

液相色谱-质谱法测定大鼠全血中3种CYP450探针药物

李继印¹⁾, 李树华¹⁾, 赵文嵩²⁾, 杨红梅²⁾, 方平²⁾, 李林¹⁾, 李虹²⁾

(1) 昆明医科大学法医学院, 云南昆明 650500; 2) 云南省公安厅司法鉴定中心, 云南昆明 650228)

[摘要] **目的** 建立大鼠全血中3种CYP450探针药物咖啡因(CYP1A2)、咪达唑仑(CYP3A1)和氯唑沙宗(CYP2E1)的HPLC-MS/MS分析方法。**方法** 样品经甲醇蛋白沉淀后,用高效液相色谱-串联质谱仪检测,采用多个特征离子对定性及外标标准曲线法对3种CYP450探针药物定量分析。**结果** 大鼠全血中咖啡因在5~100 ng/mL浓度范围内线性良好($r=0.9999$),咪达唑仑在1~100 ng/mL浓度范围内线性良好($r=1.0000$),氯唑沙宗在1~100 ng/mL浓度范围内线性良好($r=1.0000$),最低定量限分别为1 ng/mL、0.05 ng/mL和0.1 ng/mL;3种CYP450探针药物的提取回收率均高于90%,日内及日间精密度均小于10%。**结论** 该方法灵敏度高、重现性好、操作简便快速,可适用于cocktail探针药物法评价CYP450酶的活性研究及法医学鉴定。

[关键词] HPLC-MS/MS; 大鼠全血; CYP450; 咖啡因; 咪达唑仑; 氯唑沙宗

[中图分类号] R917 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2015)11-0003-05

Determination of Three Cytochrome P450 Probe Substrates in Cat Blood by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

LI Ji-yin¹⁾, LI Shu-hua¹⁾, ZHAO Wen-song²⁾, YANG Hong-mei²⁾, FANG Ping²⁾, LI Lin¹⁾, LI Hong²⁾

(1) *Institute of Forensic, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500*; 2) *Forensic Science Service Department of Yunnan Public Security Bureau, Kunming Yunnan 650228, China*)

[Abstract] **Objective** To develop a rapid and sensitive method for the simultaneous analysis of three cytochrome P450 probe substrates (caffeine, midazolam and chlorzoxazone) in rat blood by LC-ESI-MS/MS method. **Methods** The samples were precipitated with methanol and analyzed with HPLC-MS/MS method. Multiple characteristic ion pairs were adopted to three cytochrome P450 probe substrates for qualitative analysis and the external standard method was adopted to three cytochrome P450 probe substrates for quantitative analysis. **Results** The linear ranges were 5~100 ng/mL for caffeine ($r=0.9999$), 1~100 ng/mL for midazolam ($r=1.0000$), 1~100 ng/mL for chlorzoxazone ($r=1.0000$) and their detection limits were 1 ng/mL, 0.05 ng/mL and 0.1 ng/mL, respectively. The extract recoveries of three cytochrome P450 probe substrates were above 90%, intra- and inter-day precisions were all less than 10%. **Conclusion** The method is accurate, sensitive, specific and simple and can be used to evaluate CYP450 enzyme activity and forensic medical identification.

[Key words] HPLC-MS/MS; Rat Blood; CYP450; Caffeine; Midazolam; Chlorzoxazone

[基金项目] 云南省应用基础研究基金资助项目(2013FB118);昆明医科大学研究生创新项目(2015S07)

