

毛细管电泳法分离测定血浆样品中盐酸多奈哌齐对映体

陆益红¹, 张 玫¹, 孟 群¹, 张正行^{2*}

(1. 江苏省药品检验所, 江苏 南京 210008; 2. 中国药科大学, 江苏 南京 210009)

摘要: 目的 分离、测定血浆样品中盐酸多奈哌齐对映体的含量。方法 建立高效毛细管电泳法血浆中加入内标 *L*-酒石酸布托菲诺后, 碱化并以异丙醇-正己烷 (3:97) 提取血浆样品, 采用未涂层熔融石英毛细管柱 (70 cm × 50 μm ID), 以 25 mmol·L⁻¹ 磷酸三乙胺 (pH 2.5) 为运行缓冲液, 2.5% 磺化 β-环糊精为手性添加剂, 进样电压为 -20 kV, 进样时间为 15 s, 运行电压为 -20 kV。对盐酸多奈哌齐对映体进行电泳分离, 并进行家兔血浆样品中盐酸多奈哌齐对映体定量分析的方法验证。结果 在上述电泳条件下, 盐酸多奈哌齐对映体可达基线分离。测得血浆样品中 *R*(-)-多奈哌齐的回归方程为: $A_2/A_1 = 0.0242 + 0.2892C$, $r = 0.9992$, *S*(+)-多奈哌齐的回归方程为: $A_2/A_1 = 0.0108 + 0.2737C$, $r = 0.9997$, 线性范围为 0.1 ~ 5 mg·L⁻¹, 检测限为 0.05 mg·L⁻¹。结论 本法与手性柱 HPLC 法相比, 有高效、快速和经济等优点。

关键词: 盐酸多奈哌齐对映体; 毛细管电泳; 磺化 β-环糊精

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2006)05-0471-05

Separation and determination of donepezil hydrochloride enantiomers in plasma by capillary electrophoresis

LU Yi-hong¹, ZHANG Mei¹, MENG Qun¹, ZHANG Zheng-xing^{2*}

(1. Jiangsu Institute for Drug Control, Nanjing 210008, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: **Aim** To establish chiral separation method for donepezil hydrochloride (E2020) enantiomers by capillary electrophoresis (CE) and determine the two enantiomers in plasma. **Methods** Alkalinized plasma was extracted by isopropanol-*n*-hexane (3:97) and *L*-butefina was used as the internal standard. Enantioresolution was achieved using 2.5% sulfated-β-cyclodextrin as chiral selector in 25 mmol·L⁻¹ triethylammonium phosphate solution (pH 2.5) on the uncoated fused-silica capillary column (70 cm × 50 μm ID). The feasibility of the method to be used as quantitation of E2020 enantiomers in rabbit plasma was also investigated. **Results** E2020 enantiomers were separated at a baseline level under the above condition. The linearity of the response was evaluated in the concentration range from 0.1 to 5 mg·L⁻¹. The linear regression analysis obtained by plotting the peak area ratio (A_2/A_1) of the analyte to the internal standard versus the concentration (C) showed excellent correlation coefficient ($r = 0.9992$ for *R*(-)-E2020, $r = 0.9997$ for *S*(+)-E2020) and the equations were $A_2/A_1 = 0.0242 + 0.2892C$ and $A_2/A_1 = 0.0108 + 0.2737C$, respectively. The low limit of detection was 0.05 mg·L⁻¹. The inter- and intra-day precision (RSD) were all less than 20%. **Conclusion** Compared with CSP by HPLC, the CE method is simple, reliable, inexpensive and suitable for studying the stereoselective pharmacokinetics in rabbits.

Key words: donepezil hydrochloride enantiomers; capillary electrophoresis; sulfated-β-cyclodextrin

盐酸多奈哌齐 (donepezil hydrochloride, E2020) 为新一代中枢乙酰胆碱酯酶抑制剂, 其分子结构中有 1 个手性中心, 一般以外消旋体的形式供临床治

收稿日期: 2005-08-24.

