

LC-MS 法测定人血浆中人参三醇二琥珀酸酯钠含量的方法学研究

李华龙, 吴 燕, 米亚娴

天津市药品检验所, 天津 300070

摘 要 **目的:** 建立测定人血浆中人参三醇二琥珀酸酯钠的液相色谱-质谱联用法。**方法:** 色谱柱为 Shimadzu VP-C₁₈ 柱 (150 mm×2.0 mm, 5 μm); 乙腈-10 mmol/L 乙酸铵水溶液 (55:45) 为流动相, 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 40 °C; 内标物为吲达帕胺。质谱条件为电喷雾离子源 (ESI), 选择负离子提取方式检测, 人参三醇二琥珀酸酯钠和吲达帕胺的选择检测离子分别为 m/z 675.5 ($[M-Na+H]^+$)、 m/z 364.1 ($[M+H]^+$)。**结果:** 人参三醇二琥珀酸酯钠线性范围为 0.030 4~101.3 μg/mL, 定量下限为 0.030 4 μg/mL。准确度、精密度以及稳定性均符合有关要求。**结论:** 本方法专属性强, 灵敏度高, 适用于人血浆中人参三醇二琥珀酸酯钠的药代动力学研究。

关键词 血药浓度; LC-MS; 人参三醇二琥珀酸酯钠

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2009) 02-0104-03

Methodology study on determination of Sodium Panaxatriol Disuccinate in human plasma by LC-MS

LI Hua-long, WU Yan, MI Ya-xian

Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China

Abstract Objective: To develop a sensitive and specific LC-MS method for the determination of sodium panaxatriol disuccinate in human plasma. **Methods:** Separation was carried out on a Shimadzu VP-ODS analytical column (150 mm × 2.0 mm, 5 μm) with a mobile phase of CH₃CN-10 mmol/L ammonium acetate (55:45) at a flow rate of 0.3 mL/min. The internal standard was Indapamide. ESI was applied and operated in negative mode. The ion of monitor: m/z 675.5 (sodium panaxatriol disuccinate), m/z 364.1 (Indapamide). **Results:** The linear calibration curve was observed in the concentration range of 0.030 4 — 101.3 μg/mL. The lower limit quantification was 0.030 4 μg/mL. The accuracy, precision (intra-day and inter-day), sensitivity and stability (ambient temperature, freeze/thaw, freeze storage) of the method fulfilled the guideline of the analytical validation criteria. **Conclusion:** The method with specificity is sensitive, rapid and suitable for pharmacokinetics study on sodium panaxatriol disuccinate in human plasma.

Key words drug plasma concentration; LC-MS; sodium panaxatriol disuccinate

人参三醇二琥珀酸酯钠是昆明医学院天然药物化学研究室对三七皂苷进行结构改造合成的系列衍生物中的一个, 药理学研究表明, 人参三醇二琥珀酸酯钠对 Lewis 肺癌和黑色素瘤 B16 有明显的抑制作用, 对肝癌 H22、淋巴细胞白血病 P388 具有延长存活期的作用。本文采用 LC-MS 方法进行了人参三醇二琥珀酸酯钠人体药代动力学分析, 对指导临床研究具有一定的参考意义。

1 仪器与试剂

Shimadzu LCMS-2010A 液相色谱质谱联用仪 (含 LC-10Advp 二元梯度泵, 配有电喷雾离子化接口

的四极杆质谱检测器及自动进样器等); TG16—WS 台式高速离心机。人参三醇二琥珀酸酯钠对照品 (厂方提供: 质量分数 100%), 内标物为吲达帕胺 (中国生物制品检定所: 质量分数 100%); 乙腈为色谱纯, 乙酸铵、醋酸乙酯、磷酸均为分析纯; 醋酸为优级纯, 水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及质谱条件

色谱条件: Shimadzu VP-ODS (150 mm×2.0 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为: 乙腈-10 mmol/L 乙酸铵水溶液 (55:45), 柱温: 40 °C, 体积流量: 0.3

