

# 液相色谱-串联质谱法测定大鼠脑透析液中 CTN986 及其脱糖产物的含量

郭继芬<sup>1</sup>, 张绍东<sup>2</sup>, 孟繁华<sup>1</sup>, 赵毅民<sup>1</sup>

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 北京市神经外科研究所, 北京 100050)

**摘要** 建立了测定 CTN986 及其脱糖产物芦丁和陆地棉苷在大鼠脑透析液中含量的高效液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS) 法. 采用微透析技术结合 HPLC-MS/MS, 以甲醇-异丙醇-水-甲酸 (体积比 20: 10: 70: 0.1) 为流动相, 用 Zorbax C<sub>8</sub> 柱分离, 待测物通过电喷雾离子化四极杆串联质谱, 以多反应监测方式 (MRM) 进行检测. 采用外标法分析给予 CTN986 后大鼠脑透析液中 CTN986 及其脱糖产物的浓度, 经过体内回收率校正后, 计算出脑透析液中待测物的浓度. CTN986、芦丁和陆地棉苷的线性范围为 2 ~ 500 ng/mL, 日内及日间精密度 (RSD) 均小于 15%, 准确度 (RE) 在 -4% ~ 13% 之间. 本方法专属性强、灵敏度高, 适用于脑透析液中 CTN986 的药代动力学分析, 为药代动力学研究提供了新的方法学参考.

**关键词** CTN986; 液相色谱-串联质谱法; 微透析

**中图分类号** O657

**文献标识码** A

**文章编号** 0251-0790(2009)08-1528-05

槲皮素-3-O-β-D-呋喃芹菜糖-(1→2)-[α-L-吡喃鼠李糖-(1→6)]-β-D-吡喃葡萄糖苷 (CTN986) 是本研究组从无毒棉花籽中分离得到的具有抗抑郁活性的黄酮苷类化合物. 该化合物对 5HT<sub>1A</sub> 受体有特异性结合, 在小鼠强迫游泳实验中表现出良好的抗抑郁活性, 是一个潜在的抗抑郁药 (已获国家发明专利和美国发明专利)<sup>[1,2]</sup>. 因此, 研究 CTN986 在动物脑组织中的药代动力学特征具有重要意义. 本组已建立了鼠血及组织中 CTN986 浓度测定的高效液相色谱-串联质谱法 (HPLC-MS/MS)<sup>[3,4]</sup>, 本文采用微透析技术结合 HPLC-MS/MS, 通过外标法测定了大鼠脑透析液中以游离型存在的 CTN986 及其脱糖产物浓度.

微透析 (Microdialysis) 技术是一种新型生物采样技术, 可在麻醉或清醒的生物体上使用, 特别适合于深部组织和重要器官的活体生化研究. 其主要原理为将一种具有透析作用且充满液体的微细探针置于生物体内, 与探针周围组织进行物质交换后测定其内部的化学物质含量<sup>[5,6]</sup>. 微透析技术最大的优点是可在基本上不干扰体内正常生命过程的情况下进行在体 (*in vivo*)、实时 (Real time) 取样, 特别适用于研究生命过程的动态变化. 经适当选取微透析膜的截留分子量, 微透析液中可不含蛋白质和酶等生物大分子, 能直接进行 HPLC 等分析, 免除了复杂样品的前处理. 而且由于避开了血脑屏障的阻隔, 可直接观察药物对脑的影响<sup>[7]</sup>.

微透析技术的另一大优点是样品的采集与分析过程既可在线又可离线进行<sup>[8]</sup>, 将它与 HPLC 等分离、分析技术相结合, 具有非常高的检测灵敏度和选择性.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂及 LC-MS/MS 分析条件

美国 ABI 公司 API 3000 型液相色谱-质谱-质谱联用仪, 配有 Turbo Ionspray 离子化源及 Analyst 1.1 数据处理系统; 美国安捷伦公司 Agilent 1100 四元梯度泵和自动进样器.

CTN986 和陆地棉苷由军事医学科学院毒物药物研究所植物化学研究室提供, 芦丁购自 Acros Or-

收稿日期: 2008-12-30.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 30672508) 和北京市自然科学基金 (批准号: 7072061) 资助.