* 通讯作者 Tel: 86-25-83271256,
E-mail: zhangzx@cpu.edu.cn

疗早、中期阿尔茨海默综合征^[1-3]。文献^[4,5]报道的人体药动学研究多为 E2020 的外消旋体。而手性药物反应的靶器官能识别立体异构体,其对映体经常存在不同的药理活性,在体内的吸收、分布、代谢转化和排泄以及药动学方面也常存在显著差异^[6]。因此,一些发达国家对手性药物的申报要求进行对映体拆分和药理活性检测。进口药品注册标准中用手性柱 HPLC 法控制药品中对映体的量。Gotti 等^[7]用毛细管电泳法也只对制剂中的 E2020 进行了测定;虽将羧甲基- β -环糊精和人血清白蛋白作为手性添加剂拆分 E2020 对映体,但未对 R、S 构型定位,也无应用实例。本文应用高效毛细管电泳法,将磺化- β -环糊精作为手性添加剂,实现了 E2020 对映体的拆分,在缺乏对映体对照品的情况下,用手性柱 HPLC 收集了两对映体,确定了对映体的位置并建立了家兔血浆样品中 E2020 对映体的测定方法。与手性柱 HPLC 相比,前者具有高效、简捷、快速、低廉和有机溶剂消耗少等优点。

材料与方 法

仪器 Beckman P/ACE™ MDQ 型毛细管电泳仪(美国 Beckman 公司);含自动进样器、带恒温控制的毛细管卡盒、样品池、高压电源、电极及二极管阵列检测器,32kat 工作站。石英毛细管 70 cm(有效长度 60 cm) \times 50 μ m ID(河北永年光导纤维厂)。岛津 LC-10AT+10A 检测器,Chrom tek 工作站;手性色谱柱:3,5-二甲苯氨基甲酸酯纤维素柱(250 mm \times 4.6 mm ID,10 μ m);Perkin-Elmer 241 旋光仪。

药品与试剂 E2020 对照品(连云港豪森制药有限公司提供,质量分数 99.8%);内标为 L 酒石酸布托啡诺(L-butefina)(连云港恒瑞制药有限公司提供,质量分数 99.9%);磺化- β -环糊精(sulfated- β -CD)(Fluka Chemical Co.); β -环糊精(β -CD)和羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)(均为 Sigma 公司);其他试剂均为分析纯。

实验方法 ① 毛细管电泳法 开机后,毛细管依次用 1 mol \cdot L⁻¹ NaOH 溶液、0.1 mol \cdot L⁻¹ NaOH 溶液、水和缓冲液各冲洗约 5 min;进样前用缓冲液冲洗 2 min,静止平衡 2 min。采用电迁移进样或压力进样方式。分离电压为 -20 kV,分离柱温为 25 $^{\circ}$ C,紫外检测波长为 214 nm。② 血浆样品的处理 取血浆 1 mL,置 10 mL 具塞离心管中,精密加入内标 L 酒石酸布托啡诺溶液(100 μ g \cdot mL⁻¹) 50 μ L,0.1 mol \cdot L⁻¹ NaOH 0.2 mL,涡旋 10 s,精密加

入异丙醇-正己烷(3:97) 5 mL,涡旋 3 min,于 3 500 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min。精密吸取有机相 4 mL,在 40 $^{\circ}$ C 水浴中用氮气吹干。残留物连同离心管置于冰箱中冷藏,待分析。测试时,残渣加稀释 20 倍的背景缓冲液 300 μ L 溶解,离心(1.5 \times 10⁴ r \cdot min⁻¹) 5 min,上层液经 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤,吸取滤液适量用于分析。

结果与讨论

1 HPLC 法测定条件的选择

1.1 缓冲液的影响 分别考察了磷酸二氢钠缓冲液、磷酸二氢钾缓冲液、Tris 磷酸缓冲液和磷酸三乙胺缓冲液的分离效果。结果表明:用磷酸三乙胺作运行缓冲液时,电流值低,基线平稳,迁移时间较短,对映体能良好分离,故选择磷酸三乙胺缓冲液。

增加缓冲液浓度,离子强度增大,明显改变缓冲液的容量,表 1 的结果表明:随着缓冲液浓度的增加,电流值增大,迁移时间延长且分离度增大;缓冲液浓度过大也会引起背景电导增大,灵敏度下降,工作电流增大及噪音增加等负面效应。故选择缓冲液浓度为 25 mmol \cdot L⁻¹。

缓冲液的 pH 值不仅影响电渗流的大小,同时决定待测组分是否带电荷及其有效迁移率的大小。缓冲液 pH 值对手性分离的影响如图 1 所示。结果表明:pH 2.5 时分离度与峰面积均最大。

