

## LC-MS/MS 法测定大鼠脑组织中奥拉西坦的浓度

程强<sup>1</sup>, 羿国娟<sup>1</sup>, 叶雷<sup>2</sup>, 贺英<sup>1</sup>, 孙文霞<sup>1</sup>, 荣祖元<sup>3\*</sup>

(1. 抗生素研究与再评价四川省重点实验室, 四川抗菌素工业研究所, 成都大学, 成都 610052;

2. 重庆东泽医药科技发展有限公司, 重庆 400030; 3. 四川省食品药品检验检测院, 成都 611731)

**摘要 目的:** 建立一种简便、快速的 LC-MS/MS 法测定大鼠脑组织中奥拉西坦的浓度, 并对 SD 大鼠静脉注射奥拉西坦后的脑组织分布进行研究。**方法:** SD 大鼠脑组织样品用 0.9% 氯化钠溶液匀浆后, 以吡拉西坦为内标, 用乙腈沉淀蛋白, 采用 LC-MS/MS 系统进行分离和测定。色谱柱为 Agilent Poroshell 120 SB-C<sub>18</sub> 柱 (100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm), 流动相为 30% 甲醇-70% 水 (含 10 mmol · L<sup>-1</sup> 甲酸铵, 0.1% 甲酸), 流速为 0.2 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温为 30 °C。质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式, 多反应离子监测 (MRM), 检测离子为奥拉西坦 *m/z* 158.6 → 113.6, 内标吡拉西坦 *m/z* 142.6 → 125.4。SD 大鼠分别单次静脉注射奥拉西坦 500、1 000、2 000 mg · kg<sup>-1</sup>, 于不同时间点分别采集脑组织, 测定脑组织中奥拉西坦的浓度。**结果:** SD 大鼠脑组织匀浆液质量浓度在 1.0~100.0 μg · mL<sup>-1</sup> 范围内线性关系良好, 定量下限为 1.0 μg · mL<sup>-1</sup>, 批内和批间精密性 RSD 均小于 5.7%, 准确度为 96.3%~105.2%。大鼠分别单次静脉注射 500、1 000、2 000 mg · kg<sup>-1</sup> 3 个剂量的奥拉西坦后, 主要药动学参数 *t*<sub>1/2</sub> 分别为 (3.56 ± 0.27) h、(3.36 ± 0.49) h、(3.60 ± 0.79) h, *C*<sub>max</sub> 分别为 (24.78 ± 16.06) μg · g<sup>-1</sup>、(50.79 ± 25.92) μg · g<sup>-1</sup>、(82.21 ± 19.33) μg · g<sup>-1</sup>, MRT<sub>0-t</sub> 分别为 (2.54 ± 0.02) h、(2.38 ± 0.30) h、(2.57 ± 0.08) h, AUC<sub>0-t</sub> 分别为 (48.59 ± 10.92) μg · h · g<sup>-1</sup>、(94.54 ± 9.30) μg · h · g<sup>-1</sup>、(201.35 ± 18.87) μg · h · g<sup>-1</sup>。**结论:** 本测定方法可用于大鼠奥拉西坦药代动力学在脑组织中的分布研究; 大鼠分别单次静脉注射 3 个剂量的奥拉西坦后, 奥拉西坦进入脑组织的时间较快, 浓度较高, 持续时间较长, 利于发挥活化和改善脑组织功能的作用。

**关键词:** 促智药; 奥拉西坦; 大鼠; 静脉注射; 脑组织浓度; 液相色谱-串联质谱; 药代动力学

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)11-1952-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.11.16

## Concentration determination of oxiracetam in rat brain by LC-MS/MS

CHENG Qiang<sup>1</sup>, YI Guo-juan<sup>1</sup>, YE Lei<sup>2</sup>, HE Ying<sup>1</sup>, SUN Wen-xia<sup>1</sup>, RONG Zu-yuan<sup>3\*</sup>

(1. Antibiotics Research and Re-evaluation Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Industrial Institute of Antibiotic, Chengdu

University, Chengdu 610052, China; 2. Dongze Pharmaceutical Science and Technology Co., Ltd., Chengdu 400030, China;

3. Sichuan Institute for Food and Drug Control, Chengdu 611731, China)

**Abstract Objective:** To develop a simple and rapid HPLC-MS/MS method for the determination of oxiracetam concentration in rat brain tissue, and to study the distribution of oxiracetam in the brain tissues after being injected

\* 通信作者 Tel: (028) 87826348; E-mail: rongzuyuan@126.com

第一作者 Tel: (028) 84216051; E-mail: chengqiang@cdu.edu.cn

intravenously in SD rats. **Methods:** The tissue samples of SD rat brain were firstly homogenized with 0.9% sodium chloride solution. Using piracetam as an internal standard (IS) and acetonitrile as a protein precipitant, the samples were separated and determined by LC-MS/MS system. Agilent Poroshell 120 SB-C<sub>18</sub> analytical column (100 mm × 4.6 mm 2.7 μm) was used in the system, and the mobile phase was prepared with methanol and water in a volume ratio of 30 : 70, containing 10 mmol · L<sup>-1</sup> ammonium acetate and 0.1% formic acid. The flow rate was 0.2 mL · min<sup>-1</sup> and the column temperature was set at 30 °C. The parameters for MS were as follows: electrospray ionization source (ESI) was operated in positive ion mode; the quantification was performed using multiple reaction monitoring (MRM) mode to monitor the precursor-to-product ion transitions of *m/z* 158.6 → 113.6 for oxiracetam and *m/z* 142.6 → 125.4 for the internal standard piracetam. SD rats were injected intravenously with single doses of 500, 1 000 and 2 000 mg · kg<sup>-1</sup> oxiracetam, respectively. The rat brain tissues were collected at different time intervals and the concentrations of oxiracetam in the brain tissues were determined.

