

盐酸左西替利嗪对映体杂质的高效毛细管电泳法检查

周小娟, 武 苏, 王 伟, 季一兵*

(中国药科大学分析化学教研室, 南京 210009)

摘 要 建立盐酸左西替利嗪中对映体杂质检查的毛细管电泳方法。采用石英毛细管柱(50 cm × 50 μm, 有效长度 41.5 cm), 以 40 mmol/L 磷酸二氢钠为背景缓冲液, 85 mg/mL 磺丁基-β-环糊精和 85 mg/mL 羟丙基-β-环糊精的二元体系为手性拆分剂, pH 为 5.5, 运行电压 20 kV, 检测波长 230 nm, 压力进样(5 Pa, 10 s)。盐酸左西替利嗪对映体杂质的检测限和定量限分别为 2.0 μg/mL 和 5.0 μg/mL。该方法可用于盐酸左西替利嗪原料药和片剂的对映体杂质检查。并通过析因实验考察二元体系中磺丁基-β-环糊精和羟丙基-β-环糊精之间的相互作用对西替利嗪手性分离的影响, 探讨发现负电性的环糊精与电中性环糊精所构成的二元体系的协同作用仅表现在表观淌度的影响上。

关键词 盐酸左西替利嗪; 二元体系; 磺丁基-β-环糊精; 羟丙基-β-环糊精; 毛细管电泳; 对映体杂质; 相互作用

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2013)05-0437-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20130510

Sensitive quantification of levocetirizine dihydrochloride enantiomeric impurities by capillary electrophoresis

ZHOU Xiaojuan, WU Su, WANG Wei, JI Yibing*

Department of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract A capillary electrophoresis (CE) method was developed for the quantification of levocetirizine dihydrochloride enantiomeric impurities. Sulfobutyl ether-β-cyclodextrin (SBE-β-CD) and hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD) were selected as chiral selectors. Parameters including concentration of chiral selectors, pH of buffer solution, concentration of background electrolyte, and voltage applied were optimized by orthogonal experiment design. The optimal condition obtained was a running buffer consisting of 40 mmol/L sodium dihydrogen phosphate, 85 mg/mL chiral selectors at pH 5.5 and voltage of 20 kV. The LOD and LOQ were 2.0 μg/mL and 5.0 μg/mL for isomers of levocetirizine dihydrochloride, respectively. This method could be applied to test the enantiomeric impurities of drug substance and tablets of levocetirizine dihydrochloride. A factorial experiment was employed to investigate the complex interaction between SBE-β-CD and HP-β-CD in the separation of cetirizine enantiomers. Results indicated that synergistic effect existed between SBE-β-CD and HP-β-CD, which was only reflected in the apparent mobility rather than in the resolution.

Key words levocetirizine dihydrochloride; dual cyclodextrin system; sulfobutyl ether-β-cyclodextrin; hydroxypropyl-β-cyclodextrin; capillary electrophoresis; enantiomeric impurity; interaction

This study was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. CPU-JKY2011057)

盐酸左西替利嗪(levocetirizine dihydrochloride, L-CTRZ, 图1)为西替利嗪(CTRZ)的R-构型。CTRZ是第2代H₁受体拮抗剂,临床上广泛应用于荨麻疹、过敏性鼻炎等疾病的治疗^[1]。

体内药代动力学研究表明西替利嗪的左旋体(L-CTRZ)和右旋体(D-CTRZ)在药物的吸收、分布、代谢和排泄方面有差异^[2-3]。L-CTRZ片剂在国内已有上市,因此需要合适的方法对其对映体杂

* 收稿日期 2013-04-09 * 通信作者 Tel:025-86185150 E-mail:jiyibing@msn.com

基金项目 中央高校基本科研业务费专项基金资助项目(No. CPU-JKY2011057)