Table 1 Effect of the concentration of running buffer on the separation of donepezil hydrochloride (E2020)

| Concentration /mmol \cdot L ⁻¹ | Current/ μ A | Migration time /min | R _s |
|---|------------------|---------------------|----------------|
| 5 | -25.3 | 10.42/10.90 | 1.51 |
| 10 | -29.6 | 11.08/11.64 | 2.05 |
| 20 | -32.7 | 12.13/12.87 | 2.52 |
| 25 | -35.2 | 12.75/13.32 | 2.81 |
| 30 | -37.5 | 13.73/14.14 | 2.30 |

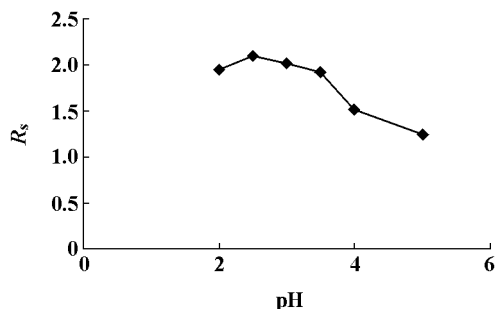


Figure 1 Effect of pH of running buffer on the separation ($n = 5$)

1.2 手性添加剂的影响 分别考察了 β -环糊精、羟丙基- β -环糊精及磺化- β -环糊精等 3 种手性添加剂对 E2020 两对映体的分离效果。

添加 $2.5 \sim 15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ β -环糊精或添加 $10 \sim 32 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 羟丙基- β -环糊精,在正电压条件下,两对映体均未达基线分离。添加磺化- β -环糊精后,由于磺化- β -环糊精带负电,在负电压下(进样端为阴极),使原本向进样端迁移的呈正电性的碱性药物与手性添加剂发生强包络络合作用而改向检测器端(阳极)迁移^[8],使两对映体分离良好。

考察了 $0.5\% \sim 3.0\%$ 磺化- β -环糊精对分离度的影响。随着环糊精浓度的增加,迁移时间变长,分离度相应增大,但当浓度增加到一定值时,对分离度的改善不再明显,反而因电流增大而引起基线不稳。故选择 2.5% 磺化- β -环糊精作为手性添加剂,此时 R_s 为 2.13。手性添加剂浓度的选择对手性分离的影响如表 2 所示。

Table 2 Effect of the concentration of chiral additive on the separation

| Concentration /% | Current / μA | Migration time /min | Area | R_s |
|------------------|-------------------------|---------------------|---------------|-------|
| 0.5 | -29.4 | 10.32/10.74 | 824.11/774.68 | 1.13 |
| 1.0 | -30.3 | 10.55/11.34 | 797.47/762.67 | 1.56 |
| 2.0 | -32.8 | 11.81/11.72 | 757.33/735.62 | 1.97 |
| 2.5 | -34.1 | 11.95/12.23 | 715.43/697.52 | 2.13 |
| 3.0 | -37.4 | 12.42/12.65 | 655.26/628.14 | 2.08 |

1.3 进样方式的选择 考察了气压进样和电迁移进样两种进样方式,调节气压进样的压力和进样时间以及电迁移进样的电压和进样时间,使各自的峰面积最大。结果表明:选择电迁移进样(-20 kV , 15 s)方式,将样品溶解在稀释 20 倍的缓冲液中,具有较强的样品富集效应。

1.4 溶剂的选择 考察了以水、缓冲液、稀释一倍的缓冲液、稀释 20 倍的缓冲液、甲醇缓冲液(1:2)、甲醇缓冲液(2:1)或 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 缓冲液(1:2)为溶剂稀释样品。结果表明:以电迁移为进样方式时,用稀释 20 倍的缓冲液作稀释样品,峰面积最大。根据电堆积原理^[9],将样品溶解在较稀的缓冲液或水中,用电迁移法进样,样品与缓冲液界面两侧存在的场强差使样品堆积。

1.5 分离电压的影响 考察了 -15 、 -20 、 -25 和 -30 kV 等 4 种分离电压对拆分的影响。结果表明:恒温时,随着分离电压升高,一方面离子迁移率

增大,使分离时间缩短,相应地使对映体与手性添加剂间的非对映异构作用减弱,从而降低拆分程度;另一方面,分离电压的升高使分离柱效提高,对映体的峰宽减小,增大分离程度,综合上述两方面的结果,选择 -20 kV 为操作电压。

