

GC/MS 方法测定人血浆中龙脑药物含量的方法学研究

李华龙¹, 陆榕², 赵丽霞³, 庞司林^{2,4}, 司端运²

1 天津市药品检验所, 天津 300070

2 天津药代动力学与药效动力学省部共建国家重点实验室, 天津 300193

3 天津药物研究院药业有限责任公司, 天津 300193

4 天津大学化工学院 制药工程专业, 天津 300072

摘要 目的: 利用 GC/MS 技术建立测定口服舒心平软胶囊后人血浆样品中龙脑含量的方法。方法: 采用 HP-WAX 石英毛细管柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), 柱温为 150 °C, 保持 5.5 min, 以 40 °C/min 的速率升至 190 °C, 保持 1 min。以氦气为载气, 分流比为 5 : 1, 扫描方式选择离子检测 (SIM), 定量龙脑为 m/z 95, 定量内标 (萘) 为 m/z 128。结果: 龙脑和内标的保留时间分别为 4.56 min 和 5.31 min, 龙脑在 5 ~ 1 000 ng/mL 线性关系良好 ($r = 0.9993$), 高、中、低 3 个浓度的样品提取回收率均在 80% 以上。结论: 本测定方法可以快速简便地定量分析人血浆样品中的龙脑含量, 有较高的灵敏度和较好的重现性, 可以满足舒心平的人体药代动力学研究。

关键词 舒心平胶囊; 龙脑; 气相色谱-质谱联用; 药代动力学

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2009) 01-0043-05

Establishment and validation of GC/MS method for the determination of borneol in human plasma

LI Hua-long¹, LU Rong², ZHAO Li-xia³, PANG Si-lin^{2,4}, SI Duan-yun²

1 Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China

2 Tianjin State Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3 Tianjin Institute of Pharmaceutical Responsible Company Ltd, Tianjin 300193, China

4 Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin, University, Tianjin 300072, China

Abstract **Objective:** A sensitive and selective GC/MS method has been developed to determine the level of borneol in human plasma after *po* ShuXinPing Capsules. **Methods:** The quantitative analysis were carried out by using a HP-WAX silica capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm). The column was maintained at 150 °C for 5.5 min, then the temperature was increased to 190 °C which was kept for 1 min at the speed of 40 °C/min. Helium was applied as carrier gas. The splitting-ratio was 5 : 1. Selective ion monitoring (SIM) was utilized for quantitation of the molecules. Borneol was monitored for the ion of m/z 95, while ions of m/z 128 were selected for naphthalene (IS). **Results:** The reserve time of borneol and IS was 4.56 min and 5.31 min, respectively. Linearity was tested ranging from 5 to 1 000 ng/mL ($r = 0.9993$). The average recoveries were 86.7%, 81.9% and 83.9% at the concentrations of 10, 50 and 500 ng/mL.

收稿日期: 2009-05-12

作者简介: 李华龙, (1964-) 男, 天津市人, 副主任药师, 从事药物分析及新药研发。Tel: (022) 23374072, E-mail: lihualong_2332@sina.com

Conclusion: The method is simple, fast, high sensitive and repeatability for quantitative analysis of borneol in human plasma, which was applied in pharmacokinetics research of ShuXinPing Capsule.

Key words borneol; GC-MS; ShuXinPing Capsule; pharmacokinetics

舒心平软胶囊是治疗冠心病心绞痛的纯中药制剂,由丹参、蒺藜、人参、冰片等中药组成。以丹参为君药,针对胸痹的症状,清热降泄,入心肝血分,活血化瘀、凉血止痛、清心安神;以人参为臣药,大补元气,生津益气,补五脏,安精神;以蒺藜为佐药,入肝经,疏肝解郁,平肝熄风;以冰片为使药,令窍闭开而神得清。对心绞痛或淤血阻络引起的胸痛、心慌气短、乏力、自汗、心悸等有较好的疗效,该品种在港澳、台湾、东南亚等世界上华人聚居的国家和地区得到了广泛的应用,但主要活性成分在体内的变化过程尚不清楚,本文通过对龙脑血浆样品进行定量来研究冰片在人体内的药代动力学过程,为临床研究寻求相应的物质基础和试验数据支持。

