

LC/MS/MS 测定大鼠尿液中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的方法学研究^{*}

★ 张启云¹ 徐国良¹ 黄丽萍² 马晓雪¹ 曾治君² 余日跃² 刘红宁² (1. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室 南昌 330004; 2. 江西中医学院 南昌 330006)

摘要:目的:建立一种快速测定大鼠尿液中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的定量方法。方法:用三重四级杆串联质谱(MS/MS)作为HPLC的检测器,其中MS/MS使用了多反应检测(MRM)扫描方式。分别选择304.2→134.2和288.2→244.2离子对m/z作为MRM检测的离子对;流动相:甲醇-水(85:15),内含5 mol/L 甲酸铵;色谱柱:Agilent Zorbax XDB-C18,以测定大鼠尿液中吴茱萸碱和吴茱萸次碱为例,对此方法进行了应用。结果:方法的线性范围为吴茱萸碱=5.615-1437.5 ng/ml($r=0.999$),检测限1.87 ng/ml,吴茱萸次碱=10.26-1314.25 ng/ml($r=0.998$),检测限5.13 ng/ml。结论:此法灵敏、准确,可用于含吴茱萸碱和吴茱萸次碱的药物代谢研究。

关键词:高效液相色谱;串联质谱;吴茱萸碱;吴茱萸次碱

中图分类号:R 284.1 **文献标识码:**A

Determination of Evodiamine and Rutaecarpine in Rat Urine by LC/MS/MS

ZHANG Qi-yun¹, XU Guo-liang¹, HUANG Li-ping², MA Xiao-xue¹, ZENG Zhi-jun², YU Ri-yue², LIU Hong-ning²

1. Key laboratory of Modern Preparation (Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine), Ministry of Education, Nanchang 330004

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006

Abstract: Objective: To establish a method for quantitative analysis of evodiamine and rutaecarpine in rat urine rapidly. Methods: A triple-quadrupole tandem mass spectrometry was used as the detector of HPLC. As to MS/MS, multi-reactions monitoring (MRM) scan mode was employed. Among the product ions of evodiamine and rutaecarpine, m/z-134.2 and 244.2 are the most abundant in intensity, thus the parent-daughter ion pairs of m/z 304.2→134.2 and 288.2→244.2 were selected as MRM ions pairs. MS/MS conditions were optimized to achieve highest sensitivity. The mobile phase of HPLC was methanol-water (85:15) containing 5mM ammonium formate. The analytical column was Agilent Zorbax XDB-C18. The flow rate of HPLC was 0.5ml/min. The areas of ion flow peaks were used to determine the content of evodiamine and rutaecarpine in the rat urine. Results: The standard curves for evodiamine and rutaecarpine showed good linearity over ranges of 5.615-1437.5ng/ml ($r=0.999$) and 10.26-1314.25ng/ml ($r=0.998$), and the detection limit for evodiamine and rutaecarpine were 1.87ng/ml and 5.13ng/ml respectively. Conclusion: This method is highly sensitive, fast and very accurate. Therefore, it is possible to be applied to study the metabolism of evodiamine and rutaecarpine.

Keywords: HPLC; MS/MS; Evodiamine; Rutaecarpine

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth 和石虎 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth var. *officinalis* (Dode) Huang 等的干燥将近成熟果实,是一种常用中药,临床应用已有数百年的历史。国内外学者对吴茱萸的化学成分和药理作用进行了深入研究,证明其具有镇痛、降血压等广泛的药理作用,主要活性成分为吴茱萸碱和吴茱萸次

碱^[1,2]。

近年来,国内外关于吴茱萸碱和吴茱萸次碱的体内代谢分析方法报道日益增加。裘国丽等^[3]建立家兔中吴茱萸碱和吴茱萸次碱同时测定的液质联用方法,栾连军等^[4]进行了家兔中吴茱萸碱和吴茱萸次碱口服给药后的药动力学研究, Kuofang Jeng 等^[5]利用 HPLC 研究了静脉给药后血浆中吴茱

* 基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)基金资助项目(2006CB504702)

萸碱测定方法;侯晓红等^[6]建立了血浆中吴茱萸次碱测定的HPLC方法;Hanchieh Kuo等^[7]则研究了静脉给药后血浆中吴茱萸次碱的分析方法。Dawei Wen等^[8]使用LC/MS/MS建立血清中吴茱萸碱及吴茱萸次碱含量测定方法学研究,为吴茱萸碱及吴茱萸次碱的药代动力学及其在体内代谢研究提供研究基础。目前尚未见吴茱萸碱及吴茱萸次碱在尿液中的分析方法研究。

本文采取LC/MS/MS的方法,将MS/MS作为检测吴茱萸碱和吴茱萸次碱的高选择性的检测器,通过多反应监测(multireactions monitoring,MRM)的扫描方式监测色谱流出的吴茱萸碱和吴茱萸次碱的信号,实现了对吴茱萸碱和吴茱萸次碱的精确定量。

1 材料

1.1 试剂与仪器 试剂:甲醇(HPLC级,Product of Tedia, USA),吴茱萸碱和吴茱萸次碱对照品(中国药品生物制品检定所),甲酸铵(Sigma Aldrich, USA),水为超纯水,吴茱萸为市售药材。

仪器:Agilent 6410 Triple Quadrupole (Agilent Technologies, USA);TGL-16 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);METTLER AE-40 分析天平,GL-固相萃取装置(迪马公司)。

1.2 样品的准备 空白尿样:SD大鼠购买于江西医学院,以标准食物喂食和饮水。实验时称重约250 g,将实验大鼠置于代谢笼中,自由饮水。收集正常大鼠尿液,置于-20℃冰箱中,待分析。

