

# 液相色谱 - 质谱法同时测定吴茱萸水提物中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量

鄢良春<sup>1</sup> 李波<sup>1,2</sup> 华桦<sup>1</sup> 廖利<sup>1</sup> 赵军宁<sup>1</sup>

(1 四川省中医药科学院, 成都, 610041; 2 四川省郫县人民医院, 郫县, 611730)

**摘要** 目的: 建立同时测定吴茱萸水提物中吴茱萸碱(Evodiamine, EVO)和吴茱萸次碱(Rutaecarpine, RUT)的 LC/MS 方法。方法: 液相色谱采用 Welch Materials Xtimate-C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 3 μm), 以甲醇-10 mmol/L 乙酸铵水溶液(85:15)为流动相, 流速 0.2 mL/min, 柱温 30 ℃。质谱采用正离子全扫描模式, m/z: 0~1000, 电喷雾离子化源(ESI)。雾化气为氮气, 雾化压力为 40 psi; 喷雾电压 4000 V, 源温度为 100 ℃; 去溶剂气为氮气, 温度 350 ℃, 流速为 10 L/min。结果: 吴茱萸碱在 2.02~504 ng/mL (r=0.9992), 吴茱萸次碱在 1.97~493.33 ng/mL (r=0.9999) 线性关系良好, 回收率分别为 87.8%~97.04% 和 86.35%~98.22%, 日内、日间精密性均 <10%。结论: 该方法简便、可靠、灵敏度高, 可用于同时测定吴茱萸水提物中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量及药代动力学研究。

**关键词** 吴茱萸水提物; 吴茱萸碱; 吴茱萸次碱; 液相色谱-质谱

## Simultaneous Determination of Evodiamine and Rutaecarpine in Water extracts of Evodia rutaecarpa by LC-MS

Yan Liangchun<sup>1</sup>, Li Bo<sup>1,2</sup>, Hua Hua<sup>1</sup>, Liao Li<sup>1</sup>, Zhao Junning<sup>1</sup>

(1 Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China;

2 Pixian People's Hospital, Pixian 611730, China)

**Abstract Objective:** To establish a LC-MS method for the simultaneous determination of evodiamine and rutaecarpine in water extracts of Evodia rutaecarpa. **Methods:** A Welch Materials Xtimate-C<sub>18</sub> (2.1 mm × 150 mm, 3 μm) was used. The mobile phase consisting of a mixture of methanol and 10 mmol/L ammonium acetate (85:15) was delivered at a flow-rate of 0.2 mL/min. The column temperature was maintained at 30 ℃. The mass spectrometer was operated under the positive ion mode. Atomization pressure (N<sub>2</sub>) was 40 psi, voltage was 4000V and temperature was 100 ℃. The drying gas (N<sub>2</sub>) flow was 10 L/min, the drying gas temperature was 350 ℃. **Results:** The linear ranges were 2.02~504 ng/mL (r=0.9992) and 1.97~493.33 ng/mL (r=0.9999) for evodiamine and rutaecarpine. The method extraction recoveries of evodiamine and rutaecarpine were 87.8%~97.04% and 86.35%~98.22% respectively. The intra- and inter-day RSD were also lower than 10%. **Conclusion:** The method is simple, reliable and sensitive. It can be used for the pharmacokinetics research of water extracts of Evodia rutaecarpa.

**Key Words** Water extracts of Evodia rutaecarpa; Evodiamine; Rutaecarpine; LC-MS

中图分类号: R284.2 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2014.02.004

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss) Benth, 石虎 *Evodia rutaecarpa* (Juss) Benth var *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss) Benth. Var *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实。吴茱萸始载于《神农本草经》, 列为中品, 能温中散寒、疏肝止痛, 用于厥阴头痛、寒疝腹痛、寒湿脚气、经行腹痛、脘腹胀痛、呕吐吞酸、五更泄泻、高血压、外治口疮等<sup>[1]</sup>。近年来, 国内外学者对吴茱萸的化学成分进行深入研究, 主要集中在吴茱萸碱 (Evodiamine, EVO)、吴茱萸次碱 (Rutaecarpine, RUT)、柠檬苦

