

文章编号:1671-7554(2008)08-0823-05

# 液相色谱质谱联用技术测定动物血浆和组织中莪术醇

郝震峰,王本杰,张蕊,魏春敏,袁桂艳,郭瑞臣

(山东大学齐鲁医院临床药理研究所,济南 250012)

**摘要:**目的 建立 HPLC-MS/MS 法测定动物组织和血浆中莪术醇浓度。方法 以奥硝唑为内标物, Diamonsil™ 色谱柱 C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为固定相, 流速 1 mL/min, 采用多反应离子检测方式测定犬血浆和大鼠 5 种组织样品中莪术醇 (m/z 254.3 → 219.3) 和内标奥硝唑 (m/z 220.3 → 128.2) 的浓度。结果 在动物血浆和组织匀浆中, 莪术醇浓度与内标物峰面积之比呈良好的线性关系。结论 所建立的 HPLC-MS/MS 方法操作简便快速, 灵敏度高, 专属性强, 可用于莪术醇动物药代动力学和组织分布研究。

**关键词:** 莪术油; 莪术醇; 组织分布; 液相色谱-质谱联用

**中图分类号:** R927.2; R-322 **文献标志码:** A

## Determination of curcumol in animal plasma and tissues by HPLC-MS/MS

HAO Zhen-feng, WANG Ben-jie, ZHANG Rui, WEI Chun-min, YUAN Gui-yan, GUO Rui-chen

(Institute of Clinical Pharmacology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

**Abstract:** **Objective** To develop high performance liquid chromatography coupled with the tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) quantitative detection method for determination of curcumol in animal plasma and tissues. **Methods** Dog plasma and rat tissue samples spiked with ornidazole as the internal standard were separated on a Diamonsil C<sub>18</sub> column and eluted at a flow rate of 1 mL/min, and the precursor/product ion combinations of m/z 254.3 → 219.4 and m/z 220.3 → 128.1 were monitored to quantify curcumol by MRM. **Results** A good linearity of plasma or tissue curcumol concentration and area ratio of curcumol to i. s was obtained. **Conclusion** The developed method is rapid, highly sensitive and specific and could be used in animal curcumol pharmacokinetic and tissue distribution studies.

**Key words:** Zedoary turmeric oil; Curcumol; Tissue distribution; High performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry

莪术油是从姜科莪术干燥根茎中提取的挥发油,具有抗病毒、抗炎、抗肿瘤、抗菌等作用。主要用于病毒性感染、呼吸系统和消化系统疾病,也用于癌症、心脑血管、生殖系统和皮肤疾病<sup>[1]</sup>。莪术油中含有莪术烯、吉马酮、莪术二酮、新莪术二酮、莪术醇等二十多种成分,其中莪术醇是抗菌、抗病毒、抗肿瘤的主要有效成分<sup>[2]</sup>。

本试验以莪术醇为测定指标,进行莪术油乳剂注射给药后 Beagle 犬血浆和大鼠组织 HPLC-MS/MS 方法学研究,以及莪术油乳剂注射给药药代动力学

和组织分布研究。

## 1 材料与方法

1.1 药品与试剂 莪术醇对照品,纯度 99.1% (购自中国药品生物制品检定所,批号 100185-200405)。内标奥硝唑,纯度 99.6% (湖南精细化工品研究所)。乙腈,色谱纯 (美国 TEDIA COMPANY,批号 LOT 044263)。甲酸,色谱纯 (美国 TEDIA COMPANY,批号 LOT409189)。醋酸铵,分析纯 (天津市天大化学

收稿日期:2008-03-03

作者简介:郝震峰(1974-),硕士研究生,主要从事药代动力学和临床药理学的研究。

通讯作者:郭瑞臣,教授。Tel:82169636, E-mail: grc7636@126.com

试验厂,批号 20050516)。

1.2 仪器 HPLC-MS/MS(Agilent 1100, 美国 Agilent 公司; API 4000, 美国 ABI 公司); METTLER TOLEDO AX-205 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); XW-80A 型旋涡混合器(上海精科实业有限公司)。

1.3 实验动物 雄性 Beagle 犬, 体重 9~12 kg, 广州医药工业研究院提供。健康 Wistar 大鼠 30 只, 雌雄各半, 190~200 g, 普通级, 山东大学实验动物中心提供。