[作者简介] 李继印(1989~),男,河南商丘市人,在读硕士研究生,主要从事法医毒物分析工作。

[通信作者] 李虹. E-mail: yngalh@163.com

以附子类（附子、川乌和草乌）为代表的中草药，具有镇痛、抗炎、抗癫痫、抗肿瘤、提高免疫力等^[1,2]多种生理活性，常被用于治疗各种疑难杂症，但因毒性强，安全范围窄，中毒案件不断发生，尤以附子类药酒中毒居多。由于附子类药酒主要活性和毒性成分为乌头碱、次乌头碱和新乌头碱，目前，国内外对乌头类生物碱的研究主要集中在心脏、神经毒性以及抗炎作用^[3,4]等方面。笔者为解决法医学实践中的乌头类药物中毒问题，采用 Cocktail 探针药物法研究草乌酒对大鼠肝脏 CYP1A2、CYP3A1、CYP2E1 亚型的影响^[5-8]，为研究草乌酒对大鼠肝脏 CYP450 酶的调控机制提供依据。咖啡因，咪达唑仑和氯唑沙宗分别是 CYP1A2、CYP3A1、CYP2E1 的探针药物，可以特异性地反应 3 个亚酶的活性；因此，本研究建立了检测 3 种 CYP450 探针药物的 HPLC-MS/MS 法，该方法灵敏度高于文献报道的方法^[9-13]，且稳定性好、准确性高、实用性较强。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠 30 只，体重

(280±20) g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

1.1.2 主要试剂 咖啡因 (caffee, CAF)、咪达唑仑 (midazolam, MDZ)、氯唑沙宗 (chlorzoxazone, CLZ) 均购自中国药品食品检定研究院；乙腈、甲醇为色谱纯，甲酸、氨水为分析纯，实验用水为屈臣氏去离子水。

1.1.3 仪器 HPLC-MS/MS 三重四极杆串联质谱仪，配为 Agilent1290 型高效液相色谱仪 (Analyst[®] software 工作站) 和 AB SCIEX 4000Q TRAP 串联质谱仪，电喷雾离子源 (ESI)。

1.2 方法

1.2.1 分析条件 液相条件：ACQUITY UPLC[®] BEH C18 色谱柱 (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm)；流动相：A 为乙腈，B 为 0.1% 甲酸水溶液。洗脱梯度：0~0.8 min，流动相 A 为 1%；0.8~2.5 min，流动相 A 由 1% 升到 99%；2.5~3.5 min，流动相 A 为 99%；3.5~3.6 min，流动相 A 由 99% 降到 1%；3.6~6 min，流动相 A 为到 1%。进样体积：5 μL，流速 0.3 mL/min，保留时间 7 min，柱温 40℃。

质谱条件：电喷雾离子源分别采用正离子 (ESI+) 和负离子扫描 (ESI-)，多反应检测 (MRM)，三重四极杆检测器。3 种 CYP450 探针药物定量离子对的质谱参数见表 1。

表 1 3 种 CYP450 探针药物的质谱参数

Tab. 1 The Mass parameters of three CYP450 probe substrates

待测物	母离子	子离子	扫描模式	DP(伏)	EP(伏)	CE(伏)	CXP(伏)
咖啡因	195.1	138.1	ESI+	70	10	27	12
咪达唑仑	326.0	291.3	ESI+	100	10	38	12
氯唑沙宗	168.0	132.2	ESI-	-100	-10	-29	-15

1.2.2 实验大鼠处理 实验大鼠随机平均分为空白组、乙醇组、单草乌组、低草乌酒组和高草乌酒组（每组 6 只），每组大鼠分别经对应药剂诱导 15 d 后，按照体重剂量注射 3 种 CYP450 探针药物的混合物（吐温 -20 和生理盐水溶解），并于注射前和注射后 3、5、10、15、30、60、90、120、240、480、720、1 440 min 尾静脉采血。

1.2.3 样品处理 取 5~20 μL 大鼠全血于 EP 管中，加入适量甲醇，振荡 3 min、超声 10 min、离心 10 min，取上清液经有机滤膜 (13 mm×0.22

μm) 过滤后待检。

1.2.4 标准系列溶液的配制 精密称取咖啡因、咪达唑仑和氯唑沙宗标准品各 10.0 mg 于 10 mL 容量瓶中，配成 1.0 mg/mL 的甲醇标准储备液，置 4℃ 冰箱保存。以甲醇标准储备液配制咖啡因、咪达唑仑和氯唑沙宗的系列混标溶液 (1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL)，以及 10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL 的低、中、高三种基质加标溶液及基质后加标溶液。