质进行检查和控制。

调研发现,目前对 CTRZ 的拆分主要有手性固定相 HPLC-MS 法^[4-5]和毛细管电泳法^[6-7]。麦芽糊精^[6]、大环抗生素^[7]作为拆分剂拆分 CTRZ 的 CE 法已有文献报道,但未见采用磺丁基- β -环糊精(sulfobutyl ether- β -cyclodextrin, SBE- β -CD)和羟丙基- β -环糊精(hydroxypropyl- β -cyclodextrin, HP- β -CD)对其进行杂质检查的报道。

本文采用正交实验设计,建立 SBE- β -CD 和 HP- β -CD 的二元体系拆分 CTRZ 对映体的 CE 法。并首次通过析因实验探讨了负电性 SBE- β -CD 和电中性的 HP- β -CD 在 CTRZ 手性分离过程中的相互协同作用。

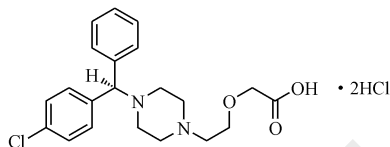


Figure 1 Chemical structure of levocetirizine dihydrochloride

1 材料

1.1 试药

盐酸西替利嗪对照品、盐酸左西替利嗪对照品(中国食品药品检定研究院);盐酸左西替利嗪原料药(湖南九典制药有限公司);盐酸左西替利嗪片(重庆华邦制药股份有限公司);苯甲酰胺(内标物,IS,国药集团化学试剂有限公司);羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD,平均取代度为 6.0)、磺丁基- β -环糊精(SBE- β -CD,平均取代度为 7.1)(昆山瑞斯克化工有限公司);其他试剂均为分析纯,水为市售纯净水。

1.2 仪器

HP^{3D}CE 7100 毛细管电泳仪(美国安捷伦科技公司);熔融石英毛细管柱(内径 50 μ m,总长度 50 cm,有效长度 41.5 cm,河北永年光导纤维厂);电子天平,pb-10 型 pH 计(德国 Sartorius 公司)。

2 方法

2.1 电泳条件

熔融石英毛细管柱(50 cm \times 50 μ m,有效长度 41.5 cm);电泳运行缓冲液为 40 mmol/L 磷酸二氢钠(含 85 mg/mL SBE- β -CD 和 85 mg/mL HP- β -

CD,1 mol/L 氢氧化钠调 pH 至 5.5);DAD 检测器检测波长 230 nm;分离电压 20 kV;压力进样(5 Pa,10 s);毛细管温度 25 $^{\circ}$ C。

2.2 溶液的配制

L-CTRZ 对照品储备液:取 L-CTRZ 对照品约 250 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,备用。

内标储备液:取苯甲酰胺约 5 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,备用。

CTRZ 对照品储备液:取 L-CTRZ 对照品约 25 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,备用。

3 结果与讨论

3.1 拆分方法的建立

3.1.1 拆分剂的种类与浓度的选择 考察天然环糊精(α -CD, β -CD, γ -CD);电中性环糊精衍生物(DM- β -CD, HP- β -CD);负电性环糊精衍生物(SBE- β -CD, CM- β -CD)其一元体系和二元体系对 CTRZ 消旋体分离的影响。结果发现:一元体系(SBE- β -CD)和二元体系(SBE- β -CD 和 HP- β -CD)的混合物,质量比为 1:1)对 CTRZ 具有拆分能力。SBE- β -CD 为拆分剂时,主峰拖尾严重,无法准确检测对映体杂质。与一元体系相比,HP- β -CD 的加入显著提高柱效($n = 5.8 \times 10^4 \rightarrow n = 23.5 \times 10^4$),改善峰型,并缩短分析时间。因此采用 SBE- β -CD 和 HP- β -CD 构成的二元体系为手性拆分剂。

考察二元体系拆分剂中两种环糊精(质量比 1:1)的质量浓度为 35, 70, 80, 100 mg/mL 时对 CTRZ 分离的影响。结果表明:随着拆分剂浓度的增加,CTRZ 对映体的分离度逐渐增加。当拆分剂质量浓度达到 100 mg/mL 时,过高的电流($I = 85 \mu$ A)导致焦耳热增加,色谱峰展宽;且高浓度的拆分剂在毛细管内壁的吸附增加,保留时间的重现性显著降低。故二元体系拆分剂的浓度范围确定为 70 ~ 100 mg/mL。

