

液相色谱-串联质谱法同时测定人血浆中罗通定、舒必利浓度

唐 裕, 余 勤, 南 峰, 梁茂植, 秦永平

(四川大学华西医院, GCP 中心临床药理研究室, 四川 成都 610041)

摘要: 采用 HPLC-MS/MS 法同时测定人血浆中罗通定、舒必利浓度。以维拉帕米为内标, 血浆经 NaOH 溶液碱化后, 用二氯甲烷液-液萃取, 以液相色谱分离、电喷雾离子化串联质谱进行检测, 采用多反应监测模式同时测定罗通定(m/z 356.4/340.4)和舒必利(m/z 342.3/214.1)浓度。罗通定及舒必利标准曲线的线性范围分别是 $0.7813 \sim 400 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r=0.9993$) 和 $3.125 \sim 1600 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r=0.9993$); 方法学回收率分别是 $95.3\% \sim 100.8\%$ 和 $98.6\% \sim 102.4\%$; 日内精密度分别为 $2.78\% \sim 6.79\%$ 和 $1.56\% \sim 2.63\%$; 日间精密度分别为 $0.32\% \sim 2.22\%$ 和 $0.80\% \sim 1.41\%$ 。该方法能简便、快速、准确地测定人血浆中罗通定和舒必利浓度, 可用于罗通定和舒必利的药动力学及其他相关研究。

关键词: 罗通定; 舒必利; HPLC-MS/MS

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2008)01-13-05

Simultaneous Quantitative Determination of Rotundine and Sulpiride in Human Plasma with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

TANG Yu, YU Qin, NAN Feng, LIANG Mao-zhi, QIN Yong-ping

(Laboratory of Clinical Pharmacology, GCP center,

West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: The method for simultaneous quantitative determination of Rotundine and Sulpiride in human plasma was established by HPLC-MS/MS. Verapamil was chosen as internal standard. Sample of plasma was alkalinified by sodium hydroxide, then extracted with dichloromethane. Rotundine (m/z 356.4/340.4) and Sulpiride (m/z 342.3/214.1) were detected by LC-MS/MS with multiple reaction monitoring mode. The standard curve of Rotundine and Sulpiride are linear in the concentration range of $0.7813 \sim 400 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r=0.9993$) and $3.125 \sim 1600 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r=0.9993$), respectively. The method recovery of Rotundine and Sulpiride are $95.3\% \sim 100.8\%$ and $98.6\% \sim 102.4\%$. The intra-day RSD are $2.78\% \sim 6.79\%$ and $1.56\% \sim 2.63\%$. The inter-day RSD are $0.32\% \sim 2.22\%$ and $0.80\% \sim 1.41\%$. This method is simple, rapid, sensitive and accurate for determination of Rotundine and Sulpiride simultaneously. It can be used in pharmacokinetic for studying Rotundine and Sulpiride.

Key words: Rotundine; Sulpiride; HPLC-MS/MS

罗通定(Rotundine, Rot)又名左旋四氢巴马汀(*l*-Tetrahydropalmatine, *l*-THP),是来源于千金藤属植物的生物碱,临床上具有良好的镇静止痛作用,近年来的研究还发现其具有抗心律失常、扩张冠状动脉和降低血压等作用。舒必利为苯甲酰胺类抗精神病药物,是特异性多巴胺 D₂ 受体拮抗剂,具有与氯丙嗪相似的抗精神病效用,同时能止吐并抑制胃液分泌,临床主要用于精神分裂症的系统治疗,顽固性恶心、呕吐以及胃及十二指肠溃疡,眩晕,偏头痛等的治疗。分别测定罗通定及舒必利体内浓度的方法已有文献报道^[1-4],但关于同时测定这两种物质的研究尚未见报道。本工作拟建立可快速,灵敏的同时检测人血浆中的罗通定和舒必利浓度的测定方法。

1 实验材料

1.1 药品与试剂

罗通定、舒必利和内标维拉帕米化学对照品(批号分别为 100452-200301、171242-200302 和 10233-0102):购自中国药品生物制品检定所;实验用甲醇、甲酸、二氯甲烷为 HPLC 级,醋酸胺等其他化学试剂为分析纯;实验中所用去离子水为 MILLIPORE 公司 Milli-Q 仪制备的 I 类水。

