

柱前衍生化反相 HPLC 法测定血浆中普罗帕酮的对映异构体

王亚芹 钟大放* 陈仁弟

(沈阳药科大学药物代谢与药物动力学实验室, 沈阳 110015)

摘要 建立了选择性测定血浆中普罗帕酮对映异构体的柱前衍生化反相 HPLC 法。用 $S(+)$ -1-(1-萘基)乙基异氰酸酯为衍生化试剂, 与血浆中提取出的普罗帕酮反应生成非对映立体异构体, 以 HPLC-UV 检测法(220 nm)定量。采用此法成功地测试了 10 名健康受试者单剂量口服 300 mg 盐酸普罗帕酮片后对映异构体的药代动力学曲线。此法灵敏度高($7.5 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), 操作简便, 重现性好。

关键词 普罗帕酮; 对映异构体; 衍生化; HPLC 法

普罗帕酮(propafenone)是目前临床常用的 Ic 类抗心律失常药, 化学结构为 3-苯基-1-[2-[3-(丙氨基)-2-羟基丙氧基]苯基]-1-丙酮, 分子中有一手性中心, 存在一对对映异构体, 临床上使用其外消旋体的盐酸盐。据报道^[1], 该药两个对映体对钠通道的阻断作用相同, 但对肾上腺素 β 受体的阻断作用有显著差异。本文建立了用手性试剂 $S(+)$ -1-(1-萘基)乙基异氰酸酯($S(+)$ -NEIC)与血浆中提取出的普罗帕酮进行衍生化反应, 进而用反相 HPLC 法测定其对映体浓度比值的方法, 与文献方法相比, 有灵敏度高、操作简便、重现性好的特点。

材 料 与 方 法

药品与试剂 $R(-)$ -, $S(+)$ -和 (\pm) -普罗帕酮盐酸盐标准品由德国 Knoll 公司提供, 盐酸普罗帕酮片(50 mg/片)由山东省医药工业研究所制药厂生产。 $S(+)$ -NEIC 购自瑞士 Fluka 公司($d=1.133$), 取 2 μl , 加无水 CH_2Cl_2 4 ml 稀释, 得浓度为 $0.566 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的溶液, 备用, 室温可保存一周; 甲醇、乙腈为色谱纯试剂, 山东禹王公司产品; 重蒸馏水由本实验室自制;

其余试剂均为分析纯, 沈阳化学试剂厂产品。普罗帕酮及其对映体的所有标准溶液均用 0.2% 磷酸配制, 以防止该有机碱性化合物在玻璃壁上可能出现的吸附。

色谱仪器与条件 高效液相色谱仪(包括 LC-10AD 泵, SPD-10A 紫外检测器, Rheodyne 7125 进样阀, C-R6A 积分仪)为日本岛津公司产品; 色谱柱为 Nucleosil-ODS, 250 mm \times 4.0 mm ID, 粒径 7 μm , 德国 Knauer 公司产品。色谱流动相组成: 甲醇—乙腈—磷酸二氢铵溶液($0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)—85% 磷酸(180:40:80:0.5, v/v), 流速 $1.2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温为室温, 检测波长设定为 220 nm。

血浆样品预处理 健康成年男性志愿受试者 10 名, 一次口服盐酸普罗帕酮片 6 片(300 mg), 分别在服药前和服药后 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 12 h 由肘静脉取血 5 ml, 置肝素化试管中, 离心 5 min($3000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$), 分离血浆, 于 -30°C 保存备测。取受试者血浆 0.5 ml, 按文献方法^[2]测定其中普罗帕酮外消旋体和活性代谢物 5-羟基普罗帕酮的浓度。另取受试者血浆 1.0 ml 置具塞试管内, 依次加入 0.2% 磷酸溶液和 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸钠溶液各 200 μl , 混匀, 再加入正己烷—二氯甲烷—异丙醇(100:50:5, v/v)溶液 3 ml, 旋涡混和 1 min, 于摇床往复振荡 10 min($200 \text{ 次}\cdot\text{min}^{-1}$), 离心 5

