

HPLC-MS(TOF)法测定人血浆中多奈哌齐的浓度

陆益红¹, 文红梅², 李伟², 池玉梅², 张正行^{3*}

(1. 江苏省药品检验所, 江苏南京 210008; 2. 南京中医药大学, 江苏南京 210029; 3. 中国药科大学, 江苏南京 210009)

摘要: 目的 建立测定人血浆中多奈哌齐的 HPLC-MS(TOF)法。方法 血浆中加入内标氯雷他定后经碱化以异丙醇-正己烷(3:97)提取血浆样品,用 LC/MS(TOF)联用技术,以电喷雾(ESI)作为接口技术,选择多奈哌齐的准分子离子($[M+H]^+$, m/z 380)和内标氯雷他定的准分子离子($[M+H]^+$, m/z 383)作为测定离子,测定人血浆中多奈哌齐的浓度。结果 多奈哌齐的回归方程: $A_s/A_i = 0.0137 + 0.1056 C$, $r = 0.9998$;线性范围为 $0.1 \sim 15 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,定量限为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,方法回收率和提取回收率均大于 90%。结论 该测定方法灵敏度高、专属性好、快速,可满足人体内药代动力学研究要求。

关键词: 多奈哌齐; 高效液相色谱-质谱法; 血药浓度; 氯雷他定

中图分类号: R917.101; R917.103 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2003)03-0203-04

Determination of donepezil in human plasma by HPLC-MS

LU Yi-hong¹, WEN Hong-mei², LI Wei², CHI Yu-mei², ZHANG Zheng-xing³

(1. Jiangsu Institute for Drug Control, Nanjing 210008, China; 2. Nanjing University of Traditional Medicine, Nanjing 210029, China; 3. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: **Aim** To establish a sensitive and specific liquid chromatography-mass spectrometry (time-of-flight) [LC-MS (TOF)] method for the determination of donepezil in human plasma after an oral administration of 5 mg donepezil hydrochloride tablet. **Methods** Alkalized plasma was extracted with isopropanol-hexane (3:97) and loratadine was used as internal standard. Solutes were separated on a C_{18} column with a mobile phase of methanol-acetate buffer (pH 4.0) (80:20). Detection was performed on a time-of-flight mass spectrometry equipped with an ESI interface and operated in positive-ionization mode. Donepezil quantitation was realized by computing the peak area ratio (donepezil-loratadine) (donepezil m/z 380 $[M+H]^+$ and loratadine m/z 383 $[M+H]^+$) and comparing them with calibration curve ($r = 0.9998$). **Results** The linear calibration curve was obtained in the concentration range of $0.1 - 15 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. The detection limit of donepezil was $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. The average recovery was more than 90%. The intra- and inter-run precision was measured to be below 15% of RSD. **Conclusion** The method is sensitive, simple and rapid, so, it can meet the need of the studies on the pharmacokinetics and bioavailability of donepezil.

Key words: donepezil; HPLC-MS; plasma concentration; loratadine

多奈哌齐(donepezil, E2020)为新一代中枢乙酰胆碱酯酶抑制剂,因其半衰期长,副作用小,是治疗早、中期阿尔茨海默症的有效药物^[1-3]。由于该药的口服剂量很小,所以体内血药浓度很低^[4-6],人 *po* 盐酸多奈哌齐片 2 mg 后,峰浓度仅为 $3.0 \sim 4.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Ohnishi 等^[6]用液相色谱法测定了人血浆中

多奈哌齐的浓度,检测灵敏度仅为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。难以满足人体生物利用度测定的要求。本文以异丙醇-正己烷(3:97)作提取溶剂采用 LC-ESI/MS(TOF)联用技术,以气动辅助电喷雾(ESI)作为接口技术,选择多奈哌齐的准分子离子($[M+H]^+$, m/z 380)和内标氯雷他定(loratadine)的准分子离子($[M+H]^+$, m/z 383)作为测定离子,用标准曲线法测定人血浆中多奈哌齐的浓度。血浆中内源性物质不干扰样品

和内标的测定,且分离度好。定量限可达 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,能满足生物利用度研究中血药浓度测定的要求。图1为多奈哌齐和氯雷他定的分子结构式。

