

正相液相色谱-串联质谱法分离普萘洛尔对映体

张娟红^{1,2}, 王 荣^{1,2*}, 谢 华¹, 孟宪栋¹, 贾正平^{1,2*},
马 骏¹, 张军莉¹, 王 娟¹

(1. 兰州军区兰州总医院全军临床药理基地, 甘肃 兰州 730050; 2. 兰州大学药学院, 甘肃 兰州 730000)

摘要 :建立正相液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分离普萘洛尔对映体的方法,并用于盐酸普萘洛尔片对映体含量测定。样品使用甲醇进行简单提取,采用 Chiralcel OD-H 手性柱,以正己烷-乙醇-氨水(70:30:0.4, v/v/v)为流动相,流速为 0.4 mL/min。在正离子模式下,通过电喷雾离子化(ESI⁺),采用多反应监测(MRM)方式进行检测,用于定量分析检测的离子对为 m/z 260.2→116.0,在 20 min 内完成普萘洛尔对映体定量分析。盐酸普萘洛尔对映体在 2.5~1 000 μg/L 质量浓度范围内线性关系良好,定量限为 2.5 μg/L;日内及日间测定的相对标准偏差小于 2.64%。两种对映体的加样回收率范围分别为 99.08%~102.58% 和 100.21%~103.16%。该方法准确、简便、可靠、有效,可用于盐酸普萘洛尔片对映体的质量控制。

关键词 :正相液相色谱-串联质谱;手性分离;测定;普萘洛尔对映体

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2011)01-0026-05

Enantiomeric separation of propranolol by normal phase chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry

ZHANG Juanhong^{1,2}, WANG Rong^{1,2*}, XIE Hua¹, MENG Xiandong¹,
JIA Zhengping^{1,2*}, MA Jun¹, ZHANG Junli¹, WANG Juan¹

(1. Base for Clinical Pharmacology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Region, Lanzhou 730050, China; 2. Pharmacy College, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract : A rapid and sensitive method was developed and validated using a normal phase liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for determination of propranolol enantiomers in pharmaceuticals. Sample preparation involved a single extraction step by the addition of methanol. Separation of propranolol enantiomers was achieved on a Chiralcel OD-H chiral column using a mobile phase consisting of *n*-hexane-ethanol-ammonia (70:30:0.4, v/v/v), and the flow rate was 0.40 mL/min for 20 min. The analyte was monitored by tandem mass spectrometry with electrospray positive ionization in multiple reaction monitoring (MRM) mode, using the transitions of m/z 260.2→116.0. Propranolol enantiomers can be completely separated. The linear range was 2.5–1 000 μg/L, and the limit of quantification (LOQ) was 2.5 μg/L. The values for within day and between day precisions and accuracies were well within the generally accepted criteria for analytical methods. The relative standard deviations (RSDs) were less than 2.64%, and the recoveries of the two enantiomers were 99.08%–102.58% and 100.21%–103.16%, respectively. The separation method is accurate, convenient, reliable, efficient, and can be subsequently used for quality control of propranolol enantiomers in pharmaceuticals.

Key words : normal phase liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); chiral separation; determination; propranolol enantiomers

* 通讯联系人:王 荣,教授,主要研究方向为手性药物分析及体内药物分析. E-mail: wangrong-69@163.com.

贾正平,教授,博士生导师,主要研究方向为手性药物分析及分子药理学. E-mail: 13919768606@163.com.

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 20775089)和甘肃省科技支撑计划项目(No. 1011FKCA144).

收稿日期:2010-09-10

手性药物的立体结构与其生物活性有着密切的关系,通常一种对映体具有良好的生物活性,另一种活性很弱或没有活性,甚至还有毒副作用。因此手性药物拆分近年来已引起人们的广泛关注。手性药物的对映体进入生物体内,将被手性环境(如酶、蛋白质、受体等)作为不同的分子加以识别匹配,因此,在药效学、药物动力学和毒理学方面存在对映体选择性作用^[1]。当前手性药物的研究已成为国际新药研究的主要方向之一。