1.4 样本采集<sup>[3]</sup> Beagle 犬静脉注射给予莪术油脂乳剂, 于给药前和给药后设定时间由股静脉取血 4 mL, 离心, 取血浆于 -20 贮存, 备测。

健康 Wistar 大鼠经尾静脉注射莪术油脂乳剂, 按设定时间依次处死, 取心、肝、肺、肾和脑组织, 用生理盐水冲洗、滤纸吸干后贮存于 -20, 备测。

1.5 色谱条件 Diamonsil™ 色谱柱 C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相 乙腈(含 0.3 mol/L 醋酸铵, 0.1% 甲酸) 水(含 0.1% 甲酸) = 95:5 (V/V), 流速 1 mL/min; 进样量 40 μL。

1.6 质谱条件 MRM(multiple reaction monitoring) 模式, 离子源温度 550, 雾化电压 5 500 V, 雾化气 70 psi, 辅助气 40 psi, 碰撞电压 12.5 V(莪术醇), 20 V(内标)。采集 m/z 254.3 → 219.4(莪术醇)和 220.3 → 128.1(内标)的离子时。

1.7 标准溶液配制 精密称取莪术醇对照品 0.010 38 g, 置 50 mL 容量瓶中, 以流动相稀释至刻

度, 配成 0.2 mg/mL 的储备液, 备用。

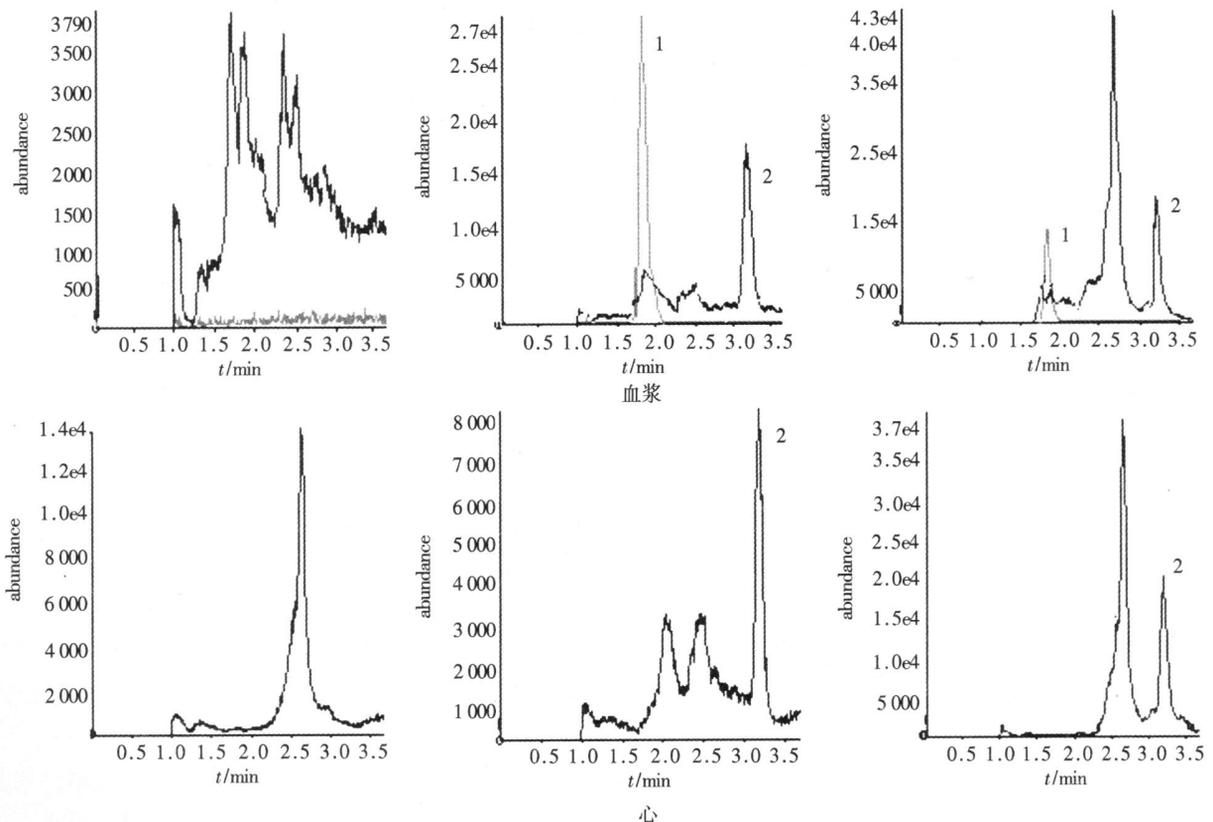
1.8 血浆样品处理 取 Beagle 犬血浆 1.0 mL, 加入 15 μL 内标(奥硝唑 0.05 μg/mL), 100 μL 0.1 mol/L NaOH 溶液混匀, 再加入 5 mL 提取剂(氯仿-异丙醇 = 95:5, V/V), 涡旋 2 min, 4 000 r/min 离心 5 min, 取有机相于 37 水浴氮气吹干, 残渣以 100 μL 流动相溶解, 取 40 μL 进样。