1 材料

1.1 药品与试剂

龙脑化学对照品:中国药品生物制品检定所提供,编号:110881-200605,含量 99.0% 以上。萘,分析纯,由天津市药品检验所提供,批号:991117。醋酸乙酯:色谱纯,韩国 B&J 公司产品。乙腈:色谱纯,美国 Sigma 公司产品。

1.2 仪器

日本岛津 GC/MS—QP2010 气相色谱质谱联用仪(配有 EI 离子化源以及 GC/MS Solutions 数据处理系统);涡旋混合器;低温低速离心机;石英亚沸高纯水蒸馏器;Turbo Vap® LV 浓缩仪。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱:美国 Agilent 公司 HP-WAX 石英毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm);柱温:150 °C,保持 5.5 min,以 40 °C/min 的速率升至 190 °C,

保持 1 min;载气为氦气;柱前压为 70 kPa;分流比为 5 : 1;进样量为 1 μL。

2.2 质谱条件

离子源为 EI 源;离子源温度为 200 °C;接口温度为 250 °C;检测器电压为 1.2 kV;扫描方式:选择离子监测(SIM),用于定量分析的离子分别为:龙脑 m/z 95,内标 m/z 128。

2.3 血浆处理方法

准确加入血浆(空白、含药、服药后)0.5 mL,加内标溶液(10 μg/mL 萘无水乙醇溶液)10 μL,涡旋混匀,加 2 mL 提取溶剂(正己烷-三氯甲烷=10 : 1,每 550 mL 中加入 110 μL 0.05 % NaOH),涡旋 1 min,3 000 r/min 离心 5 min,分取上层有机相置另一试管中,于 30 °C 下氮气流吹至 200 μL,进样 1 μL,进行 GC/MS 分析,记录色谱图。