2 结果

2.1 系统适应性试验

在前述检测条件下, 空白血、基质加标溶液和样品中咖啡因、咪达唑仑和氯唑沙宗的谱图详见图 1, 其保留时间 (Rt) 分别为 2.05 min、2.48 min 和 2.18 min. 空白血样中不含有 3 种 CYP450 探

针药物, 且空白基质对 3 种 CYP450 探针药物的测定无干扰.

2.2 流动相酸碱性条件的选择

分别用流动相 0.1% 氨水 - 水溶液、0.1% 甲酸 - 水溶液和 0.3% 甲酸 - 水溶液对基质加标溶液 (40 ng/mL) 进行分析, 结果见图 2、图 3: 氯唑沙宗在碱性流动相中出现双峰, 因此选用酸性流动相; 在酸性流动相为 0.1% 甲酸 - 水溶液中咖啡因

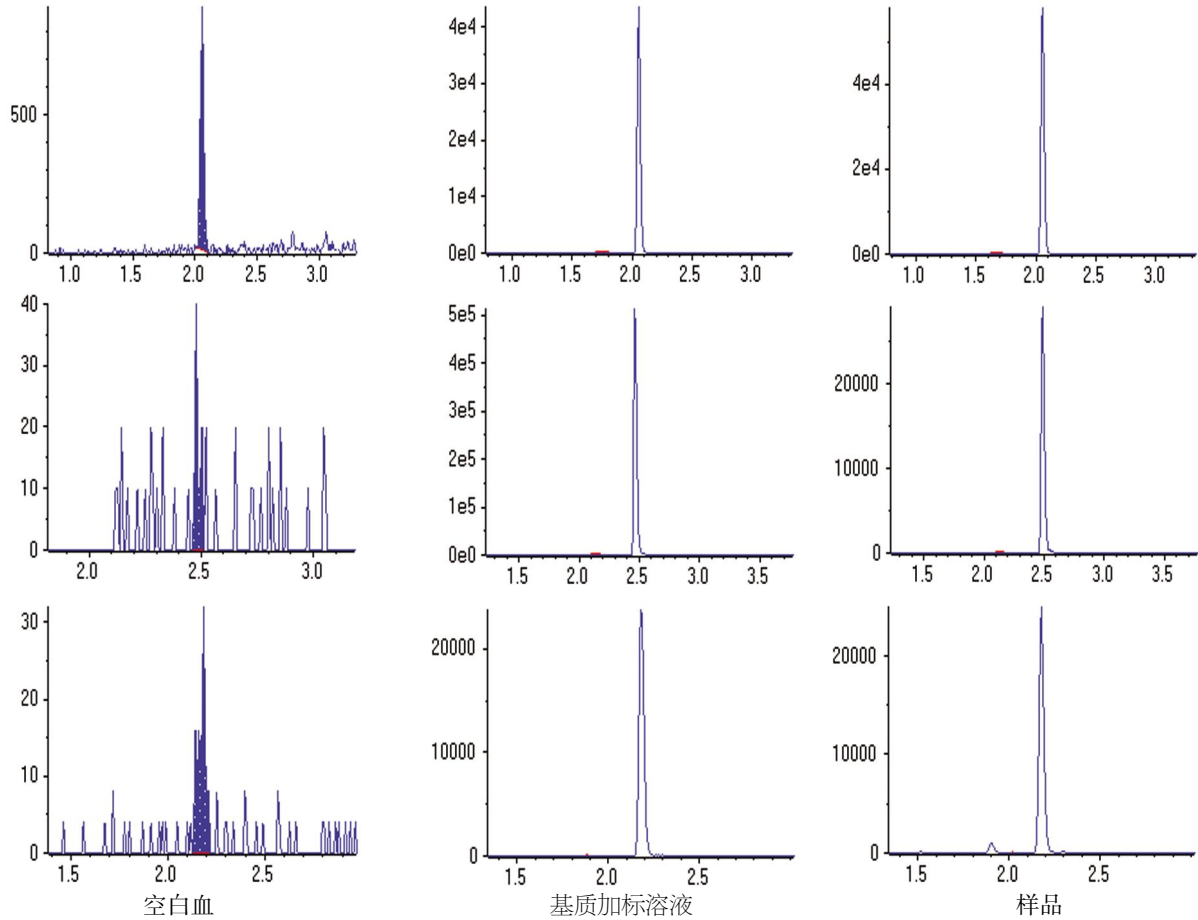


图 1 自上而下依次为咖啡因、咪达唑仑和氯唑沙宗的谱图

Fig. 1 The chromatograms of caffeine, midazolam and chlorzoxazone from top to bottom

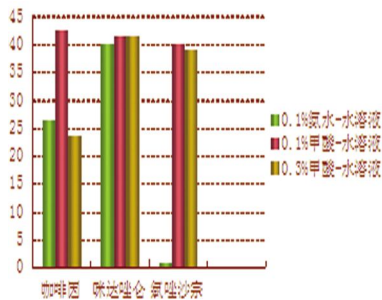


图 2 流动相酸、碱性对 3 种 CYP450 探针药物的影响

Fig. 2 Effects of acid and alkalinity of the mobile phase on three CYP450 probe substrates

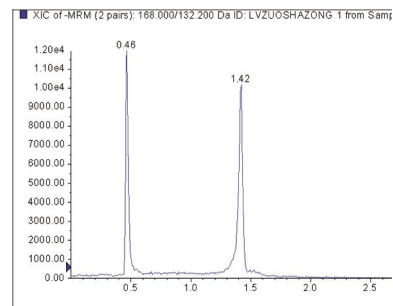


图 3 氯唑沙宗在碱性流动相中的响应