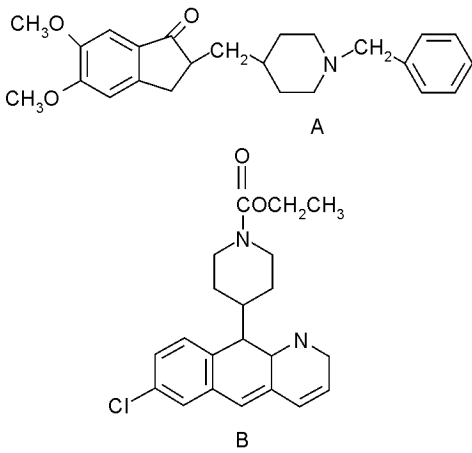


Figure 1 Structure of donepezil (A) and loratadine (B)

材料与方法

仪器 LC-MS 联用系统: Waters 2690 HPLC(美国 Waters 公司)含四元高压泵、在线真空脱气机、恒温自动进样器、柱温箱。MarinerTM 5140 质谱仪(美国 Applied Biosystem 公司):电喷雾离子化接口的飞行时间质谱检测器。质谱工作站: MarinerTM 工作站(4.0 版)。

药品与试剂 盐酸多奈哌齐片(连云港豪森制药有限公司,批号:0001181,5 mg/片);盐酸多奈哌齐对照品(连云港豪森制药有限公司,质量分数 99.8%);氯雷他定(北京正青星光生物医学科技有限公司,批号:000426,质量分数 99.8%);甲醇(色谱纯,江苏汉邦科技有限公司);冰醋酸、醋酸铵、三乙胺、正己烷和氢氧化钠均为分析纯;空白人血浆由南京市红十字血液中心提供;实验用水为重蒸水。

对照品溶液的配制:精密称取盐酸多奈哌齐对照品 10 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得对照品贮备液($0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。取贮备液 1.0 mL,置 20 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,配成 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

内标溶液的配制:精密称取氯雷他定 15 mg,置于 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,取此液 1.0 mL,置 100 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,配成 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的内标溶液。

色谱条件 色谱柱:Kromasil KR 100-5 C_{18} ($5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm ID}$, 瑞士);预柱:Waters C_{18} ($5 \mu\text{m}$, $10 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm ID}$);流动相:甲醇-醋酸盐缓冲

液(含 0.1% 醋酸铵、0.1% 冰醋酸、0.01% 三乙胺的水溶液, pH 4.0) (80:20);流速: $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温: $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

质谱检测参数 离子极性:正离子(positive);离子化方式:电喷雾离子化源(ESI);检测离子:多奈哌齐 $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z 380;氯雷他定 $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z 383;喷嘴电压:5 500 V;喷管电压:180 V;检测器电压:2 000 V;四极杆温度: $100 \text{ }^\circ\text{C}$;喷管温度: $155 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

血浆样品的处理 吸取血浆 1.0 mL 置 10 mL 具塞离心管中,精密加入内标氯雷他定溶液($1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 20 μL , $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液 0.2 mL,涡旋 10 s,加入异丙醇-正己烷(3:97) 5.0 mL,涡旋 3 min,于 $3\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。吸取有机相 4.0 mL,在 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中用氮气吹干。残留物连同离心管冷藏于冰箱,待分析。测试时,残渣加甲醇 200 μL 溶解,吸取 40 μL 注入液相-质谱联用仪中分析。

结果

1 方法的专属性

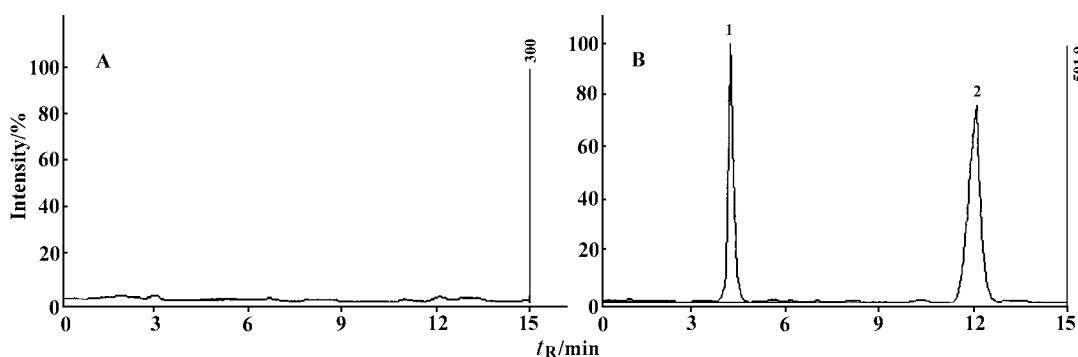
在上述色谱条件下,测得服药前空白血浆及服药后血浆样品的典型色谱、质谱图(图 2,3)。由图可见多奈哌齐的保留时间为 4 min,内标物氯雷他定的保留时间为 12 min,空白血浆中的内源性物质不干扰多奈哌齐血药浓度的分析。本法具有较高的专属性。

