

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01058

## 毛细管电泳法检测左旋普拉克索中右旋普拉克索杂质的研究

刘长海<sup>1</sup>, 孙青葵<sup>2</sup>, 盛春泉<sup>2</sup>, 张 海<sup>3</sup>, 陈 俊<sup>3</sup>, 赵 亮<sup>3</sup>, 柴逸峰<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433

2. 第二军医大学药学院药物化学教研室, 上海 200433

3. 第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438

**[摘要]** **目的:**建立毛细管电泳法,对左旋普拉克索中右旋普拉克索进行杂质检查。**方法:**分别以β-环糊精(β-CD)、羟丙基-β-环糊精(HP-β-CD)、硫酸酯-β-环糊精(SBE-β-CD)和二甲基-β-环糊精(DM-β-CD)为手性选择剂,考察手性选择剂的浓度、pH、柱长和柱内径对分离选择性的影响,采用未涂渍熔融石英毛细管 47 cm × 50 μm(有效长度 40 cm),背景电解质溶液:40 mmol/L 柠檬酸三钠缓冲液,含有 0.5% SBE-β-CD,用磷酸调节 pH 值到 4.0,柱温:30℃,检测波长 254 nm,电压 16 kV。**结果:**2 种旋光异构体的分离度良好(Rs>2.5),样品中右旋普拉克索的含量均小于 0.5%。**结论:**所建立的方法简单可靠、专属性强,可以作为常规的杂质检查手段。

**[关键词]** 毛细管电泳;手性分离;左旋普拉克索;右旋普拉克索

**[中图分类号]** R 927.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)09-1058-04

### Capillary electrophoresis for analysis of optical impurity of L-pramipexole

LIU Chang-hai<sup>1</sup>, SUN Qing-yan<sup>2</sup>, SHENG Chun-quan<sup>2</sup>, ZHANG Hai<sup>3</sup>, CHEN Jun<sup>3</sup>, ZHAO Liang<sup>3</sup>, CHAI Yi-feng<sup>1\*</sup>

1. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433

3. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438

**[ABSTRACT]** **Objective:** To develop a capillary electrophoresis system for purity test and enantioseparation of L-pramipexole. **Methods:** Using β-CD, HP-β-CD, SBE-β-CD and DM-β-CD as chiral selection agents, we investigated the influence of concentration, pH of chiral selection agent and column length and inner diameter on chiral separation. The enantiomers were baseline separated under the following conditions-uncoated fused silica capillary (50 μm × 47 cm) with an effective length of 40 cm, back-ground electrolyte solution: 40 mmol/l trisodium citrate buffer solution, 0.5% SBE-β-CD, pH 4.0 adjusted by phosphoric acid, 5% methanol, 25 mmol · L<sup>-1</sup> SDS, 40 mmol · L<sup>-1</sup> sodium tetraborate solution as running buffer, and 16 kV separation voltage. The detection wavelength was set at 254 nm and the column temperature was 30℃. **Results:** The baseline separation of L-pramipexole was obtained under our condition. The optical isomerism had satisfactory resolution (Rs>2.5) and the content of R-pramipexole was less than 0.5%. **Conclusion:** The proposed method is simple, reliable and can be used for routine purity test and chiral separation.

**[KEY WORDS]** capillary electrophoresis; enantioseparation; L-pramipexole; R-pramipexole

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(9):1058-1061]

普拉克索(pramipexole)是 1997 年美国批准上市的新型抗帕金森病新药,结构见图 1,为非麦角类衍生物,能选择性与多巴胺 D2 受体结合,并能激活 D3 受体,是第一个作用于 D3 受体的药物<sup>[1-2]</sup>。相对于其他抗帕金森病药物,其不良反应发生率低,目前已作为抗帕金森病的一线治疗药物<sup>[3-11]</sup>。经实验发

现该化合物对映异构体间的生物活性、药理活性、不良反应方面存在较大的差异和可探讨性<sup>[8]</sup>,在进行异构体的定向合成过程中,应控制右旋普拉克索对映体杂质的含量。经文献检索,未发现有毛细管电泳法(capillary electrophoresis, CE)手性分离普拉克索的报道。本实验采用 CE 法手性分离普拉克索的