**Results:** The linear calibration curve of oxiracetam was obtained in the concentration range of 1.0–100.0 μg · mL<sup>-1</sup>, and the lower limit of quantification (LLOQ) was 1.0 μg · mL<sup>-1</sup>. Both the intra- and inter-batch precisions of RSD were less than 5.7%. The accuracy was in the range of 96.3%–105.2%. The main pharmacokinetic parameters of oxiracetam in SD rats brain tissue after a single dose of 500, 1 000, 2 000 mg · kg<sup>-1</sup> oxiracetam by intravenous route were as follows:  $t_{1/2} = (3.56 \pm 0.27) \text{ h}, (3.36 \pm 0.49) \text{ h}, (3.60 \pm 0.79) \text{ h}$ ;  $C_{\max} = (24.78 \pm 16.06) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}, (50.79 \pm 25.92) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}, (82.21 \pm 19.33) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ;  $\text{MRT}_{0-t} = (2.54 \pm 0.22) \text{ h}, (2.38 \pm 0.30) \text{ h}, (2.57 \pm 0.08) \text{ h}$ ;  $\text{AUC}_{0-t} = (48.59 \pm 10.92) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{g}^{-1}, (94.54 \pm 9.30) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{g}^{-1}, (201.35 \pm 18.87) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{g}^{-1}$ .

**Conclusion:** The method can be used to investigate the pharmacokinetics of oxiracetam distributed in rat brain tissues. After being injected intravenously with a single dose of oxiracetam at 3 dosages, the uptake of oxiracetam into the brain tissue is very quick, maintained at a high concentration with a long duration. All the actions promote the activation and improvement of the brain functions.

**Keywords:** nootropic drug; oxiracetam; rat; intravenous administration; concentration of brain tissue; LC-MS/MS; pharmacokinetics

奥拉西坦 (oxiracetam) 是一种具有代表性的促智药类药物,能够透过血脑屏障进入脑组织,促进乙酰胆碱和磷酸乙醇胺的合成和脑代谢,从而改善智力和记忆,是美国 FDA 批准的少数用于治疗老年性痴呆的药物之一,在临床上广泛用于脑损伤及引起的神经功能缺失、记忆与智能障碍等病症的治疗<sup>[1-7]</sup>。尽管人们对其进行了广泛而深入的研究,但由于其属于认知增强剂的范畴,药理学家和精神科医生目前并未找到能被普遍接受的作用机理<sup>[8]</sup>,有关药理研究仍在不断的进行。奥拉西坦的作用部位是脑组织,有 S 和 R 2 种手性构型,有文献报道 S-奥拉西坦在脑组织的活性要优于 R-奥拉西坦<sup>[9]</sup>,其临床疗效的好坏与在脑组织中的浓度密切相关,但又几乎没有脑组织中的浓度数据报道,因此,测定奥拉西坦在不同时间脑组织中的浓度非常重要。目前对奥拉西坦在动物和人体血浆中的浓度测定方法研究较多,主要为 HPLC

法<sup>[10-12]</sup>、HPLC 手性分析法<sup>[13-16]</sup>和 LC-MS/MS 法<sup>[17-20]</sup>,在脑组织中奥拉西坦的测定方法却少有报道,仅为早期的同位素标记法<sup>[21-22]</sup>。本实验在克服脑组织中大量脂溶性物质干扰的基础上,采用简便的方法处理样品,建立了一种快速、灵敏、准确的脑组织样品 LC-MS/MS 测定方法,并成功对大鼠静脉注射 3 个剂量奥拉西坦后的脑组织浓度进行了药动学组织分布研究。

## 1 仪器、试药与动物

### 1.1 仪器

Agilent 6410B 质谱仪 (配备 Agilent 1200 高效液相色谱仪、Agilent G1367C 自动进样器、Agilent G6410B Triple Quad LC-MS/MS 质谱仪和 Agilent MassHunter Workstation Software version B.03.01 质谱数据处理软件, Agilent 公司); Millipore Simplicity 纯水机 (密理博公司); Sartorius CPA225D 型十万分之一电子天平 (赛多利斯公司); TGL-16G 台式离心机

(上海安亭科学仪器厂); XW-80A 涡旋混合器(上海青浦沪西仪器厂); 海尔 DW-86L490 超低温冰箱(青岛海尔集团有限公司)。

## 1.2 样品与试剂

奥拉西坦原料药(批号 20141215, 含量 99.0%, 湖南健朗药业有限责任公司); 奥拉西坦工作对照品(批号 20141215-R, 含量 99.1%, 重庆东泽医药科技发展有限公司); 吡拉西坦对照品(批号 100386-200702, 含量 99.9%, 中国食品药品检定研究院); 甲醇(色谱纯, Fisher 公司); 甲酸(色谱纯, Sigma 公司); 甲酸铵(分析纯, Sigma 公司); 0.9% 氯化钠注射液(批号 L216030802, 四川科伦药业股份有限公司), 水为去离子超纯水。

## 1.3 动物

SD 大鼠(SPF 级) 105 只, 雌雄均有(雌雄比例 2:3), 体质量 170~200 g, 成都达硕生物科技有限公司提供, 生产许可证号 SCXK(川)2013-24。