Fig. 3 The response of chlorzoxazone

和氯唑沙宗响应度高, 而咪达唑仑几乎无改变, 因此本实验选用 0.1% 甲酸 - 水溶液作为流动相。

2.3 提取溶剂的选择

本实验分别选用乙腈和甲醇对大鼠全血进行前处理后进样分析, 结果见图 4, 以乙腈为提取和定容溶剂时, 咖啡因的色谱峰为双峰。因此, 本实验选用甲醇作为前处理及定容溶剂。

2.4 线性范围与检出限、定量限

用 HPLC-MS/MS 法测定 3 种 CYP450 探针药物的系列混标溶液, 以定量离子的积分峰面积为纵坐标, 浓度 C 为横坐标, 绘制 3 种 CYP450 探针药物的外标标准曲线, 检出限 (LOD) 以信噪比 (S/N) 大于 3 为评价标准, 定量限 (LOQ) 以信噪比大于 10 为标准; 3 种 CYP450 探针药物的线性方程、检出限和定量限见表 2。

2.5 回收率、准确度、精密度和基质效应

在 1.2.1 条件下分别对 10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL 的低、中、高 3 种基质加标溶液、基质后加标溶液和混标溶液进样分析 ($n=6$), 考察 3 种 CYP450 探针药物在低、中、高 3 种浓度中的提

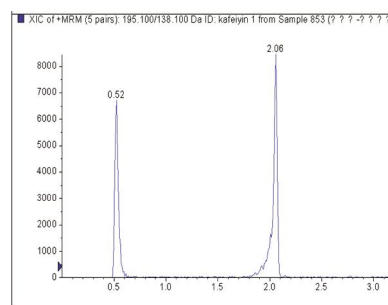


图 4 样品中咖啡因经乙腈处理后的响应

Fig. 4 The response of caffeine in samples in alkaline mobile phase after treatment with acetonitrile