**[收稿日期]** 2008-11-20 **[接受日期]** 2009-03-20

**[作者简介]** 刘长海, 硕士. E-mail: changhai1978@yahoo.com.cn

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871203, E-mail: yfchai@smmu.edu.cn

对映体,并进行了方法学考察。

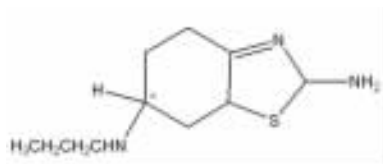


图1 普拉克索化学结构

Fig 1 Chemical structure of pramipexole

## 1 仪器和材料

Beckman P/CAE System 5000 毛细管电泳仪(美国贝克曼公司),二极管阵列检测器。河北永年光学纤维厂生产的熔融石英毛细管柱  $50\ \mu\text{m}$ (内径) $\times 47\ \text{cm}$ (有效长度  $40\ \text{cm}$ ),柱上紫外检测。左旋普拉克索和右旋普拉克索对照品由上海医药工业研究院提供;安乃近(内标,中国药品生物制品检定所,99.2%);硫酸酯- $\beta$ -环糊精(SBE- $\beta$ -CD)、羟丙基- $\beta$ -环糊精(HP- $\beta$ -CD)、二甲基- $\beta$ -环糊精(DM- $\beta$ -CD)纯度均大于98%,为本课题组自制。甲醇、磷酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、磷酸二氢钠和柠檬酸三钠均为分析纯,水为重蒸馏水。

## 2 方法和结果

2.1 电泳条件 未涂渍熔融石英毛细管, $50\ \mu\text{m}\times 47\ \text{cm}$ (有效长度  $40\ \text{cm}$ );背景电解质溶液:40 mmol/L 柠檬酸三钠缓冲液,含有0.5% SBE- $\beta$ -CD,用磷酸调节pH值到4.0,柱温: $30^\circ\text{C}$ ,检测波长254 nm,电压16 kV。每次进样前依次用0.1 mol/L的氢氧化钠冲洗3 min,用运行缓冲液冲洗5 min。此条件下左旋普拉克索和右旋普拉克索分离的电泳图如图2所示。

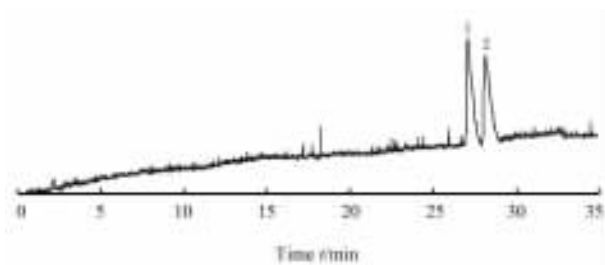


图2 普拉克索的毛细管电泳图

Fig 2 Typical chromatogram of pramipexole by CE

1:R-pramipexole; 2:L-pramipexole

### 2.2 溶液配制

2.2.1 对照品贮备液的制备 精密称取右旋普拉

克索对照品22.43 mg置10 ml容量瓶中,用pH值为4.0的40 mmol/L柠檬酸三钠缓冲液溶解并定容,摇匀,配制成2.243 mg/ml的右旋普拉克索溶液。精密量取此右旋普拉克索溶液1 ml置50 ml容量瓶中,用pH值为4.0的40 mmol/L柠檬酸三钠缓冲液稀释并定容,摇匀,配制成44.86  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的右旋普拉克索溶液。置于 $4^\circ\text{C}$ 冰箱中备用。

精密称取左旋普拉克索对照品22.31 mg置10 ml容量瓶中,用pH值为4.0的40 mmol/L柠檬酸三钠缓冲液溶解并定容,摇匀,配制成2.231 mg/ml的左旋普拉克索溶液。置于 $4^\circ\text{C}$ 冰箱中备用。

精密称取安乃近对照品105.6 mg置100 ml容量瓶中,用水溶解并定容至刻度,摇匀,配制成1.056 mg/ml的安乃近溶液,置于 $4^\circ\text{C}$ 冰箱中备用。