## 2 方法

### 2.1 试验条件

**2.1.1 色谱条件** 色谱柱为 Agilent Poroshell 120 SB-C<sub>18</sub> 柱(2.7 μm, 100 mm × 4.6 mm), 流动相为 30% 甲醇-70% 水(10 mmol · L<sup>-1</sup> 甲酸铵, 0.1% 甲酸), 流速为 0.2 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温为 30 °C, 进样体积为 2 μL, 以吡拉西坦作为内标。

**2.1.2 质谱条件** 采用电喷雾离子源(ESI), 正离子模式。奥拉西坦检测离子为  $m/z$  158.6 → 113.6, 碎裂电压为 65 V, 碰撞能量为 10 V; 内标吡拉西坦检测离子为  $m/z$  142.6 → 125.4, 碎裂电压为 60 V, 碰撞能量为 1 V。干燥气体温度为 350 °C, 干燥气体流速为 10 L · min<sup>-1</sup>, 雾化器压力为 172 kPa, 毛细管电压为 4 000 V, 见图 1。

### 2.2 溶液的配制

**2.2.1 奥拉西坦对照品系列标准工作液** 精密称取奥拉西坦工作对照品适量, 置于 10 mL 棕色量瓶中, 用 40% 甲醇-60% 水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配成终质量浓度为 25.0 mg · mL<sup>-1</sup> 的奥拉西坦溶液。取奥拉西坦溶液适量, 用 40% 甲醇-60% 水梯度稀释配制奥拉西坦对照品系列标准工作液, 质量浓度分别为 5.0、12.5、25.0、50.0、125.0、250.0、500.0 μg · mL<sup>-1</sup>, 现配现用。

**2.2.2 内标溶液** 精密称取吡拉西坦对照品适量, 用 40% 甲醇-60% 水溶解配成终质量浓度为 50 μg · mL<sup>-1</sup> 的内标溶液, 现配现用。

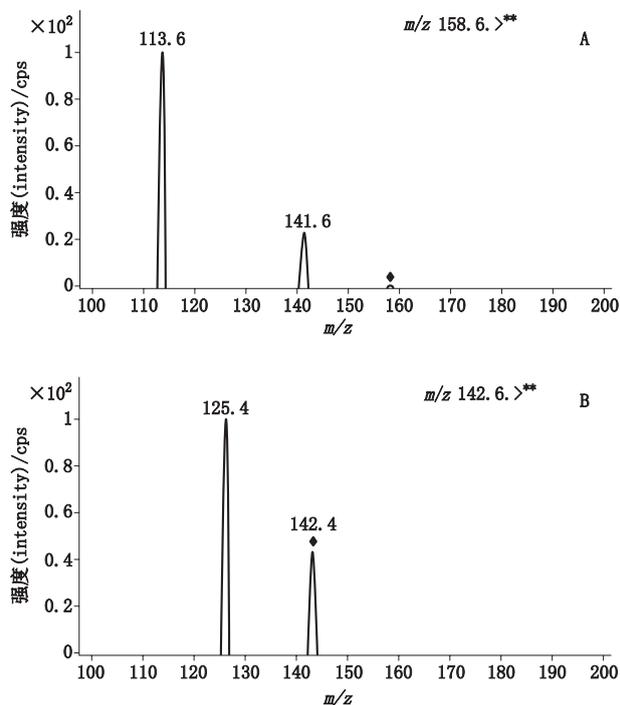


图 1 奥拉西坦(A)和内标吡拉西坦(B)[M+H]<sup>+</sup>离子扫描图

Fig. 1 Product ion [M+H]<sup>+</sup> mass spectra of oxiracetam (A) and internal standard piracetam (B)

### 2.3 脑组织样品的处理

取完整大鼠脑组织, 称量, 置于玻璃匀浆器中, 加 0.9% 氯化钠溶液 5 mL, 匀浆, 3 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取匀浆上清液 0.1 mL, 置 1.5 mL 具塞塑料离心管中, 加入 50 μg · mL<sup>-1</sup> 吡拉西坦内标溶液 10 μL, 振荡混匀后加入乙腈 300 μL, 涡旋沉淀蛋白 1 min, 10 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液经 0.45 μm 滤膜过滤, 转移入进样小瓶中, 进样 2 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

### 2.4 大鼠药动学实验

SD 大鼠 105 只, 随机分为 3 个剂量组, 每组 35 只(其中 5 只作为空白不给药), 分 6 个时间点, 每时间点 5 只(雌 2 只, 雄 3 只), 给药前禁食 4 h, 自由饮水, 分别静脉注射 500、1 000、2 000 mg · kg<sup>-1</sup> 奥拉西坦, 于注射后 0.25、0.5、1、2、4、8 h 后立即处死, 小心取脑组织, 用滤纸吸干残留血液并称量, -70 °C 保存, 待测。

### 2.5 数据处理

测定得到的脑组织匀浆溶液浓度根据对应大鼠脑组织的质量和匀浆液体积, 换算得到大鼠单位质量脑组织中奥拉西坦的浓度。采用 DAS 2.1 软件非室模型计算脑组织主要药动学的统计矩参数, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 其中  $T_{\max}$ 、 $t_{1/2}$  和 MRT 参数用 SPSS 进行组间统