本文于 1997 年 3 月 12 日收到。

本文为国家自然科学基金资助项目, No. 39570830

* 联系人

min($3000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$), 转移有机相于另一具塞试管内, 在 40°C 下以氮气吹干溶剂, 放至室温, 于残留物中加入 $S(+)$ -NEIC 溶液 $10 \mu\text{l}$, 无水二氯甲烷 $50 \mu\text{l}$, 旋涡混合 1 min , 于室温静置反应 30 min , 去掉试管塞, 使溶剂自然挥发, 残留物用甲醇-水($3:1, v/v$) $100 \mu\text{l}$ 溶解, 吸取 $20 \mu\text{l}$ 进样分析。

结 果

1 衍生化反应

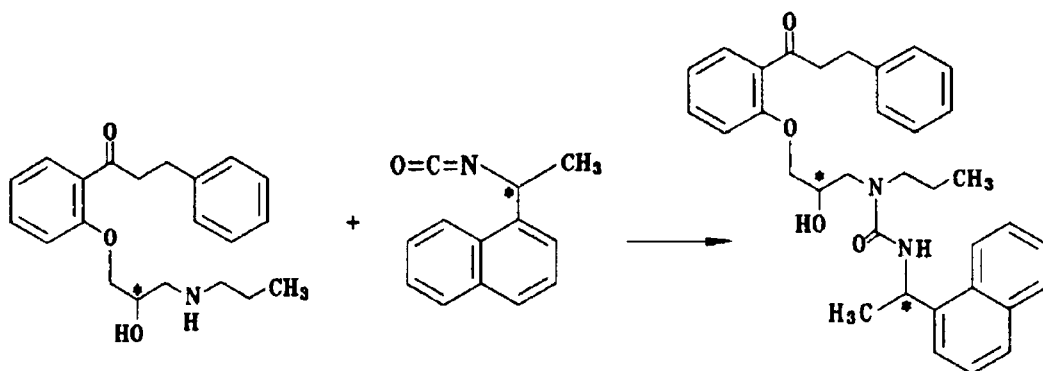


Fig 1 Pre-column derivatization of propafenone enantiomers with $S(+)$ -NEIC.

2 色谱分析

血浆样品典型的色谱图如图 2 所示。在所选条件下, 对映体的衍生物获得了满意的分离, $R(-)$ -和 $S(+)$ -普罗帕酮衍生物色谱峰的保留时间分别为 18.2 min 和 19.4 min 。该方法的专一性通过 6 名受试者空白血浆样品的分析得到证明。在分析方法建立阶段, 其确证通过 3 个分析批(run)的标准曲线和质量控制(QC)样品进行。每条标准曲线包含的样品中, $R(-)$ -和 $S(+)$ -普罗帕酮的总浓度分别为 240 和 $480 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (普罗帕酮及其对映体的浓度与剂量均以其盐酸盐计算), 而 $S(+)/R(-)$ 对映体比值分别为 1, 2 和 3, 且平行进行 3 个样品的分析。使用加权最小二乘法^[3]计算回归直线, 求得 $S(+)/R(-)$ 对映体衍生物的峰高比值与其浓度比值间的线性关系式, 发现在浓度范围 $7.5 \sim 360.0 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 和血浆中对映体浓度比值 1~3 范围内线性良好, γ 值介于 0.9945 和 0.9968 之间。

使用适当的有机溶剂将普罗帕酮自血浆中提取后, 加入 $S(+)$ -NEIC 进行衍生化。通过与这一光学纯的异氰酸酯反应, 普罗帕酮的对映体将生成 N, N -取代的脲类非对映异构体衍生物, 使其在非手性色谱柱上得以分离。为确认色谱峰的归属, 将 $R(-)$ -和 $S(+)$ -普罗帕酮标准品分别进行了衍生化, 以生成的非对映异构体色谱峰与外消旋体衍生物的色谱峰保留时间进行对照。衍生化反应式见图 1。