1.9 组织样品处理 取大鼠冷冻组织, 自然融化后, 精确称量, 3 倍生理盐水匀浆, 取 1.0 mL 匀浆液, 按“1.8 血浆样品处理”项下操作。

## 2 结果

2.1 专属性 取大鼠空白血浆 1.0 mL, 按“血浆样品处理”项下操作得空白血浆色谱图(图 1A); 取莪术醇标准溶液与内标溶液混合后进样得莪术醇与内标色谱图(图 1B); 将一定浓度莪术醇和内标加入空白血浆, 按“血浆样品处理”项下操作, 得血浆提取后莪术醇和内标色谱图(图 1C)。上述色谱条件下, 莪术醇和内标保留时间分别为 3.19 min 和 1.83 min。莪术醇和内标一级和二级质谱图见图 2。

取大鼠心脏、肝脏、肺脏、肾脏和脑组织, 按“组织样品处理”项下操作, 得各组织处理后样品。各组织空白匀浆、空白匀浆加莪术醇及内标和动物样品加内标处理后色谱图见图 1。



心

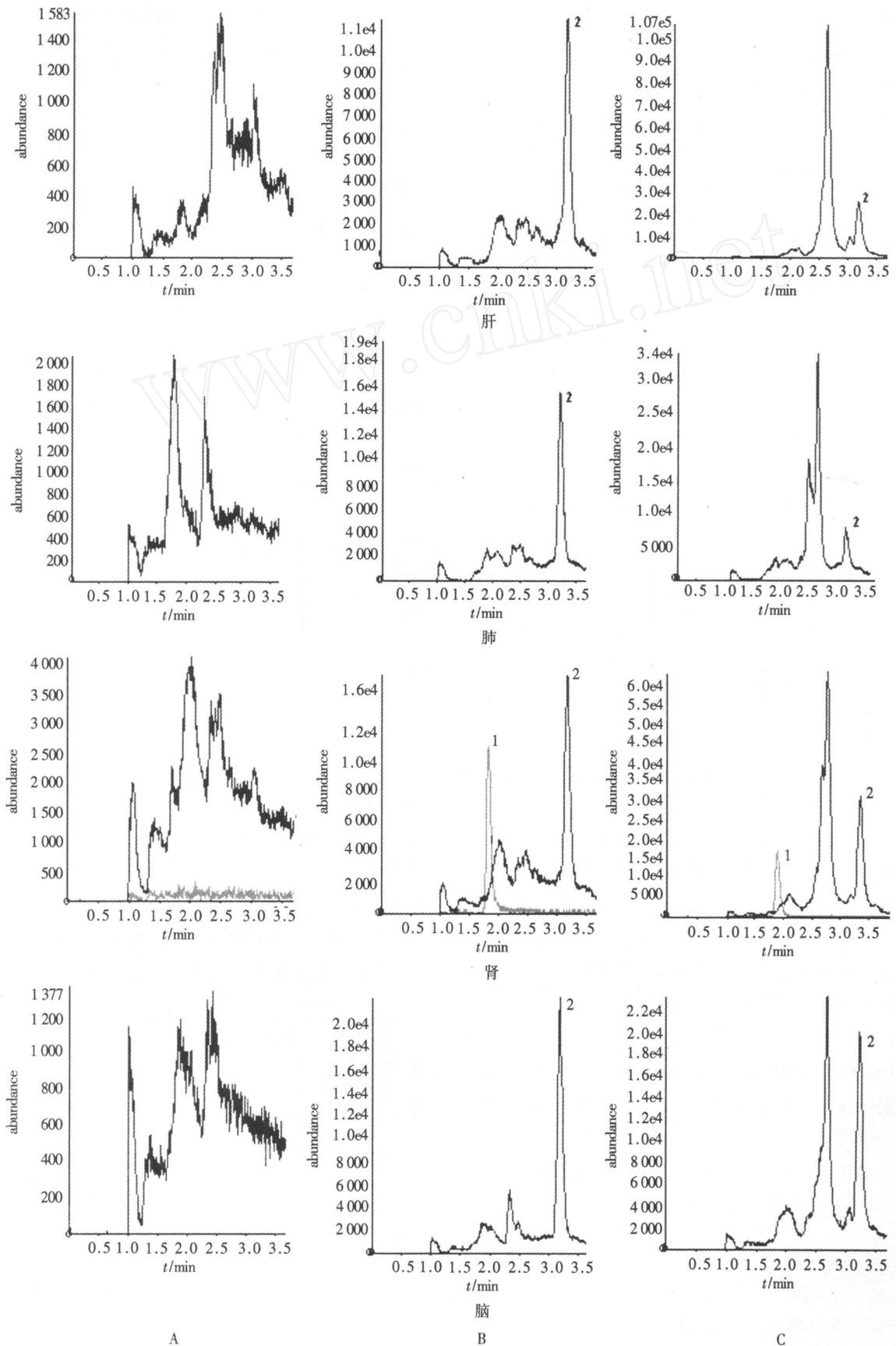


图 1 空白血浆/组织(A)、空白血浆/组织+莪术醇标准品+内标(B)、药后血浆/组织样品+内标(C)色谱图(1:内标,2:莪术醇)

Fig. 1 Chromatograms of blank plasma/tissues(A), blank plasma/tissues spiked with curcuminol and internal standard(B), plasma/tissue samples spiked with internal standard (C) (1: internal standard, 2: curcuminol)