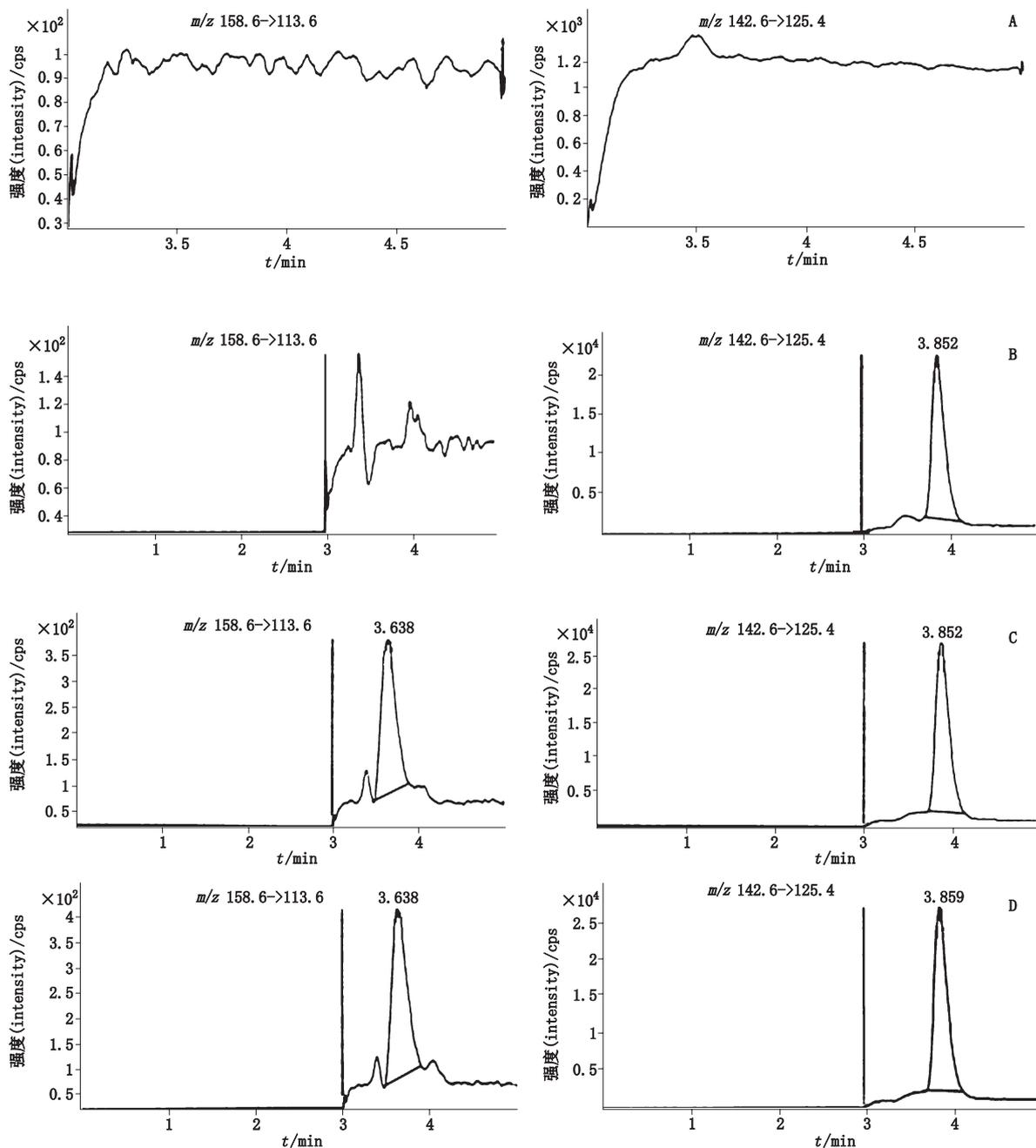
计学检验,  $P < 0.05$  视为差异有统计学意义, AUC 和 AUMC 参数进行线性分析。

### 3 结果

#### 3.1 专属性

按“2.1”项下试验条件, 分别测定 6 个不同大鼠

空白脑组织、空白脑组织 + 奥拉西坦 / 吡拉西坦和受试大鼠的脑组织样品, 结果表明, 大鼠脑组织中的内源性物质不干扰奥拉西坦和内标吡拉西坦的测定, 脑组织中奥拉西坦和内标吡拉西坦的保留时间分别为 3.6 和 3.8 min 左右, 方法具有较高的特异性, 见图 2。



A. 空白脑组织 (blank brain tissue) B. 空白脑组织 +  $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  吡拉西坦 (blank brain tissue spiked with  $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  piracetam) C. 空白脑组织 +  $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (LLOQ) 奥拉西坦 /  $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  吡拉西坦 (blank brain tissue spiked with  $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  oxiracetam /  $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  piracetam) D. SD 大鼠静脉注射  $500 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  奥拉西坦后 8 h 脑组织样品 (brain tissue sample of SD rats, 8 h after single intravenous administration of  $500 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  oxiracetam)

图 2 大鼠脑组织中奥拉西坦和内标 (吡拉西坦) LC-MS/MS 色谱图

Fig. 2 LC-MS/MS chromatograms of oxiracetam and internal standard (piracetam) in rat brain tissue

### 3.2 标准曲线及定量下限

分别取质量浓度为 5.00、12.5、25.0、50.0、125、250、500  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的奥拉西坦对照品系列标准工作液 20  $\mu\text{L}$ , 置于 1.5 mL 具塞塑料离心管中, 氮气吹干, 加入空白大鼠脑组织匀浆上清液 (取完整大鼠脑组织, 加入 5 mL 蒸馏水匀浆后 3 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min) 0.1 mL 混匀, 制备相当于含奥拉西坦质量浓度为 1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准脑组织样品, 按“2.3”项下方法处理样品后进样分析。以奥拉西坦的浓度为横坐标, 奥拉西坦与内标的峰面积比值为纵坐标, 经加权 ( $W=1/X^2$ ) 最小二乘法进行线性回归运算, 制备标准曲线, 回归方程为:  $Y=0.0134X-0.000852$  ( $W=1/X^2$ )  $r=0.9989$