素等单体成分的研究<sup>[2-4]</sup>。吴茱萸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱含量测定方法一般为 HPLC 法及液相色谱-紫外检测法等, 多只测定吴茱萸中的单一成分。

中医临床运用中, 吴茱萸多以复方水煎为主。前期本研究室对吴茱萸的毒性情况做了比较系统研究, 结果表明吴茱萸提取物对大鼠、小鼠均具有一定的毒性作用<sup>[5-7]</sup>。本研究拟建立一种同时测定吴茱萸水提物中吴茱萸碱和吴茱萸次碱含量的液相色谱-质谱法 (LC/MS), 为进一步研究吴茱萸毒性及其药代动力学特征奠定基础<sup>[8-9]</sup>。

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项项目 (编号: 2011ZX09401-304-(4-1)); 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (编号: 2009CB522801); 国家自然科学基金面上项目 (编号: 81073047)

作者简介: 鄢良春, 硕士, 副研究员, E-mail: yanlc9722@163.com

通信作者: 赵军宁, 男, 研究员, 博士生导师, 电话: (028)85226120, E-mail: zarmy@189.cn

## 1 实验材料

1.1 受试药物 吴茱萸由四川省中医药科学院资源与种植研究所舒光明研究员于重庆红庙村实地采集并鉴定,由四川省中医药科学院易进海研究员提供水提取物样品。

1.2 主要试剂 吴茱萸碱对照品、吴茱萸次碱对照品(成都曼思特生物科技有限公司,纯度均 $\geq 98\%$ );卡马西平对照品(中国食品药品检定研究院,纯度 $\geq 98\%$ );甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司);DMEM 高糖培养基(Gibco);胎牛血清(PAA);非必需氨基酸(Sigma)。

1.3 主要仪器 美国 Agilent 1200 RRLLC-6410 triple quadrupole 液质联用系统,配有 G1312B 二元泵、G1322B 真空脱气机、G1329B 自动进样器和 G1316B 柱温箱,使用 MassHunter 软件控制系统及数据处理;超纯水系统(Millipore);CP-225D 型精密电子天平(Sartorius),FD-ID-50 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);XW-80A 漩涡混旋仪(上海青浦沪西仪器厂)。

## 2 实验方法

2.1 色谱条件 Welch Materials Xtimate-C<sub>18</sub>, (2.1 mm × 150 mm, 3 μm);流动相:甲醇-10 mmol/L 乙酸铵水溶液(85:15);流速:0.2 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

2.2 质谱条件 采用电喷雾离子化源(ESI),正离子模式,喷雾电压 4000 V,源温度为 100 ℃;雾化气为氮气,雾化压力为 40 psi;去溶剂气为氮气,温度 350 ℃,流速为 10 L/min;碰撞气为高纯氮气,压力为 0.1 MPa;采用 MRM 模式对药物检测,质谱条件如下。

表 1 吴茱萸水提取物中吴茱萸碱和吴茱萸次碱 LC/MS 法测定条件

标准品	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞碎片电压 (V)	毛细管电压 (V)
吴茱萸碱	304.3	134.2	90	20
吴茱萸次碱	288.1	273.1	190	32
内标卡马西平	237.2	194.2	120	15

2.3 受试样品吴茱萸水提取物的制备 取吴茱萸药材,加水煎煮 2 次,每次加水 10 倍,第 1 次煎煮 2 h,第 2 次煎煮 1.5 h,合并煎液,滤过、浓缩冷冻干燥,即得。每克药粉含原生药 3.44 g。用 DMEM-10 培养液(含 10% 胎牛血清,1% 非必需氨基酸的 DMEM 高糖培养液)配成不同浓度溶液,0.22 μm 过滤器过滤备用。