普萘洛尔(*propranolol*)作为一种重要的 β -肾上腺受体阻断剂,广泛应用于临床治疗心律失常及抗高血压。普萘洛尔有*R*型和*S*型两种光学异构体,这两种对映体在生物体内主要经细胞色素 P450 代谢,并存在立体选择性差异^[2]。动物实验表明,*S*型对映体 β -受体阻断作用要比*R*型强约 100 倍,且在血液中有更长的半衰期^[3]。而*R*型普萘洛尔具有抑制性欲作用,是一种男性避孕药^[4]。但在临床上普萘洛尔一直是以外消旋体方式供药。由于两种异构体的活性差别很大,使得普萘洛尔对映体的分离具有重要的意义。关于其分离测定方法较多,主要有紫外分光光度法(UV)^[5]、高效液相色谱法(HPLC)^[6-8]、毛细管电泳法(CE)^[9-13]。也有采用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)分离分析废水^[14,15]及生物样品^[16-19]中普萘洛尔对映体的报道。以 Chiralcel OD-H 为手性柱的 LC-MS/MS 分离分析药物制剂中普萘洛尔单一对映体方法尚未见文献报道,更主要的是 Chiralcel OD-H 与反相手性柱相比具有寿命长、分离碱性化合物效果好等优点。本实验采用 LC-MS/MS 法建立了正相分离普萘洛尔对映体的方法,并测定了不同厂家普萘洛尔制剂中单一对映体和实验室自己制备的普萘洛尔对映体,为药物制剂的质量控制与检测提供了一种准确、简便、可靠、快速、有效的方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

UFLC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司);API 3200 三重四极杆串联质谱仪(美国 Applied Biosystems 公司);超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);涡旋混匀器(浙江金坛市金城教学仪器厂)等。

正己烷、乙醇均为色谱纯(美国 Fisher 公司),氨水为分析纯(北京化工厂);盐酸普萘洛尔标准品(批号:100783-200401,中国药品生物制品检定所);6 个不同厂家盐酸普萘洛尔片(批号分别为:

A090701、0808011、090601、20091103、090301、1003155,市售);*R*型普萘洛尔和*S*型普萘洛尔两种对映体为实验室自制。

1.2 色谱条件

色谱柱:Chiralcel OD-H 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m,兰州中科安泰分析科技有限责任公司);流动相:正己烷-乙醇-氨水(70:30:0.4, v/v/v);洗脱方式:等度洗脱;流速:0.40 mL/min;进样量:10 μ L。

1.3 质谱条件

离子源:电喷雾离子源(ESI);扫描方式:正离子模式;检测方式:多反应监测模式(MRM);喷雾电压(IS):4 000 V;雾化温度(TEM):380 $^{\circ}$ C;普萘洛尔定量离子对 m/z 260.2 \rightarrow 116.0,碰撞诱导解离电压(DP):32 V;碰撞能量(CE):35 eV。

1.4 标准溶液的配制

精密称取盐酸普萘洛尔标准品 0.002 0 g 于 10 mL 容量瓶,用甲醇溶解并定容,得 200 mg/L 盐酸普萘洛尔标准溶液作为储备液。将储备液依次用甲醇稀释成质量浓度为 5、10、25、50、100、250、500、1 000、2 000 μ g/L 的系列标准溶液。

1.5 供试品溶液的制备

取盐酸普萘洛尔片 20 片,精密称定,研细,精密称取适量(含盐酸普萘洛尔 20 mg),置 100 mL 容量瓶中,加水 2 mL,振摇 5 min,用甲醇稀释至刻度,摇匀,过滤,精密量取续滤液 5 mL 置 50 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得供试品储备液。取供试品储备液 500 μ L 于 1.5 mL 离心管,加甲醇 500 μ L,得供试待测溶液。

精密称取实验室自制*R*型和*S*型普萘洛尔各 0.001 0 g 于 10 mL 容量瓶,用甲醇溶解并定容,得 100 mg/L *R*型、*S*型普萘洛尔两种储备液。将储备液用甲醇稀释成质量浓度为 1 mg/L 的自制*R*型和*S*型普萘洛尔待测溶液。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

选用 1.0 mg/L 普萘洛尔标准品溶液进行质谱条件的选择,以 ESI⁺ 作为电离模式,分别对 IS、DP、TEM、CE 等质谱参数进行了优化。在质谱扫描以及 MRM 中只有对这些参数进行细致的优化,才能得到最佳条件和检测离子对。在最佳条件下主要生成 $[M + H]^+$ 离子峰 m/z 260.2 (见图 1a)。选择性对 $[M + H]^+$ 离子进行产物离子质谱分析得相应的二级扫描质谱图(见图 1b)。