收稿日期: 2009-08-12

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

mL/min, 进样量: 5 μ L。

质谱条件: 电喷雾离子化 (ESI) 方式, 选择性正离子检测, 人参三醇二琥珀酸酯钠 $\text{SIM}[\text{M}-\text{Na}+\text{H}]^+$, m/z 675.5; 内标 吲达帕胺 $\text{SIM}[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 364.1。检测器电压 1.5 kV, 电离源电压 4.5 kV, 喷雾气的流速为 1.5 L/min, CDL 温度 250 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 系列对照品溶液及内标溶液的配制

精密称取人参三醇二琥珀酸酯钠 (Rg) 对照品 50.65 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 即得 1.013 mg/mL 对照品贮备溶液, 再以甲醇逐级稀释得质量分数分别为 2.026、10.13、202.6 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液。

精密称取吲达帕胺 20.72 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 再精密量取此溶液 2 mL 置 200 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 即得 4.144 $\mu\text{g/mL}$ 内标工作液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 储藏备用。

2.3 血浆处理方法

取 1.0 mL 血浆置具塞离心管中, 分别加入 0.2 mL 10% 磷酸和 4.144 $\mu\text{g/mL}$ 内标工作液 25 μL , 涡流混合 30 s, 加 5 mL 醋酸乙酯, 涡流混合 3 min, 离心 10 min (5 000 r/min), 吸取上层有机相 4 mL 于另一具塞离心管中, 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴空气流吹干, 精密加入流动相 100 μL , 涡流混合 1 min, 离心 15 min (13 000 r/min), 取上清液 5 μL 进行 LC/MS 分析。

2.4 色谱行为

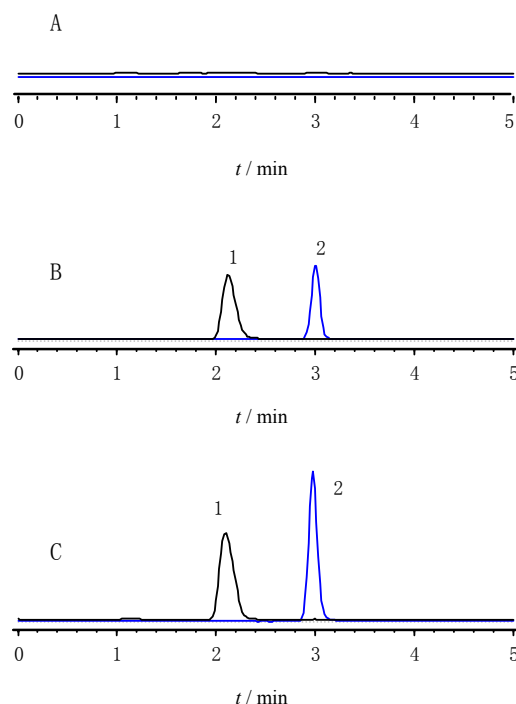
Rg 和内标吲达帕胺的全扫描质谱图显示, Rg 主要的分子离子峰质荷比 (m/z) 为 675.5 $[\text{M}-\text{Na}+\text{H}]^+$, 吲达帕胺主要的分子离子峰质荷比 (m/z) 为 364.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。采用两个通道进行选择性检测。

空白血样、空白血样加对照品及内标和受试者血样的色谱图见图 1, 人参三醇二琥珀酸酯钠和内标的保留时间分别约为 3.0 和 2.1 min, 分离度良好, 血浆中内源性物质及其他杂质不干扰样品的分离测定。

2.5 线性关系及最低定量限

取 1.0 mL 空白血浆 8 份, 分别置具塞离心管中, 精密加不同量的 Rg 对照品溶液, 混匀, 配成一系列质量分数为 0.030 4、0.101 3、0.202 6、5.065、10.13、20.26、50.65 和 101.3 $\mu\text{g/mL}$ 的模拟血浆样品, 按 “2.3” 项下操作。以 Rg 与内标物的峰面积比值为纵坐标, 浓度为横坐标进行回归, 得回归

方程: $Y=0.084\ 4X+0.358\ 5$ ($r=0.999\ 8$)。该方法的线性范围为 0.030 4~101.3 $\mu\text{g/mL}$, 最低定量限为 0.030 4 $\mu\text{g/mL}$ 。