2 标准曲线的制备

分别精密吸取盐酸多奈哌齐对照品溶液适量于 8 个具塞离心管中,各加入空白血浆 1.0 mL,分别配制成含盐酸多奈哌齐 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 和 $15.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血浆样本。按“血浆样品处理”项下操作,每种浓度做 5 份样品,记录峰面积。以多奈哌齐峰面积(A_s)与内标峰面积(A_i)的比值(A_s/A_i)对质量浓度($C, \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)进行线性回归,得回归方程: $A_s/A_i = 0.0137 + 0.1056 C$, $r = 0.9998$ 。根据标准曲线,多奈哌齐的线性范围为 $0.1 \sim 15 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,最低定量质量浓度为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,其精密度(RSD)为 15.0%。

3 方法回收率的测定

配制低、中、高 3 种不同质量浓度(0.2, 2 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)的血浆样本各 5 份,按“血浆样品的处理”项下操作,测定多奈哌齐和内标的峰面积,由标准曲线测得实测量,以实测量与加入量之比计算方法回收率。低、中、高 3 种浓度的方法回收率的平均值分别



1: Donepezil (t_R : 4.2 min); 2: Loratadine (t_R : 12.0 min)

Figure 2 HPLC chromatograms of blank plasma (A) and volunteer plasma after oral administration of donepezil (B)

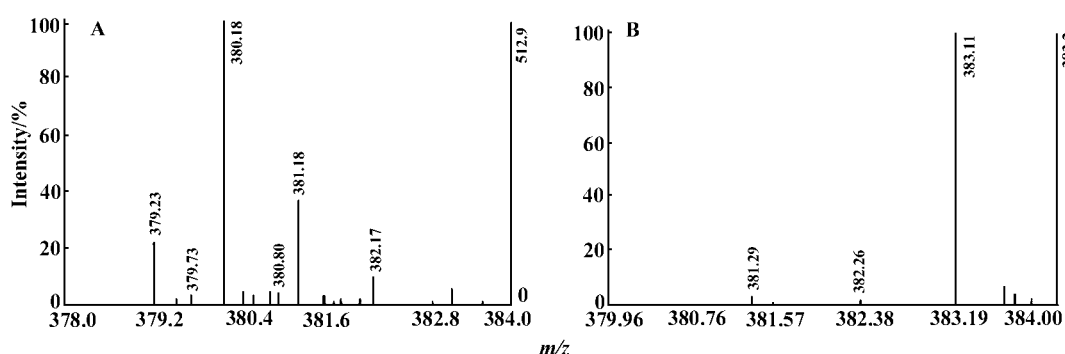


Figure 3 Mass spectrum of donepezil (m/z 380.15) (A) and loratadine (internal standard, IS) (m/z 383.18) (B)

为 94.3%, 102.0% 和 101.6%; RSD% 分别为 10.5%, 3.2% 和 2.9%。

4 提取回收率的测定

配制低、中、高 3 种不同质量浓度 ($0.2, 2$ 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的血浆样本各 5 份, 按“血浆样品处理”项下操作, 记录样品峰面积 (A_x)。另分别取盐酸多奈哌齐对照品溶液适量置离心管中, 配成含多奈哌齐质量浓度分别为 $0.2, 2$ 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液, 每份样品 1 mL, 加内标氯雷他定 $20 \mu\text{L}$ ($1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 将溶剂挥干后, 加入甲醇 $200 \mu\text{L}$ 溶解, 取 $40 \mu\text{L}$ 直接进样, 记录样品峰面积 (A_x)。上述 A_x 与 A_s 的比值即为血浆中多奈哌齐的提取回收率 ($R\%$), 回收率按下式计算, $R\% = A_x / A_s \times 5/4 \times 100\%$ 。低、中、高 3 种浓度的提取回收率的平均值分别为 101.6%, 97.3% 和 96.8%; RSD% 分别为 3.8%, 4.6% 和 4.2%。内标经同样提取处理, 其回收率为 98.2%。