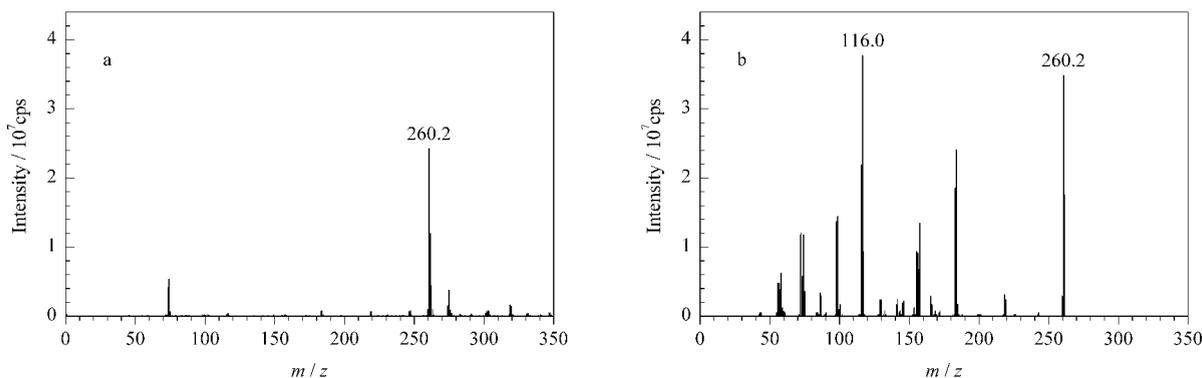


图 1 普萘洛尔的(a)母离子和(b)碎片离子质谱图

Fig. 1 MS/MS spectra of (a) parent ion and (b) fragment ion of propranolol

2.2 色谱条件的选择

当流动相氨水的浓度(用体积分数表示)由 0.1% 增大到 0.4% 时,普萘洛尔对映体的分离效果逐渐增大;当进一步增大氨水的浓度时,分离效果反而有所下降。当氨水的浓度固定时,通过改变正己烷和乙醇的体积比,考察了其对分离效果和保留时间的影响。实验结果表明,随着正己烷含量的增加,普萘洛尔对映体的分离度有所增加,保留时间相应延长。在本实验体系条件下,综合考虑分离效果、响应值和分析时间,当使用正己烷-乙醇-氨水(70:30:0.4, v/v/v)时普萘洛尔对映体的分离效果最好,已

达基线分离,分离度大于 2。说明流动相中正己烷和乙醇含量的大小对拆分效率产生不可忽视的影响。另外,在固定相和流动相组成一定的条件下,流速是影响色谱分离行为的另一重要参数,通过优选流动相流速,可以获得最大分离度。当流动相流速为 0.40 mL/min 时,普萘洛尔对映体出峰效果比较好,同时比较稳定。

2.3 方法的专属性

在上述色谱条件下,分别取空白溶液、标准品溶液与供试待测溶液进行测定,得到特征峰,结果表明,辅料对测定无干扰(见图 2)。

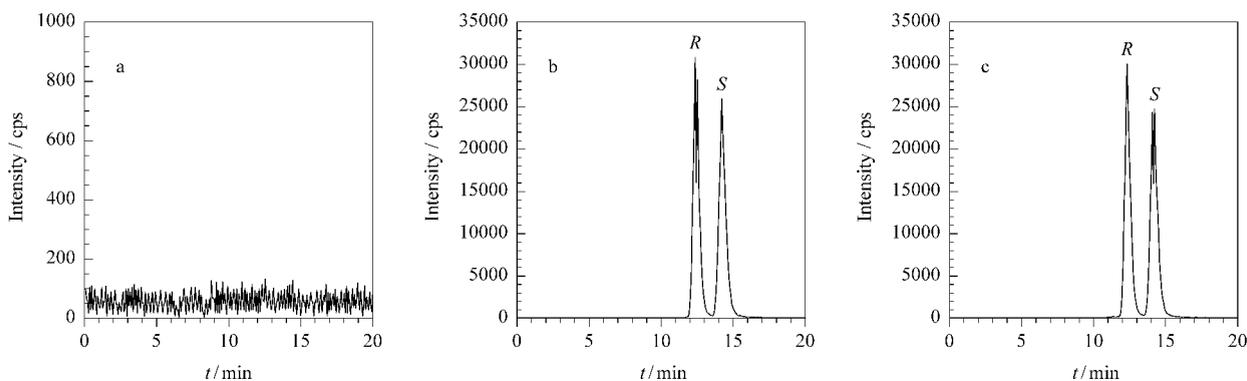


图 2 普萘洛尔的典型 LC-MS/MS 谱图

Fig. 2 Representative LC-MS/MS chromatograms of propranolol

a. blank solvent; b. blank solvent spiked with standard propranolol hydrochloride; c. propranolol hydrochloride tablet.