1.2 主要仪器

岛津公司 SIL-HTC 系列 HPLC 仪,包括 SIL-HTC 系统控制器,LC-10ADvp 高压梯度输液泵,SIL-HTC 全自动进样器;美国 ABI 公司 API3000 三重四极杆串联质谱,电喷雾离子源(ESI),Analyst 1.4 工作站。采用 PHENOMENEX Gemini C₁₈(50 m×2.0 mm, 5 μm)分析柱。

2 测定方法

2.1 标准溶液的配制

精密称取 12 mg 罗通定对照品,用 50% 甲醇-水溶液溶解,并于 50 mL 容量瓶中定容,得罗

通定储备液(240 μg·L⁻¹),于 4 ℃ 冰箱保存。精密称取 12 mg 舒必利对照品,用 50% 甲醇-水溶液溶解,并于 50 mL 容量瓶中定容,得舒必利储备液(240 μg·L⁻¹),于 4 ℃ 冰箱保存。分别取 0.25 mL 罗通定储备液和 1.0 mL 舒必利储备液,用 50% 甲醇-水溶液稀释定容于 100 mL 容量瓶中,得罗通定和舒必利标准曲线工作液,使用时用 50% 甲醇-水溶液稀释得到标准曲线系列工作液。

2.2 质谱条件

罗通定、舒必利和内标维拉帕米的正离子扫描一、二级质谱图示于图 1,检测离子对分别为 356.4/340.4^[5],342.3/214.1 和 455.4/303.4,其优化后的主要质谱条件列于表 1,加热温度 450 ℃。

2.3 样品处理

取 0.1 mL 血浆样品,分别加入 0.1 mL 纯水和内标工作液,漩涡混匀。加入 0.2 mL 1 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠溶液,漩涡混匀后加入 3 mL 二氯甲烷萃取液,漩涡萃取 8 min,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,负压抽弃上层液,转移下层有机相于尖底试管中,置于 40 ℃ 水浴中通气流挥干,残留物用 0.1 mL 流动相溶解后分装入全自动进样器,进样 20 μL,以内标法定量。

3 结果

3.1 色谱行为

在上述色谱条件下,罗通定、舒必利和内标的保留时间分别为 1.24、1.65、1.27 min,血浆中内源性物质及其他杂质不干扰样品的分离测定。罗通定,舒必利的最低定量限为 0.781 3 和 3.125 μg·L⁻¹(以信噪比≥5 计)。

3.2 标准曲线

分别取标准曲线工作液样品,按 2.3 中方法处理后,以罗通定、舒必利对内标的峰面积比对应其浓度进行线性回归,分别得到罗通定和舒必

表 1 罗通定、舒必利和内标维拉帕米的质谱分析参数
Table 1 Parameters of mass spectra for Rotundine and Sulpiride

参数	雾化气	气帘气	碰撞活化气	离子喷雾电压	温度 /℃	离子去簇电压	环形聚焦电压	Q ₀ 聚焦电压	碰撞活化电压	碰撞室出口电压
罗通定	8	11	7	4 500	450	64	200	9	38	11
舒必利	8	11	7	4 500	450	33.5	120	6	25	11
维拉帕米	8	11	7	4 500	450	80	400	10	52	11