3.1.2 缓冲液 pH 的选择 CTRZ 分子结构中有 3 个官能团:强酸性基团(羧基, $pK_a = 2.93$)、强碱性基团(哌嗪基, $pK_a = 8.0$)和弱碱性基团(哌嗪基, $pK_a = 2.19$)^[6]。预实验表明,当缓冲液 pH 小于 5.5 时,CTRZ 以阳离子的形式存在,正电性的

药物与负电性的拆分剂之间的强烈的静电相互作用使出峰时间超过 45 min。当缓冲液 pH 大于 8.0 时,电渗流增加,CTRZ 的分离度降至 1.30。故综合考虑分析时间和分离度,缓冲液的 pH 范围确定为 pH 5.5 ~ pH 7.5。

3.1.3 二元体系中拆分剂质量比的选择 随着电中性 HP- β -CD 的加入,CTRZ 的分离度的变化如图 2 所示。二元体系中 SBE- β -CD 与 HP- β -CD 的质量比为 1:1 时 CTRZ 实现最大分离 ($R_s = 2.22$)。故 SBE- β -CD 和 HP- β -CD 的质量比确定为 1:1。

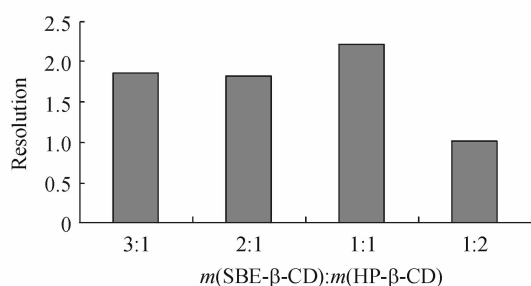


Figure 2 Resolution of applied dual cyclodextrin system along with the different weight ratios of sulfobutyl ether- β -cyclodextrin (SBE- β -CD) to hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) at pH 5.5

3.1.4 有机改性剂的选择 实验表明,甲醇和乙腈在 6% ~ 20% 的范围内变化均无法使对映体的分离度得到改善。高黏度异丙醇的加入使 CTRZ 的保留时间增加,分离度显著降低。这可能是因为疏水的有机改性剂添加到缓冲液中后会占据环糊精的部分疏水空腔,减少了药物对映体和空腔的亲合力,削弱了环糊精的选择能力,故本实验不加入任何有机改性剂。

3.2 电泳条件的优化

本实验中采用二元体系,两种拆分剂之间的相互作用不可忽视,因此采用正交试验优化电泳条件。选择两种拆分剂的质量浓度 (75, 85, 100 mg/mL)、缓冲液的酸碱度 (pH 5.5, pH 6.5, pH 7.5)、缓冲盐的浓度 (25, 40, 50 mmol/L)、运行电压 (15, 20, 25 kV) 为考察因素,以 CTRZ 消旋体的分离度作为考察指标,选用标准的 $L_9(4^3)$ 正交试验设计表进行实验。结果表明,各因素对 CTRZ 对映体分离的影响程度由大到小依次为:缓冲液的 pH、拆分剂的浓度、运行电压、缓冲盐的浓度;即缓冲液的 pH 是最主要的影响因素。CTRZ 对映体的最优分离条件为:拆分剂的质量浓度 100 mg/mL,缓冲液 pH 5.5,缓冲盐的浓度 40 mmol/L,电压 15 kV。

然而,在此条件下高浓度的拆分剂在毛细管壁的吸附作用导致保留时间的重现性降低。因此,拆分剂的浓度,运行电压均采用次优水平 85 mg/mL, 20 kV,典型电泳图谱如图 3 所示,对映异构体间的分离度达到 3.32,理论塔板数高达 2.35×10^5 。

