洗脱。结果: 此条件下苯巴比妥与内标茶碱显示良好分离; 方法回收率大于 87%; 批内批间变异系数均小于 10%; 线性范围为 10~2 000 ng/mL; 可定量下限为 10 ng/mL。在相应的生物样品中标准曲线的相关系数 *r* 大于 0.999 7, 质控样本、冻融试验及基质效应均符合要求。结论: 该方法经考查符合生物样品测定要求, 可用于海马中苯巴比妥的含量测定。

关键词 苯巴比妥; LC-MS 法; 海马; 含量测定

中图分类号 TQ460.7 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2006)02-0142-04

Determination of phenobarbital in rat hippocampus by LC-MS

YANG Zhi-hong, LIU Xiao-dong, XIE Lin, LIANG Yan, YANG Hui-wen

(Center of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract Aim: To develop a sensitive and specific LC-MS method for the quantitative analysis of phenobarbital (PB) in rat hippocampus. **Methods:** PB was extracted from rat hippocampus by the mixed solvents of ether and cyclohexane after theophylline was added as internal standard. After evaporation, the residual was reconstituted with methanol and centrifuged. The upper aliquot was used for injection onto HPLC system. The chromatographic analyses were performed on a by Shim-pack ODS C₁₈ column (150 mm×2.0 mm ID, 5.0 μm) with the mobile phase which was operated in the gradient mode using mobile phase A (methanol-0.03% formic acid-0.004% triethylamine) and mobile phase B (methanol) at a flow rate of 0.2 mL/min. Detection was carried out on an electrospray ionization (ESI) mass spectrometer; operated in selected ion monitoring (SIM) and negative-ionization mode of target ion *m/z* 231 for PB and *m/z* 179 for the theophylline. **Results:** Under this analytic setting, there was good resolution between PB and IS. The calibration curve was linear in the range of 10~2000 ng/mL with *r*>0.99 and the limit of quantitation of 10 ng/mL. The recoveries of the analytes were more than 87%, and both intra-batch and inter-batch RSD were less than 10%. In addition, freeze-thaw stability, matrix effect, and quality control were with acceptable data. **Conclusion:** A sensitive, reliable and accurate method suitable for the quantitation of PB in rat hippocampus has been established.

Key words phenobarbital; LC-MS; hippocampus; determination of contents

This project was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 program) (No. 2003AA2Z347A) and Foundation of Jiangsu Key Laboratory of Drug Metabolism & Pharmacokinetics (No. BM2001201)

苯巴比妥 (phenobarbital, PB) 为经典的巴比妥类中枢神经系统抑制性药物, 用于防治癫痫大发作

及治疗癫痫持续状态, 也有将其列为治疗小儿癫痫的首选药物。海马区是与癫痫关系最为密切的脑

* 收稿日期 2005-09-05 * 通讯作者 Tel: 025-83271006 E-mail: xdlu@cpu.edu.cn

基金项目 国家高技术研究发展计划 (“八六三”计划) 资助项目 (No. 2003AA2Z347A); 江苏省药物代谢动力学重点实验室资助项目 (No. BM2001201)

部结构,大约60%的癫痫起源于颞叶,而海马癫痫占颞叶癫痫的70%~80%,海马薄片研究也证实癫痫发作期放电始自于CA1区,所以海马区中治疗药物的浓度及其本身的病变与癫痫之间存在着密切的相关性。本实验考察整体情况下PB在大鼠脑海马区中的摄取情况,以便进一步对PB在海马区上的转运规律和抗药机制进行研究。测定生物样品中PB浓度的方法有高效液相色谱法^[1-4],最低检测浓度在1 $\mu\text{g/mL}$ 左右,但由于海马质量体积较小(大鼠约50 mg),药物浓度较低,用常规HPLC法不能满足测定要求。尽管有Kanazawa、Goulle等^[5,6]采用LC-APCI-MS、GC-MS法测定PB在血浆或头发中的含量,但未见采用LC-ESI-MS法测定海马区中PB含量的文献报道。

1 实验材料

1.1 仪器

岛津LC-MS 2010A高效液相色谱-质谱联用仪;SCL-10Avp系统控制器,LC-10ADvp泵,DGU-14AM在线真空脱气机,SIL-HTc恒温自动进样器,CTO-10Avp柱温箱,电喷雾离子化接口的四极杆质谱检测器以及LC-MS solution 2.04色谱工作站;Millipore Milli-Q Gradient A10超纯水器;Sigma T21高速离心机;Thermo Savant SPD1010真空离心浓缩装置。

