

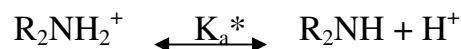
四、利用非水相毛細管電泳法分離苯二氮平類藥物

4.1 分離原理

苯二氮平類藥物由結構上 (Fig.4-1) 分析，溶於水中應成微鹼性狀態，在中性或鹼性的環境中分子屬於不帶電之中性分子，在此情況下使用 CZE 進行分離則會因分析物之移動速度與電滲流速度相同而無法分離，對中性分析物而言，需要界面活性劑加入緩衝溶液中形成帶電微胞，藉著帶電微胞電泳遷移速度與電滲流遷移速度不同，並利用分析物在溶液相與微胞相間的分配行為方能分離成功[48,49]。

本實驗並不採行上述方式，而是利用酸性條件，讓分析物結構之 amino group 質子化，使分析物帶正電，由分子結構些許的不同影響正電荷之穩定性，通常能使正電荷穩定存在的苯二氮平分析物移動速度較快，反之則移動速度變慢。查閱相關有機化合物之 pK_a 物性表，得知胺類化合物其接受 $[H^+]$ 之能力與與氮原子周圍取代基有關，而 pK_a 為已質子化 (protonated) 胺類化合物在水溶液中再解離出氫離子 $[H^+]$ 之指標， pK_a 愈大，顯示已質子化胺類愈不易釋放出 $[H^+]$ 。其平衡濃度也愈大。相對而言亦表示愈容易接受 $[H^+]$ 。由已質子化胺類相關物性表得知 pK_a 的變化關係：脂肪族胺類大於芳香族胺類，氮原子周圍存在有推電子基者 (-CH₃、-OH)，大於存在有拉電子基者 (-NO₂、-Cl、-COOH)，且脂肪族胺因立體阻礙效應影響下，其 pK_a 大小順序為：二級胺大於一級胺大於三級胺。

K_a^* 表示已質子化 (protonated) 胺類在有機溶液之解離常數，分析物 (有機胺) 與 $[H^+]$ 作用方程式如下所示：



$$K_a^* = [R_2NH][H^+] / [R_2NH_2^+]$$

另由 Table 4-1 及 Table 4-2 清楚的觀察到無論是已質子化胺類或是有機酸，在甲醇溶液中之 pK_a^* 均高於在水溶液中的 pK_a ，顯示在甲醇溶液影響下，無論是已質子化胺類或是有機酸均不易釋放出 $[H^+]$ 。通常 pK_a 較高的化合物，於有機溶液中之 pK_a^* 亦相對較高。

本實驗採用非水相電泳之主要原因：係考量有機溶劑對疏水性分析物溶解力大(管壁吸附效應小)、電流值低(焦耳熱低)，產生分析物波峰寬度擴散效應較小，因此非水相毛細管電泳法在有機溶劑之高溶解力輔助下，應可獲得不錯的分離結果。

4.2 儀器裝置

毛細管電泳儀是使用貝克曼公司(Beckman Instrument, Fullerton, CA, USA)所製造之 P/ACE 2000 系列進行實驗，資料分析則利用視窗版訊華軟體(訊華股份有限公司, Taipei, Taiwan)予以處理，內徑 $50\ \mu\text{m}$ ，外徑 $360\ \mu\text{m}$ ，總長 $37\ \text{cm}$ (至偵測窗口為 $30\ \text{cm}$)之二氧化矽毛細管(fused-silica capillary, polymicro Technologies, Inc., Phoenix, AZ, USA)作為分離管柱，毛細管外層塗附之聚醯亞胺 polyimide(PI)以火焰控制燒灼長度 $0.5\ \text{cm}$ ，再以乙醇溶劑輕微擦拭灼燒處，管柱溫度控制在 25°C 下。分離電壓為 $18\ \text{kV}$ 。樣品注射以壓力注射($0.5\ \text{psi}$)方式導入毛細管中。所使用之偵測器為 P/ACE 2000 內建之紫外光-可見光(UV-Visible)偵測器，偵測波長 $230\ \text{nm}$ 。

4.3 試藥

所有試藥均為分析級。苯二氮平類標準品八種包括氯二氮平(chlordiazepoxide)、氯氮平酸鹽(clorazepate)、安定(diazepam)、溴西洋(bromazepam)、硝西洋(nitrazepam)、阿普唑他(alprazolam)、三唑他(triazolam)、舒樂安定(estazolam) 皆購自 Sigma

Chem.Co.(St.Louis,MO,U.S.A.)。草酸(oxalic acid)購自 Riedel-deHaën 公司。三乙胺(triethylamine)購自 Fluka 公司。甲醇(methanol)、乙醇(ethanol)皆購自 Merck 公司。乙腈(acetonitrile) 購自 Mallinckrodt 公司。苯二氮平分析物結構詳見 Fig. 4-1。真實藥片部分：白朗明膠囊購自人生製藥股份有限公司、煩寧錠購自 ROCHE Pharmaceutical Co.,LTD。

