

## 高效液相色谱-质谱联用测定家兔体内可乐定血药浓度

柯光明<sup>1</sup>, 张恩宏<sup>1</sup>, 王 丽<sup>2</sup>, 张 强<sup>3</sup>, 杜洪光<sup>1</sup>, 郭洪猷<sup>1\*</sup>

(1. 北京化工大学 理学院, 北京 100029; 2. 北京康倍得医药技术开发有限公司, 北京 100089;  
3. 北京大学 药学院, 北京 100081)

**摘要:** 目的 用 HPLC-MS 测定家兔体内可乐定血药浓度, 研究可乐定在家兔体内的药代动力学行为。方法 色谱仪为 Waters Alliance 2790, 色谱柱为 XTerra C<sub>18</sub> (150 mm × 2.1 mm ID, 5 μm)。流动相为乙腈-碳酸氢铵水溶液, 梯度洗脱; 质谱仪为 Micromass ZQ-4000 仪, 电喷雾电离源, 选择离子监测 (SIM) 质荷比 ( $m/z$ ) 为 230。结果 本方法回收率较高, 重现性好。线性范围为 1 ~ 80 μg·L<sup>-1</sup>, 最低检测浓度为 0.05 μg·L<sup>-1</sup>。主要药代动力学参数  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-1}$  和  $T_{max}$  分别为 (27 ± 9) μg·L<sup>-1</sup>, (5 352 ± 1 121) μg·L<sup>-1</sup>, (79 ± 17) h。结论 本法灵敏度高, 选择性强, 具有较高的精密度和准确度。透皮贴剂中的可乐定可以平稳地透过家兔皮肤, 稳定地控释达 7 d。

**关键词:** 高效液相色谱-质谱联用法; 可乐定; 透皮贴剂; 血药浓度; 药代动力学

中图分类号: R917.101 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2004)05-0367-03

## Determination of clonidine in rabbit plasma by HPLC-MS

KE Guang-ming<sup>1</sup>, ZHANG En-hong<sup>1</sup>, WANG Li<sup>2</sup>, ZHANG Qiang<sup>3</sup>,  
DU Hong-guang<sup>1</sup>, GUO Hong-you<sup>1\*</sup>

(1. College of Science, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China; 2. Beijing KBD Pharmaceutical Technology Development Ltd, Beijing 100089, China; 3. School of Pharmaceutical Science, Peking University, Beijing 100081, China)

**Abstract:** **Aim** To determine clonidine in rabbit plasma by LC-MS. **Methods** The LC-MS system consisted of Waters Alliance 2790 HPLC and Micromass ZQ-4000 MS. The HPLC was performed by using XTerra C<sub>18</sub> (150 mm × 2.1 mm ID, 5 μm). The mobile phase, consisting of acetonitrile/ammonium hydrogen carbonate solution, was maintained to a flow-rate of 0.2 mL·min<sup>-1</sup> and the linear gradient elution was adopted. Mass spectrum was obtained by using electrospray ionization interface and the  $m/z$  of SIM was 230. **Results** The average recovery was high and the method was reproducible. The calibration curve showed good linearity in the range of 1 ~ 80 μg·L<sup>-1</sup>, the lowest limit of detection was 0.05 μg·L<sup>-1</sup>. The  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-1}$  and  $T_{max}$  value of the pharmacokinetics parameter were (27 ± 9) μg·L<sup>-1</sup>, (5 352 ± 1 121) μg·L<sup>-1</sup>, (79 ± 17) h. **Conclusion** The results demonstrated that the method had high sensitivity, good selectivity, accuracy and precision. It is used to determine the clonidine concentration in plasma. The transdermal patch can deliver clonidine to the surface of rabbit skin stably for periods of up to 1 week after a single application.