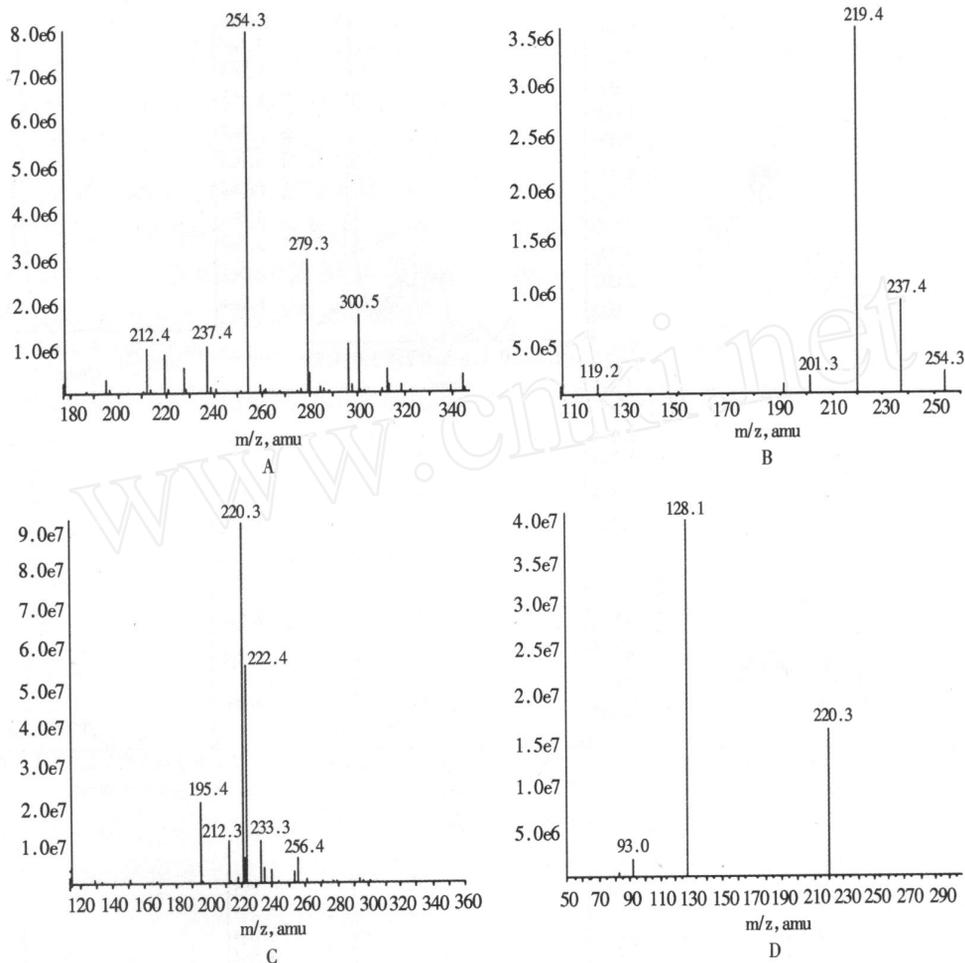


图2 莪术醇一级(A)和二级(B)质谱图、内标一级(C)和二级(D)质谱图

Fig. 2 MS(A) and MS-MS (B) spectrum of curcuminol, MS (C) and MS-MS(D) spectrum of the internal standard

2.2 标准曲线制备 取空白血浆 1.0 mL 于 10 mL 具塞玻璃试管中,加莪术醇储备液使配成 0.25、0.5、1、2.5、5、10、25、50、100 ng/mL 浓度系列的血浆样品,按“血浆样品处理”方法提取测定。以待测物浓度与内标浓度比值为横坐标,待测物峰面积与内标峰面积比值为纵坐标,计算回归方程为  $y = -0.00752 + 0.0624x$ ,  $r = 0.9971$ 。在 0.25 ~ 100 ng/mL 范围内线性关系良好,可满足莪术油脂乳剂静脉注射给药血浆莪术醇药代动力学和组织分布研究要求。

各大鼠组织莪术醇标准工作曲线见表 1。

表1 各脏器组织中莪术醇标准工作曲线数据及标准曲线方程

脏器	线性范围 (/ng mL <sup>-1</sup> )	标准曲线方程	相关系数
心脏	0.5-50.0	$y = 4890x + 1740$	0.9968
肝脏	0.25-50.0	$y = 4230x + 3530$	0.9990
肺脏	0.25-25.0	$y = 8510x - 1240$	0.9967