1.6 毛细管柱温的选择 分别对 15 、 20 、 25 和 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 等 4 种柱温进行试验。结果表明: $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 时更有利于对映体的分离和检测。

1.7 内标物的选择 分别考察了内标物:苯磺酸左氨氯地平、酒石酸右托特罗定及酒石酸左布托啡诺。结果表明:酒石酸左布托啡诺作内标物时,内标与多奈哌齐对映体及血浆中内源性物质分离良好(图 2)。

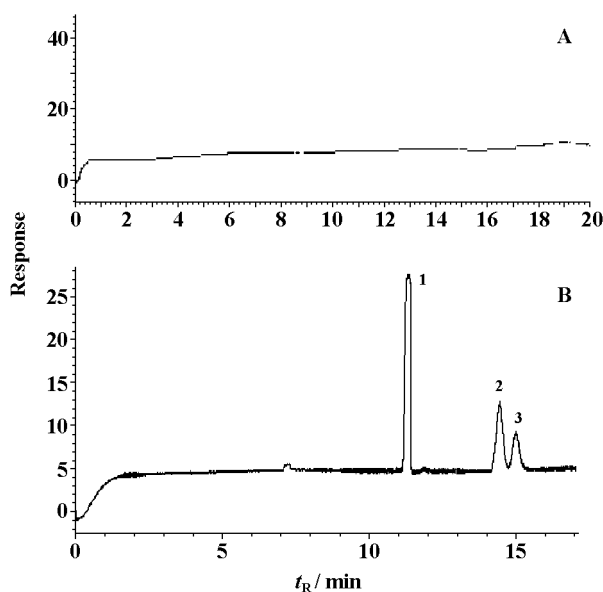


Figure 2 Electropherogram of blank plasma (A), rabbit plasma at 3 hours after ig administration of E2020 (B) under the following conditions: fused-silica capillary column ($70 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m}$ ID); 2.5% sulfated- β -cyclodextrin as chiral selector in $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ triethylammonium phosphate solution ($\text{pH} 2.5$); separation voltage -20 kV ; temperature $25 \text{ }^\circ\text{C}$; voltage injection -20 kV for 15 s ; detection at 210 nm . 1: *L*-butefina; 2: *R*(-)-E2020; 3: *S*(+)-E2020

由此,最终确定以 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸三乙胺($\text{pH} 2.5$)为运行缓冲液, 2.5% 磺化 β -环糊精为手性添加剂,进样电压为 -20 kV ,进样时间 15 s ,运行电压为 -20 kV 。

2 对映体的鉴定

由于缺乏 E2020 对映体的对照品,试验采用文献^[7]报道的手性柱 HPLC 法色谱条件分离 E2020 对映体,测得保留时间分别为 7.72 min 和 8.95 min ,

文献已确定首先出峰的组分为 R-E2020,后出峰的组分为 S-E2020。

通过不断收集两对映体的流份并测定各自的旋光度,以确定其旋光性。结果表明: R-E2020为左旋体, S-E2020为右旋体。

将上述流份中的流动相分别用 N_2 挥干后,测定残渣与 E2020对照品毛细管电泳图谱以确定 HPCE 中对映体的归属。结果表明:第 1 峰为 R(-)-E2020,第 2 峰为 S(+)-E2020。电泳图见图 3。