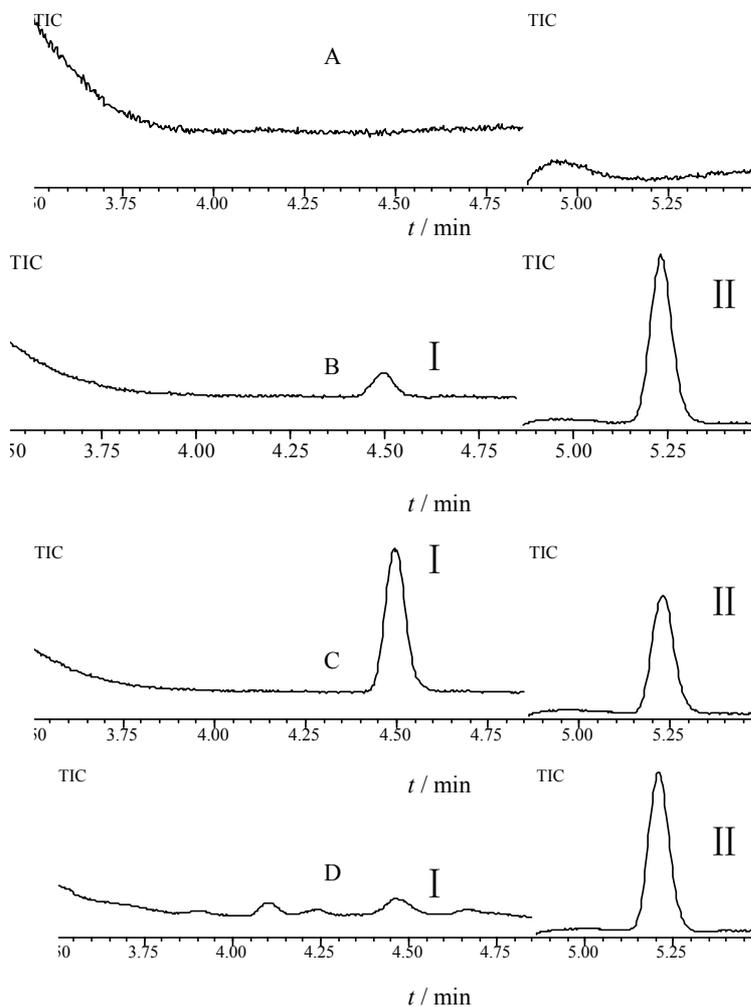
2.4 GC/MS 测定方法专属性

龙脑和内标在色谱柱上完全分离,保留时间分别为 4.56 min 和 5.31 min,各志愿者空白血浆中无内源性物质干扰,人空白血浆与含药血浆 GC/MS 色谱图比较见图 1。

3 结果

3.1 线性关系与灵敏度

取空白人血浆 0.5 mL,分别加入一定体积的龙脑的标准系列溶液,配制成相当于质量浓度为 5、10、50、200、500、1 000 ng/mL 的血浆样品,按“血浆样品的处理方法”操作,进样 1 μL,记录色谱图;以待测物浓度为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标,用加权最小二乘法进行回归运算,求得的回归方程即为标准曲线,代表性的回归方程为 $y = 0.002 2 x + 0.026 4$ ($r = 0.999 3$,权重为 $1/x^2$),本方法龙脑的线性范围为 5.0 ~ 1 000.0 ng/mL,最低定量限为 5.0 ng/mL。



A-人空白血浆; B-空白血浆中加入 5.0 ng/mL 龙脑和内标; C-空白血浆中加入 500.0 ng/mL 龙脑和内标; D-408 号志愿者口服 6 粒胶囊 2 h 后的血浆样品; 峰 I: 龙脑; 峰 II: 萘
 A-Human blank plasma; B-blank plasma spiked with borneol (5.0 ng/mL) and internal standard; C-blank plasma spiked with borneol (500.0 ng/mL) and internal standard; D-human (No.408) plasma sample colleted at 2 h after po 6 ShuXinPing Capsula; Peak I : borneol; Peak II : naphthalene

图 1. 龙脑和萘 (内标) 在选择离子监测 (SIM) 扫描方式下的 GC/MS 色谱图

Fig 1. GC/MS chromatography of borneol and naphthalene (internal standard) in selective ion monitoring (SIM) mode

3.2 精密度试验

取空白血浆 0.5 mL, 按“标准曲线的制备”项下方法配制龙脑低、中、高 3 个质量控制 (QC) 浓度点 (10、50、500 ng/mL) 的样品并进行样品处理, 每天考察一个分析批, 每个分析批重复 6 个样本, 连续进行三个分析批试验, 计算 QC 浓度点样品的测得浓度, 进而得到本方法的精密度, 数据见表 1。3 个分析批各个浓度点的 RSD 均小 ±15 %, 批内和批间的精密度都小于 15 %, 表明测定方法的精密

度及准确度均较高。

3.3 回收率试验

按血浆中龙脑的测定方法, 对低、中、高 3 个质量浓度 (10、50、500 ng/mL) 的样品进行回收率考察。因为在样品处理过程中样品吹干时会有较明显的损失, 而吹干的速度和程度没有一个统一的尺度, 因此考察回收率时只能用龙脑与内标峰面积比来计算, 经计算龙脑在血浆中的平均回收率为 86.7 %、81.9 % 和 84.2 % (表 2), 表明本处理方

法的人血浆中的龙脑的提取回收率较高且稳定,符合生物样品的定量要求。

3.4 稳定性考察

按血浆中龙脑的测定方法,在 10、50 和 500

ng/mL 3 个质量浓度水平对血浆于室温放置 2、4 h,室温冻融 1 次、3 次以及冻存 1 个月(-80 °C 下)等不同条件下的稳定性进行考察(表 3),结果表明龙脑在上述条件下均较稳定。

表 1 血浆中龙脑测定方法的批内与批间精密度

Table 1. Inter- and intra- batch precinternal standardion study of borneol in human plasma

龙脑/ (ng•mL ⁻¹)	精密度 / %	
	批内	批间
10	3.8	8.2
50	14.0	4.8
500	9.6	6.1

表 2 血浆样品中龙脑的回收率考察 (n=3)

