

HPLC-ESI-MS测定人血浆中多奈哌齐的浓度

胡锦涛^{1,2}, 程晓华¹, 熊玉卿^{2*} (1. 南昌大学第一附属医院, 南昌 330006; 2. 南昌大学医学院临床药理研究所, 南昌 330006)

摘要:目的 建立快速、灵敏的HPLC-MS检测方法测定人血浆中多奈哌齐浓度。方法 以马来酸氯苯那敏为内标, 待测血浆经碱化处理后, 经乙酸乙酯进行液-液萃取, 采用Shim-pack ODS C₁₈柱(250 mm×2.0 mm, 5 μm), 以甲醇-0.1%醋酸溶液(60:40)为流动相, 流速0.2 mL·min⁻¹, 柱温35 ℃。采用质谱电喷雾离子源正源(ESI⁺)将样品离子化, 选择性离子监测(SIM)准分子离子峰。结果 多奈哌齐在0.1~16.0 ng·mL⁻¹内线性关系良好($r=0.999\ 8$), 最低定量限为0.1 ng·mL⁻¹。方法回收率为92.5%~105.3%, 提取回收率均大于75%, 批内与批间RSD均小于10%。结论 该方法简单, 快速、灵敏度高、专属性强, 适用于人血浆中多奈哌齐浓度的测定及药动学研究。

关键词: 多奈哌齐; HPLC-ESI-MS; 血药浓度

中图分类号: R917.101;R969.11

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2009)08-0670-04

Determination of Donepezil in Human Plasma by HPLC-ESI-MS

HU Jinfang^{1,2}, CHENG Xiaohua¹, XIONG Yuqing^{2*} (1. The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2. Institute of Clinical Pharmacology, Medical College of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC-MS method for the determination of donepezil in human plasma. **METHODS** Alkalized plasma was extracted with ethyl acetate and chlorphenamine maleate was used as internal standard. Solutes were separated on a Shim-pack ODS C₁₈ column(250 mm×2.0 mm, 5 μm)with a mobile phase of methanol-0.1%acetate buffer (60:40). The flow rate was 0.2 mL·min⁻¹ and column was used with temperature of 35 ℃. Donepezil and internal standard were ionized in the eletrospray ionization (ESI) with positive source of the mass spectrometer and detected in selected

作者简介: 胡锦涛, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: 13970922003 E-mail: howye@163.com *通信作者: 熊玉卿, 女, 教授, 博导
Tel: (0791)6360654 E-mail: xyq1126@yahoo.com.cn

ionization monitor (SIM) mode. **RESULTS** The calibration curve was linear in the range of 0.1-16.0 ng·mL⁻¹ ($r=0.9998$) with the lower limit of quantitation, accuracy was within 92.5%-105.3%. The recovery of the extraction was more than 75%, intra- and inter-batch precision (RSD) were less than 10%. **CONCLUSION** The method is proved to be suitable for pharmacokinetics and determination of donepezil in human plasma with simple, quickness, sensitive and specificity. **KEY WORDS:** donepezil; HPLC-ESI-MS; plasma concentration of drug

多奈哌齐(donepezil)为新一代中枢乙酰胆碱酯酶(AchE)抑制剂,能够增加大脑乙酰胆碱含量,因其半衰期长,不良反应较小,是目前治疗早、中期阿尔茨海默症的有效药物^[1]。近年来,有关多奈哌齐血药浓度的方法多为HPLC紫外检测^[2-3],但由于该药的口服剂量很小,体内血药浓度很低,因此除对所采用仪器试剂及样品处理等要求较高外,却仍很难达到最低检测限要求。当前,检测灵敏度较高的HPLC-MS用于血药浓度较低的含量测定被广泛采用,本试验在参考有关文献^[4-5]的基础上对该方法学进行改进,建立了一种能快速、灵敏以及专属性强的人血浆中多奈哌齐HPLC-MS测定法,并成功应用于其相对生物利用度及药动学的研究。

1 仪器与试剂

岛津LCMS-2010EV 高效液相色谱-质谱联用仪(日本岛津公司),包括CBM-20A系统控制器,LC-20AB双泵,SIL-20A自动进样器,CTO-20A柱温箱,电磁切换阀,LCMSsolution色谱工作站;XW-80A旋涡混匀器(上海第二医科大学);N-EVAP 112 干浴氮吹仪(美国);Anke LXJ-II大容量多管离心机(上海安亭);Sigma 3K30台式超高速冷冻离心机(德国Sigma公司)。

多奈哌齐对照品(含量99.2%,批号:060915),由广东东阳光药业有限公司提供;内标马来酸氯苯那敏对照品(含量99.8%,批号:060418)购自中国药品生物制品检定所。甲醇(色谱纯),乙酸乙酯,Merck公司生产;其余试剂均为市售分析纯。