3 样品测定

120 个样品分为 5 个分析批, 对每一分析批建立一条由 6 个样品构建的标准曲线, 并使用 6 个 QC 样品决定对该批结果的取舍。标准曲线所用样品与 QC 样品中所含 $S(+)$ -和 $R(-)$ -普罗帕酮的总浓度及对映体浓度比值与在分析前确证中相同。

根据生物样品分析的有关国际规范^[4], 每个分析批(每天)建立一条标准曲线, 用于计算被测样品中普罗帕酮的对映体浓度比值。标准曲线是通过以 SR' 和 SS' 非对映异构体的峰高比值对血浆中加入的 $R(-)$ -和 $S(+)$ -普罗帕酮的对映体浓度比值作图而获得的回归直线。样品中每一对映体的浓度则根据所测得的对映体浓度比值和以文献报道方法^[2]测得的普罗帕酮外消旋体浓度计算而得。分析方法的精密度和准确度根据对 QC 样品的测试结果, 分别用相对标准差(RSD)和测量结果均值对配制浓度的相对偏差(RE)表示(表 1)。

在分析前确证 (prestudy validation) 完成后, 该方法被用于一项包括 10 名受试者的普罗

帕酮对映体选择性药代动力学研究^[5], 图 3 为其中的部分结果。

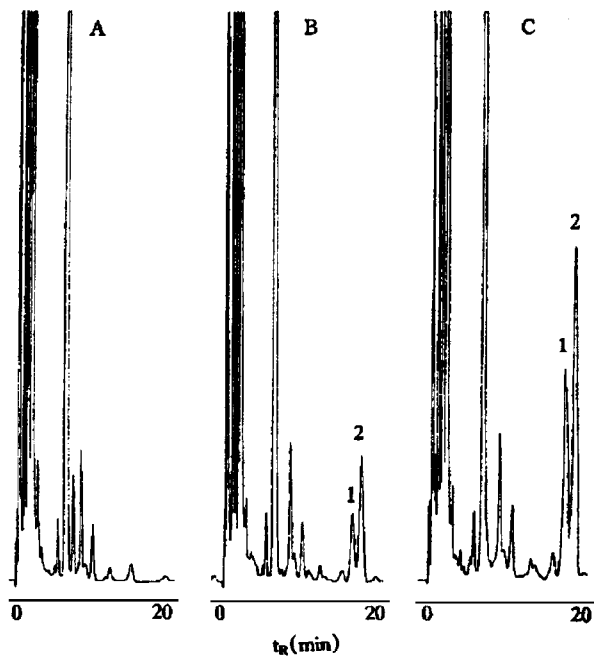


Fig 2 Representative chromatograms of blank plasma (A), blank plasma spiked with 160 ng·ml⁻¹ R(-)- and 320 ng·ml⁻¹ S(+)-propafenone (B) and a sample 2 h after oral administration of 300 mg propafenone hydrochloride to a healthy volunteer (C); peaks 1 and 2 are derivatized R(-)- and S(+)-propafenone, respectively.

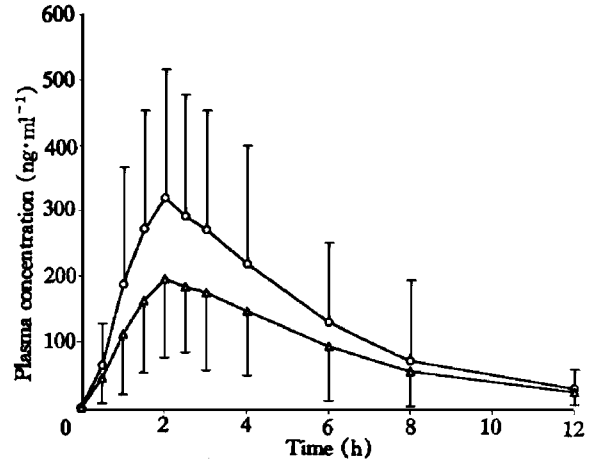


Fig 3 Mean plasma concentration vs time profiles of R(-)-propafenone and S(+)-propafenone after oral administration of 300 mg of the racemate to 10 healthy volunteers. ○ — ○ S(+)-Propafenone; △ — △ R(-)-Propafenone.