Table 2. Recovery of borneol in plasma (n=3)

标示质量浓度/ (ng•mL ⁻¹)	回收率/ %
10	86.7 ± 0.7
50	81.9 ± 4.0
500	83.9 ± 2.2

表 3 龙脑在人血浆中的稳定性考察

Table 3 Stability of borneol in human plasma in different conditions

处置方法	10.0 / (ng•mL ⁻¹)		50.0 / (ng•mL ⁻¹)		500.0 / (ng•mL ⁻¹)	
	测定值	RSD / %	测定值	RSD / %	测定值	RSD / %
冻融一次	10.3	2.8	48.8	- 2.4	499.1	- 0.2
	9.8	- 2.3	52.2	4.4	438.0	-12.4
	9.9	- 0.7	48.8	- 2.4	434.0	-13.2
冻融三次	9.8	- 0.6	47.7	- 4.6	456.8	- 8.6
	11.1	11.0	51.0	2.0	478.2	- 4.4
	9.7	- 3.0	50.7	1.4	511.4	2.3
室温 2 h	10.2	1.6	48.2	- 3.6	460.9	- 7.8
	9.9	- 0.4	48.1	- 3.8	506.9	1.4
	10.4	3.5	46.9	- 6.2	470.8	- 5.8
室温 4 h	9.8	- 2.5	45.2	- 9.6	561	12.2
	10.7	7.0	45.0	-10.0	574	14.8
	9.9	- 1.3	45.4	- 9.2	584	16.8
冻存 30 d	10.6	5.8	55.3	10.6	539.3	7.9
	9.6	- 4.0	48.5	- 3.0	547.1	9.4
	9.7	- 2.7	49.4	- 1.2	552.2	10.4

3.5 定量下限

龙脑血浆样品的定量下限均为 5.0 ng/mL, 在此浓度点实际测定 6 个样本的平均质量浓度为: (5.36 ± 0.70) ng/mL, RSD 为 13.1%, 表明测定方法的定量下限附近的样品定量结果较稳定。

4 讨论

用 GC/FID 或 GC/MS 检测血浆中冰片含量有大量的文献报道^[1-5]。它们的定量下限在 10 ~ 50 ng/mL 左右, 本试验采用了正己烷-三氯甲烷 = 10 : 1 作为萃取液, 回收率可达到 80 % 以上, 定量下限达到 5 ng/mL。另外, 由于冰片和萘在室温条件下都易升华, 因此萃取后的上清液不能全部吹干, 给试验的标准化操作带来一些困难, 主要表现在同一浓度的龙脑峰面积数值的波动较大, 但与内标物的比值稳定, 并且其比值与浓度之间存在很好的线性关系, 方法学验证结果表明, 本实验所建立的分析方法, 灵敏、专一、精确、可靠, 可以满足实验要求。

参考文献:

- [1] 孙彩华, 钱松洋, 付迎. GC-FID法测定人含服速效救心丸后血浆中冰片的浓度[J]. 中国中医药科技, 2008, 15(1): 44-45
- [2] 陈群, 李士敏, 王玮. GC-MS法同时测定小鼠血浆中冰片和丹皮酚浓度[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(5): 592-594
- [3] 宋洪涛, 郭涛, 张晓红, 等. 毛细管气相色谱法测定人体血浆中冰片的血药浓度[J]. 解放军药学学报, 2003, 19(1): 12-15
- [4] Ye Q, Deng C. Determination of camphor and borneol in Flos Chrysanthemi Indici by UAE and GC-FID[J]. *J Chromatogr Sci.* 2009, 47(4): 287-290.
- [5] Yan-Yu X, Qi-neng P, Zhi-peng C. A simple gas chromatographic method for the simultaneous determination and pharmacokinetic study of tetramethylpyrazine phosphate and borneol in mouse plasma and brain tissue after oral administration of the fufang tetramethylpyrazine phosphate tablets[J]. *J Chromatogr Sci.* 2008, 46(5): 395-400.