联系人简介: 赵毅民, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事天然药物化学研究. E-mail: zhaoyim@nic.bmi.ac.cn

rganics 公司. 甲醇及异丙醇为色谱纯(美国 Fisher 公司), 水为 Millipore 去离子水, 其它试剂均为分析纯试剂.

微透析探针 (MD-2204, BR-4, Lot: 1362. 60. 1203) 购自美国 BAS 公司. Ringer 溶液, 即人工脑脊液组成为 138 mmol/L NaCl + 11 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$  + 5 mmol/L KCl + 1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  + 1 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  + 1 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH = 7.4).

Wistar 大鼠, 雄性, 体重为 (300 ± 20) g, 由军事医学科学院实验动物中心提供, 实验前禁食 12 h.

液相色谱条件: Zorbax  $\text{C}_8$  色谱柱, 150 mm × 4.6 mm i. d., 5  $\mu\text{m}$  粒径; 流动相为甲醇-异丙醇-水-甲酸(体积比 20: 10: 70: 0.1), 流速为 0.5 mL/min; 柱温为室温(25  $^\circ\text{C}$ ).

质谱检测条件: 离子源为 ESI 源; 正离子方式检测; 喷射电压为 4500 V; 离子源温度为 300  $^\circ\text{C}$ ; 源内气体 GS1 (NEB,  $\text{N}_2$  气) 为 36 PSI; 气帘气体 (CUR,  $\text{N}_2$  气) 为 50 PSI; 碰撞气 (CAD,  $\text{N}_2$  气) 为 36 PSI; 扫描方式为多反应监测 (MRM), 用于定量分析的离子反应分别为  $m/z$  743.4 → 303.1 (CTN986),  $m/z$  611.2 → 303.1 (芦丁) 和  $m/z$  465.2 → 303.3 (陆地棉苷). 相应的结构式和二级全扫描质谱如图 1 所示.

## 1.2 标准系列溶液配制

精密称取 CTN986、芦丁和陆地棉苷对照品各 10 mg, 分别配制成 1 mg/mL 的贮备液, 再用 Ringer 溶液精确稀释贮备液得到浓度分别为 2, 4, 10, 20, 50, 100, 200 和 500 ng/mL 的 CTN986、芦丁和陆地棉苷对照品混合溶液, 于 -20  $^\circ\text{C}$  下冷冻保存待测.

## 1.3 微透析模型的建立和探针回收率的测定

取体重在 300 g 左右的 Wistar 大鼠, 用体积分数 20% 的水合氯醛通过腹腔注射麻醉大鼠, 并置于立体定位仪上, 切开头皮, 暴露颅骨, 定位, 钻孔, 将一自制不锈钢导轨植入大鼠纹状体区内, 并用牙托粉固定. 然后将大鼠单独饲养, 术后第二天进行微透析采样.

将平衡好的透析探针插入事先埋好导轨的大鼠脑内, 以含 200 ng/mL CTN986、芦丁和陆地棉苷的 Ringer 溶液进行灌注. 稳定 2 h 后, 连续收集 3 份透析样品, 通过 HPLC-MS/MS 法测定透析液中各待测物的浓度 ( $c_{\text{out}}$ ), 同时测定透析前各待测物的浓度 ( $c_{\text{in}}$ ), 按如下公式计算回收率  $R_{\text{in vivo}} (\%) = (1 - c_{\text{out}}/c_{\text{in}}) \times 100\%$ .

## 1.4 微透析采样和样品浓度的测定

将平衡好的透析探针插入事先埋好导轨的大鼠脑内, 以 Ringer 溶液进行灌注. 通过微量注射泵, 以 1.5  $\mu\text{L}/\text{min}$  流速将 Ringer 试液泵入大鼠脑内, 每隔 20 min 收集一份大鼠脑透析液, 收集给药前和给药后 0 ~ 20, 20 ~ 40, 40 ~ 60, 60 ~ 80, 80 ~ 100, 100 ~ 120, 120 ~ 140, 140 ~ 160, 160 ~ 180, 180 ~ 200, 200 ~ 220, 220 ~ 240, 240 ~ 260, 260 ~ 280 及 280 ~ 300 min 的微透析样品. 吸取 20  $\mu\text{L}$  微透析样品进行 HPLC-MS/MS 分析, 通过外标法测定透析液中待测物的浓度 [ $c(\text{Dialysate})$ ], 并用相应的探针