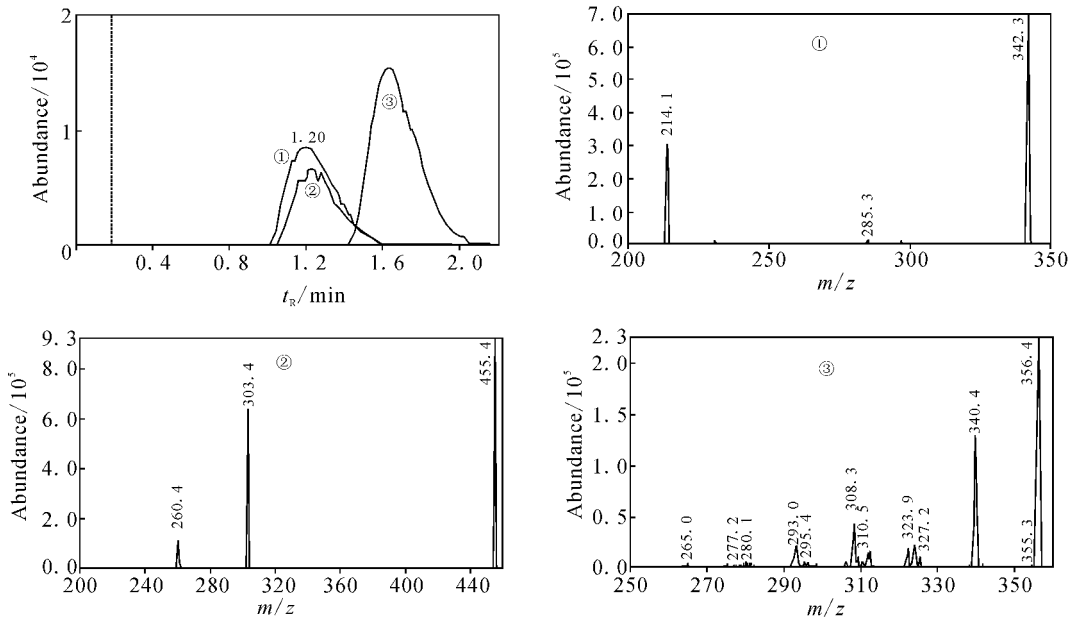


图 1 总离子流图和罗通定、舒必利、维拉帕米的二级质谱图

- ①舒必利($632.2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)二级质谱图(保留时间 1.196 min, m/z 342.3/214.1);
 ②维拉帕米($400 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)二级质谱图(保留时间 1.247 min, m/z 455.4/303.4);
 ③罗通定($193.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)二级质谱图(保留时间 1.640 min, m/z 356.4/340.4)

Fig. 1 The total ions chromatogram and MS² chromatogram of Rotundine, Sulpiride and Verapamil

- ①MS² chromatogram of Sulpiride($632.2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, t_R 1.196 min, m/z 342.3/214.1);
 ②MS² chromatogram of Verapamil($400 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, t_R 1.247 min, m/z 455.4/303.4);
 ③MS² chromatogram of Rotundine ($193.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, t_R 1.640 min, m/z 356.4/340.4)

利血浆的标准曲线回归方程 $y = 0.0139x - 0.0102$ 和 $y = 0.00213x + 0.00481$ ($r = 0.9993$)。罗通定和舒必利血浆标准曲线分别在 $0.7813 \sim 400 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3.125 \sim 1600 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

3.3 萃取回收率

取 2 份空白血浆分别加入不同浓度的罗通定和舒必利工作液,配成浓度分别为 200、25、 $3.13 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 800、100、 $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的高、中、低 3 种浓度样品,按 2.3 样品处理方法处理后进样,记录质谱峰面积。同时配制绝对进样量相当于各浓度 100% 含量的对照品工作液直接进样,用预处理后样品的罗通定和舒必利峰面积分别与直接进样的峰面积比较,计算萃取回收率分别为 $(60.3 \pm 2.9)\%$ 、 $(66.4 \pm 6.0)\%$ 、 $(70.0 \pm 4.7)\%$ 和 $(48.8 \pm 5.1)\%$ 、 $(64.5 \pm 3.6)\%$ 、 $(50.2 \pm 0.7)\%$ 。

3.4 方法回收率

取 6 份空白血浆分别加入不同浓度的罗通

定和舒必利工作液,配成浓度分别为 200、25、 $3.13 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 800、100、 $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的高、中、低 3 种浓度样品,按 2.3 样品处理方法处理后进样,以药物和内标的峰面积比在标准曲线上分别求出罗通定和舒必利浓度。于同批内连续测定含量 6 次,计算药物方法回收率分别为 $(100.0 \pm 4)\%$ 、 $(95.3 \pm 3.1)\%$ 、 $(100.8 \pm 10.6)\%$ 和 $(98.6 \pm 4.9)\%$ 、 $(100.4 \pm 3.5)\%$ 、 $(102.4 \pm 2.4)\%$ 。

3.5 精密度

用空白血浆配制罗通定浓度为 200、25、 $3.13 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,舒必利浓度为 800、100、 $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血浆样品。按 2.3 样品处理方法处理后,于同批内连续测定 6 次,共测定 3 批,其结果列于表 2。