尿液样品处理:取大鼠尿液1ml,13 000 r/min离心10 min,取上清液,上经2 ml甲醇、2 ml纯水活化后的SPE柱,以每分钟30滴速度萃取,用2 ml水洗脱,再用1 ml甲醇洗脱,收集洗脱液,经0.45 μm微孔滤膜过滤,滤液用于HPLC/MS/MS分析。

1.3 色谱条件 色谱柱:Agilent Zorbax XDB-C₁₈柱(5 μm, 150 mm×4.6 mm),配有ProElut C₁₈预柱(迪马公司);柱温:30℃;流动相:甲醇:水(85:15),含5 mmol/L甲酸铵;流速:0.5 ml/min,进样量:10 μl。

2 方法

2.1 质谱条件的优化 吴茱萸碱和吴茱萸次碱的对照品溶于甲醇,通过HPLC进样系统进入质谱,采取正离子模式,首先使用一级质谱优化吴茱萸碱及吴茱萸次碱的分子离子峰[M+1]⁺304.2及288.2,使它们强度最大;然后使用二级质谱扫描m/z-304.2及m/z-288.2的子离子。

离子源模式:ESI正离子模式;毛细管电压:4 000 V;雾化器压力:40 psi;干燥气流速:10 L/min;干燥气温度:350℃。

将HPLC与MS/MS的离子源连接,使用以上参数对HPLC的流出物进行检测,以吴茱萸碱和吴茱萸次碱的峰面积作为定量的依据。

2.2 吴茱萸碱与吴茱萸次碱的定量分析

2.2.1 色谱行为 采取MRM方式检测吴茱萸碱、吴茱萸次碱的离子流,质谱信号强,与UV检测器相比,提高选择性

的同时提高了信噪比和灵敏度。吴茱萸碱和吴茱萸次碱的保留时间分别为5.12 min和6.65 min。

2.2.2 标准曲线 精密称取吴茱萸碱对照品2.30 mg,吴茱萸次碱2.11 mg,分别用甲醇溶解,定容至10 ml,得吴茱萸碱和吴茱萸次碱储备液,4℃冰箱保存。流动相稀释得到吴茱萸碱标准系列浓度为5.615、11.230、22.46、44.92、89.84、179.68、359.37、718.75、1437.50 ng/ml;吴茱萸次碱的标准系列浓度为10.26、20.53、41.07、82.14、164.28、328.56、657.12、1314.25 ng/ml,分别依次进样10 μl。吴茱萸碱工作曲线: $y = 491.7667x + 5947.3101$ ($r = 0.999$),线性范围为5.615~1437.5 ng/ml,检测限是1.87 ng/ml,吴茱萸次碱工作曲线: $y = 106.0300x - 730.4084$ ($r = 0.998$),线性范围是10.26~1314.25 ng/ml,检测限是5.13 ng/ml。

2.2.3 加样回收实验 取空白大鼠尿液,分别加入高、低两个浓度吴茱萸碱和吴茱萸次碱对照品混合液,按照尿液样品处理方法,平行5个样品,结果如表1。

表1 大鼠尿液吴茱萸碱和吴茱萸次碱加样回收率结果

成分	浓度 /ng·ml ⁻¹	回收率(%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
吴茱萸碱	180	95.2,97.1,103.7,96.8,94.8	97.5	3.68
	90	93.2,94.1,95.7,90.8,96.5	94.1	2.38
吴茱萸次碱	160	91.5,93.7,89.8,90.7,91.0	91.3	1.60
	80	88.9,90.5,85.7,93.5,94.8	90.7	4.01

3 讨论

三重四级杆质谱,具有独特的高选择性,可以显著降低复杂基质的背景干扰,从而提高检测灵敏度,是检测生物样品的药物浓度的良好仪器。本文建立的方法灵敏、准确,可用于含吴茱萸碱和吴茱萸次碱的药物代谢研究。

参考文献

- [1]胡长平,李元建.吴茱萸碱和吴茱萸次碱的药理学研究进展[J].中国药理学通报,2003,19(10):108.
- [2]逯振宇,蔺兴遥,崔佳.吴茱萸对心血管药理作用的研究[J].中医药研究,2002,18(2):44.
- [3]袁国丽,栾连军,程翼宇.液相色谱-电喷雾质谱法测定血浆中吴茱萸碱和吴茱萸次碱浓度[J].药物分析杂志,2005,25(10):1179.
- [4]栾连军,袁国丽,程翼宇.吴茱萸碱和吴茱萸次碱在家兔体内的药动学研究[J].中国药理学杂志,2006,41(1):48.
- [5]Kuofang Jeng, Yeouhuang Lin, Liehwen Lin, et al. High performance liquid chromatographic determination of evodiamine in rat plasma: Application to pharmacokinetic studies[J]. J Chromatogr B, 1995, (668):343.
- [6]侯晓红,于治国,杜惠莲.高效液相色谱法测定大鼠血浆中吴茱萸次碱浓度[J].沈阳药科大学学报,2001,18(5):335.
- [7]Hanchieh Kuo, Tunghu Tsai, Chengjen Chou, et al. High performance liquid chromatographic determination of rutaecarpine in rat plasma: Application to a pharmacokinetic studies[J]. J Chromatogr B, 1994, (665):27.
- [8]Dawei Wen, Chenchen Li, Yiping Liao, et al. Determination of evodiamine and rutaecarpine in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Anal Bioanal Chem, 2006, (385):1 075.

(收稿日期:2007-10-10)