

液相色谱-串联质谱法测定 Beagle 犬血浆中罗替戈汀的浓度

苏小函¹, 沙春洁², 刘万卉^{1,2}

(1. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264005; 2. 山东绿叶制药有限公司, 山东 烟台 264003)

Determination of Rotigotine in Beagle Dog Plasma by HPLC-MS/MS

SU Xiao-han¹, SHA Chun-jie², LIU Wan-hui^{1,2}

(1. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China;

2. Shandong Luye Pharmaceutical Co. Ltd, Yantai 264003, China)

Abstract: The rotigotine in beagle dog plasma was determined by liquid chromatographic-tandem mass spectrometry. The method of HPLC-MS/MS was used, and detection was performed on a tandem spectrometry in multiple reaction monitoring(MRM) mode. The standard curves are linear in the range of 0.025-12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, and the recovery is 89%-91%, the intra-day and the inter-day precision are less than 5.6% and 6.8%, respectively. The low limit of quantification(LLOQ) is 0.025 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The specificity is good and sensitive, so this method is suitable for the pharmacokinetical research of rotigotine.

Key words: rotigotine; HPLC-MS/MS; plasma concentration

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2009) 增刊-0113-03

罗替戈汀属于非麦角类选择性多巴胺受体激动剂(D1/D2/D3)类药物,通过刺激体内的多巴胺受体并模拟神经递质多巴胺而起作用,临床上主要用于早期继发性帕金森病和晚期帕金森病的辅助治疗^[1]。将罗替戈汀制成微球具有明显的缓释效果,可以减少用药的次数、减小血药浓度的波动性以及药物的副作用,提高病人的顺应性。目前,国外报道罗替戈汀的测定方法有HPLC-UV、HPLC-MS、GC/MS和放射性标记法^[2-4],国内未见报道。本工作采用HPLC-MS/MS法测定血浆中罗替戈汀的浓度,该方法快速简便、专一性强、灵敏度高。

1 实验部分

1.1 仪器

API 4000型三重四极杆串联质谱仪: 美国Applied Biosystem公司产品; Agilent 1200高分离度快速液相色谱系统RRLC: 美国Agilent公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件 Agilent Eclipse Plus-C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm×3.5 μm); 流动相: A 为 (1 mmol·L⁻¹ NH₄Ac) 水, B 为甲醇; 梯度洗脱: 0~0.5min, 65%~95% B; 0.5~2.5min, 95%~95% B; 2.5~2.6min, 95%~65% B; 2.6~6.0min, 65%~65% B; 流速 0.35 mL·min⁻¹; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 10 μL 。

1.2.2 质谱条件 电喷雾离子化源; 离子喷射电压 5 500 V; 温度 550 $^{\circ}\text{C}$; GS1: 3.45×10⁵ Pa; GS2: 3.79×10⁵ Pa; 气帘气压力 (CUR): 1.03×10⁵ Pa, 碰撞气压力 (CAD): 5.52×10⁴ Pa; 正离子方式检测; 扫描方式为多反应监测 (MRM); 罗替戈汀及地西洋的 DP 电压分别为 50 V 和 88 V,

CE分别为36 V和47 V, CXP均为10 V, 用于定量分析的离子对分别是316.2→147.1(罗替戈汀)和285.4→193.1(地西洋)。

1.2.3 血浆样品处理方法 向0.2 mL血浆中分别加入100 μL 内标溶液(300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 地西洋), 100 μL V(甲醇):V(水)=80:20, 100 μL 1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 , 涡流混合2 min, 加入3 mL V(正己烷):V(二氯甲烷):V(异丙醇)=2:1:0.1提取剂, 涡流10 min, 3 600 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 取上层有机澄清液于另一试管中, 35 $^\circ\text{C}$ 压缩空气流下吹干, 加入100 μL V(甲醇):V(水(1 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵))=80:20复溶。13 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3 min, 取上清进样10 μL , 记录色谱图。

1.2.4 标准曲线与线性范围 取0.2 mL犬空白血浆, 加入100 μL 系列浓度标准溶液, 100 μL 内标(300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 地西洋), 制备成相当于血浆浓度为0.025、0.05、0.25、1.00、2.50、5.00、12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的样品, 按1.2.3操作, 记录色谱图。所得标准曲线回归方程为 $Y=0.78X+0.028$ ($r=0.9964$), 线性范围为0.025~12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 定量下限为0.025 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2 结果

2.1 方法的专属性

按1.2.3操作, 得空白血浆色谱图、空白加标色谱图、血浆样品色谱图。结果表明, 空白血浆中的内源性物质不干扰罗替戈汀和内标地西洋的测定。

2.2 准确度和精密度

取空白血浆, 制备低、中、高3个浓度(0.1、0.5、5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的质量控制(QC)样品, 每个浓度进行6次分析, 按1.2.3操作, 分别计算日内、日间差异。求得日内精密度分别为5.6%、3.7%、3.0%, 日间精密度分别为5.2%、2.3%、6.8%。

2.3 方法回收率和基质效应考察

取空白血浆, 制备低、中、高3个浓度(0.1、0.5、5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的样品, 每个浓度进行4次分析, 按1.2.3操作, 分别计算方法回收率及基质效应。方法回收率分别为91.1%、89.0%、89.7%, 基质抑制效应在14%~40%范围内, 表明基质抑制效应影响不大。