肾脏	0.5-25.0	$y = 0.075x + 0.00532$	0.9988
脑	0.5-50.0	$y = 3970x - 729$	0.9970

2.3 精密度和回收率 配制 0.5, 10.0 和 80.0

ng/mL的莪术醇空白血浆样品,按样品处理项操作,计算相对回收率;以空白血浆样品提取后峰面积与对应浓度莪术醇溶液峰面积之比,计算绝对回收率;空白血浆样品一日内测定 5 次,或每日 1 次,连续测定 5 日,计算日内、日间精密度,结果见表 2。

表2 精密度和回收率 ( $n=5$ , %)

浓度 (/ng mL <sup>-1</sup> )	相对回收率	绝对回收率	日内 RSD	日间 RSD
0.5	91.4 ± 9.7	32.5 ± 2.6	6.1	13.7
10	103.0 ± 8.4	37.2 ± 1.4	4.1	2.7
80	98.5 ± 2.0	31.6 ± 1.2	9.9	14.5

2.4 稳定性试验 取 0.5、10、80 ng/mL 浓度的质控样品,反复冻融 2 次或 -20 °C 存放 1 周后测定,评价方法的稳定性。结果显示,质控样品冻融前、冻融 1 次、冻融 2 次、冷冻 24 h 和冷冻 7 d 后测定,标准偏差小于 5%,结果见表 3。

2.5 质量控制试验结果 在未知样品测定过程中,随行测定低、中、高(0.5、10、80 ng/mL)浓度的质控样品,使其均匀分布在未知样品测试顺序中。结果低、中、高浓度质量控制样品回收率相对标准偏差均小