Tab 1 Precision and accuracy of the method to measure R(-)/S(+)-propafenone enantiomeric ratios in plasma samples

Total concentration	Precision (RSD%)		Accuracy (RE%)	
	240 ng·ml ⁻¹	480 ng·ml ⁻¹	240 ng·ml ⁻¹	480 ng·ml ⁻¹
S(+)/R(-) enantiomeric ratio				
1.00	3.57	3.17	-2.60	-0.40
2.00	5.33	2.47	-3.05	0.56
3.00	2.93	4.71	-1.30	-0.80

(n = 9, triplicate assays in 3 runs)

讨 论

Kroemer 等^[6]采用 2,3,4,5-四氧乙酰葡萄糖异硫氰酸酯(GITC)进行衍生化反应, 发现在患者服药达到稳态后, 血浆中普罗帕酮的 S(+)/R(-)对映体浓度比值约为 2:1。已有报道采用手性色谱柱^[7]或柱前衍生化正相 HPLC 法^[8]测定血浆中普罗帕酮的对映体。与

普罗帕酮相似, 一系列抗心律失常药和 β 受体阻滞药具有芳环取代的丙醇胺结构, 羟基所联结的碳原子为手性中心, 仲胺氮原子上的活泼氢可发生衍生化反应。我们曾以 R(-)-NEIC 作为衍生化试剂, 建立柱前衍生化反相 HPLC 法, 测定了血浆中普罗帕酮的同系物地丙苯酮的对映异构体^[9]。地丙苯酮在氮原子上连有特戊基, β 受体阻滞药普萘洛尔、美托洛尔、阿

替洛尔等氮原子上连有异丙基,相比之下,普罗帕酮的氮原子上连有正丙基,其衍生化反应的空间位阻最小,反应较易进行,无须加入碱性催化剂等。在室温(15~25℃)下,对映体的反应产率随时间迅速增加,约15 min后即可达到最大值。故本文将反应条件确定为室温,30 min,在所选用条件下,未发现衍生化过程导致药物对映体发生消旋化^[10]。

本文根据反相 HPLC 的特点和普罗帕酮的对映体选择性代谢特点,选择 S(+)-NEIC 作为衍生化试剂。Mehvar 报道的正相 HPLC 法^[8]以 R(-)-NEIC 作为衍生化试剂, R(-)-普罗帕酮的衍生物比 S(+)-普罗帕酮的衍生物先出峰。在反相 HPLC 条件下,这一出峰顺序将发生逆转。一般在分离度不高时,较强的色谱峰由于拖尾效应,易影响后续峰的测量准确性。由于已知 R(-)-普罗帕酮在血浆中比 S(+)-普罗帕酮浓度低,故为使前者的衍生物在反相 HPLC 条件下先出峰,采用了相反构型的衍生化试剂。

采用反相 HPLC 法,衍生物色谱行为的重现性有较大改善,操作难度和测试成本也明显降低。在室温下,NEIC 试剂仅与 β 受体阻滞药物分子侧链上的仲胺基反应,而分子中的醇羟基保持不变^[11]。尽管本文结果表明,在普罗帕酮的对映体浓度比值与衍生物峰高比值间存在良好的线性关系,但发现这一衍生化反应进行得并不完全。因此,难于为这一色谱方法寻找一合适的内标物。本文所提出的方法,即通过测定对映体浓度比值,再结合预先测得的外消旋体浓度,计算各个对映体的浓度,在此情形下是一必要的选择。

尽管采用 HPLC 手性色谱柱分离对映异构体是一种高效、直接的手段,但在许多情况下,将其用于生物样品的分析遇到较大的困难。HPLC 手性柱所需色谱条件的限制使其难于消除内源性物质的干扰;同时,对于象普罗帕酮这类药物,由于首过代谢存在较大的个体差异,使需测量的血浆浓度范围扩大,但物质本身的紫外吸收并不强。在此条件下,选用具有较强紫