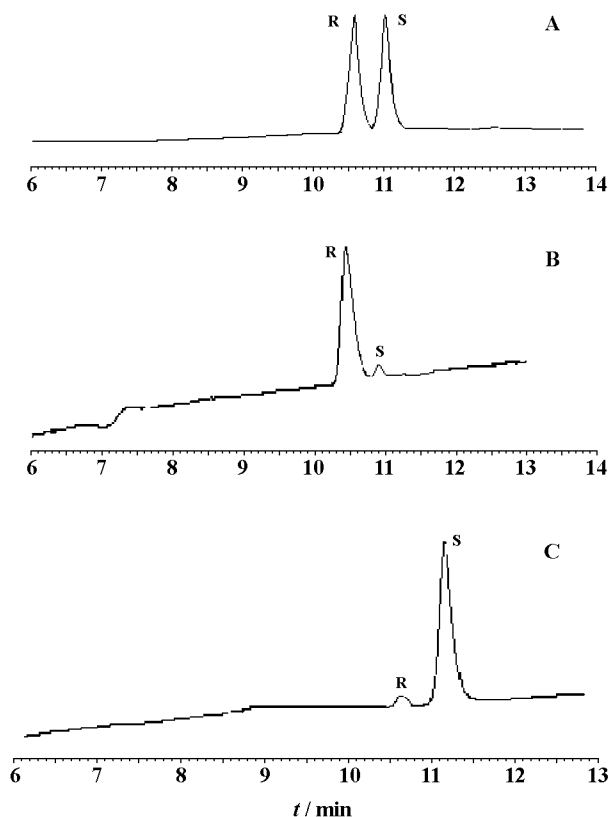


Figure 3 Electropherogram of E2020 racemate (A), R(-)-E2020 (B) and S(+)-E2020 (C) by CE. The conditions are the same as described in Figure 2. R: R(-)-E2020; S: S(+)-E2020

3 血浆样品中 E2020对映体测定

3.1 方法的专属性 在上述电泳条件下,测得家兔给药前和给药后血浆样品添加内标的典型色谱图(图 2)。由图可见内标及空白血浆中的内源性物质均不干扰多奈哌齐两种对映体血药浓度的分析。

3.2 线性关系 分别精密吸取 E2020对照品溶液适量于 6 个具塞离心管中,各精密加入空白血浆 1.0 mL,分别配制含 E2020 为 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 和 10.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的血浆样本,即相当于含 E2020 各对映体 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 和 5 $\mu\text{g} \cdot$

mL^{-1} 的血浆样品。按血浆样品的处理方法项下自“精密加入内标溶液 50 μL ”起同法操作,并进行 HPCE 分析。以 E2020 对映体峰面积 (A_s) 与内标峰面积 (A_i) 的比值 F ($F = A_s / A_i$) 对浓度 (C , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行线性回归,得血浆 5 条平均标准曲线方程。R(-) 多奈哌齐: $F = 0.0242 + 0.2892C$, $r = 0.9992$; S(+) 多奈哌齐: $F = 0.0108 + 0.2737C$, $r = 0.9997$ 。线性范围均为 0.1 ~ 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,定量限均为 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。当 S/N 为 3 时,检测限均为 0.05 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.3 方法回收率 配制含 E2020 低、中和高 3 种不同质量浓度 (0.2, 2 和 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 折算成各对映体质量浓度分别为 0.1, 1, 和 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的血浆样本各 5 份,同上方法进行样品处理,并测定 E2020 对映体和内标的峰面积,由回归方程求得实测量,以实测量与加入量之比计算出方法回收率。低、中和高 3 种不同质量浓度对映体的平均方法回收率: R(-)-E2020 为 97.0%, 98.7% 和 98.4% (RSD 为 7.2%); S(+)-E2020 为 100.0%, 105.4% 和 98.9% (RSD 为 7.1%)。

3.4 提取回收率 配制含 E2020 低、中和高 3 种不同质量浓度 (0.2, 2 和 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的血浆样本各 5 份,同上方法处理样品,用于分析。测定 E2020 两对映体峰面积与内标峰面积的比值 F 。另取低、中和高 3 种浓度的对照品溶液,同法操作,测定盐酸多奈哌齐两对映体峰面积与内标峰面积的比值 F' 。按下式计算提取回收率 ($R\%$), $R\% = F / F' \times 5 / 4 \times 100\%$ 。测得低、中和高 3 种不同质量浓度对映体的平均提取回收率: R(-)-E2020 为 87.9%, 92.9% 和 93.4% (RSD 为 3.5%); S(+)-E2020 为 89.1%, 91.5% 和 93.2% (RSD 为 4.6%)。

3.5 精密度试验 配制含 E2020 低、中和高 3 种不同质量浓度 (0.2, 2 和 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的血浆样本,同上方法进行样品处理,记录 E2020 对映体峰面积 (A_s) 与内标峰面积 (A_i) 的比值,分别测定日内变异和日间变异 ($n = 5$)。低、中、高 3 种浓度的日内精密密度 (RSD): R(-)-E2020 为 10.8%, 6.9% 和 3.9%, S(+)-E2020 为 19.2%, 9.0% 和 2.8%; 日间精密密度 (RSD) R(-)-E2020 为 9.5%, 9.6% 和 2.3%, S(+)-E2020 为 13.0%, 7.3% 和 3.7%。3 种浓度血浆中两对映体的浓度之比的日内精密密度 (RSD): 12.6%, 4.71% 和 4.72%; 日间精密密度 (RSD): 15.35%, 10.17% 和 4.58%。