**Key words:** High performance liquid chromatography-mass spectrometry; clonidine; transdermal patch; plasma drug concentration; pharmacokinetics

可乐定是临床常用的抗高血压药。以前多采用

片剂口服和注射液的形式给药, 副作用较严重, 近年来开发出了可乐定透皮长效控释制剂, 该剂型具有给药稳定、副作用小和病人对治疗的依从性高等优点<sup>[1]</sup>。由于达到有效治疗水平时需要的可乐定血药浓度比较低, 为每毫升血浆纳克级, 甚至每毫升血浆

收稿日期: 2003-06-18.

\* 通讯作者 Tel: 86-10-64713897,

E-mail: guohy@mail.buct.edu.cn

皮克级<sup>[2]</sup>,因此为了测定可乐定血药浓度,必须建立一种高灵敏度的分析测试方法。国内外已用放射免疫分析法<sup>[3]</sup>、气相色谱法<sup>[2,4]</sup>、高效液相色谱法<sup>[5]</sup>和气相-质谱联用法<sup>[6]</sup>测定可乐定血药浓度。用HPLC-MS方法测定可乐定血药浓度及药代动力学的研究未见报道。本文建立了一种灵敏度高、专属性强、HPLC-MS分析方法测定家兔体内可乐定血药浓度,并研究了可乐定在家兔的体内过程及药代动力学参数。

## 材料与方 法

**仪器与试剂** Waters Alliance 2790 - Micromass ZQ-4000 仪;乙腈为色谱纯(Fisher 公司);高纯氮气( $\geq 99.999\%$ )由北京普莱克斯实用气体有限公司提供;大白兔(2.5~3.0 kg)为北京大学医学部提供;可乐定透皮贴剂为自制;可乐定对照品为中国药品生物制品检定所提供。

**色谱条件** 色谱柱为 Xterra C<sub>18</sub>, (150 mm × 2.1 mm ID, 5 μm, Waters 公司);流动相:乙腈-碳酸氢铵水溶液(用氨水调至 pH 10.5),梯度洗脱(0~8 min:乙腈-碳酸氢铵水溶液为 10:90→90:10;8~12 min:乙腈-碳酸氢铵水溶液为 10:90);柱温:35 °C;流速:0.2 mL·min<sup>-1</sup>;进样量:10 μL。

**质谱条件** 质谱仪为 Micromass ZQ-4000 仪;电喷雾电离源(ESI),ESI 电离毛细管电压:3 kV;锥孔电压(cone):40 V;离子源温度(source temperature):105 °C;脱溶剂温度(desolvation temperature):150 °C;选择离子监测(SIM *m/z* 230,可乐定准分子离子)。

**标准溶液的配制** 精密称取对照品适量置量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,配置成 1.0 mg·L<sup>-1</sup>及

0.1 mg·L<sup>-1</sup>储备液,-20 °C 保存备用。临用时将储备液用乙腈稀释至所需浓度,即得标准系列工作液(5,20,50,100,200 和 400 μg·L<sup>-1</sup>)。

**血样的抽取** 选取体重 2.5~3.0 kg 的大白兔 6 只,试验前将大白兔背部剪毛并剃干净,然后贴 2.0 mg/片的可乐定贴片。给药后 0,3,6,12,24,48,72,96,120,144,168,192,216 和 240 h 由耳缘静脉各取血 2.4 mL(168 h 后揭下可乐定透皮贴片)。

**血样的处理与测定** 精密量取肝素抗凝的家兔血浆 1.0 mL,涡旋处理 10 s,加乙腈 5 mL,涡旋提取 3 min,离心(3 500 r·min<sup>-1</sup>) 10 min,取上层液,用 0.2 μm 的滤膜过滤,于 50 °C 水浴用氮气流吹干。残渣加流动相溶解后进样 10 μL。

## 结 果

### 1 方法专属性

分别取空白血浆及给药后的血浆样品 1.0 mL 各 6 份,按“血样的处理与测定”项操作处理,进样 10 μL,得选择离子色谱图(图 1)。结果表明,空白和给药后的血样中内源性物质不干扰可乐定的测定。