2.4 样品预处理 微量加样器精密吸取待测样品 600 μL 置 1.5 mL 离心管中,加入 804 ng/mL 卡马西平 40 μL,冷冻干燥后,加入 600 μL 甲醇溶解,涡旋混匀 1

min,12 000 r/min 离心 10 min,0.22 μm 微孔滤膜过滤,取上清液 10 μL 进样测定。

2.5 混合对照品溶液的配制 精密称取吴茱萸碱(EVO)对照品和吴茱萸次碱(RUT)对照品适量,用 DMEM-10 培养液配制成终浓度分别为 504 ng/mL(EVO),493.33 ng/mL(RUT)的对照品混合溶液。作为标准储备液。4 ℃ 冰箱保存。

### 2.6 方法学考察

2.6.1 方法专属性 取空白 DMEM-10 溶液、空白 DMEM-10 溶液加内标卡马西平、空白 DMEM-10 溶液加 EVO、RUT 和内标卡马西平混合物、吴茱萸水提取物 DMEM-10 溶液,分别经 LC/MS 检测后,记录色谱图,考察其专属性。

2.6.2 线性关系考察 取空白 DMEM-10 溶液 600 μL,精密加入浓度为 804 ng/mL 卡马西平 40 μL,配成 EVO 终浓度为 2.016、20.16、50.40、100.80、201.60、504 ng/mL,RUT 终浓度为 1.97、19.73、49.33、98.67、197.33、493.33 ng/mL 的混合对照品溶液。按 2.4 项下方法处理后,进样 10 μL 经 LC/MS 测定。记录峰面积。

2.6.3 精密度实验 在标准曲线范围内取空白 DMEM-10 溶液,配制 EVO、RUT 高、中、低 3 个不同浓度的样品,按 2.4 项下方法处理样品,在 1 d 内分别测定 5 份样品,计算日内精密度;每天各测定 1 份样品,连测 5 d,计算日间精密度。

2.6.4 回收率实验 配制 EVO、RUT 高、中、低 3 个浓度样品,记录峰面积,计算其回收率。

2.6.5 稳定性实验 在标准曲线范围内用空白 DMEM-10 溶液配制高、中、低,的 EVO、RUT 混标溶液,按 2.4 项下方法操作,分别在冷冻后 0,1,2,11 和 14 d,进行 LC/MS 含量测定,计算 RSD%。

2.6.6 重复性实验 取受试样品按 2.4 项下方法操作,测定吴茱萸碱、吴茱萸次碱含量,进行重复性实验。

2.7 吴茱萸水提取物样品吴茱萸碱、吴茱萸次碱含量测定 按 2.3 项下制备受试样品 3 份,按 2.4 项下制备成受试样品溶液,进样 10 μL,测定吴茱萸碱、吴茱萸次碱含量。

## 3 实验结果

### 3.1 方法学考察结果

3.1.1 方法专属性 如图 1-图 4 所示,在该实验条件下采用 MRM 模式对药物检测,吴茱萸碱、吴茱萸次碱和卡马西平保留时间分别为 3.1 min、2.3 min 和 4.0 min。结果表明:空白 DMEM-10 培养液不干扰吴茱萸碱、吴茱萸次碱的测定。(图 1:空白 DMEM-10 培

养液 MRM 色谱图,图 2:空白 DMEM - 10 培养液加内标卡马西平 MRM 色谱图;图 3:吴茱萸碱、吴茱萸次碱和内标卡马西平混合物 MRM 色谱图;图 4:吴茱萸水提物 DMEM - 10 溶液 MRM 色谱图)