取回收率、基质效应、准确度、日内和日间精密度的 (表 3)。结果表明, 该检测方法具有良好的准确度、精密度的、提取回收率和较好的基质效应。

2.6 样品稳定性

配制一定浓度的低、中、高 3 种基质加标大鼠血, 室温放置 24 h 及经过 3 次冻融循环后, 按 1.2.3 方法处理基质加标大鼠血成浓度分别为 10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL 的基质加标溶液 ($n=6$), 并在 1.2.1 条件下测定, 考察其短期稳定性及解冻稳定性。结果表明, 3 种 CYP450 探针药物在上述条

表 2 3 种 CYP450 探针药物的线性与检测灵敏度

Tab. 2 The linearities and detection sensitivities of three CYP450 probe substrates

待测物	线性	线性范围	相关系数 (r)	最低检出限	最低定量限
咖啡因	$A=1.51e^3 C + 3.36e^3$	5 ~ 100 ng/mL	0.9999	0.3 ng/mL	1 ng/mL
咪达唑仑	$A=1.74 e^4 C + 3.16e^3$	1 ~ 100 ng/mL	1.0000	0.01 ng/mL	0.05 ng/mL
氯唑沙宗	$A = 886 C + 506$	1 ~ 100 ng/mL	1.0000	0.05 ng/mL	0.1 ng/mL

表 3 3 种 CYP450 探针药物的提取回收率、基质效应、准确度、精密度和稳定性 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 The extract recoveries, matrix effects, accuracies, precisions and stabilities of three CYP450 probe substrates ($\bar{x} \pm s$)

目标物	浓度 (ng/mL)	RSD%		准确度 (%)	回收率 (%)	基质效应 (%)	稳定性 (ng/mL)	
		日内	日间				短期稳定性	冻融稳定性
咖啡因	10	8.2	2.5	101.0 ± 8.0	102.5 ± 4.8	105.3 ± 4.1	10.0 ± 0.5	10.0 ± 0.3
	50	1.0	1.0	99.3 ± 1.8	100.1 ± 4.4	95.3 ± 8.3	50.1 ± 0.9	51.1 ± 0.5
	100	2.5	1.3	97.4 ± 7.4	99.7 ± 6.9	98.1 ± 2.4	97.5 ± 1.1	99.4 ± 1.0
咪达唑仑	10	5.3	2.9	97.7 ± 6.8	100.1 ± 5.8	101.2 ± 2.4	9.1 ± 0.1	9.9 ± 0.2
	50	1.1	0.9	100.4 ± 6.1	100.4 ± 5.9	98.7 ± 1.7	48.9 ± 0.5	48.7 ± 0.5
	100	1.3	0.6	98.9 ± 2.6	101.5 ± 5.9	92.4 ± 1.2	96.5 ± 1.1	97.4 ± 0.6
氯唑沙宗	10	2.5	2.0	97.6 ± 5.0	96.9 ± 4.4	101.0 ± 1.2	9.3 ± 0.1	9.8 ± 0.1
	50	1.9	1.3	98.7 ± 5.1	96.7 ± 5.5	99.2 ± 4.6	52.5 ± 0.5	50.1 ± 0.7
	100	3.4	1.0	98.0 ± 5.4	103.0 ± 7.7	99.1 ± 1.0	100.3 ± 1.3	101.0 ± 1.0

件下均稳定(表 3)。

2.7 实验大鼠血样检测

用 HPLC-MS/MS 法对 30 只大鼠中 300 余份大鼠血样中 3 种探针药物进行检验分析, 结果表明: 该方法检测灵敏度高, 专属性强, 操作简便、快捷, 满足研究的检测需求。

3 讨论

本文分别对酸性和碱性流动相进行了考察, 当以流动相为乙腈-0.1%氨水水溶液进行梯度洗脱时, 氯唑沙宗色谱图会出现双峰, 基底效应干扰大, 故本文选用酸性流动相进行梯度洗脱。与此同时, 本文分别对甲醇和乙腈两种前处理溶剂进行了比较分析, 当用乙腈作为前处理及定溶溶剂时, 咖啡因色谱图会出现双峰, 这可能是因为咖啡因分子极性高, 基底效应高, 故本文选用甲醇作为前处理及定溶溶剂。