### 2 标准曲线的制备

取空白血浆 1.0 mL 共 6 份,分别加入标准系列工作液,使其血浆质量浓度分别为 1,4,10,20,40 和 80 μg·L<sup>-1</sup>,按“血样的处理与测定”项操作,以质量浓度  $C(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$  为横坐标,以峰面积( $Y$ )为纵坐标进行线性回归,线性方程为  $Y = 2\,420C + 783$ ,  $r = 0.998\,4$ ,血浆中可乐定的质量浓度在 1~80 μg·L<sup>-1</sup> 线性关系良好,可乐定的最低检测限为 0.05 μg·L<sup>-1</sup>。定量下限为 0.2 μg·L<sup>-1</sup>。

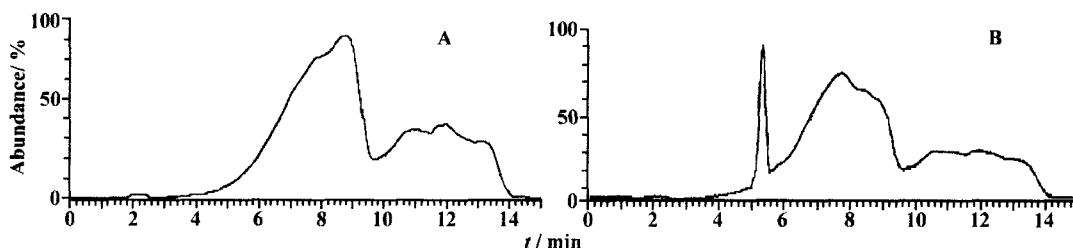


Figure 1 Chromatograms of blank plasma (A) and the plasma clonidine after administering of patch to rabbits (B) by selected ion monitoring (SIM) scan mode

### 3 精密度试验

按“标准曲线的制备”项下配制低、中和高 3 个浓度的质量控制样品,每个浓度进行 5 个样本分析,

连续进行 3 d,并与标准曲线同时进行,以当日的标准曲线计算样品的测得浓度,与配制浓度对照,求得样品测定方法的准确度和精密度,见表 1。

**Table 1 Precision for the analysis of clonidine in rabbit plasma ( $n = 5$ )**

| Concentration<br>/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | RSD / %    |             |
|--|------------|-------------|
|  | Within-day | Between-day |
| 4  | 3.50       | 7.41        |
| 20   | 2.82       | 6.52        |
| 80   | 2.54       | 5.16        |

#### 4 方法回收率

取空白血浆 1.0 mL, 配成质量浓度为 4, 20 和 80  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的样品, 按“血样处理与测定”项下操作, 每个浓度进行 5 个样本分析, 平均方法回收率为 86.2%, 94.3% 和 96.2%。

#### 5 家兔可乐定贴片的药代动力学研究

计算不同取样时间的可乐定血药浓度。绘制血药浓度-时间曲线(图 2)。将家兔透皮给药的血药浓度-时间数据用中国科学院计算中心的 CRFO 软件进行拟合计算, 求出可乐定在家兔体内的各项药代动力学参数。其药代动力学参数见表 2。