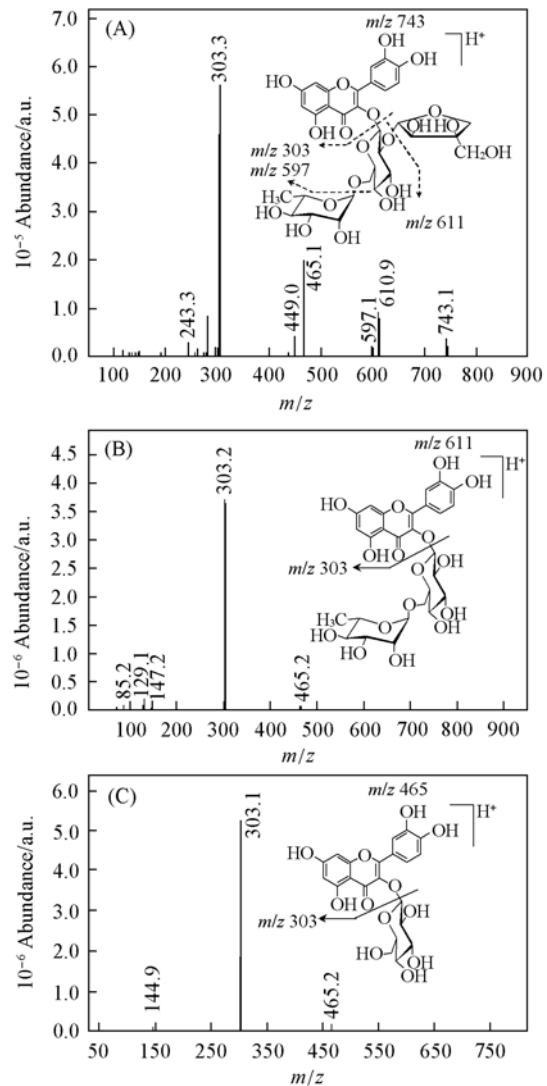


Fig. 1 Product ion mass spectra of CTN986 (A), rutin (B) and hirsutrin (C)

回收率将其换算成脑中实际药物的浓度 $c(\text{Brain})$ ，计算公式如下： $c(\text{Brain}) = c(\text{Dialysate})/R_{m \text{ vivo}}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 质谱条件的优化

采用 ESI 源分析各待测物，分别在正、负离子检测方式下将样品溶液直接注入质谱仪中获得了各待测物的一级全扫描质谱。正离子检测图谱中可观察到 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 及 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 等准分子离子峰；负离子检测图谱中的基峰均为 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 。利用串联质谱的碰撞诱导解离(CID)技术继续对 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 和 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 离子进行二级质谱分析，正离子 CID 谱中产生系列脱糖碎片离子，基峰为脱糖后的苷元离子( $m/z$  303)(如图 1 所示)；负离子 CID 谱中的基峰亦为脱糖后的苷元离子( $m/z$  301)。实验选取 MRM 扫描方式进行检测，即在一级质谱中同时选择各待测物的准分子离子，在二级质谱中选择监测它们的主要碎片离子，根据待测物碎片离子的色谱峰面积比定量。结果发现，待测物在正离子条件下的信噪比大约是负离子条件下的 5 倍，因此选择在正离子条件下对其进行检测，并对各质谱参数进行优化。另外，由于 CTN986 的 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 离子( $m/z$  743)在离子源内能够发生源内裂解，产生分别失去一个糖和两个糖的碎片离子  $m/z$  611 和  $m/z$  465，而这两个碎片离子又与芦丁和陆地棉苷的 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 离子相一致，且都能够在二级质谱中产生  $m/z$  303 的苷元离子，从而干扰芦丁和陆地棉苷的测定。尽管 LC-MS/MS 技术具有高度的选择性，即使待测物与杂质或内标物具有相同的保留时间，但如果质量数不同，或质量数相同而碎片离子不同，仍然可以不受色谱分离的限制而选择性地检测待测物。但当同时测定 CTN986、芦丁和陆地棉苷时，如果不能将三者色谱上完全分离，CTN986 的源内裂解就会干扰芦丁和陆地棉苷的测定，而芦丁的源内裂解亦会干扰陆地棉苷的测定，因此必须使三者实现完全的色谱分离。