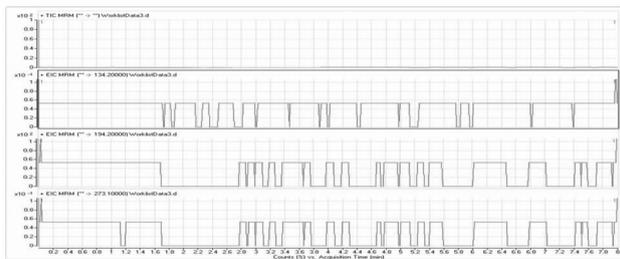


图 1 空白 DMEM - 10 培养液 MRM 色谱图

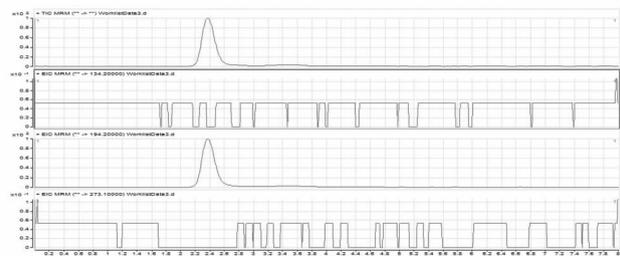


图 2 空白 DMEM - 10 培养液加内标卡马西平 MRM 色谱图

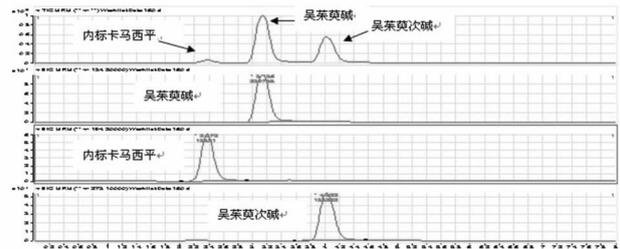


图 3 吴茱萸碱、吴茱萸次碱和内标卡马西平混合物 MRM 色谱图

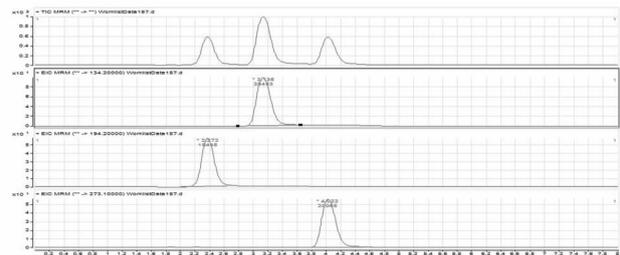


图 4 吴茱萸水提物 DMEM - 10 溶液 MRM 色谱图

3.1.2 线性关系考察 以样品浓度(C)为横坐标,样品与内标峰面积之比为纵坐标,进行线性回归。得到回归方程:  $Y_{\text{吴茱萸碱}} = 0.0098x + 0.0096$  ( $r = 0.9992$ ),  $Y_{\text{吴茱萸次碱}} = 0.0073x - 0.03$  ( $r = 0.9999$ )。表明吴茱萸碱在 2.02 ~ 504 ng/mL,吴茱萸次碱在 1.97 ~ 493.33 ng/mL 线性关系良好。

3.1.3 精密度实验 高、中、低浓度生物样品日内、日间峰面积与内标物峰面积之比  $RSD < 10\%$ ,精密度良好,结果见表 2。

表 2 精密度实验结果

对照品	浓度 (ng/mL)	日内 (n=5)		日间 (n=5)	
		峰面积/内标峰面积	RSD (%)	峰面积/内标峰面积	RSD (%)
EVO	5.00	0.0481975 ± 0.001273	2.64	0.04844525 ± 0.00168	3.47
	100.8	0.95213119 ± 0.020945	2.2	0.94862136 ± 0.019764	2.08
	504	4.80246219 ± 0.228923	4.77	4.84158295 ± 0.216694	4.48
RUT	5.00	0.03261 ± 0.002215	6.8	0.032365 ± 0.002165	6.67
	98.67	0.093914 ± 0.007787	8.3	0.092857 ± 0.007145	7.69
	493.33	3.486964 ± 0.1108	3.18	3.506019 ± 0.10499	2.99

3.1.4 回收率实验 高、中、低浓度生物样品回收率大于 85%,满足生物样品分析检测的要求,结果见表 3。

表 3 回收率实验结果 (n=6)

对照品	浓度 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	回收率 (%)	RSD (%)
EVO	5.00	4.39 ± 0.28	87.8	6.39
	100.8	95.76 ± 1.91	95.00	1.99
	504	489.07 ± 23.36	97.04	4.78
RUT	5.00	4.32 ± 0.13	86.35	3.00
	98.67	96.91 ± 1.16	98.22	1.20
	493.33	480.86 ± 16.24	97.47	3.38