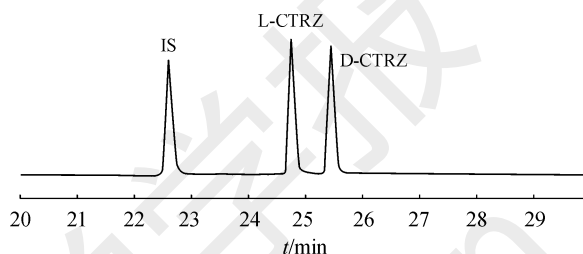


Figure 3 Capillary electrophoresis chromatogram of cetirizine (CTRZ) enantiomers achieved with the optimized parameters (85 mg/mL SBE- β -CD and 85 mg/mL HP- β -CD, 40 mmol/L sodium dihydrogen phosphate, pH = 5.5, 25 °C, 20 kV)

3.3 方法学验证

3.3.1 专属性 精密移取 L-CTRZ 对照品储备液, CTRZ 对照品储备液, 内标储备液适量于 10 mL 量瓶内,加水稀释定容制成 2.5 mg/mL L-CTRZ 溶液,含 0.5% 异构体杂质,10 μ g/mL 内标物,作为专属性考察溶液。典型电泳谱图见图 4, L-CTRZ 与对映体杂质的分离度为 2.92。

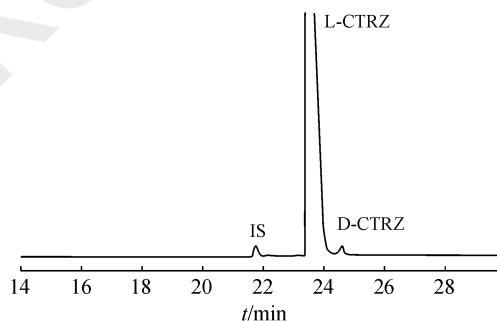


Figure 4 Capillary electrophoresis chromatogram of L-CTRZ and D-CTRZ

3.3.2 线性、范围、检测限和定量限 精密移取 L-CTRZ 对照品储备液, CTRZ 对照品储备液及内标储备液适量于 10 mL 量瓶内,加水稀释定容,制成 D-CTRZ 质量浓度分别为 5, 10, 12.5, 15, 20, 25, 50 μ g/mL 的标准系列溶液。分别进样,测定相对峰面积。以对映体杂质的浓度为横坐标,相对峰面积为纵坐标,得线性方程: $Y = 0.0496X + 0.3959$, $r^2 = 0.9983$ 。

按照逐步稀释法分别测定 $S/N = 3:1$ 和 $S/N = 10:1$ 时,对映体杂质的最低检测限为 2.0 μ g/mL,

定量限为 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.3.3 准确度 分别制得低(0.20%)、中(0.50%)、高(0.80%)3个浓度水平的对映体杂质溶液(每个浓度水平3份),按“2.1”项下条件测定,计算回收率为 $(98.5 \pm 1.72)\%$ 。

取片剂10片,充分研磨,精密称取片粉适量(含L-CTRZ 25 mg)于10 mL量瓶内。精密移取CTRZ消旋体标准品储备液,内标物储备液适量,加水稀释定容,超声溶解30 min。转移至离心管内,10 000 r/min离心10 min,取续滤液分别制成低(0.20%)、中(0.50%)、高(0.80%)3个浓度水平对映体杂质溶液(每个浓度水平3份),按“2.1”项下条件测定,计算盐酸左西替利嗪片剂的加样回收率为 $(97.7 \pm 1.38)\%$ 。