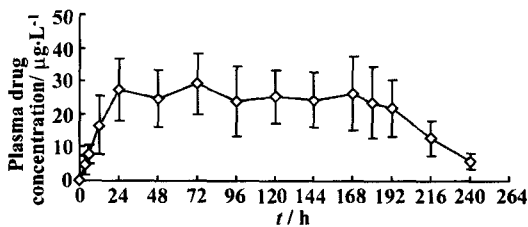


Figure 2 Curve of plasma drug concentration and time

**Table 2 Pharmacokinetic parameters of rabbits after taking clonidine transdermal patch ( $n = 6$ )**

| Parameter   | Value                          |
|---|--------------------------------|
| $A / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$                           | $24 \pm 11$                    |
| $K_e / \text{h}^{-1}$   | $(5 \pm 4) \times 10^{-2}$     |
| $K_a / \text{h}^{-1}$   | $(7 \pm 5) \times 10^{-2}$     |
| $Tl / \text{h}$   | $1.0 \pm 0.4$                  |
| $Tf / \text{h}$   | $180 \pm 79$                   |
| $T_{1/2}(K_e) / \text{h}$                                     | $20 \pm 6$                     |
| $T_{1/2}(K_a) / \text{h}$                                     | $12 \pm 3$                     |
| $T_{\max} / \text{h}$   | $79 \pm 17$                    |
| $C_{\max} / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$                    | $27 \pm 9$                     |
| $AUC_{0-\infty} / \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ | $(5.4 \pm 1.1) \times 10^3$    |
| $CL / \text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$           | $(4.7 \pm 2.4) \times 10^{-4}$ |
| $V / L$   | $16 \pm 7$                     |

#### 讨论

国内已有报道用薄层色谱(TLC)分离和液闪测定技术研究家兔体内可乐定血药浓度的变化, 但误差较大。本试验采用高效液相色谱-质谱联用测定

可乐定的血药浓度, 具有较高的灵敏度和专属性, 能满足体内低浓度药物研究的需要。

可乐定为生物碱, 普通硅胶基质填料 pH 范围为 2~8, 不适合用作可乐定的色谱分离, 本文选用 XTerra 色谱柱, XTerra 填料为 3-(氯二甲基甲硅烷基)丙基-N-十二烷基氨基甲酸酯键合无定型硅胶, pH 为 2~12。使得碱性化合物可在高于其 pKa 的 pH 条件下处于游离状态, 增强了固定相与样品的相互作用, 有利于获得更好的选择性, 使可乐定的保留时间更稳定。选择较低的流速( $0.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ), 保证了色谱柱的分离效果。在保证分析质量的前提下采用梯度洗脱可使样品的出峰时间提前, 提高样品测试速度, 缩短了样品分析周期。

实验结果证实, 贴片中的可乐定可以稳定地透过家兔皮肤, 被吸收进入血液循环, 血药浓度 1 d 内达到平稳水平, 可连续平稳地维持 7 d。由此可见, 通过可乐定透皮贴剂经皮给药, 可以减少给药频率, 使用方便。

#### 结论

HPLC-MS 是检测家兔体内可乐定血浓度的一种有效方法。本法灵敏度高, 专属性强, 具有较高精密度和准确度, 适合低浓度的可乐定血药浓度测定分析。

#### References:

- [1] Breidthardt J, Schumacher H, Mehlbirger I. Long-term (5 years) experience with transdermal clonidine in the treatment of mild to moderate hypertension [J]. *Clin Auton Res*, 1993, **3**:385 - 387.
- [2] Girault J, Fourtillan JB. Quantitative measurement of clonidine in human plasma by combined gas chromatography/electron capture negative ion chemical ionization mass spectrometry [J]. *Biomed Environ Mass Spectrom*, 1988, **17**: 443 - 448.
- [3] Arndts D, Stahle H, Strack CJ. A newly developed precise and sensitive radioimmunoassay for clonidine [J]. *Arzneim-Forsch / Drug Res*, 1979, **29**(1):Nr 3:532 - 538.
- [4] Yang XM, Chen XY. Determination of clonidine in plasma by gas chromatography [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1994, **14**(2):24 - 25.
- [5] United States Pharmacopoeial Convention Inc. United States Pharmacopoeia XXI/NF XVI. Easton: Mack Printing and Publishing Company, 1985. 234 - 235.
- [6] Wenzla T, Lankmayra EP, Wintersteigerb R. Determination and quantification of clonidine in human blood serum [J]. *J Biochem Biophys Met*, 2002, **53**:131 - 139.