2 方法

2.1 检测条件

色谱条件:流动相:甲醇-0.1%醋酸溶液(60:40),流速:0.2 mL·min⁻¹,分析柱:Shim-Pack ODS C₁₈(250 mm×2.0 mm, 5 μm);柱温:35 °C。

质谱条件:选择性离子检测(SIM);电喷雾离子化(ESI);离子极性:正离子(Positive);检测离子选择:多奈哌齐, $[M+H]^+ m/z$: 380;马来酸氯苯那敏, $[M+H]^+ m/z$: 275;雾化气流速1.5 L·min⁻¹;干燥气流量:8.0 L·min⁻¹,检测电压1.65 kV;曲形脱溶剂装置温度:250 °C;加热块温度:200 °C。

2.2 血浆样品的处理

取1.0 mL血浆,精密加入20 μL内标(马来酸氯苯那敏, 8.0 ng·mL⁻¹),并加入500 μL 0.1 mol·L⁻¹ Na₂CO₃溶液以碱化样品,混匀后加5.0 mL乙酸乙酯,振荡3 min,4 500 r·min⁻¹离心5 min,取上清液4.0 mL,置50 °C干浴锅中氮气挥干,以0.1 mL甲醇溶解残渣,再经18 000 r·min⁻¹离心10 min后,取10 μL进样,用峰面积进行定量分析。

2.3 方法专属性

在本实验条件下,多奈哌齐及内标有较大的质谱响应,并与血浆中内源性杂峰有良好的分离度,干扰样品峰的测定,基线噪音小,多奈哌齐、内标的保留时间分别约为2.3、2.4 min,见图1。本方法具有较高的专属性,在此条件下所测得的结果能代表多奈哌齐浓度。

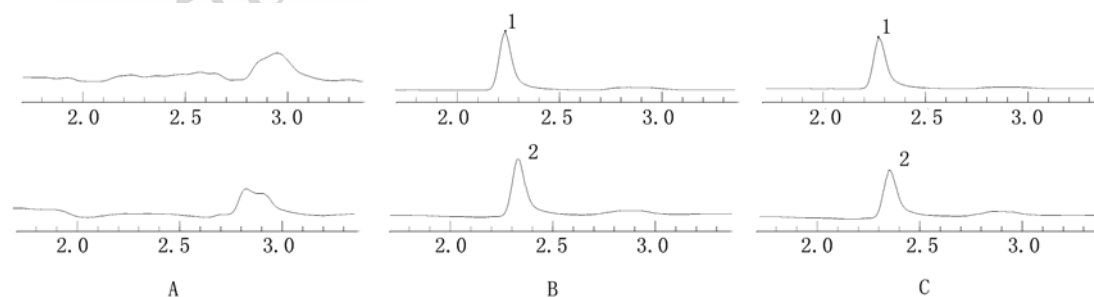


图1 人血浆中多奈哌齐典型色谱图

A-空白血浆; B-空白血浆加入多奈哌齐及内标; C-健康受试者口服5 mg多奈哌齐4 h后血浆样品; 1-多奈哌齐; 2-马来酸氯苯那敏(内标)

Fig 1 Typical chromatograms of donepezil in human plasma

A-blank plasma; B-blank plasma spiked with donepezil and internal standard; C-plasma sample from a healthy volunteer, 4 h after oral administration of 5 mg donepezil; 1-donepezil; 2-chlorphenamine maleate(internal standard)

2.4 线性范围和定量限

取空白血浆1.0 mL,加不同量的多奈哌齐对照品贮备液,使其浓度分别为0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 ng·mL⁻¹,按“2.2”项下操作,记录样品和内标峰面积,利用样品浓度 C 对样品与内标峰面积比 R 作直线回归,得回归方程 $R=0.3397C+0.0811$, $r=0.9998$,线性范围0.1~16 ng·mL⁻¹,定量下限为0.1 ng·mL⁻¹。

2.5 回收率与精密度试验

取空白血浆1.0 mL,配制含多奈哌齐浓度分别为0.2, 1.0, 4.0 ng·mL⁻¹的血浆样品各5份,按“2.2”项下处理后进样分析,每日测定5份,连续测定3 d,以每1天内测得的各浓度计算批内RSD,不同日内测定的各浓度计算批间RSD,以同样浓度下各样品与内标峰面积比值除以样品直接进样所得样品峰面积与内标的比值计算提取回收率。结果见表1。结果表明批内、批间RSD均<10%,方法学符合测定要求。

表1 回收率与精密度试验结果($n=5$)

加入浓度 /ng·mL ⁻¹	提取回收率 /%	方法回收率 /%	精密度	
			批内 RSD/%	批间 RSD/%
0.2	76.21	105.28	5.43	6.83
1.0	83.41	92.50	6.67	9.65
4.0	79.27	101.33	4.73	5.54