3.3.4 精密度 含0.50% D-CTRZ的供试品溶液连续进样6次,计算日内精密度。相对保留时间和相对峰面积的RSD分别为0.97%和2.1%。

按日内精密度的测定方法分别在连续两天内测定,计算日间精密度。相对保留时间和相对峰面积的RSD分别为0.95%和4.2%。

3.3.5 溶液稳定性 供试品溶液室温放置0,2,

4,6,8,12 h后进样,记录对映体杂质的相对峰面积,RSD为3.0%,结果表明供试品溶液在12 h内稳定。

3.3.6 样品的测定 按“2.1”项下条件测定L-CTRZ原料药及片剂,内标法进行定量。L-CTRZ原料药中对映体杂质的含量为0.45%,片剂中对映体杂质含量低于0.20%。

3.4 SBE- β -CD和HP- β -CD之间的相互作用

文献中关于二元体系中两种拆分剂之间相互作用的解释和描述相对简单且近似^[8-9]。析因实验设计是一种将两个或多个因素进行交叉分组的实验设计,可检验两个或多个因素间是否存在交互作用。为了进一步考察负电性SBE- β -CD和电中性HP- β -CD之间的协同作用,进行2因素2水平实验。每个条件下分别进行两次实验,表观电渗流和分离度的结果见表1。以SBE- β -CD浓度和HP- β -CD浓度为自变量,表观电渗流和分离度为因变量,利用SPSS软件进行多因素方差分析。SBE- β -CD和HP- β -CD之间交互作用对CTRZ对映体表观淌度(μ_{app})、分离度(Resolution)的多因素方差分析结果见表2。

Table 1 Experimental result of the two-level factorial design

Experiment runs	A ^a [$c/(\text{mg/mL})$]	B ^b [$c/(\text{mg/mL})$]	Apparent mobility (μ_{app}) / [$10^{-8} \cdot \text{m}^2/(\text{V} \cdot \text{s})$]	Resolution
A1B1	0	0	3.23	0
			3.08	0
A2B1	35	0	0.53	1.79
			0.55	1.74
A1B2	0	35	2.85	0
			2.81	0
A2B2	35	35	1.42	2.00
			1.43	1.87

^a Factor A: concentration of SBE- β -CD; ^b Factor B: concentration of HP- β -CD

Table 2 Multivariate variance analysis on apparent mobility and resolution by SPSS

Parameter	Source	Type III sum of squares	DF ^a	Mean Square	F ^b	Sig. ^c P
Apparent mobility	A	8.080	1	8.080	2 627.707	0.000
	B ^e	0.157	1	0.157	50.992	0.002
	A * B ^f	0.732	1	0.732	238.065	0.000
Resolution	A	6.845	1	6.845	2822.680	0.000
	B	0.014	1	0.014	5.959	0.071
	A * B	0.014	1	0.014	5.959	0.071

^a Degree of freedom; ^b Value of F-tests; ^c P-value of fixed factor, significance at $\alpha = 0.05$ level; ^d Factor A: concentration of SBE- β -CD; ^e Factor B: concentration of HP- β -CD; ^f Interaction between SBE- β -CD and HP- β -CD

由表3可得,对表观电渗流而言,所有因素(A,B,A*B)的Sig.值均小于0.05,可以推出SBE- β -CD和HP- β -CD的浓度对表观电渗流有显

著性影响,且SBE- β -CD和HP- β -CD二者之间具有显著的交互作用。对分离度而言,Sig.(A*B)大于0.05,表明SBE- β -CD和HP- β -CD二者在分

离度上无显著的交互作用。

有文献报道带电的环糊精衍生物与电中性环糊精衍生物构成的二元体系可通过协同作用显著提高对映体分离度^[10]。本实验通过 SPSS 统计分析发现,电中性 HP- β -CD 与 CTRZ 对映体之间无手性识别作用,HP- β -CD 的加入仅缩短分析时间,并没有提高分离度。二元体系中所谓的“协同作用”仅表现在对表观淌度的影响上,对分离度无协同作用。