3.6 稳定性试验 配制一定量的含药血浆及含药

和内标的血浆,分别进行冷冻(-20℃)和冷藏(4℃)放置试验及冻融两次的稳定性试验。结果表明:含药血样经冷冻和冷藏放置均较稳定;冻融两次对样品含量无影响;血样处理吹干后,冷藏放置3d内稳定。

3.7 家兔血浆样品中 E2020对映体的测定 取健康家兔6只,雌雄各半,体重2.1~2.3 kg。给药前禁食12 h,但不禁水。按 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药,自耳缘静脉抽取给药前及给药后1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 24.0和48.0 h的静脉血2 mL,置于含肝素的试管中,离心后分离血浆,于-20℃冷冻保存备用。用上述方法分离测定的E2020两对映体平均血药浓度经时过程曲线见图4。

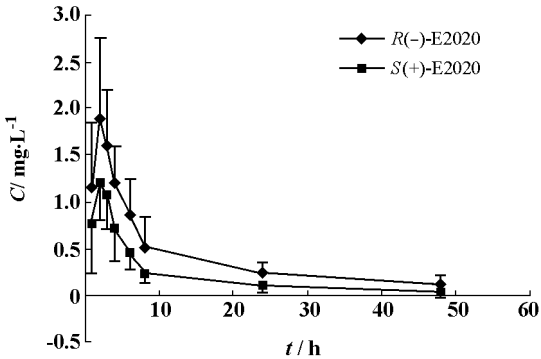


Figure 4 Mean plasma concentration-time curve of E2020 enantiomers after a single oral dose ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) of E2020 in six rabbits

结论

以磺化-β-环糊精作为手性添加剂的高效毛细管电泳法和3,5-二甲苯氨基甲酸酯纤维素为填料的手性柱法均可实现E2020对映体的拆分,手性柱HPLC法具有特异性强,灵敏度高等优点,但价格昂贵。而高效毛细管电泳具有高效、快速、灵敏和经济等优点,在家兔血浆样品测定方法学评价中线性良

好,精密度高及重现性好,可满足家兔血浆样品的测定和药动力学研究。

References

- [1] Mihara M, Ohnishi A, Tomono Y, et al. Pharmacokinetics of E2020, a new compound for Alzheimer's disease, in healthy male volunteers [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*, 1993, 31: 223 - 229.
- [2] Rho JP, Lipson LG. Focus on donepezil: a reversible acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Formulary*, 1997, 32: 677 - 678.
- [3] Rogers SL, Doody RS, Mohs RC, et al. Donepezil improves cognition and global function in Alzheimer disease: a 15-week, double-blind, placebo-controlled study [J]. *Arch Intern Med*, 1998, 158: 1021 - 1031.
- [4] Lu YH, Wen HM, Li W, et al. Determination of donepezil in human plasma by HPLC-MS [J]. *Acta Pharm Sin (药学学报)*, 2003, 38: 203 - 206.
- [5] Lu YH, Wen HM, Li W, et al. Determination of donepezil hydrochloride (E2020) in plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application to pharmacokinetic studies in healthy Chinese young subjects [J]. *J Chromatogr Sci*, 2004, 42: 234 - 237.
- [6] Mehvar R, Jamali F. Bioequivalence of chiral drugs. Stereospecific versus non-stereospecific methods [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1997, 33: 122 - 128.
- [7] Gotti R, Cavrini V, Pomponio R, et al. Analysis and enantioresolution of donepezil by capillary electrophoresis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2001, 24: 863 - 870.
- [8] Zhang K, Zhang ZC, Wang QS, et al. Enantioseparation of six drugs by capillary zone electrophoresis using cyclodextrins as chiral additives [J]. *Clin Pharm J (中国药学杂志)*, 2002, 37: 52 - 54.
- [9] Zhang CX, Thomann W. Head-column field-amplified sample stacking in binary system capillary electrophoresis. 2. Optimization with a preinjection plug and application to micellar electrokinetic chromatography [J]. *Anal Chem*, 1998, 70: 540 - 548.