2.6 介质效应

分别取多奈哌齐对照品贮备液适量于离心管中,用甲醇配成浓度为0.2, 1.0, 4.0 ng·mL⁻¹的溶液各10份,每份1.0 mL,置50 °C干浴锅中氮气挥干,其中5份以甲醇100 μ L溶解残渣,吸取10 μ L进行分析,记录样品及内标峰面积 A_s 。另外5份以1.0 mL空白血浆提取后的100 μ L甲醇复溶溶液溶解残渣,吸取10 μ L 进行分析,记录样品及内标峰面积的峰面积 A_x 。介质效应 $ME(\%)=A_x/A_s \times 100\%$,若 ME 值大于85%或小于115%,则表明无介质效应,否则即表明有介质效应干扰测定。实验结果显示多奈哌齐在0.2, 1.0, 4.0 ng·mL⁻¹种浓度水平的 ME 平均值分别为(107.8 $\pm$ 3.2)%、(101.7 $\pm$ 4.2)%、(99.8 $\pm$ 2.5)%,内标 ME 平均值(106.3 $\pm$ 2.7)%。该结果表明采用本实验建立的血样测定方法,多奈哌齐及内标的测定不受介质效应干扰。

2.7 稳定性考察

精密配制0.2, 1.0, 4.0 ng·mL⁻¹3种浓度的对照品血样,分别进行血浆室温放置6 h、反复冻融3次、

血浆样品处理后自动进样器内放置12 h以及-20 °C冷冻保存30 d的稳定性考察,试验结果表明,在上述处理储存条件下样品稳定性良好。

2.8 人体内血浆药物浓度

20名健康男性志愿者口服5 mg盐酸多奈哌齐片后于服药前和服药后1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0, 48.0, 72.0, 96.0, 120.0, 168, 216.0 h采集上肢静脉血4 mL到抗凝试管中,离心分离血浆于-20 °C冷冻保存备用,采用上述方法处理后测定多奈哌齐平均血药浓度-时间曲线见图2。

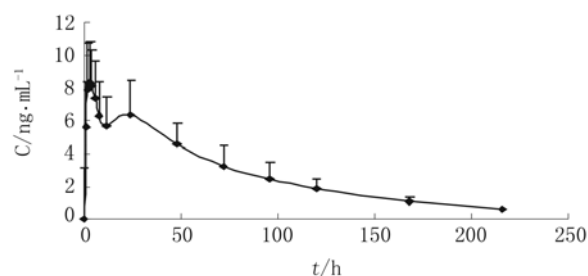


图2 20名受试者单剂量口服5 mg多奈哌齐片后血浆中药物平均浓度-时间曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of donepezil after a single oral dose of 5 mg donepezil tablets in 20 volunteers

3 讨论

多奈哌齐为非极性化合物,呈弱碱性。因此,在血浆处理过程中加入 Na_2CO_3 进行碱化处理,使多奈哌齐在碱化后血浆中呈分子状态,从而有利于有机溶剂的提取,提高其萃取回收率。本试验采用经典的液-液萃取方法,曾试用乙醚、乙酸乙酯、正己烷-异丙醇(95:5)分别对碱化预处理后血浆中多奈哌齐进行提取。最后发现经乙酸乙酯提取的碱化预处理后血浆,操作过程标准统一,提取后的样品纯净,基线噪音低,回收率高,且操作简便快速,成本较低。

由于HPLC-MS较容易受介质效应影响,样品处理时应尽可能净化,故同相关文献所报道的HPLC-MS相比^[4-5],本试验采用18 000 r·min⁻¹对复溶后样品进行离心,同时采用电磁切换阀进行柱后切换的方法,将不需要的时间段流动相从旁路通过,直接排入废液池,尽可能减少检测器样品杂质的累积,从而减少样品杂质对离子源的污染,保持试验方法的高灵敏性,并定时清洗离子化室,有效减少介质效应,现有文献未见这方面报道。

流动相由简单的甲醇-醋酸溶液组成,内标法测定,减少了试验中的检测误差。整个分析处理过

程的操作简便快速,成本较低,单份样品分析耗时很短,且方法学结果表明试验方法精密度和回收率较高,专属性强,较适用于大批样本量的分析。

REFERENCES

- [1] RHO J P, LIPSON L G. Focus on donepezil: a reversible acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease [J]. Formulary, 1997, 32 (7):677-678.
- [2] YASUI-FURUKORI N, FURUYA R, TAKAHATA T, et al. Determination of donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor, in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection [J]. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci, 2002, 768(2):261-263.
- [3] PAPPA H, FARRU R, VILANOVA P O, et al. A new HPLC method to determine donepezil hydrochloride in tablets [J]. J Pharm Biomed Anal, 2002, 27(1-2):177-181.
- [4] LU YH, WEN H M, LI W, et al. Determination of donepezil in human plasma by HPLC-MS [J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 2003, 38(3): 203-205.
- [5] DING L, HAO XY, LI LM. Quantitation of donepezil in human plasma by HPLC-MS [J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 2004, 35(1): 36-38.

收稿日期: 2008-08-25