2.2.2 背景电解质(BGE)的配制 吸取一定体积的0.1 mol/L的磷酸溶液,滴加到40 mmol/L柠檬酸三钠缓冲液中至所需pH值。取适量手性选择剂SBE- $\beta$ -CD直接加入上述溶液中溶解、混匀,即得到含一定浓度手性选择剂的背景电解质溶液。

### 2.3 分离条件考察

2.3.1 手性选择剂种类对分离的影响 分别以 $\beta$ -CD、HP- $\beta$ -CD、SBE- $\beta$ -CD和DM- $\beta$ -CD为手性选择剂,我们考察了手性选择剂的浓度、pH、柱长和柱内径对分离选择性的影响,发现分别单用 $\beta$ -CD、HP- $\beta$ -CD和DM- $\beta$ -CD都不能够拆分左旋普拉克索和右旋普拉克索,只有SBE- $\beta$ -CD能够部分分离左旋普拉克索和右旋普拉克索,所以选择SBE- $\beta$ -CD为手性选择剂。还可观察到普拉克索的电泳峰拖尾严重,这是由于普拉克索在毛细管壁上吸附较严重,影响了分离的效率,以下手性条件优化的目的主要就是减少普拉克索在毛细管内壁的吸附效应,提高对映体的分离效率。

2.3.2 缓冲溶液种类及浓度对分离的影响 以SBE- $\beta$ -CD为手性选择剂,浓度为0.5%,且缓冲液pH值为5.0,研究了缓冲液浓度对左旋普拉克索和右旋普拉克索手性分离效果的影响,由于普拉克索易吸附于毛细管内壁,因此,缓冲液的离子强度对左旋普拉克索和右旋普拉克索手性分离的影响很大,实验中考察了50 mmol/L Tris缓冲液、50 mmol/L磷酸二氢钠缓冲液和50 mmol/L柠檬酸三钠缓冲液及其浓度,发现采用较高浓度的柠檬酸三钠缓冲液时,对映体的分离效率最高。分析原因是由于提高了缓冲液的离子强度抑制了普拉克索在毛细管柱

上的吸附。但缓冲液浓度太高会增加焦耳热、增加扩散、影响分离选择性。经考察柠檬酸三钠缓冲溶液的最佳浓度为 40 mmol/L。

2.3.3 pH 值对分离的影响 通过调节 pH 值,可调节电泳中电迁移和电渗的平衡,达到增加分离度的目的,本研究考察了背景电解质溶液中磷酸-Tris 缓冲溶液的 pH 值(2.5~7.0)对上述手性药物分离的影响。实验表明在 pH 4.0 时,手性分离效果最好,而当 pH 值为 2.5 和 3.0 时,对映体在 60 min 未出峰。

2.3.4 手性选择剂浓度对分离的影响 在 40 mmol/L 磷酸-柠檬酸三钠(pH 4.0)缓冲溶液中,加入不同浓度(0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%)的手性选择剂,以考察手性选择剂浓度对手性分离效果的影响。选择剂浓度太低,分离选择性不够;浓度太高,背景电解质溶液离子强度增加,增加焦耳热,增加扩散,影响分离选择性。结果表明当 SBE-β-CD 浓度为 0.5% 时从分离时间和分离度综合评价,结果最佳。

2.3.5 毛细管柱的选择 考察了内径为 75 μm 和 50 μm 毛细管对分离选择性的影响,实验表明 75 μm 柱分离选择性差,未能有效分离上述对映体。原因是同样离子强度的背景电解质溶液,相同电场条件下,其电渗流远大于 50 μm 柱,引起焦耳热的增加,限制了高电压的使用,从而影响了 CE 的高分离效率,50 μm 柱的焦耳热低,且散热平衡快,可使用高电压和高离子强度的背景电解质溶液,使上述对映体能完全分离。柱长增加可增加柱效,但同时也降低了分离速度,增加分离样品扩散引起的分离选择性的降低,本研究考察了 47 cm、57 cm 和 67 cm 柱长对分离的影响,发现 47 cm 柱长最佳。