4 结 论

本研究建立了以 SBE- β -CD 和 HP- β -CD 构成的二元体系为拆分剂的毛细管电泳方法,并对其进行了系统的方法学验证,该方法适用于盐酸左西替利嗪原料药和片剂的对映体杂质的定量检查。采用析因实验探讨了电负性的 SBE- β -CD 与电中性的 HP- β -CD 为手性拆分剂时,二种拆分剂之间相互作用对西替利嗪手性分离的影响。结果证明 SBE- β -CD 和 HP- β -CD 之间确实存在协同作用,但这种协同作用仅体现在对表观电渗流的影响上。

参 考 文 献

- [1] Wang DY, Hanotte F, De Vos C, *et al.* Effect of cetirizine, levocetirizine, and dextrocetirizine on histamine-induced nasal response in healthy adult volunteers [J]. *Allergy*, 2001, **56** (4): 339 - 343.
- [2] Chen C. Physicochemical, pharmacological and pharmacokinetic properties of the zwitterionic antihistamines cetirizine and levocetirizine [J]. *Curr Med Chem*, 2008, **15** (21): 2 173 - 2 191.
- [3] Tillement JP, Testa B, Brée F. Compared pharmacological characteristics in humans of racemic cetirizine and levocetirizine, two histamine H_1 -receptor antagonists [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, **66** (7): 1 123 - 1 126.
- [4] Ryu JK, Yoo SD. Simultaneous determination of levocetirizine and pseudoephedrine in dog plasma by liquid chromatography-mass spectrometry in the presence of dextrocetirizine [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2012, **15** (4): 519 - 527.
- [5] Kang SW, Jang HJ, Moore VS, *et al.* Enantioselective determination of cetirizine in human plasma by normal-phase liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2010, **878** (32): 3 351 - 3 357.
- [6] Nojavan S, Fakhari AR. Chiral separation and quantitation of cetirizine and hydroxyzine by maltodextrin-mediated CE in human plasma: effect of zwitterionic property of cetirizine on enantioseparation [J]. *Electrophoresis*, 2011, **32** (6/7): 764 - 771.
- [7] Chen B, Du YX. Evaluation of the enantioseparation capability of the novel chiral selector clindamycin phosphate towards basic drugs by micellar electrokinetic chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2010, **1 217** (11): 1 806 - 1 812.
- [8] Jamali B, Björnsdóttir I, Cornett C, *et al.* Investigation of a dual CD chiral CE system for separation of glitazone compounds [J]. *Electrophoresis*, 2009, **30** (16): 2 853 - 2 861.
- [9] Fillet M, Hubert P, Crommen J. Enantiomeric separations of drugs using mixtures of charged and neutral cyclodextrins [J]. *J Chromatogr A*, 2000, **875** (1/2): 123 - 134.
- [10] Lipka E, Danel C, Yous S, *et al.* Dual CD system in capillary electrophoresis for direct separation of the four stereoisomers of agonist and antagonist melatonergic ligands [J]. *Electrophoresis*, 2010, **31** (9): 1 529 - 1 532.

· 校园信息 ·

中国药科大学 2013 年度国家自然科学基金喜获丰收

日前,国家自然科学基金集中受理阶段评审结果公布。截至 8 月底,中国药科大学共有 54 个项目获得立项资助,总资助金额 3 579 万。

从学部分布来看,这 54 个资助项目中,医学部 44 项、化学科学部 5 项、生命科学部 2 项、信息科学部 1 项、基础人才基金 2 项。从项目类别来看,中国药科大学荣获重点项目 1 项、国际(地区)合作与交流项目 1 项、国家基础人才培养基金重点项目 2 项、国家杰出青年科学基金项目(在公示期)1 项、优秀青年科学基金项目 1 项、面上项目 27 项、青年科学基金项目 19 项、海外及港澳学者合作研究基金 2 项。

所获项目中,集中申报项目资助比率由去年的 26.03% 提高到 30.51%,创中国药科大学历史新高,比同期全国平均资助率 22.52% 高出近 8 个百分点。重点项目、国际(地区)合作与交流项目及国家基础人才培养基金项目数量,为中国药科大学历史同期最好水平,充分展示了中国药科大学申报项目的高质量和高水平。

(科技处)