### 2.2 色谱条件的选择

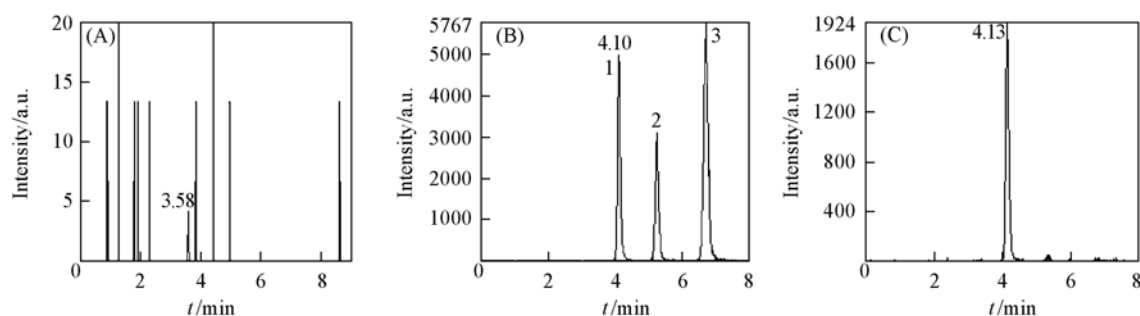
应用 LC-MS/MS 技术进行体液中的药物或代谢物定量分析时，可以选用短的色谱柱以缩短保留时间，提高分析速度。但在实验中发现，使用短柱很难使 3 个待测物基线分离，最终选择了 150 mm × 4.6 mm 的 Zorbax C<sub>8</sub> 色谱柱。另外，为了改善色谱分离和提高质谱响应，对流动相进行了优化，结果发现，甲醇比乙腈更有利于 CTN986 的离子化，使质谱响应增强；在流动相中加入异丙醇能够显著提高待测物的质谱响应(同时柱压升高)；加入低浓度甲酸(使流动相的 pH 值约为 4)可以改善色谱峰的拖尾现象，缩短保留时间，并可增强 CTN986 的质谱响应。文献[9]报道，在流动相中应用酸性改性剂可以抑制弱酸性酚羟基的解离，同时还可以抑制这些基团与固定相上残留的痕量金属离子的反应，从而避免峰拖尾或峰前延现象。另外，文献[10]报道，流动相中甲酸或乙酸的加入可以提高黄酮苷类化合物在 ESI-MS 分析时的灵敏度。但三氟乙酸的加入则会因其较强的离子对效应使分析物成为中性分子而降低检测灵敏度<sup>[11]</sup>。本实验选用甲醇-异丙醇-水-甲酸(体积比 20:10:70:0.1)为流动相，150 mm × 4.6 mm 的 Zorbax C<sub>8</sub> 柱为色谱柱，获得了较理想的峰形和质谱响应。在此系统下，CTN986、芦丁和陆地棉苷的保留时间分别为 4.1、5.3 和 6.8 min，使各待测物之间获得了良好分离。

### 2.3 分析方法确证

2.3.1 方法的专属性考察 空白透析液的色谱图见图 2(A)，各待测物对照品的色谱图见图 2(B)，大鼠给药 20 min 后透析液中待测物的色谱图见图 2(C)。结果表明，空白透析液中无色谱峰干扰各待测物的测定。分别对用 Ringer 溶液和流动相配制的各对照品低、中、高 3 个浓度(2, 50, 500 ng/mL)的样品峰面积进行比较，结果表明比值均在 85%~115% 之间，可见不存在明显的基质效应。