1.2 药品与试剂

苯巴比妥标准品(中国药品生物制品检定所);内标物:茶碱标准品(中国药品生物制品检定所);甲醇(Fisher公司,色谱纯);其余试剂均为市售分析纯,实验用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为Shim-pack ODS C_{18} (5.0 μm , 150 mm $\times$ 2.0 mm ID,岛津公司),柱温40 $^{\circ}\text{C}$ 。采用梯度洗脱方式:流动相A为含0.03%甲酸与0.004%三乙胺的超纯水,流动相B为甲醇;流速为0.2 mL/min。梯度洗脱程序如下:0~4.0 min, B:10%~90%;4.0~4.5 min, B:90%;4.5~5.0 min, B:90%~10%;5.0~10 min, B:10%。

2.1.2 质谱检测参数 离子化方式:电喷雾离子化(ESI);离子极性 Negative;选择性离子监测(SIM);曲型脱溶剂装置(CDL)温度250 $^{\circ}\text{C}$;CDL电

压:20 V;加热块温度200 $^{\circ}\text{C}$;离子源电压-4.5 kV;检测电压:1.6 kV;检测离子 $[\text{M-H}]^{-}$;苯巴比妥 m/z :231,茶碱 m/z :179;雾化气流速1.5 L/min;干燥气流速2.0 L/min。

2.2 海马样品处理

精密称定海马50 mg,加入定量超纯水超声匀浆。取匀浆悬液0.5 mL,精密加入2.5 $\mu\text{g/mL}$ 内标10 μL ,涡旋混匀,加入乙醚-环己烷混合溶液(1:1)5 mL,振荡3 min,离心(4 000 r/min, 10 min)。取上清液4 mL,置真空离心浓缩装置挥干。用甲醇200 μL 溶解残渣,高速离心(20 000 r/min, 5 min),取上清液10 μL 进样,用样品与内标峰面积比进行定量分析。

2.3 标准曲线的制备

取空白海马匀浆悬液0.5 mL,精密加入PB标准品溶液10 μL ,配制成10, 20, 50, 100, 250, 500, 1 000和2 000 ng/mL各浓度,按“2.2”项下操作,记录样品和内标峰面积,利用样品浓度 c 对样品与内标峰面积比 R 作直线回归,得回归方程 $R = 0.012c - 0.0066$, $r^2 = 0.9996$ ($n = 5$),线性范围10~2 000 ng/mL,标准曲线最低点10 ng/mL时, $S/N > 10$ 。

2.4 方法的专属性

在本试验条件下,PB和内标峰形良好、分离完全、基线噪音小、无杂质峰干扰,两者的保留时间分别为6.7 min与5.4 min(如图1)。在此条件下所测得的结果能代表PB浓度。

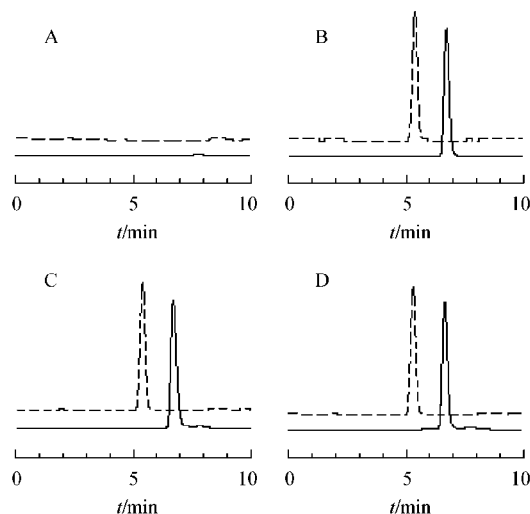


Fig.1 SIM chromatograms of (A) blank hippocampus solution; (B) standard PB, standard IS; (C) blank hippocampus solution spiked with standard PB and standard IS, respectively; (D) rat hippocampus sample of 60 min after a single intravenous administration of PB at dose of 10 mg/kg — PB(m/z :231);----IS(m/z :179)

2.5 方法回收率测定

取 8 支洁净玻璃试管,精密加入 PB 标准品工作液和内标 10 μL ,置真空离心浓缩装置中挥干,残渣用甲醇 200 μL 溶解,取 10 μL 进样分析,用样品峰面积/内标峰面积比与稀释后的样品浓度作直线回归,得到标准品的回归方程。另取试管加空白海马匀浆悬液 0.5 mL,加入 PB 标准品工作液和内标,使其浓度分别为 20, 100 和 1 000 ng/mL,按“2.2”项下操作,将样品峰面积/内标峰面积比代入到标准品的回归方程,得到相应的浓度,从而求得海马匀浆悬液中 PB 的提取回收率,结果见表 1。

Tab.1 Recovery of PB in hippocampus solution ($n=5$)