3.1.5 稳定性试验 生物样品中各成分在 -20 °C 冰箱保存 14 d,测定混合对照品和内标物的峰面积。各浓度样品测定值的  $RSD$  均小于 7.0%,说明在低温条件下,14 d 内各成分的稳定性良好,结果见表 4。

表 4 稳定性实验结果

对照品	浓度 (ng/mL)	峰面积/内标物峰面积	RSD (%)
EVO	2.016	0.01743836 ± 0.000967	5.55
	201.6	1.89975294 ± 0.04015	2.11
	504	4.80246219 ± 0.228923	4.77
RUT	1.97	0.00887 ± 0.0006	6.76
	197.33	1.422242 ± 0.018561	1.31
	493.33	3.486964 ± 0.1108	3.18

3.1.6 重复性实验 重复性考察结果显示,吴茱萸碱和吴茱萸次碱的  $RSD$  均小于 5%,符合实验要求。

3.2 受试样品中吴茱萸碱、吴茱萸次碱的含量测定结果显示,800 μg/mL 的吴茱萸水提物中吴茱萸碱 (EVO) 的含量为 (36.86 ± 0.30) μg/mL、吴茱萸次碱 (RUT) 为 (41.08 ± 0.29) μg/mL。结果见表 5。

表 5 含量测定结果

样品	批号	吴茱萸碱/内标峰面积	EVO (μg/mL)	吴茱萸次碱/内标峰面积	RUT (μg/mL)
吴茱萸水提物	1	4.046	37.07	3.329	41.41
	2	4.037	36.99	3.290	40.93
	3	3.985	36.51	3.287	40.90
均值		4.02 ± 0.03	36.86 ± 0.30	3.30 ± 0.02	41.08 ± 0.29

### 4 讨论

吴茱萸是常用温理药,本草记载吴茱萸生品有小毒,但其临床应用广泛,含有多种活性成分,具有多种药理作用,尤以在心血管系统方面作用的研究进展迅猛。关于吴茱萸中主要活性成分如吴茱萸碱、吴茱萸次碱等的研究已经深入到分子和基因水平。中药成分复杂、含量微少,一般的分离仪器与测定方法难以对中药成分进行分离和检测。

本研究建立同时测定吴茱萸水提物中吴茱萸碱、吴茱萸次碱含量的 LC/MS 法,操作简便,灵敏度高,重复性好,样品专属性、分离度、精密性、回收率等均符合生物样品检测的相关要求。且检测样品用量少,样品预处理方法简便,与液液萃取、固相萃取和直接蛋白沉淀等样品处理方法相比,该方法具有待测成分损失较小,不受杂质干扰等优点,特别适合大批量样品分析测定及吴茱萸体内、体外药代动力学研究。LC/MS 法与液相色谱法、紫外检测法等分析方法相比,具有更高的灵敏度。本实验研究结果提示,LC/MS 法将在中药材及中成药制剂化学成分的定量分析中具有广阔的应用前景。

(上接第 140 页)

效应测定》,中国国标 GB/T15441 - 1995《水质急性毒性的测定发光细菌法》均提示 Microtox 技术作为高效的毒性测试方法的广泛应用前景。我们有理由相信,未来在进一步改善和完善专门针对中药的 Microtox 技术系统基础上,这种任何人都能简单地用这种技术而且只需要很短时间完成标准化检测,将可能是复杂成分中药毒性和安全性快速检测、安全性评价以及风险分级评定的重大突破。

### 参考文献

[1] 赵军宁,叶祖光. 传统中药毒性分级理论的科学内涵与《中国药典》(一部)标注修订建议[J]. 中国中药杂志,2012,37(15):2193-2198.

[2] 赵军宁,杨明,陈易新,等. 中药毒性理论在我国形成与创新发展的[J]. 中国中药杂志,2010,35(7):922-927.

[3] 赵军宁,鄢良春,宋军. 建立以“功效”为核心的新型中药质量评价模式[J]. 中药药理与临床,2010,26(5):158-161.