2.4 标准曲线

将 1.4 节所制备的普萘洛尔系列标准溶液进行 LC-MS/MS 分析,以质量浓度($\mu\text{g/L}$)为横坐标 X ,普萘洛尔峰面积为纵坐标 Y 进行线性回归, R 型和 S 型普萘洛尔标准曲线分别为 $Y_R = 957X_R + 320$ ($r = 0.9998$)和 $Y_S = 942X_S + 464$ ($r = 0.9998$)。结果表明两种普萘洛尔对映体在 2.5 ~ 1000 $\mu\text{g/L}$ 范围内有良好的线性关系。普洛奈尔对映体的定量限为 2.5 $\mu\text{g/L}$ 。

2.5 精密度试验

取一定量的盐酸普萘洛尔储备溶液,用甲醇稀释,得到普萘洛尔两种对映体质量浓度分别为 5、500、850 $\mu\text{g/L}$ 的质量控制(QC)样品各 5 份,进行 LC-MS/MS 分析,计算得到日内测定值的相对标准偏差(RSD)。取上述质量浓度的 QC 样品连续测定 3 d,得到日间 RSD,结果见表 1。日内和日间测定值的 RSD 均小于 2.64%,符合药物制剂分析的方法学要求。

表 1 普萘洛尔对映体精密度试验结果

ρ (Propranolol) / ($\mu\text{g/L}$)	<i>R</i> -Propranolol/%		<i>S</i> -Propranolol/%	
	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
	($n=5$)	($n=3$)	($n=5$)	($n=3$)
5	1.90	1.98	2.59	2.64
500	0.65	0.73	0.51	0.60
850	0.95	1.01	0.98	1.10

2.6 重现性试验

精密称取同一批次盐酸普萘洛尔片剂 5 份,按 1.5 节所述步骤平行制备 5 份供试品溶液,进行 LC-MS/MS 分析,*R* 型、*S* 型普萘洛尔的 RSD 分别为 0.92%、1.03%。结果显示本方法有较好的重现性。

2.7 回收率试验

取已知含量的普萘洛尔供试品待测溶液 0.5 mL,分别加入质量浓度为 5、500、850 $\mu\text{g/L}$ 的普萘洛尔标准溶液 0.5 mL,涡旋混匀后进行 LC-MS/MS 分析,计算回收率。结果上述供试品中普萘洛尔两种对映体的回收率分别为 99.08% ~ 102.58% 和 100.21% ~ 103.16%,RSD 均小于 1.40%。

2.8 稳定性试验

取同一份供试品溶液,分别于配制后放置 0、2、6、12、24 h 进行 LC-MS/MS 分析。*R* 型普萘洛尔峰面积的 RSD 为 1.87%;*S* 型普萘洛尔的 RSD 为 1.94%。结果表明供试品溶液于室温下放置 24 h 后状态稳定。

2.9 实际样品及自制 *R* 型、*S* 型对映体测定

按 1.5 节所述方法制备 6 种不同厂家的普萘洛尔供试待测溶液,在上述条件下进行 LC-MS/MS 分析,测定各厂家普萘洛尔片中各对映体的含量,得到每种对映体占标示量的百分数。结果见表 2。

表 2 普萘洛尔对映体含量测定结果($n=3$)

Sample	Lot number	Labeled amount/ (mg/tablet)	Actual amount/%	
			<i>R</i> -Propranolol	<i>S</i> -Propranolol
1	A090701	10	103.47	102.27
2	0808011	10	105.07	106.00
3	090601	10	104.33	105.22
4	20091103	10	102.07	101.40
5	090301	10	100.80	99.80
6	1003155	10	105.13	107.13

取自制 *R* 型和 *S* 型普萘洛尔待测贮备溶液于进样瓶,在上述已确定的 LC-MS/MS 条件下进行分析测定,单一对映体的色谱图见图 3。测定自制 *R* 型和 *S* 型普萘洛尔对映体的含量,结果分别为 91.40% 和 90.32%。