由于 3 种探针药物咖啡因、咪达唑仑和氯唑沙宗在大鼠体内的药物代谢动力学特征不同, 且同一只大鼠连续不同时间点采集的血中 3 种探针药物的血药浓度差异较大, 因此, 对检测方法的线性范围、灵敏度、稳定性要求较高。本文建立的检测 3 种探针药物的 HPLC-MS/MS 法, 样品前处理简便快速, 回收率高, 检测线性范围控制在 100 ng/mL 以内, 对仪器残留污染小; 灵敏度高, 便于低血药浓度血样的处理和检测; 稳定性好, 确保检测结果准确可靠。

本文建立的方法, 能准确、快速的测定大鼠全血中咖啡因、咪达唑仑和氯唑沙宗 3 种探针药物, 可推广于药物代谢研究和法医学鉴定。

[参考文献]

[1] 王朝虹, 文静, 陈义华, 等. 液相色谱质谱联用测定乌头碱在大鼠体内代谢产物 [J]. 中国法医学杂志, 2006, 21(2): 88-90.
[2] 瞿建刚. 乌头类药物的毒性和用量探讨 [J]. 北方药学,

2013, 10(11): 12.

- [3] 乌兰其其格, 那生桑. 草乌的现代研究进展 [J]. 中国民族医药杂志, 2009, 4(4): 66-68.
[4] 彭淑萍. 草乌的药理和毒理作用研究 [J]. 中国中医药咨讯, 2011, 3(4): 139.
[5] LIN W, ZHANG J, LING X, et al. Evaluation of the effect of TM208 on the activity of five cytochrome P450 enzymes using on-line solid-phase extraction HPLC-DAD: A cocktail approach [J]. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2013, 923(924): 29-36.
[6] DU J, LU X, LONG Z, et al. In vitro and in vivo anticancer activity of aconitine on melanoma cell line B16 [J]. Molecules, 2013, 18(1): 757-767.
[7] SARAH C SIM, MAGNUS INGELMAN-SUNDBERG. Update on allele nomenclature for human cytochromes P450 and the human cytochrome P450 allele (CYP-Allele) nomenclature database [M]. United States: Humana Press, 2013: 251-259.
[8] ZHU L, YANG X, ZHOU J, et al. The exposure of highly toxic aconitine does not significantly impact the activity and expression of cytochrome P450 3A in rats determined by a novel ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method of a specific probe buspirone [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 51(1): 396-403.
[9] QIAN ZHAO, YAN L I, JIN PING, et al. LC-MS/MS method to simultaneously determine six probe drugs for CYP450 isozymes in Human Liver Microsomes [J]. Chromatographia, 2014, 77(13): 913-922.
[10] 胡道德, 顾磊, 姚慧娟, 等. Cocktail 探针药物评价淫羊藿提取物对大鼠 CYP450 酶的影响 [J]. 中国新药与临床杂志, 2009, 28(5): 337-341.
[11] 叶林虎, 孔令提, 肖冰心, 等. LC-MS/MS 同时测定 5 种探针药物代谢产物和快速评价细胞色素 P450 同工酶的活性 [J]. 中国药物警戒, 2013, 10(5): 263-268.
[12] 侯丛颂, 杨志宏, 孙晓波. LC-ESI-MS-MS 法同时测定大鼠血浆中甲苯磺丁脲 /4- 羟基甲苯磺丁脲、氯唑沙宗及其药代动力学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12): 144-150.
[13] 肖娟, 王莹, 蔡巧玲, 等. Cocktail 探针药物法评价半夏泻心汤及不同配伍组对 CYP450 酶活性的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 181-186.

(2015-06-29 收稿)