1-吲达帕胺; 2-人参三醇二琥珀酸酯钠对照品

1-Indapamide; 2- sodium panaxatriol disuccinate

图1 空白血样 (A)、受试者血样 (B) 和空白血样加入人参三醇二琥珀酸酯钠对照品及吲达帕胺 (C) 的色谱图

Fig.1 Chromatograms of blank plasma (A), plasma after administration (B), and blank plasma + sodium panaxatriol disuccinate + Indapamide (C)

2.6 精密度、准确度及回收率

取空白血浆 1.0 mL, 配制 Rg 质量分数为 0.101 3、10.13、50.65 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品血浆各 5 份, 按 “2.3” 项下操作, 进行 LC-MS 分析。将测得结果与相应浓度对照品甲醇溶液测得结果相比较, 求算绝对回收率, 与以随行标准曲线计算结果比较得方法回收率, 日内平行做 5 次, 连续 3 d。分别计算日内、日间精密度, 结果见表 1。

2.7 稳定性试验

制备浓度 202.6 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品血浆, 分别进行室温放置 2 h 稳定性试验、冷冻稳定性试验 (-20 $^{\circ}\text{C}$ 分别冷冻放置 0、10、40、180 d) 和冻融稳定性试验 (反复冻融 2 次), 按 “2.3” 项下操作, 将测定的峰面积比代入标准曲线, 结果表明 Rg 在各条件下稳定。

表 1 Rg 回收率、日内和日间精密度

Table 1 Recovery rate, intra-day and inter-day RSD of Rg

浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	绝对回收率/ %	方法回收率/ %	RSD/ %	
			日内	日间
0.1013	78.56±1.48	99.58±7.23	7.26	7.23
10.13	75.47±1.67	104.92±3.11	2.96	5.50
50.65	77.26±1.83	94.85±2.76	2.91	2.94

3 讨论

有关血浆中人参三醇二琥珀酸酯钠的测定方法国内外尚未有报道。本实验参考部分测定其类似物的文献^[1~3]，采用 LC-MS 联用测定人血浆中人参三醇二琥珀酸酯钠药物浓度的方法，以 ESI 源选择负离子提取方式检测 (SIM) 人参三醇二琥珀酸酯钠和内标吡达帕胺分子离子峰，具有较高的灵敏度和专属性；本方法只需有机溶剂进行一步萃取，大大简化了血浆样品的处理过程。此方法特异性好，无干扰，精密度、灵敏度等均符合人体血药浓度检测

和药物动力学研究的要求。

参考文献：

[1] 韩正洲, 李 宇, 等. 双波长薄层扫描法测定促血生颗粒中人参三醇的含量[J]. 中成药, 2003, 6(25): 159-161.

[2] 贾沪宁, 于清峰, 王志群, 等. 薄层色谱 pH 法测定人参三醇-3, 6-二琥珀酸单酯的离解常数[J]. 中国药科大学学报, 2004, 35(3): 232-234.

[3] 刘奕明, 杨 柳, 曾 星, 等. 参麦注射液中人参皂苷 Rg₁ 和 Re 药代动力学研究[J]. 药学学报, 2005, 40(4): 365-368.

(上接第 103 页)

称量组织质量，较适合大动物或大血管，对于小血管来说误差可能会增大。将标记的血小板仅作为示踪量，根据动物体内血小板总数并通过公式进行换算，可求出实际沉积的血小板数量，该表示方法不受注入体内标记血小板量的影响，可减小注入量影响因素的误差，表明方法科学、可靠。

参考文献

[1] 万叔良, 何红兵, 潘明新, 等. ⁹⁹锝标记血小板检测内

皮化人工血管内皮细胞抗血小板粘附聚集功能的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2001, 18(3): 221-222.

[2] Sundrehagen E, Urdal P, Heggli D E, *et al.* Radiolabelling of platelets with Technetium-99m[J]. *Thromb Res*, 1990, 57 (5): 737-745.

[3] 陈献明, 潘家绮, 唐志刚, 等. ¹¹¹ 钪标记血小板观察兔受损主动脉内膜血小板沉积量[J]. 中华血液学杂志, 1993, 14(3): 121-123.