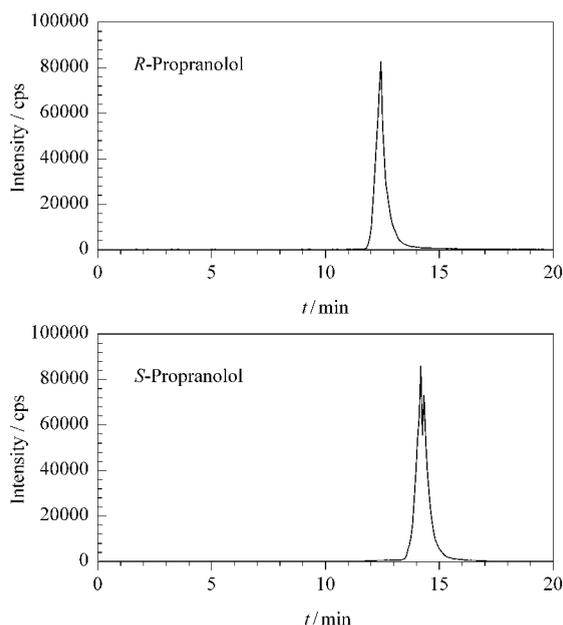


图 3 自制普萘洛尔对映体的 LC-MS/MS 谱图
Fig. 3 Representative LC-MS/MS chromatograms of self-prepared propranolol enantiomers

3 结论

本实验所述方法具有简单、可靠的优点,并且回收率良好,分离度较高,辅料未见干扰。检测结果发现,同一制剂中两种对映体含量有所不同,且不同厂家的两种对映体含量也有一定差异;自制两种普萘洛尔对映体的含量均偏低($<98\%$),待进一步纯化,故建立以普萘洛尔手性单一对映体为质量控制对象的 LC-MS/MS 方法有重要意义。与 UV 法相比,本方法更加准确、专属性好、减少了操作误差,且取样量少,适用于片剂中的普萘洛尔对映体含量测定及普萘洛尔单一对映体纯度的检查。

参考文献:

- [1] Zheng H. Medicinal Chemistry. Beijing: People's Medical Publishing House (郑虎, 药物化学. 北京: 人民卫生出版社), 1979: 206
- [2] Li X, Zeng S. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology (李新, 曾苏. 中国药理学与毒理学杂志), 1999, 13 (1): 53
- [3] Fillet M, Bechet I, Chiap P, et al. J Chromatogr A, 1995, 717(1/2): 203
- [4] Zhou H J, Gu Z P. Reproduction & Contraception (周慧君, 顾芝萍. 生殖与避孕), 1996, 16(1): 49
- [5] Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China. Part 1. Beijing: Chemical Industry Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部. 北京: 化学工业出版社), 2005: 683
- [6] Gasparrini F, Cancelliere G, Ciogli A, et al. J Chromatogr A, 2008, 1191: 205

- [7] D 'Orazio G , Aturki Z , Cristalli M , et al. *J Chromatogr A* , 2005 , 1081 : 105
- [8] Hoffmann C V , Laemmerhofer M , Lindner W. *J Chromatogr A* , 2007 , 1161 : 242
- [9] Du Y X , Taga A , Suzuki S , et al. *J Chromatogr A* , 2002 , 947(2) : 287
- [10] Zhao X Z , Zhang X W , Zhang S S. *Anal Biochem* , 2009 , 387 : 171
- [11] Servais A C , Fillet M , Chiap P , et al. *J Chromatogr A* , 2005 , 1068 : 143
- [12] Chu Y B , Jiang W Q , Cui F X , et al. *Chinese Journal of Chromatography* (初永宝 , 蒋文强 , 崔凤霞 , 等. 色谱) , 2003 , 21(2) : 138
- [13] Ding G S , Tang A N. *Chinese Journal of Chromatography* (丁国生 , 唐安娜. 色谱) , 2006 , 24(4) : 402
- [14] Nikolai L N , McClure E L , MacLeod S L , et al. *J Chromatogr A* , 2006 , 1131 : 103
- [15] MacLeod S L , Sudhir P , Wong C S. *J Chromatogr A* , 2007 , 1170 : 23
- [16] Jensen B P , Sharp C F , Gardiner S J , et al. *J Chromatogr B* , 2008 , 865 : 48
- [17] Siluk D , Mager D E , Gronich N , et al. *J Chromatogr B* , 2007 , 859 : 213
- [18] Chen J W , Hsieh Y S , Cook J , et al. *Anal Chem* , 2006 , 78 : 1212
- [19] Xia Y Q , Bakhtiar R , Franklin R B. *J Chromatogr B* , 2003 , 788 : 317