于 12%,符合体内药物分析的要求。结果见表 4。

表 3 冻融和稳定性试验结果( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

项目	浓度( /ng mL <sup>-1</sup> )		
	0.5	10	80
冻融前	0.51 ±0.03	10.05 ±1.19	82.53 ±9.66
冻融 1 次	0.50 ±0.02	9.62 ±1.64	80.17 ±11.65
冻融 2 次	0.52 ±0.05	10.16 ±1.27	80.33 ±11.67
冷冻前	0.51 ±0.02	10.00 ±1.37	82.53 ±9.66
冷冻 24 h	0.50 ±0.02	10.06 ±1.47	83.27 ±10.58
冷冻 7 d	0.47 ±0.04	9.80 ±1.45	74.23 ±4.98

表 4 质控样本回收率数据

样本 No.	0.5 ng/mL		10 ng/mL		80 ng/mL	
	浓度	回收率(%)	浓度	回收率(%)	浓度	回收率(%)
1	0.56	112	10.3	103	68.2	85.2
2	0.54	108	11.1	111	71.5	89.4
3	0.57	113	8.8	88	65.8	82.3
$\bar{x}$	0.56	111.0	10.1	100.5	68.0	85.0
SD	0.01	2.65	1.19	11.95	3.55	4.45

### 3 讨论

莪术油含有多种成分,原药材、莪术油中莪术醇的含量测定虽有红外分光光度法、双波长薄层扫描法和气相色谱法<sup>[4,6]</sup>,但不能满足其生物样品微量、存在干扰成分时的测定。放射性同位素示踪法也可用于生物样品中莪术醇含量测定,虽具有较高的灵敏度,但选择性相对较差,易受代谢产物干扰,可产生放射性污染<sup>[7]</sup>。莪术油药代动力学研究多采用有效成分血浓度法<sup>[8]</sup>,如以吉马酮为目标成分,采用 HPLC 法研究莪术油在大鼠体内的药代动力学特征,但吉马酮药理活性相对莪术醇较弱。本实验选择莪术醇作为含量测定指标,进行其生物样本测定的方法学研究,为其体内药代动力学及莪术油脂剂乳剂的体内处置过程研究提供依据。结果表明,内标奥硝唑相对稳定,离子化效应强,保留时间适中。全扫描图谱可见,  $m/z$  为 254.3 的离子峰最强,

推测为莪术醇  $[M + NH_4]^+$  峰,而内标  $m/z$  为 220.3 的分子离子峰  $[M + H]^+$  最强;  $m/z$  分别为 219.4 和 128.1 的离子峰是莪术醇和内标相对较强的子离子峰,因此选择  $m/z$  254.3 219.3 和  $m/z$  220.3 128.2 作为多反应离子检测的离子对。

莪术醇具挥发性,样本提取过程中易损失,蛋白沉淀法难以达到检测限要求。本实验采用有机溶剂提取浓缩方法,操作简单,灵敏度高,专属性强,重现性好,血浆内源物对测定无干扰。

经方法学考察确证,所建立方法简便、快速、灵敏度高、专属性强,回收率、日内、日间精密度满足生物样本中微量莪术醇测定的要求,可用于动物药代动力学和组织分布研究。

#### 参考文献:

- [1] 宋步昌,鞠建峰. 莪术油的药理作用及临床应用[J]. 山东中医杂志, 2003, 22(9): 555-556.
- [2] 周欣,李章万,王道平,等. GC-MS 法建立温莪术挥发油指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(12): 1138-1140.
- [3] 张蕊,王本杰,赵恒利,等. HPLC-MS/MS 法测定血浆中莪术醇浓度及 Beagle 犬体内的药代动力学研究[J]. 药学报, 2007, 42(8): 973-977.
- [4] 杨庆丰,李绍平,陈莹,等. 不同来源莪术中莪术醇、吉马酮、莪术二酮定量分析[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(7): 827-830.
- [5] 游剑,于英伟,李青坡,等. 莪术油微球含量测定[J]. 中成药, 2005, 27(1): 25-26.
- [6] 吴雨川,刘天扬,姜连阁,等. RP-HPLC 法测定莪术油中莪术醇和吉马酮含量[J]. 中医药信息, 2004, 21(4): 64-65.
- [7] 苏成业,刘金友,许洪霞,等. 3H-莪术醇在正常大鼠及肿瘤小鼠体内的代谢研究[J]. 药学报, 1980, 15(5): 257-262.
- [8] 游剑,于英伟,李青坡,等. 应用 HPLC 研究莪术油的药代动力学[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(5): 380-382.

(编辑:孙玉芝)