外吸收基团的衍生化试剂(如含有萘环的 NEIC 试剂),可显著改善检测的灵敏度。但是,由于普罗帕酮分子结构对荧光的“猝灭效应”,反应生成的衍生物比 S(+)-NEIC 本身的荧光强度显著降低,故不能采用 HPLC 荧光检测法。

本文所建立的测定血浆中普罗帕酮对映异构体的柱前衍生化反相 HPLC 法,可以推广到对许多具有丙醇胺结构的抗心律失常药、 β 受体阻滞药以及 β 受体兴奋药的对映体选择性分析。

参 考 文 献

- 1 De Soyza N, Terry L, Murphy ML. Effect of propafenone in patients with stable ventricular arrhythmias. *Am Heart J*, 1984, **108**:285
- 2 Blume H, Zhong D, Elze M, *et al.* Advantages of a steady-state crossover design in assessment of bioequivalence of highly variable drugs: propafenone. *Eur J Pharm Sci*, 1994, **2**:385
- 3 钟大放. 以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题. *药物分析杂志*, 1996, **16**:343
- 4 Shah VP, Midha KK, Dighe S, *et al.* Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *J Pharm Sci*, 1992, **81**:309
- 5 钟大放,王亚芹,王爱民. 普罗帕酮的对映体选择性药代动力学研究. *中国临床药理学杂志*, 1997, **13**:82
- 6 Kroemer HK, Funck-Brentano C, Silberstein DJ, *et al.* Stereoselective disposition and pharmacological activity of propafenone enantiomers. *Circulation*, 1989, **79**:1068
- 7 Boehm R, Ellrich R, Koytchev R. Quantitation of R- and S-propafenone and the main metabolite in plasma. *Pharmazie*, 1995, **50**:542
- 8 Mehvar R. Liquid chromatographic analysis of propafenone enantiomers in human plasma. *J Chromatogr*, 1990, **79**:527
- 9 Zhong D, Chen R, Fieger-Bueschges H, *et al.* Enantioselective determination of diprafenone in human plasma. *Pharmazie*, 1997, **52**:106
- 10 钟大放,黄海华. 血浆中布洛芬的立体选择性分析方法改进——制备非对映异构体时外消旋化反应的发生与控制. *药物分析杂志*, 1995, **15**(增刊):64
- 11 Darmon A, Thenot JP. Determination of betaxolol enantiomers by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1986, **374**:321

A REVERSED PHASE HPLC METHOD WITH PRE-COLUMN DERIVATIZATION TO DETERMINE PROPAFENONE ENANTIOMERS IN HUMAN PLASMA

Wang Yaqin(Wang YQ), Zhong Dafang(Zhong DF) and Chen Rendi(Chen RD)

*(Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Shenyang
Pharmaceutical University, Shenyang 110015)*

ABSTRACT A reversed phase HPLC method to stereoselectively determine enantiomers of propafenone in human plasma has been developed. After extraction of 1 ml plasma with 3 ml of n -C₆H₁₄:CH₂Cl₂:2-C₃H₇OH (100:50:5, v/v) and dried under N₂, the enantiomers of propafenone were allowed to react with homochiral $S(+)$ -1-(1-naphthyl) ethyl isocyanate (5.66 μ g in 60 μ l CH₂Cl₂) at RT for 30 min, to give the diastereomeric derivatives. Their separation was achieved using HPLC with a C₁₈-column and UV-detection (220 nm) and the enantiomeric ratios were measured. The concentrations of each enantiomer were then calculated using the enantiomeric ratios and the racemic propafenone concentrations previously measured. This method after validation procedures has been applied to the multisample analyses of a human pharmacokinetic study with 10 healthy volunteers after an oral dose of 300 mg propafenone hydrochloride. The method was shown to be sensitive (7.5 ng•ml⁻¹), convenient and reproducible.

KEY WORDS Propafenone; Enantiomers; Derivatization; HPLC method