线性范围为 1.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ~100.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 定量下限 (LLOQ) 为 1.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 3.3 精密度与准确度

按“3.2”项下方法制备 2.5、10.0、50.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  3 个浓度的标准脑组织样品作为质控样品, 每一浓度各 15 份, 每天分别取 3 个浓度各 5 份, 按“2.3”项下方法处理样品后进样测定, 连续测定 3 d, 计算批内、批间精密度和准确度, 结果见表 1。奥拉西坦脑组织样品的批内、批间精密度  $\text{RSD}<15\%$ , 符合生物样品测定要求。

表 1 大鼠脑组织中奥拉西坦的精密度与准确度 ( $n=5$ )

Tab. 1 Precision and accuracy of oxiracetam in rat brain tissue ( $n=5$ )

$C_{\text{added}}/$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	$C_{\text{found}}/$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	准确度 (accuracy) /%	精密度 (precision), $\text{RSD}/\%$	
			批内 (intra-day)	批间 (inter-day)
1.00	0.96 $\pm$ 0.05	96.3 $\pm$ 5.5	5.3	5.7
2.50	2.45 $\pm$ 0.07	97.5 $\pm$ 3.8	3.9	2.8
10.0	10.01 $\pm$ 0.43	100.9 $\pm$ 4.6	4.5	4.3
50.0	51.63 $\pm$ 1.74	105.2 $\pm$ 3.2	3.0	3.4

### 3.4 绝对回收率

按“3.2”项下方法制备 2.5、10.0、50.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  3 个浓度的标准脑组织样品作为质控样品, 每一浓度各 5 份, 按“2.3”项下方法处理样品后进样分析, 分别记录奥拉西坦和吡拉西坦的峰面积  $A_{1\text{样}}$ 、 $A_{1\text{内}}$ 。同上, 用纯水代替大鼠空白脑组织匀浆液, 制备 3 个浓度的质控样品, 每一浓度各 5 份, 按“2.3”项下方法加入内标后处理样品进样分析, 分别记录奥拉西坦和吡拉西坦的峰面积  $A_{2\text{样}}$ 、 $A_{2\text{内}}$ , 以均值比值  $A_{1\text{样}}/A_{2\text{样}} \times 100\%$  和  $A_{1\text{内}}/A_{2\text{内}} \times 100\%$  分别表示奥拉西坦和吡拉

西坦的绝对回收率。在本文条件下, 低、中、高 3 个浓度绝对回收率奥拉西坦分别为 (87.4  $\pm$  3.4)%、(89.0  $\pm$  1.5)%、(89.2  $\pm$  2.1)%,  $\text{RSD}$  分别为 3.9%、1.7%、2.3%; 内标吡拉西坦分别为 (96.9  $\pm$  1.9)%、(96.0  $\pm$  2.1)%、(97.1  $\pm$  2.6)%,  $\text{RSD}$  分别为 1.9%、2.2%、2.7%。

### 3.5 提取回收率

按“3.2”项下方法制备 2.5、10.0、50.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  3 个浓度的标准脑组织样品作为质控样品, 每一浓度各 5 份, 按“2.3”项下方法处理样品后进样分析, 分别记录奥拉西坦和吡拉西坦的峰面积  $B_{1\text{样}}$ 、 $B_{1\text{内}}$ 。另取 5 只大鼠空白脑组织匀浆液 0.1 mL, 以 10  $\mu\text{L}$  40% 甲醇-60% 水代替 10  $\mu\text{L}$  内标溶液, 其余按“2.3”项下方法操作, 将上清液转移至已吹干含 12.5、50.0、250  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  3 个浓度奥拉西坦对照品标准工作液 20  $\mu\text{L}$  和内标溶液 10  $\mu\text{L}$  的 1.5 mL 具塞塑料离心管中, 制成不包括提取过程, 相当于 2.5、10.0、50.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  3 个浓度的含基质样品, 每一浓度各 5 份, 分别记录奥拉西坦和吡拉西坦峰面积  $B_{2\text{样}}$ 、 $B_{2\text{内}}$ , 以均值比值  $B_{1\text{样}}/B_{2\text{样}} \times 100\%$  和  $B_{1\text{内}}/B_{2\text{内}} \times 100\%$  分别表示奥拉西坦和内标吡拉西坦的提取回收率。在本文条件下, 低、中、高 3 个浓度提取回收率奥拉西坦分别为 (88.4  $\pm$  3.6)%、(90.5  $\pm$  5.8)%、(90.9  $\pm$  5.3)%,  $\text{RSD}$  分别为 4.1%、6.4%、5.8%; 内标吡拉西坦分别为 (100.4  $\pm$  0.92)%、(92.1  $\pm$  9.8)%、(98.3  $\pm$  4.1)%,  $\text{RSD}$  分别为 0.92%、10.6%、4.2%。

### 3.6 基质效应

分别取 12.5、50.0、250  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  3 个浓度奥拉西坦对照品标准工作液 20  $\mu\text{L}$  和内标溶液 10  $\mu\text{L}$  置 1.5 mL 具塞塑料离心管中, 氮气吹干, 以 0.1 mL 纯水代替脑组织匀浆液, 按“3.2”项下方法制备 2.5、10.0、50.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  3 个浓度的无基质对照样品, 每一浓度各 5 份, 分别记录奥拉西坦和吡拉西坦峰面积  $C_{\text{样}}$ 、 $C_{\text{内}}$ , 与“3.5”项下  $B_{2\text{样}}$ 、 $B_{2\text{内}}$  比较, 以均值比值  $B_{2\text{样}}/C_{\text{样}} \times 100\%$  和  $B_{2\text{内}}/C_{\text{内}} \times 100\%$  的分别表示奥拉西坦和吡拉西坦的基质效应。奥拉西坦 3 个浓度的基质效应分别为 (99.2  $\pm$  4.8)%、(98.3  $\pm$  6.2)%、(99.4  $\pm$  3.8)%,  $\text{RSD}$  分别为 4.8%、6.3%、3.8%; 内标吡拉西坦 3 个浓度的基质效应分别为 (100.1  $\pm$  1.4)%、(99.2  $\pm$  2.6)%、(101.4  $\pm$  3.2)%,  $\text{RSD}$  分别为 1.4%、2.6%、3.2%, 在本文条件下, 脑组织中基质对测定无影响。