3.6 特异性考察

在上述的实验条件下,分别考察了 6 份不同空白血浆样品,血浆中内源性杂质均不干扰药物和内标的测定。

表 2 罗通定和舒必利日内和日间精密度

Table 2 Precision of Rotundine and Sulpiride in with-in day and between day

舒必利	精密度 RSD%		罗通定	精密度 RSD%	
	日内	日间		日内	日间
高($800 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.60%	0.80%	高($200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	3.18%	1.42%
中($100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.63%	1.00%	中($25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.78%	2.22%
低($12.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.56%	1.41%	低($3.13 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	6.79%	0.32%

3.7 稳定性实验

3.7.1 长期稳定性 取在 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下放置 1、7、14、30 天的高、中、低浓度血浆样品,按 2.3 样品处理方法处理后,以药物和内标的峰面积比在当日标准曲线上分别求出罗通定和舒必利高、中、低浓度的变化率。结果显示, $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 30 天的变化率分别为 -6.44% 、 -4.89% 、 -9.24% 和 -1.39% 、 -7.60% 、 -9.34% ,表明样本在 30 天内基本稳定。

3.7.2 反复冻融稳定性 考查样品在 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中完全冰冻后,在室温环境下解冻,经反复冻融 1、2、3 次后,按 2.3 样品处理方法,以药物和内标的峰面积比在当日标准曲线上分别求出罗通定和舒必利高、中、低浓度变化率。结果显示,反复冻融 3 次后的变化率分别为 -3.66% 、 -0.20% 、 -0.97% 和 -0.70% 、 -1.81% 、 -1.95% ,表明样本在反复冻融 3 次后基本稳定。

3.7.3 室温放置稳定性 配制高、中、低浓度血浆样品,分别在室温放置 2、4 h,按 2.3 样品处理方法,以药物和内标的峰面积比在当日标准曲线上分别求出罗通定和舒必利高、中、低浓度变化率。室温放置 4 h 后的变化率分别为 -2.93% 、 5.30% 、 0.16% 和 3.61% 、 -0.49% 、 -6.23% ,表明样本在室温放置 4 h 后基本稳定。

3.7.4 萃取物稳定性 将挥发干后的高、中、低浓度样品分别在室温放置 2、4、24 h 后,用流动相溶解进样测定,以药物和内标的峰面积比在当日标准曲线上分别求出罗通定和舒必利高、中、低浓度变化率。结果显示,萃取物室温放置 24 h 后的变化率分别为 -6.43% 、 2.24% 、 0.97% 和 2.72% 、 1.47% 、 -0.39% ,表明萃取物在室温放置 24 h 后基本稳定。

4 方法应用

经四川大学华西医学中心伦理委员会批准,筛选 10 例戒毒健康受试者,分别单次口服含 60 mg 罗通定和 200 mg 舒必利的脱毒舒胶囊,于空腹服药前和服药后 0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、5、6、8、11、14、24、36、48 h 抽取前臂静脉血 3 mL(共 17 点血样),按 2.3 样品处理方法对各时间点血浆样品进行测定,用标准曲线求出血药浓度,均值药-时曲线图示于图 2。采用 DAS 2.0 药动学软件处理得到主要药动学参数如下:罗通定和舒必利单次给药的 $t_{1/2}$ 分别为 5.36 和 9.65 h, AUC_{0-t} 分别为 1 484 和 12 092 $\text{h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, C_{max} 为 397.7 和 999.9 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;多次给药的 $t_{1/2}$ 分别为 10.76 和 9.34 h, AUC_{0-t} 为 1 742 和 20 739 $\text{h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, C_{max} 为 195.3 和 1 195.6 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

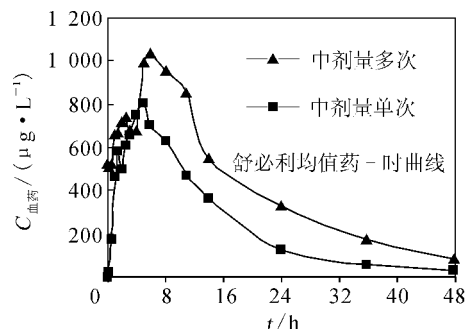
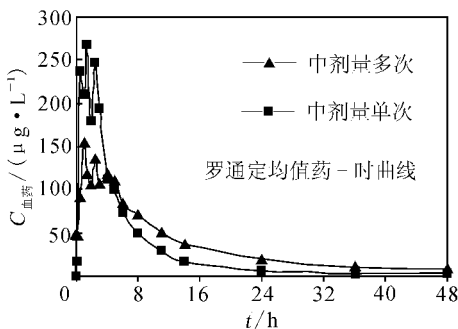