2.4 药动学测定结果

以罗替戈汀微球为研究对象, 研究其在比格犬体内的药动学特征。结果显示, 罗替戈汀微球在犬体内缓慢释放, 体现了微球的缓释效果, 药时曲线示于图1。

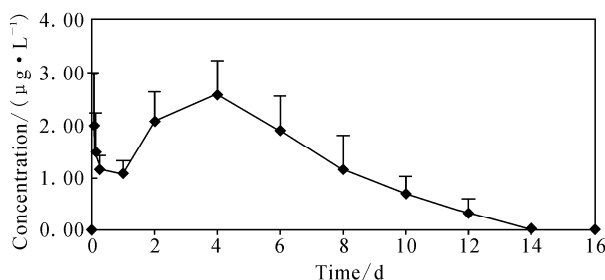


图1 肌肉注射罗替戈汀(2.61 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)后的药时曲线

Fig.1 Plasma C-T curve of Rotigotine by administration of intramuscular injection(2.61 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

3 小结

本试验建立的RRLC-MS/MS方法在0.025~12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内线性良好, 低、中、高三个浓度测定的日内、日间差分别小于5.6%及6.8%, 方法提取回收率均高于89%, 基质抑制低于40%, 能够用于罗替可汀在体内的药代动力学研究。

参考文献:

[1] 马秉亮. 多巴胺D2受体激动剂Rotigotine Hydrochloride[J]. 药学进展, 2003, 27(4): 254-255.

- [2] WILLI C, HANS M W, WIM J A M, et al. Transdermal administration of radiolabelled [^{14}C] rotigotine by a patch[J]. *Formulation Clin Pharmacokinet*, 2007, 46(10): 851-857.
- [3] SWART P J, OELEN W E, BRUINS A P, et al. Determination of the dopamine D2 agonist N-0923 and its major metabolites in perfused rat livers by HPLC-UV-atmospheric pressure ionization mass spectrometry[J]. *Anal Toxicol*, 1994, 18(2): 71-77.
- [4] PAUL A Z, WAHEED S A. High resolution gas chromatographic/mass spectrometric method for the determination of N-0923 in human and monkey plasma[J]. *Rapid Commun Mass*, 1993, 7: 1 145-1 149.
- [5] SWART P J, ZEEUW R A. Extensive gastrointestinal metabolic conversion limits the oral bioavailability of the dopamine D2 agonist N-0923 in freely moving rats[J]. *Pharmazie*, 1992, 47(8): 613-615.

(上接第 106 页)

本方法的特异性良好,人血浆中均不存在 TF、M1、M2 本底,通道内也无其他杂质干扰其分离和测定。方法的定量下限(LLOQ)为 $1\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$,其在人血浆中的质量色谱图示于图 1。人血浆中 TF、M1、M2 在 $1\sim 500\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内,其浓度与响应值之间具有良好的相关性,全部标准曲线的相关系数(r)均在 0.990~1.000 之间,典型的标准曲线示于图 2。方法的日内和日间精密度,准确度符合要求($\text{RSD}\% \leq 15\%$ 、 $\text{RE}\% \leq 15\%$)。TF、M1、M2 的混合标准溶液($2\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$)在 $-30\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下可稳定放置 28 天。血浆样品中的 TF、M1、M2 在室温条件下($25\text{ }^\circ\text{C}$)放置 24 h、冻存($-30\text{ }^\circ\text{C}$)58 天和反复冻融($-30\text{ }^\circ\text{C}$ 至 $25\text{ }^\circ\text{C}$)3 次的情况下,能够保持良好的稳定性。经过预处理的血浆样品中的 TF、M1、M2 在自动进样器(温度设定为 $15\text{ }^\circ\text{C}$)中可稳定放置 24 h。血浆中 TF、M1、M2 的低、中、高浓度的萃取回收率基本一致;TF、M1、M2 在人血浆中不存在明显的基质效应。

3 小结

本工作建立了定量测定人血浆中 TF、M1、M2 浓度的 HPLC-MS/MS 法,该方法灵敏度高、特异性强,且各项考核结果均符合 SFDA 及本实验室相关 SOP 的要求,满足了准确测定人血浆中 TF、M1、M2 浓度的要求,可以提供准确可靠的分析结果。

参考文献:

- [1] ARAI Y, FUJIMORI A, SUDO K, et. al. Vasopressin receptor antagonists: potential indications and clinical results[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2007, 7: 124-129.
- [2] SHOAF S E, WANG Z, BRICMONT P, et. al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of tolvaptan, a nonpeptide AVP antagonist, during ascending single-dose studies in healthy subjects[J]. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2007, 47: 1 498-1 507.

(上接第 112 页)

3 结论

哌嗪衍生物 SIPI5358 可以与 α -、 β -、 γ -环糊精形成非共价复合物。

参考文献:

- [1] 李建其,黄丽瑛,董文心.芳烷醇哌嗪类化合物的合成及抗抑郁活性[J].*中国药物化学杂志*,2006,16(5):270-273.
- [2] 吕娜,郑永勇,李建其,等.哌嗪衍生物 SIPI5357 与环糊精分子非共价复合物的制备与分析[J].*分析化学*,2009,37(2):199-204.
- [3] 潘婷婷,储艳秋,周鸣飞,等.抗抑郁化合物 SIPI5838 和环糊精分子非共价复合物的研究[J].*化学学报*,2008,66(22):2 462-2 468.