### 3.7 稳定性

按“3.2”项下方法制备 2.5、10.0、50.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

3个浓度的标准脑组织样品作为质控样品,每一浓度数份,分别考察于室温放置2 h,样品处理后4℃放置24 h, -70℃冻存30 d和-70℃冻融循环3次的稳定性,测定结果见表2。含奥拉西坦标准脑组织样品在上述条件下稳定性良好,符合生物样品测定要求。

表2 奥拉西坦在大鼠脑组织中的稳定性考察 (n=3)

储存条件 (storage condition)	C/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )		RSD/ %	相对 偏差 (RE) /%
	加入量 (added)	测定值 (found)		
室温放置2 h (room-temperature for 2 h)	2.50	2.43	5.2	-2.9
	10.0	10.1	3.1	1.0
	50.0	52.9	1.3	5.8
样品处理后4℃放置24 h (4℃ for 24 h after sample processing)	2.50	2.53	2.0	1.4
	10.0	9.74	4.7	-4.9
	50.0	50.6	2.6	1.3
-70℃冻存30 d (freeze for 30 d at -70℃)	2.50	2.52	3.8	-1.9
	10.0	9.86	2.7	-1.4
	50.0	49.4	4.7	-1.3
-70℃冻融循环3次 (3 freeze-thaw cycle at -70℃)	2.50	2.48	4.2	-3.3
	10.0	10.1	5.4	-1.8
	50.0	50.7	4.5	3.9

### 3.8 大鼠药代动力学实验

SD大鼠分别静脉注射500、1 000、2 000  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 奥拉西坦后,大鼠脑组织中奥拉西坦浓度-时间曲线见图3,经非室模型统计矩计算主要药代动力学参数见表3。 $T_{\text{max}}$ 、 $t_{1/2}$ 、 $\text{MRT}_{0-t}$ 、 $\text{MRT}_{0-\infty}$ 经统计学处理无显著性差异 ( $P>0.05$ );  $\text{AUC}_{0-t}$ 、 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 、 $\text{AUMC}_{0-t}$ 、 $\text{AUMC}_{0-\infty}$ 符合线性动力学特征。

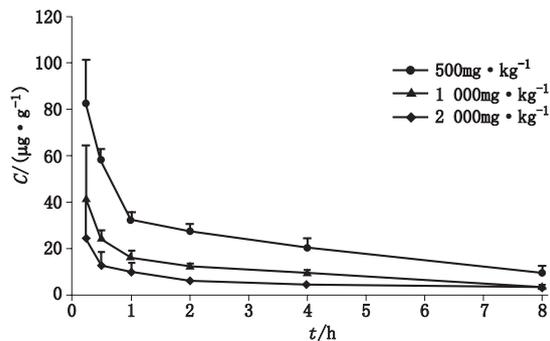


图3 SD大鼠单次静脉注射奥拉西坦500、1 000、2 000  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的平均脑药-时曲线图

Fig. 3 Mean brain tissue drug concentration-time curves for oxiracetam after single intravenous administration of 500, 1 000, 2 000  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  to SD rats

表3 SD大鼠静脉注射奥拉西坦后的脑组织主要药代动力学参数 (n=5)

Tab. 3 Main pharmacokinetic parameters of oxiracetam in brain tissue after intravenous administration to SD rats

参数 (parameter)	剂量 (dosage) / ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )		
	500	1 000	2 000
$C_{\text{max}}/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	24.78 ± 16.06	50.79 ± 25.92	82.21 ± 19.33
$T_{\text{max}}/\text{h}$	0.30 ± 0.11	0.25 ± 0	0.25 ± 0
$t_{1/2}/\text{h}$	3.56 ± 0.27	3.36 ± 0.49	3.60 ± 0.79
$\text{AUC}_{0-t}/(\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{g}^{-1})$	48.59 ± 10.92	94.54 ± 9.30	201.35 ± 18.87
$\text{AUC}_{0-\infty}/(\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{g}^{-1})$	59.87 ± 14.13	112.04 ± 6.72	251.39 ± 27.45
$\text{AUMC}_{0-t}$	121.68 ± 20.63	223.32 ± 26.45	517.18 ± 45.78
$\text{AUMC}_{0-\infty}$	297.32 ± 90.70	452.12 ± 68.52	1192.73 ± 284.81
$\text{MRT}_{0-t}/\text{h}$	2.54 ± 0.22	2.38 ± 0.30	2.57 ± 0.08
$\text{MRT}_{0-\infty}/\text{h}$	4.96 ± 0.90	4.05 ± 0.69	4.71 ± 0.80

注 (note):  $T_{\text{max}}$ 、 $t_{1/2}$ 、 $\text{MRT}_{0-t}$ 、 $\text{MRT}_{0-\infty}$ 组间经统计学处理无显著性差异 ( $P>0.05$ ) [The statistical analysis indicated no significant between-group differences of  $T_{\text{max}}$ 、 $t_{1/2}$ 、 $\text{MRT}_{0-t}$  and  $\text{MRT}_{0-\infty}$  ( $P>0.05$ )]