2.3.2 标准曲线和线性范围 分别取 20 μL 系列浓度的 CTN986、芦丁和陆地棉苷对照品混合溶液进行 HPLC-MS/MS 分析，建立标准曲线。以 Ringer 溶液中待测物的浓度为横坐标，待测物的峰面积值为纵坐标，用加权最小二乘法进行回归运算<sup>[12]</sup>，求得各待测物的直线回归方程。根据标准曲线，各待测物的线性范围均为 2~500 ng/mL。各待测物的最低定量限(LLOQ)均为 2 ng/mL。

2.3.3 精密度与准确度 分别取各对照品混合溶液，按绘制标准曲线方法操作，制备各对照品低、中及高 3 个浓度(2, 50, 500 ng/mL)的质量控制(QC)样品，对每种浓度连续 3 天进行 6 样本分析，并同



**Fig. 2** Representative MRM chromatograms of CTN986 (peak 1), rutin (peak 2) and hirsutrin (peak 3) in rat brain dialate

(A) Blank rat brain dialate; (B) a blank rat brain dialate sample spiked with CTN986, rutin and hirsutrin (100 ng/mL); (C) a rat brain dialate sample from a rat after an oral administration of 150 mg/kg CTN986.

时进行标准曲线的绘制, 计算 QC 样品的测得浓度, 并将 QC 样品的结果进行方差分析, 求算本法的精密度与准确度, 结果见表 1. 本方法的日内、日间精密度和准确度均符合国内外有关规范要求<sup>[13]</sup>.

**Table 1** Accuracy and precision for the analysis of CTN986, rutin and hirsutrin in dialysate ( $n = 18$ )

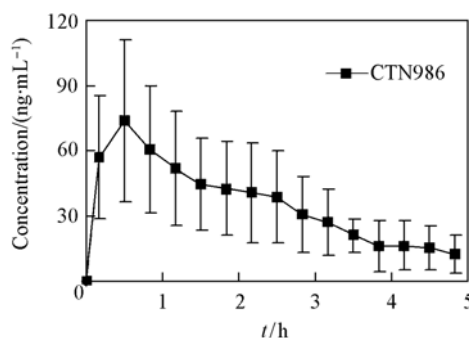
Sample	$\rho(\text{Added})/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\rho(\text{Found})/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	RSD (%)		Relative error (%)
			Intra-day	Inter-day	
CTN986	2.0	2.0 ± 0.2	10.2	13.8	-2.3
	50.0	49.0 ± 4.6	8.5	14.6	-2.1
	500.0	553.1 ± 33.1	5.2	10.2	10.6
Rutin	2.0	1.9 ± 0.2	9.6	14.0	-3.5
	50.0	50.0 ± 2.5	4.0	9.2	0.0
	500.0	533.4 ± 21.0	3.7	5.2	6.7
Hirsutrin	2.0	2.1 ± 0.2	7.4	7.7	2.5
	50.0	50.5 ± 2.8	5.2	7.9	0.9
	500.0	562.8 ± 38.9	6.0	11.6	12.6

2.3.4 样品稳定性考察 考察了 CTN986 在不同保存条件下的稳定性. 结果表明, CTN986 透析液样品室温放置 4 h 内稳定 (相对误差在 ± 8% 之内), 经历 3 次冷冻-解冻循环后稳定 (相对误差在 ± 10% 之内).

## 2.4 分析方法在药代动力学研究中的应用

对 4 只雄性 Wistar 大鼠分别灌胃 (150 mg/kg) 给予 CTN986. 给药的同时开始收集透析液, 每 20 min 收集 1 次, 连续收集 300 min, 取每份微透析样品 20  $\mu\text{L}$  进行 HPLC-MS/MS 分析.

在大鼠脑透析样品测定过程中, 每天建立一条标准曲线, 同时配制低、中及高 (双样本) 的 QC 样品, 实际脑透析样品测定按前述微透析采样方法进行, 根据当日标准曲线求算未知样品及 QC 样品的浓度. 并用相应的回收率换算成脑中实际药物的浓度. 测定结果显示, 在大鼠脑透析样品中仅检测到原形药物 CTN986, 而没有检测到其脱糖产物芦丁和陆地棉苷. 4 只雄性大鼠口服 CTN986 后脑中原形药物的平均浓度-时间曲线见图 3. 结果表明, CTN986 能够透过血脑屏障进入大鼠脑组织中.



