

LC-MS/MS 法同时分析血浆中银杏黄酮和银杏内酯化合物浓度

赵 阳, 孙 艳, 李 川

(中国科学院上海药物研究所药物代谢研究中心, 上海 201203)

Simultaneous Determination of Ginkgo Flavonoids and Terpenoids in Plasma: HCOONH₄ Enhancing ESI Efficiency and Capacity

ZHAO Yang, SUN Yan, LI Chuan

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: The development of the first LC-MS/MS based method was described for simultaneous determination of flavonoids (quercetin, kaempferol, and isorhamnetin) and terpenoids (bilobalide, ginkgolides A, B, C, and J) in acid-hydrolyzed plasma by circumventing cross-interference between the flavonoids and terpenoids identified herein. Inclusion of HCOONH₄ (0.2 mmol·L⁻¹) in the mobile phase generated beneficial LC-electrolyte effects including increased ESI-efficiency and -capacity, with the result that the newly developed procedure exhibits the highest analytical performance reported to date for ginkgo-associated studies. The method yields high sensitivity (0.32 pg) on-column LLOQ, except for ginkgolide J (1.6 pg), negligible matrix interference, wide linear dynamic ranges (0.13-2 000 μg·L⁻¹, except for quercetin (0.13-10 000 μg·L⁻¹) and ginkgolide J (0.64-2 000 μg·L⁻¹), high sample throughput (a 5-min chromatographic run time for concurrent analysis of 8 analytes), and small sample size (20 μL plasma).

Keywords: LC-MS/MS; flavonoids; terpenoids; plasma; ginkgo

中图分类号: O657.63

文献标识码: A

文章编号: 1004-2997 (2007) 增刊-83-02

银杏黄酮类和内酯类化合物由于其在银杏叶提取物中的高含量以及它们各自发挥的重要药理活性受到研究者的重视。本工作应用液相串联质谱技术 (LC-MS/MS) 建立快速、灵敏、准确地同时检测血浆中银杏黄酮和银杏内酯化合物浓度的分析方法, 并将其用于犬药代动力学研究。

1 实验部分

1.1 药物与试剂

Bilobalide (BLL)、Ginkgolides A (GLA)、B (GLB)、C (GLC)、quercetin (QCT)、kaempferol (KMF) 和 isorhamnetin (ISR) 对照品购自中国药品与生物制品检定所, ginkgolide J (GLJ) 购自上海东田生物有限公司。

1.2 液质联用分析条件

LC-MS/MS 系统由 Agilent 1100 液相色谱仪和 Thermo TSQ Quantum 三重四极杆质谱检测仪组成; 色谱柱为 Phenomenex Gemini (50 mm×2.0); 流动相为 A: V(CH₃CN): V(H₂O)=5: 495、0.2 mmol·L⁻¹ 的 HCOONH₄, B: V(CH₃CN): V(H₂O)=450: 50、0.2 mmol·L⁻¹ 的 HCOONH₄; 梯度

基金项目: 国家科学技术部基金项目 (2004CB518902、2005CB523403) 和上海市科委基金项目 (04DZ19215) 资助

作者简介: 赵 阳, 女, 博士研究生, 药代动力学专业。E-mail: zhaoyang_4110@hotmail.com

通讯作者: 李 川, 男, 研究员, 博士生导师, 从事药代动力学及中药学研究。E-mail: chli@mail.shnc.ac.cn

洗脱, 0~0.1 min, 15%~70% B, 0.1~1.3 min, 维持 70% B, 1.4~5min, 15% B; 进样量为 5 μL ; 单个样品分析时间为 5 min。负离子 ESI 检测方式下, 选择 SRM 工作模式检测 8 个化合物。

1.3 血浆样品前处理方法

事先用 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的维生素 C 处理后的 20 μL 血浆样品, 冻融后加入等体积的 4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl, 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴水解 30 min, 然后用 600 μL EtOAc 提取, 吸取上清液 500 μL , 用氮气吹除溶剂。残渣用 40 μL CH_3CN 溶解, 取离心后的上清液 5 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

1.4 方法学验证

用含所有待测化合物的浓度分别为 2 000、80、0.128 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (标示浓度) 的质控血样 20 μL , 样品前处理后, 进行批内差及批间差重复实验, 测定方法的准确性和精密性。

2 结果和讨论

2.1 同时检测银杏黄酮类和内酯类化合物的 LC-MS/MS 分析方法

(-) ESI 条件下, 5 个银杏内酯光谱图上的基峰是 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 和 $[\text{M}+\text{HCOO}]^{-}$, (-) ESI 适合 8 个化合物的同时检测; 流动相中加入 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HCOONH_4 或 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HCOOH 可以增强 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 或 $[\text{M}+\text{HCOO}]^{-}$ 离子的产生, 选择离子对 m/z 301 \rightarrow 151、285 \rightarrow 187、315 \rightarrow 300、325 \rightarrow 163、453 \rightarrow 351、423 \rightarrow 367、439 \rightarrow 383、469 \rightarrow 423 来检测 QCT、KMF、ISR、BLL、GLA、GLB、GLC 和 GLJ, 进一步增加检测的特异性和灵敏度。

2.2 “电解质效应”对动态范围的提高和对基质效应的克服

使用不加任何电解质的流动相时, 8 个化合物的动态范围高限均不超过 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; HCOONH_4 的浓度为 0.2 或 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 动态范围高限分别可以达到 400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、2 或 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。流动相中加入 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HCOONH_4 可以压缩基质干扰的窗口。

2.3 银杏黄酮和银杏内酯化合物相互干扰的发现和克服

本实验首次发现两类化合物共存时存在较明显的相互干扰, 以黄酮类化合物尤为突出, 表现为标准曲线的斜率下降, 相关系数仅为 0.420~0.782, RSD 为 14%~114%。血浆样品前处理过程中加入维生素 C, 及采用纯 CH_3CN 复溶样品, 可以较好地避开此相互干扰。

2.4 分析方法的可靠性验证

样品前处理过程中所有化合物均能保持稳定, 8 个化合物分析间无干扰, 基质的干扰可以忽略, 除了 GLJ 的最低定量限为 1.6 pg 以外, 其它化合物均为 0.32 pg 。犬单剂量口服给以金纳多片剂和金纳多注射液后得到 8 个化合物血浆药物浓度随时间变化的曲线如下图。