[4] 赵军宁,叶祖光. 中药毒性理论与安全性评价[M]. 北京:人民卫生出版社,2012.

[5] 赵军宁,朱家谷,叶祖光. 中药毒性和安全性试验方法,见:陈奇主编. 中药药理研究方法学[M]. 3版,北京:人民卫生出版社,2011:107-109.

[6] Girotti S, Ferri EN, Fumo MG, et al. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria[J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 608(1):2-29.

[7] 朱文杰,郑天凌,李伟民. 发光细菌与环境毒性检测[M]. 北京:中国

### 参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:160.

[2] 栾连军,裘国丽,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):48-50.

[3] XU Ji-hua, LIU Wen-ying, ZHENG Feng, et al. Determination of evodiamine by high performance liquid chromatogram phyntandem mass spectrometry and pharmacokinetic studies in rats[J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2007, 12(4):427-433.

[4] YANG Xiu-wei, TENG Jie, ZHAO Bo, et al. Studies on Absorption and Transport of Limoninoids from Fructus Evodiae in Caco-2 Cell Monolayer Model[J]. Chinese Herbal Medicines, 2009, 1(1):53-58.

[5] 李莉,赵军宁,易进海,等. 吴茱萸多基源、多产地毒性效应特征研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(15):2220-2221.

[6] 李莉,赵军宁,鄢良春,等. 吴茱萸水提取物对大鼠长期毒性试验[J]. 中药药理与临床,2013,29(2):93-96.

[7] 李波,李莉,赵军宁,等. 吴茱萸乙醇提取物对大鼠急性毒性及肝毒性的影响[J]. 中药药理与临床,2013,29(2):120-124.

[8] 裘国丽,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):1179-1182.

[9] 刘青春,赵军宁,鄢良春,等. HPLC 同时测定小柴胡汤中 5 种有效成分[J]. 中国中药杂志,2010,35(6):708-710.

(2014-01-06 收稿 责任编辑:洪志强)

轻工业出版社,2009.

[8] Meighen EA. Molecular biology of bacterial bioluminescence[J]. Microbiological Review, 1991, 55(1):123-142.

[9] 大连理工大学环境与生命学院. 发光细菌法急性毒性的测定. <http://netclass.dlut.edu.cn/uploads/063/files>, 2010-08-06.

[10] 北京滨松光子技术股份有限公司. 发光细菌. <http://www.bhphoton.com/product/pdf/fgxjy>, 2010-07-10.

[11] 赵军宁,鄢良春,郑晓秋,等. 一种快速检测中药综合毒性的生物测试方法[P], 中国:201310572953.0, 2013-11-18.

[12] 赵军宁,鄢良春,郑晓秋,等. 一种快速检测中药注射液综合毒性的生物检测方法[P], 中国:201310210195.8, 2013-05-31.

[13] 赵军宁,鄢良春,郑晓秋,等. 一种快速检测鱼腥草注射液综合毒性的生物检测方法[P], 中国:201310369652.8, 2013-08-23.

[14] 赵军宁,鄢良春,郑晓秋,等. 一种快速检测红花注射液综合毒性的生物检测方法[P], 中国:201310572952.X, 2013-11-18.

[15] 熊蔚蔚,吴淑杭,徐亚同,等. 等毒性配比法研究镉、铬和铅对淡水发光细菌的联合毒性[J]. 生态环境,2007,16(4):1085-1087.

[16] 吴淑杭,周德平,徐亚同,等. 二元农药混合物对发光细菌的联合毒性研究[J]. 农业环境科学学报,2008,27(5):2028-2032.

[17] 董玉瑛,邹学军,陈峥,等. 三种药品联合毒性作用及其环境风险分析[J]. 环境化学,2013,32(7):1257-1262.

[18] 杨安泰,张丽英,金彩琪,等. 用发光细菌研究中药“十八反”[J]. 上海中医药杂志,1989,(6):2-4.

[19] 沈光稳. 采用发光细菌研究探讨“十八反”配伍药物的临床毒性[J]. 中医药研究,1998,14(1):10.

(2014-01-06 收稿 责任编辑:洪志强)