图 2 罗通定及舒必利的药代动力学曲线

Fig. 2 Pharmacokinetic curves of Rotundine and Sulpiride

5 讨 论

(1)文献[6]使用液相色谱-质谱联用法测定舒必利浓度,采用乙酸乙酯作为萃取剂提取血浆中的舒必利。本实验考察了以二氯甲烷及乙酸乙酯作为萃取剂的萃取效果,发现乙酸乙酯萃取出的血浆杂质比二氯甲烷多,对基线有较大干扰,且使用乙酸乙酯的最低定量限为使用二氯甲烷的 2 倍,故确定二氯甲烷为萃取剂。

(2)本实验中存在着标准曲线线性不理想的问题,主要表现为高浓度段的响应偏低,先后尝试更换空白血浆、更换萃取剂、调整萃取剂的 pH 值,都未能解决这个问题。这可能是由于 LC-MS/MS 接口处的离子化不充分,造成高浓度样本的离子化比例较低浓度样本低,中性丢失过多,从而导致响应值偏低。为了解决这一问题,调整流动相以便增强离子化程度来改善线性:①考虑各待测组分为碱性,且在正离子模式下检测,降低 pH 应该可以促进各组分的离解、增强离子化,结果虽然降低流动相的 pH 值,但高浓度点的响应并无明显提高,相反色谱峰还出现了分岔的现象;②提高流动相中有机相的比例,结果线性得到显著改善。

(3)本实验应用液相色谱-质谱联用测定罗通定及舒必利的血药浓度,降低了最低检测限。文献报道,应用 HPLC 测定舒必利的血药浓度,其最低检测限为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ [4];应用 HPLC 测

定罗通定的血药浓度,其最低检测限为 $15 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ [1]。

参考文献:

- [1] 张金凤,谭 力,周继红,等. HPLC 测定人血浆中罗通定浓度及药代动力学研究[J]. 中国药科大学学报,1998,29(1):67-70.
- [2] 袁洞君,阳利龙,祝文兵,等. HPLC 法测定人血浆中舒必利浓度及其人体药动学和相对生物利用度研究[J]. 儿科学杂志,2006,12(3):4-6.
- [3] ERIC A, WILLIAM J, TING-KAI L, et al. Ethanol drinking experience attenuates (一) sulphiride-induced increases in extra-cellular dopamine levels in the nucleus accumbens of alcohol-preferring (P) rats[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2003, 27(3):424-431.
- [4] 柳福真,刘炳伦,秦启亮,等. 反相 HPLC 血清舒必利测定方法[J]. 山东医科大学学报,2000,38(4):1.
- [5] 牟昀雅,余伯阳. HPLC/MS/MS 法分离鉴定罗通定在大鼠胆汁中的代谢产物[J]. 中国天然药物,2006,4(6):448-451.
- [6] PEAK I B, MOON Y, HY J, et al. Hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of levosulpiride in human plasma[J]. Journal of Chromatography B, 2004, 809(2):345-350.

(上接第 12 页)

- [6] VANYNCHT G, PREECE S, MAGHUIN-ROGISTER G, et al. Gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the multiresidue analysis of β -agonists in biological matrices[J]. Journal of Chromatography A, 1996, 750(1/2):43-49.
- [7] 段建平,陈红青,陈 颖,等. 高效毛细管电泳法同时测定西马特罗、盐酸克仑特罗、沙丁胺醇[J]. 广西师范大学学报:自然科学版,2003,21(3):250-251.
- [8] HERNANDEZ-CARRASQUILLA M. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of β_2 -agonists in bovine retina[J]. Analytica Chimica Acta, 2000, 408:285-290.
- [9] KESKIN S, ÖZER D, TEMIZER A. Gas chroma-

tography-mass spectrometric analysis of clenbuterol from urine[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1998, 18(4/5):639-644.

- [10] LEE X, WHAITES E, MURBY J. Determination of clenbuterol in bovine urine using gas chromatography-mass spectrometry following clean-up on an ion-exchange resin[J]. Journal of Chromatography B, 1999, 728(1):67-73.
- [11] CAI J, HENION J. Quantitative multi-residue determination of β -agonists in bovine urine using on-line immunoaffinity extraction-coupled column packed capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B,1997,691(2):357-370.