Added (ng/mL)	Found (ng/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
20	17.41 $\pm$ 0.45	87.05 $\pm$ 2.24	2.57
100	87.71 $\pm$ 3.48	87.71 $\pm$ 3.48	3.96
1000	906.2 $\pm$ 20.39	90.62 $\pm$ 2.40	2.25

2.6 方法的精密度试验

空白海马匀浆悬液 0.5 mL 加入 PB 标准品工作液使成 20, 100 和 1 000 ng/mL 系列浓度,按“2.2”项下操作,记录样品与内标峰面积比值,代入同一条标准曲线,计算得到相应的浓度,以此作为精密度指标。考察批内变异和连续 3 d 内的批间变异情况,结果见表 2。

Tab.2 Precision of PB determination in hippocampus solution($n=5$)

c (ng/mL)	Intra-day		Inter-days	
	$\bar{x} \pm s$ (ng/mL)	RSD(%)	$\bar{x} \pm s$ (ng/mL)	RSD(%)
20	21.25 $\pm$ 1.11	5.21	20.34 $\pm$ 1.42	7.00
100	98.18 $\pm$ 4.04	4.11	98.33 $\pm$ 5.22	5.31
1 000	992.09 $\pm$ 20.96	2.11	997.22 $\pm$ 19.71	2.98

2.7 冻融稳定性考查

取洁净的试管,加入空白海马匀浆悬液 0.5 mL 及标准品工作液使 PB 浓度分别为 20, 100 和 1000 ng/mL,放置 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏 1 周,用 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴解冻后,测定海马匀浆悬液中药物浓度,结果如表 3。

Tab.3 Freeze-thaw stability of PB in hippocampus($n=5$)

Added (ng/mL)	Found (ng/mL)	RSD (%)
20	21.01 $\pm$ 1.85	8.81
100	99.47 $\pm$ 2.71	2.73
1 000	988.97 $\pm$ 32.62	3.30

2.8 基质效应考察

质谱的 SIM 模式可选择性监测目标离子,灵敏

度和专属性高,但与目标化合物同时进入离子源的内源性杂质可能会影响其离子化,这就是基质效应(matrix effect)。考察方法如下:取 6 只大鼠的空白海马匀浆悬液,不加内标,按“2.2”项下操作,挥干后加入 PB 标准工作液,挥干,用甲醇 200 μL 溶解,使终浓度为 20, 100, 1 000 ng/mL,每个浓度进样 5 次,记录峰面积为 A_1 ;另取 PB 标准工作液,挥干,加入甲醇 200 μL 溶解,使终浓度同上,即排除空白海马基质的干扰,每个浓度进样 5 次,记录峰面积为 A_2 。内标同样进行考察,结果见表 4。如果 A_1/A_2 小于 85% 或者大于 115%,表明有基质效应存在,应对色谱条件进行优化。

Tab.4 Matrix effect of PB and IS in rat hippocampus solution($n=5$)

Sample	Added (ng/mL)	A_1/A_2 (%)
PB	20	94.33
	100	93.26
	1 000	96.88
IS	20	97.87
	100	97.77
	1 000	100.80

2.9 检测方法的质控

为了检验方法的可靠性,由课题负责人配制 3 种浓度(I:20 ng/mL, II:100 ng/mL 和 III:1 000 ng/mL)的含 PB 海马匀浆悬液,对样品分析者采用单盲法进行检测方法的质控,以测得浓度表示,每种浓度重复 5 次,结果见表 5。

Tab.5 Quality control data of PB in hippocampus solution ($n=5$)

Added (ng/mL)	Found (ng/mL)	RSD (%)
20	19.03 $\pm$ 1.42	7.46
100	101.1 $\pm$ 3.53	3.49
1000	995.25 $\pm$ 30.71	3.09

3 方法学的应用

健康 SD 大鼠 8 只,雄性,体重(200 $\pm$ 20)g,由中国药科大学实验动物中心提供。8 只动物分为戊四唑(PTZ)点燃癫痫组和正常对照组,每组 4 只。两组动物按文献[7,8]分别进行 PTZ 化学点燃模型造模和正常对照动物的平行操作。摄取实验前大鼠禁食过夜但可自由饮水。实验时两组动物分别于股静脉注射 PB 生理盐水溶液,剂量为 10 mg/kg 体重。于给药后 60 min 断头处死动物,迅速取脑,剥离海马区脑组织,按“2.2”项下进行操作,采用本

文建立的 LC-ESI-MS 法测定海马区中 PB 的含量,浓度单位换算为每毫克海马组织中 PB 的纳克数,测定结果如图 2。在测定范围内,本方法可准确定量 PB 的浓度。