2.3.6 电压和电渗流的影响 考察了不同电压对手性分离效率和分离选择性的影响,电压过低,分离

效率低;电压过高,使电渗流过大引起高焦耳热,不利于手性化合物与手性选择性包合形成,影响分离选择性,本研究的最佳电压为 16 kV。

2.3.7 温度的影响 温度对手性拆分有很大影响,由于温度下降,缓冲液的黏度升高,电渗流降低,手性物质与手性添加剂接触更充分,有利于手性物质的分离,但却增加了对映体在柱内壁的吸附,降低分离速度,也影响分离效果。实验过程中分别考察了 20℃、25℃、30℃、35℃,结果柱温 30℃ 时分离情况最好。

2.4 方法学考察

2.4.1 标准曲线 分别精密量取 44.86 μg/ml 的右旋普拉克索溶液 0.5、1、1.5、2、2.5 ml 置于 5 个 10 ml 容量瓶中,然后分别精密量取 2.231 mg/ml 的左旋普拉克索溶液 1、1.2、1.4、1.6、1.8 ml 置于顺序对应的 5 个容量瓶中,最后分别精密量取 1.056 mg/ml 的安乃近溶液 1 ml 置于以上 5 个容量瓶中作为内标。用 pH 值为 4.0 的 40 mmol/L 柠檬酸三钠缓冲液分别稀释并定容至刻度,摇匀。按“2.1”中电泳条件进样,所得标准曲线如下:右旋普拉克索:  $y = 0.007421x + 0.01332, r = 0.9994$  (线性范围 2.243~11.22 μg/ml); 左旋普拉克索:  $y = 0.007862x + 0.2765, r = 0.9911$  (线性范围 223.1~401.6 μg/ml)。

2.4.2 精密度 分别精密量取 44.86 μg/ml 的右旋普拉克索溶液 1、1.5、2 ml 置于 3 个 10 ml 的容量瓶中,然后分别精密量取 2.231 mg/ml 的左旋普拉克索溶液 1.2、1.4、1.6 ml 置于顺序对应的以上 3 个容量瓶中,最后分别精密量取 1.056 mg/ml 的安乃近溶液 1 ml 置于以上 3 个容量瓶中作为内标。用 pH 值为 4.0 的 40 mmol/L 柠檬酸三钠缓冲液分别稀释并定容至刻度,摇匀。按“2.1”中电泳条件进样。由表 1 可以看出,日内精密度 < 10%, 日间精密度 < 15%, 符合定量的要求。

表 1 左旋、右旋普拉克索的精密度

Tab 1 Precision of L-pramipexole and R-pramipexole

(%)

Concentration	Intra-day precision		Inter-day precision	
	R-pramipexole	L-pramipexole	R-pramipexole	L-pramipexole
Low	9.7	1.8	13.4	1.9
Medium	4.9	2.7	10.6	3.4
High	2.3	0.7	6.7	2.8

Low: R-pramipexole 4.486 μg/ml, L-pramipexole 267.72 μg/ml; Medium: R-pramipexole 6.729 μg/ml, L-pramipexole 312.34 μg/ml; High: R-pramipexole 8.972 μg/ml, L-pramipexole 356.96 μg/ml

2.4.3 最低检测限 取对照品溶液逐步稀释并按“2.1”中电泳条件进样,按照S:N为3:1确定左旋普拉克索和右旋普拉克索的最低检测限都为1  $\mu\text{g/ml}$ 。

2.5 样品测定 精密称取20071101、20071102、20071103共3批样品,配制成药300  $\mu\text{g/ml}$ 的待测溶液,按“2.1”中电泳条件进样,3批样品中都未检出含有右旋普拉克索,结果见图3;另外在这3批样品中加入微量的右旋普拉克索,使右旋普拉克索的含量为4.48  $\mu\text{g/ml}$ ,证明此条件下能够检测右旋普拉克索,结果见图4,右旋普拉克索未被左旋普拉克索覆盖。因为右旋普拉克索的最低检测限为1  $\mu\text{g/ml}$ ,所以右旋普拉克索在这3批样品中的含量低于0.5%。