### 4 讨论

在以LC-MS/MS测定血浆中奥拉西坦的文献报道<sup>[17-20]</sup>中,其流动相组成基本相同,均以甲醇-水溶液为基础,外加一定的甲酸或甲酸铵溶液,但经试验,用于血浆测定的文献方法用于脑组织样品测定时干扰较多,基线不稳、峰形不佳。为改善峰形和稳定基线,本法在加入甲酸溶液的基础上同时加入了一定量的甲酸铵溶液,且加入的量稍大,为10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,结果能显著改善峰形。在子离子的选择上,文献报道奥拉西坦的子离子选择均为  $m/z$  159 → 114,而吡拉西坦有2个子离子可供选择,分别是  $m/z$  143 → 98<sup>[17-18]</sup>和143 → 126<sup>[19-20]</sup>,其离子响应强度基本相同,在测定时可根据具体的情况选择  $m/z$  98或  $m/z$  126,本次试验选择  $m/z$  126进行测定,干扰较少。在样品处理上,由于脑组织样品不同于血浆样品,具有较多的脂溶性成分,容易干扰LC-MS/MS系统,而奥拉西坦水溶性又较强,不便于用有机溶剂进行萃取、净化,因此,只能采用简单的沉淀蛋白法来进行样品处理,这给测定带来了一定的困难。本方法从2个方面解决此问题:一是在不降低测定灵敏度的基础上,在沉淀蛋白和稀释过程中加大稀释倍数,尽量减少引入流动相系统的量;二是同时在流动相中加入一定量的

甲酸铵与甲酸形成一定的缓冲对,增加仪器系统基线的稳定性。在奥拉西坦方法学研究和脑组织样品测定中,脑组织匀浆液浓度均以  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  表示,但在奥拉西坦最终脑组织分布结果表述时采用经换算后的  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  表示(每只大鼠脑组织质量约 2 g,加入 5 mL 0.9% 氯化钠溶液匀浆,换算系数约 2.5 倍),更能体现奥拉西坦在脑组织中的真实浓度。

在成功建立脑组织中奥拉西坦的 LC-MS/MS 测定方法后,将其应用于大鼠脑组织中的药代动力学组织分布实验。有文献报道<sup>[23]</sup>,奥拉西坦毒性极低,SD 大鼠单次静脉注射左旋奥拉西坦的最小致死量  $\geq 5\ 000\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,该实验中给药剂量为 400、800、1 600  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。因此,本文 SD 大鼠单次静脉注射剂量选择为 500、1 000、2 000  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,其中高剂量按《药物非临床药代动力学研究技术指导原则》要求稍微偏高,相当于人体最大剂量的 1 倍,有利于观察药物在过量的情况下是否还能维持线性动力学特征,会否产生蓄积,能为临床用药的安全提供参考。由于是静脉给药,实验中共取 6 个时间点,覆盖了给药后奥拉西坦向脑组织中分布的平衡相和消除相,虽然取样时间点少于通常的血浆药代动力学,但多于药代动力学组织分布研究通常要求的 3 个时间点,符合组织分布的实验要求;又由于常规的药代动力学房室模型是基于血液全身循环的药物转运而建立,不适用于脑组织分布的药代动力学参数计算,因此,本次实验采用不依赖房室模型的非室模型(统计矩模型)进行计算,以脑药浓度-时间曲线下面积为主要依据,在线性动力学下计算统计矩参数。结果显示,大鼠静脉注射奥拉西坦后能快速进入脑组织,并在脑组织中滞留较长的时间,高、中、低剂量时的平均滞留时间  $\text{MRT}_{0-t}$  分别为 2.57、2.38、2.54 h,表明在较大的剂量下奥拉西坦在脑组织中的药代动力学性质仍具有线性动力学特征。

本实验建立了一种简单、快速、专属性和抗干扰能力均较强的脑组织中奥拉西坦的 LC-MS/MS 测定方法,用于脑组织中奥拉西坦的药代动力学研究,也可用于脑组织中不同部位的奥拉西坦浓度测定,能对奥拉西坦药理作用机理的深入研究提供一定的支撑。