**Fig. 3** Mean concentration-time curve of CTN986 in rat brain after an oral dose of 150 mg/kg CTN986

Mean  $\pm$  SD,  $n = 4$ .

## 参 考 文 献

- [1] LI Yun-Feng (李云峰), YANG Ming (杨明), YUAN Li (袁莉), *et al.*. Chin. J. Pharmacol. Toxicol. (中国药理学和毒理学杂志) [J], 2000, 14: 125—127

- [ 2 ] ZHANG Qing-Jian(张庆建), YANG Ming(杨明), ZHAO Yi-Min(赵毅民), *et al.*. *Acta Pharmaceutica Sinica*(药学学报)[J], 2001, **36**: 827—831
- [ 3 ] Guo J. F., Meng F. H., Ren Z. Y., *et al.*. *Planta Medica*[J], 2008, **74**: 228—232
- [ 4 ] Guo J. F., Zhao Y. M., Zhao L., *et al.*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* [J], 2006, **20**: 1701—1708
- [ 5 ] WANG Lei(王磊), HAN Hui-Wan(韩慧婉), YU Xiao(余晓), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报)[J], 2002, **23**(6): 1050—1052
- [ 6 ] DANG Hong-Mei(党红梅), MA Wan-Yun(马万云), HAN Hui-Wan(韩慧婉). *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报)[J], 2005, **26**(10): 1803—1807
- [ 7 ] ZHANG Jin-Lan(张金兰), LIU Ying(刘颖), ZHOU Tong-Hui(周同惠). *Acta Pharmaceutica Sinica*(药学学报)[J], 2001, **36**: 555—558
- [ 8 ] HAN Hui-Wan(韩慧婉), SHU Hong-Jun(舒鸿钧), LIU Guo-Quan(刘国詮). *Chemistry*(化学通报)[J], 2000, **12**: 52—56
- [ 9 ] Oliveira E. J., Watson D. G. *J. Chromatogr. B*[J], 2001, **764**: 3—25
- [ 10 ] Cuyckens F., Claeys M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* [J], 2002, **16**: 2341—2348
- [ 11 ] Apffel A., Fischer S., Goldberg G., *et al.*. *J. Chromatogr. A*[J], 1995, **712**: 177—190
- [ 12 ] ZHONG Da-Fang(钟大放). *Chinese J. Pharmaceutical Analysis*(药物分析杂志)[J], 1996, **16**: 343—346
- [ 13 ] Shah V. P., Midha K. K., Dighe S., *et al.*. *J. Pharm. Sci.* [J], 1992, **81**: 309—312

## Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Assay for the Determination of CTN986 and Its Deglycosylation Products in the Rat Brain Dialysate

GUO Ji-Fen<sup>1</sup>, ZHANG Shao-Dong<sup>2</sup>, MENG Fan-Hua<sup>1</sup>, ZHAO Yi-Min<sup>1\*</sup>

(1. *Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China;*

2. *Beijing Neurosurgical Institute, Beijing 100050, China*)

**Abstract** An HPLC-MS/MS method was developed for the determination of CTN986 and its two deglycosylation products, rutin and hirsutin, in the rat brain dialysate. The dialysate samples were analyzed by offline liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The separation was performed using a Zorbax C<sub>8</sub> column with an isocratic mobile phase consisted of methanol/isopropanol/water/formic acid (20:10:70:0.1, volume ratio). An API 3000 tandem mass spectrometer equipped with electrospray ionization source was used as detector and was operated under the positive ion mode. Multiple reactions monitoring (MRM) mode was used to quantify three analytes. Calibration was performed by external standardization and regression curves were constructed ranging from 2 to 500 ng/mL for each compound. The intra- and inter-day precision values were below 15% and accuracy was between -4% and 13% for all quality control samples. As a result, the procedure proved to be very suitable for routine analysis. This quantitation method was applied to the pharmacokinetic study of CTN986 in the brain dialysate samples from rats following oral administration.

**Keywords** CTN986; Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Microdialysis

(Ed.: A, G)