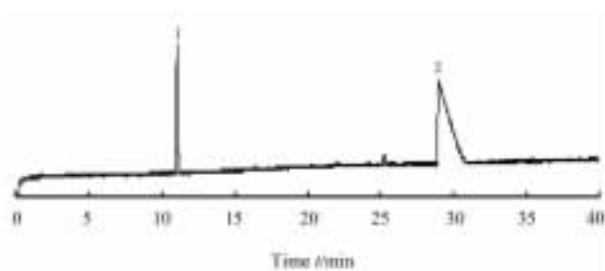


图3 样品20071101的电泳图

Fig 3 Chromatogram of sample 20071101 by CE

1:Algopyrin (internal standard); 2:L-pramipexole

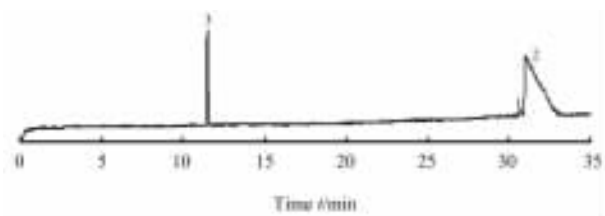


图4 微量右旋普拉克索(4.48  $\mu\text{g/ml}$ )与左旋普拉克索(268  $\mu\text{g/ml}$ )的分离图

Fig 4 Chromatogram of minor R-pramipexol and L-pramipexol by CE

1:R-pramipexol; 2:L-pramipexol; 3:Algopyrin (internal standard)

### 3 结论

本研究首次建立了用CE法测定左旋普拉克索中右旋普拉克索对映异构体杂质的方法。从实验结

果看,CE的分离效率完全能使2个含量相差很大的对映体有效分离。虽然未检测到样品中对映体杂质,但通过加入微量对映体杂质方法,说明该方法能够作为检测左旋普拉克索中右旋普拉克索杂质的方法。结合对映体的最低检测限,可以确定右旋普拉克索在样品中的含量低于0.5%。本实验中建立的分离和杂质检测方法经方法学考察,结果表明方法快速、简单、灵敏、可靠。

### [参考文献]

- [1] Klamann E, Lingens F. Degradation of (-)-ephedrine by *Pseudomonas putida*. Detection of (-)-ephedrine; NAD<sup>+</sup>-oxidoreductase from *Arthrobacter globiformis*[J]. *Z Naturforsch C*, 1980, 35(1-2): 80-87.
- [2] Singh A, Althoff R, Martineau R J, Jacobson J. Pramipexole, ropinirole, and mania in Parkinson's disease[J]. *Am J Psychiatry*, 2005, 162: 814-815.
- [3] Möller J C, Oertel W H, Köster J, Pezzoli G, Provinciali L. Long-term efficacy and safety of pramipexole in advanced Parkinson's disease results from a European multicenter trial[J]. *Mov Disord*, 2005, 20: 602-610.
- [4] Joyce J N, Woolsey C, Ryoo H, Borwege S, Hagner D. Low dose pramipexole is neuroprotective in the MPTP mouse model of Parkinson's disease, and downregulates the dopamine transporter *via* the D3 receptor[J]. *BMC Biol*, 2004, 2: 22.
- [5] Biglan K M, Holloway R G. A review of pramipexole and its clinical utility in Parkinson's disease[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2002, 3: 197-210.
- [6] Hubble J P. Pre-clinical studies of pramipexole: clinical relevance[J]. *Eur J Neurol*, 2000, 7 Suppl 1: 15-20.
- [7] Hubble J P, Koller W C, Cutler N R, Sramek J J, Friedman J, Goetz C, et al. Pramipexole in patients with early Parkinson's disease[J]. *Clin Neuropharmacol*, 1995, 18: 338-347.
- [8] Abramova N A, Cassarino D S, Khan S M, Painter T W, Bennett J P Jr. Inhibition by R(+) or S(-) pramipexole of caspase activation and cell death induced by methylpyridinium ion or beta amyloid peptide in SH-SY5Y neuroblastoma[J]. *J Neurosci Res*, 2002, 67: 494-500.
- [9] 史洪润, 孙斌. 抗帕金森病新药——普拉克索的临床应用[J]. *临床神经病学杂志*, 2000, 13: 317.
- [10] 刘凌, 李娟. 关于普拉克索治疗晚期帕金森病的临床研究[J]. *中国医药导报*, 2008, 5: 59.
- [11] 武力勇, 贾建平. 普拉克索的临床应用及安全性[J]. *药物不良反应杂志*, 2007, 9: 77.

[本文编辑] 尹茶