5 方法的精密度试验

按血浆样本标准曲线测定方法配制低、中、高 3 种不同浓度的血浆样本, 按“血浆样品处理”项下操作, 记录多奈哌齐峰面积 (A_x) 与内标峰面积 (A_s) 的

比值, 分别测定日内变异和 5 d 内的日间变异。低、中、高 3 种浓度的日内精密度 (RSD) 分别为 10.2%, 3.2% 和 2.8%; 日间精密度 (RSD) 分别为 11.2%, 3.0% 和 4.8%。

6 血浆中多奈哌齐的稳定性试验

分别配置一定量的含药血浆及含药和内标的血浆, 分别进行冷冻 ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$) 和冷藏 ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) 放置试验, 二次冻融试验, 再经提取处理后, N_2 挥干, 分别用甲醇和流动相溶解。结果表明: 含药血浆在冷冻和冷藏放置均较稳定; 冷冻后融化 2 次对样品含量无影响; 血样处理吹干后, 冷藏放置 3 d 内稳定; 加甲醇和流动相均可对处理后样品复溶, 甲醇复溶后溶液澄清, 效果好, 故选用甲醇作复溶溶剂。

7 人体内血浆浓度的测定

20 名健康志愿者 po 5 mg 盐酸多奈哌齐片后, 于服药前 (0 h) 和服药后 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0, 48.0, 96.0, 144.0 和 192.0 h 各取前臂静脉血 4 mL 置肝素抗凝管内, 离心, 分离血浆, 于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻保存备用。用上述方法测定的多奈哌齐平均血药浓度经时过程曲线见图 4。

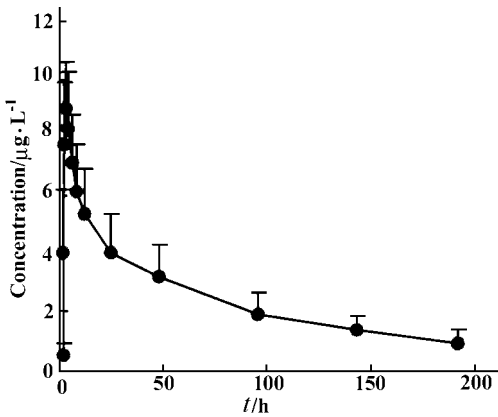


Figure 4 Mean plasma concentration-time curve of donepezil after a single oral dose (5 mg) of donepezil tablets in 20 volunteers

讨论

多奈哌齐为非极性化合物,血浆经 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 碱化后,分别用各醋酸乙酯、二氯甲烷、异丙醇-正己烷(3:97)、异丙醇-醋酸乙酯(3:97)各 5 mL 提取。结果表明:先碱化血浆,再用异丙醇-正己烷(3:97)提取则杂质少,基线噪音低,回收率高。加入异丙醇可以避免乳化。

根据多奈哌齐的结构特征,本文选择了氯雷他定作为内标,峰形好,与多奈哌齐及血浆中杂质分离完全,测定结果准确。

多奈哌齐、氯雷他定分子结构中均含有叔胺基,ESI 源易形成 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 等准分子离子。用飞行时间质谱仪中宽范围选择后,再通过滤过、积分的方式分别检测其准分子离子:多奈哌齐 m/z 380

$[M+H]^+$, $402[M+Na]^+$ 。结果表明:多奈哌齐 m/z 380 $[M+H]^+$ 的灵敏度明显高于碎片离子和 m/z 402 $[M+Na]^+$,故选择 $[M+H]^+$ m/z 380 为多奈哌齐检测离子。内标选择 $[M+H]^+$ m/z 383 为氯雷他定检测离子。

本文所建立的 HPLC-MS(TOF) 法测定血浆中多奈哌齐具有灵敏度高、专属性好和快速测定的优点,可满足药代动力学研究的要求。

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**(5) :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**(7) :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**(9) :1021 - 1031 .
- [4] Rogers SL, Friedhoff LT. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of donepezil HCl following single oral doses [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1998, **46**(Suppl 1) :1 - 6 .
- [5] Rogers SL, Cooper NM, Sukovaty R, *et al*. Pharmacodynamic profile of donepezil HCl following multiple oral doses [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1998, **46**(Suppl 1) :7 - 12 .
- [6] Ohnishi A, Mihara M, Kamakura H, *et al*. Comparison of the pharmacokinetics of E2020, a new compound for Alzheimer's disease, in healthy young and elderly subjects [J]. *J Clin Pharmacol*, 1993, **33**(11) :1086 - 1091 .