#### 参考文献

[1] 齐洪武,王政刚,程建业. 促智药奥拉西坦的研究进展[J]. 实用医院临床杂志, 2010, 7(5): 147

- QI HW, WANG ZG, CHENG JY. Advances in nootropics drugs: a study of oxiracetam[J]. *Pract J Clin Med*, 2010, 7(5): 147
- [2] PONZIO F, POZZI O, BANFIS, *et al.* Brain entry and direct central pharmacological effects of the nootropic drug oxiracetam[J]. *Pharmacopsychiat*, 1989, 22: 111
- [3] VILLARDITA C, GRIOLI S, LOMEIO C, *et al.* Clinical studies with oxiracetam in patients with dementia of Alzheimer type and multi-infarct dementia of mild to moderate degree[J]. *Neuropsychobiology*, 1992, 25(1): 24
- [4] 刘治军,胡欣. 促智药奥拉西坦的临床和基础研究[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2005, 4(3): 286  
LIU ZJ, HU X. The clinical and fundamental research of the nootropic drug-oxiracetam[J]. *Chin J Neurosurg Dis Res*, 2005, 4(3): 286
- [5] 王敬,张杰,周杰. 奥拉西坦和吡拉西坦治疗脑器质性综合症临床疗效的系统评价[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2016, 8(2): 160  
WANG J, ZHANG J, ZHOU J. Systematic review of curative effects of oxiracetam and piracetam on treatment of cerebral organic syndrome[J]. *Chin J Evid Base Cardiovasc Med*, 2016, 8(2): 160
- [6] YAO XL, YAO ZH, LI L, *et al.* Oxiracetam can improve cognitive impairment after chronic cerebral hypoperfusion in rats[J]. *Psychiatry Res*, 2016, 246(30): 284
- [7] 郭晶晶. 奥拉西坦对脑梗死急性期认知功能障碍和脑血流量的改善作用[J]. 白求恩医学杂志, 2017, 15(2): 190  
GUO JJ. The improvement of effects of oxiracetam on cognitive impairment in acute stage of cerebral infarction and cerebral blood flow[J]. *J Bethune Med Sci*, 2017, 15(2): 190
- [8] 金磊,李博,叶雷,等. 奥拉西坦的临床前药理学研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2011, 16(3): 354  
JIN L, LI B, YE L, *et al.* Preclinical pharmacology research of oxiracetam[J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2011, 16(3): 354
- [9] 李坤,王璞瑛,于媛媛. 促智药物(S)奥拉西坦的合成[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(19): 1920  
LI K, WANG YY, YU YY. Synthesis of the nootropic drug S-stereoisomer of oxiracetam[J]. *Chin J New Drugs*, 2011, 20(19): 1920
- [10] 李获,张晓宇. 奥拉西坦在犬体内的药理学研究[J]. 中国药房, 2013, 24(37): 3473  
LI H, ZHANG XY. Study on pharmacokinetics of oxiracetam in dogs[J]. *China Pharm*, 2013, 24(37): 3473
- [11] 陈倩,刘东,张东林,等. 奥拉西坦颗粒在健康人体中动力学和生物等效性[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(1): 14  
CHEN Q, LIU D, ZHANG DL, *et al.* Pharmacokinetics and bioequivalence of oxiracetam granules in healthy volunteers[J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2012, 32(1): 14
- [12] 刘杰,张国顺,赵云丽,等. 奥拉西坦口服溶液的人体生物等效性评价[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(4): 284  
LIU J, ZHANG GS, ZHAO YL, *et al.* Bioequivalence of oxiracetam

- oral solutions [J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2012, 29(4): 284
- [13] 梁大虎, 孙华, 袁小龙, 等. 手性固定相 HPLC 法测定人血浆中奥拉西坦 2 种异构体的浓度 [J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(5): 776  
LIANG DH, SUN H, YUAN XL, *et al.* A chiral stationary phase HPLC method for oxiracetam enantiomers determination in Chinese healthy volunteers' plasma [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(5): 776
- [14] 张佩婷, 王志仁, 周玉婷, 等. 奥拉西坦光学对映体在多糖类手性固定相上的拆分 [J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(2): 287  
ZHANG PT, WANG ZR, ZHOU YT, *et al.* Separation of oxiracetam optical enantiomers using polysaccharide chiral stationary phase [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(2): 287
- [15] ZHANG QY, YANG W, YANG Y, *et al.* Comparative pharmacokinetic studies of racemic oxiracetam and its pure enantiomers after oral administration in rats by a stereoselective HPLC method [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 111: 153
- [16] ZHANG QY, YANG W, ZHANG Q, *et al.* Enantioselective HPLC determination of oxiracetam enantiomers and application to a pharmacokinetic study in Beagle dogs [J]. *J Chromatogr B*, 2015, 9(13): 993
- [17] 朱荣华, 万顺, 颜苗, 等. 注射用奥拉西坦人体药动学研究 [J]. *中南药学*, 2011, 9(9): 651  
ZHU RH, WAN S, YAN M, *et al.* Pharmacokinetics of oxiracetam for injection in Chinese healthy volunteers [J]. *Cent South Pharm*, 2011, 9(9): 651
- [18] 张丹, 杨漫, 张娅喃, 等. LC-MS/MS 法测定人血浆中奥拉西坦的浓度及其两种口服制剂在健康中国人体内的生物等效性 (英文) [J]. *中国新药与临床杂志*, 2014, 33(4): 281  
ZHANG D, YANG M, ZHANG YN, *et al.* LC-MS/MS method for quantitation of oxiracetam in human plasma: application to a bioequivalence study of its two oral formulations in healthy Chinese subjects [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem*, 2014, 33(4): 281
- [19] JUNGHYUN S, JAEICK L, MIJIN L, *et al.* Rapid quantitative analysis of oxiracetam in human plasma by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 36(3): 657
- [20] WANG WS, JI H, XIE HT, *et al.* A sensitive and specific UPLC-MS/MS analysis and preliminary pharmacokinetic characterization of S-oxiracetam in Beagle dogs [J]. *Chin J Pharmacol Ther*, 2012, 17(9): 988
- [21] SHIGETOH H, YAMAGAMI S, UNO K, *et al.* A pharmacokinetics study of oxiracetam in rats (I): plasma levels profile, tissue, distribution, metabolism and excretion after single administration [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 1991, 6(4): 637
- [22] TIZIANA M, CARLO T, ALFREDO C, *et al.* *In-vivo* radiolabelled oxiracetam binding to rat brain [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1990, 42(3): 171
- [23] 沈园园, 岳鹏, 乔红群. LC-MS/MS 测定左旋奥拉西坦及其在 SD 大鼠生殖毒性中体内组织分布检测 [J]. *药物分析杂志*, 2017, 36(6): 1056  
SHEN YY, YUE P, QIAO HQ. LC-MS/MS method for quantitation of S-oxiracetam and its application to the research of SD rat tissue distribution in reproductive toxicity [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2017, 36(6): 1056

(本文于 2017 年 9 月 25 日收到)