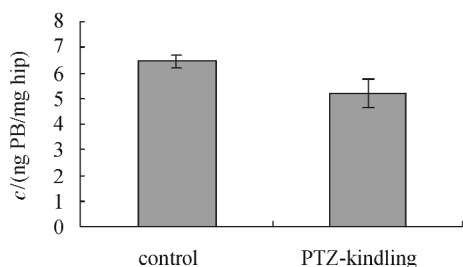


Fig.2 Concentration of PB in hippocampus between control and PTZ-kindling rats ($n=4$)

4 讨论

PB 的常用检测方法多为 HPLC-UV 法,但由于海马质量和体积较小,药物浓度较低,PB 吸收波长 210 nm 处,内源性杂质干扰较大,所以常规的紫外检测的灵敏度不能满足测定要求,故我们选用了更为灵敏的 LC-MS 法,将 HPLC 的高分离能力与 MS 检测的高灵敏度和强专属性相结合,以保证测定结果的可靠性。

本文建立的 LC-ESI-MS 法,采用选择性离子检测(SIM)模式,应用 $[M-H]^-$ 峰来进行定量分析。通过预试验得出采用负离子模式相对于正离子模式检测,能减少内源性杂质的干扰,且基线噪音较低, $[M-H]^-$ 峰度较高,其专属性及选择性较好。在流动相中加入 0.03% 的甲酸,能够提高 PB 的质谱响应、稳定其保留时间和提高进样的重现性。但当甲酸浓度过高时,PB 的信号强度变弱;当甲酸浓度太低时,进样重现性较差。本文采用乙醚-环己烷混合液提取系统提取回收率大于 87%,预试验时单用乙醚或环己烷提取回收率均低于 70%,单用乙酸乙酯提取的内源性杂质较多干扰测定,乙醚-环己烷混合液提取具有回收率较高、样品较纯净、缩短样品处理时间的优点。此外,本测定方法采用梯度改变流动相极性方式进行洗脱,利于待测药物以较好的峰形在较短的时间内出峰,可以缩短进样

时间,提高检测效率,并可使样品杂质冲洗干净,有利于延长色谱柱的使用寿命。

点燃(kindling)目前被公认为是一种理想的癫痫动物模型,它能较好地模拟人类癫痫的进行性发展和长期反复的自限性发作形式。其中,PTZ 点燃模型是目前最为认可的一种癫痫动物模型,其致病性较高且具有长久的保留能力。本实验采用 PTZ 点燃方法,较成功地复制出了接近人类癫痫的慢性癫痫模型,并在此模型上进行了抗癫痫药物 PB 在脑部海马区的摄取实验。实验结果表明,癫痫组大鼠海马区的 PB 摄取量低于正常对照组大鼠海马区 PB 的摄取量,差异具有统计学意义($P<0.05$),这可能与癫痫治疗过程中部分患者疗效欠佳和多数患者治疗后期产生抗药性存在密切的相关性,因此对 PB 在海马区上的转运规律和抗药机制值得进一步研究。

参考文献

- [1] Moriyama M, Yamashita S, Domoto H, *et al.* Determination of plasma phenobarbital concentration by high-performance liquid chromatography in rat offspring[J]. *J Chromatogr B*, 1999, **723**(1-2):301-305.
- [2] Franeta JT, Agbaba D, Eric S, *et al.* HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets [J]. *Il Farmaco*, 2002, **57**(9):709-713.
- [3] Kishore P, Rajnarayana K, Reddy MS, *et al.* Validated high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of phenytoin, phenobarbital and carbamazepine in human serum[J]. *Drug Res*, 2003, **53**(11):763-768.
- [4] Paibir SG, Soine WH. High-performance liquid chromatographic analysis of phenobarbital and phenobarbital metabolites in human urine[J]. *J Chromatogr B*, 1997, **691**(1):111-117.
- [5] Kanazawa H, Konishi Y, Matsushima Y, *et al.* Determination of sedatives and anesthetics in plasma by liquid chromatography-mass spectrometry with a desalting system[J]. *J Chromatogr A*, 1998, **797**(1-2):227-236.
- [6] Gouille JP, Noyon J, Layet A, *et al.* Phenobarbital in hair and drug monitoring[J]. *Forensic Sci Int*, 1995, **70**(1-3):191-202.
- [7] Fabisiak JP, Schwark WS. Aspects of pentylenetetrazol kindling model of epileptogenesis in the rat[J]. *Exp Neurol*, 1982, **78**(1):7-14.
- [8] Ono J, Vieth RF, Walson PD. Electroencephalographical observation of seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ) injection in rats[J]. *Funt Neurol*, 1990, **5**(4):345-352.