4.4 實驗方法

4.4.1 新的毛細管調態

將一支量好適當的長度，並用石英切片(cutter)裁剪毛細管，在一端開口 7.0 公分處做一標記，利用火焰加熱方式將標記處外圍之聚醯亞胺(PI)灼燒，並以拭鏡紙沾取乙醇擦拭灼燒處，去除碳污後產生一透明窗口，做為量測 UV-Visible 吸收值之用。再將燒好窗口的毛細管裝入 P/ACE 2000 卡匣(Cartridge)後上機。為了讓毛細管內壁之矽醇基游離活化，實驗前，先以 0.5 N 三乙胺甲醇溶液沖洗 30 分鐘，後以純淨的甲醇溶劑沖洗 40 分鐘，以去除殘留之三乙胺。

4.4.2 實驗前、後毛細管的處理

先以 0.1 N 三乙胺甲醇溶液沖洗 1 分鐘，再以甲醇沖洗 10 分鐘，最後以實驗所使用的有機相酸性緩衝溶液沖洗 4 分鐘，使管柱內壁矽醇基充分與酸性緩衝溶液作用達到平衡，即可進行樣品分析實驗。完成電泳分離後，由於有機相酸性緩衝溶液含有高濃度的草酸晶體，有機溶劑極易揮發，故容易發生晶體結晶阻塞毛細管管柱。因此每次完成電泳分離後應立即以甲醇溶劑沖洗 5 分鐘；另每日實驗結束保存管柱前必須再沖洗甲醇溶劑 40 分鐘，以徹底清除酸性緩衝溶液中之草酸與三乙胺，延長管柱使用壽命。每次分析樣品注射量，以 0.5 psi 注射 2 秒。

4.4.3 苯二氮平標準溶液之配製

苯二氮平標準品係以甲醇為溶劑，各配置成 1000 ppm 的標準母液存放在冰箱中 4°C 保存，分析時再依所需要的情況以甲醇-乙醇 (50:50,v/v)之混合溶劑加以混合稀釋。

4.4.4 水相部份酸性緩衝溶液分離測試

由分離原理的論述可知在酸性環境下苯二氮平分子可被質子化帶上正電荷，在一般水相電泳中測試其分離能力，水相酸性緩衝溶液之組成包含乙酸及乙酸钠，二種溶液條件分別為 pH 4.0, 20 mM 或 40 mM 乙酸及乙酸钠緩衝溶液，進行分離時分離電壓為 18 kV，有效管長 30 cm，毛細管全長 37 cm。

4.4.5 非水相部份甲酸系與乙酸系分離測試

非水相酸性緩衝溶液之組成包含有甲酸/甲酸钠或乙酸/乙酸钠，其有機溶劑組成為甲醇及乙腈。相關配製條件為：甲酸系測試二種濃度分別為 0.5 M 與 1.0 M，共軛鹼甲酸钠均為 10 mM。乙酸系測試二種濃度亦分別為 0.5 M 與 1.0 M，共軛鹼乙酸钠均為 10 mM 乙酸钠。配製以上四種緩衝溶液所使用之有機溶劑均為 甲醇-乙腈 (95:5,v/v) 混合溶劑。其餘分離條件與前述水相電泳相同。

4.4.6 非水相部分草酸系不同分離條件之測試

4.4.6.1 不同草酸濃度之探討

非水相酸性緩衝溶液之組成包含有草酸與三乙胺，其有機溶劑組成為甲醇及乙腈。先固定三乙胺的濃度為 2.5 mM 與 甲醇-乙腈 (95:5,v/v) 混合溶劑，改變草酸濃度由 250 mM ~ 750 mM，測試緩衝溶液中草酸

濃度改變對苯二氮平分離程度及遷移時間之影響。

4.4.6.2 不同三乙胺濃度之探討

非水相酸性緩衝溶液組成：固定草酸濃度為 450 mM 與甲醇-乙腈 (95:5,v/v)混合溶劑，改變三乙胺的濃度由 2.0 mM ~ 7.5 mM，測試緩衝溶液中三乙胺濃度改變對苯二氮平分離程度及遷移時間之影響。

4.4.6.3 不同有機溶液組成之探討

非水相酸性緩衝溶液組成：固定草酸濃度為 450 mM 與三乙胺的濃度 2.5 mM，改變混合溶劑甲醇-乙腈之組成比例，混合溶劑乙腈含量由 0% ~ 20%，測試緩衝溶液中乙腈含量多寡對苯二氮平分離程度及遷移時間之影響。

4.4.6.4 標準濃度校正曲線之製作

取八種苯二氮平混合標準原液以甲醇-乙醇(50:50,v/v)混合溶劑加以稀釋，配製成 5 ppm、10 ppm、30 ppm、50 ppm、100 ppm 等五種濃度，樣品注入條件為 0.5 psi; 2 秒，以前述測試之最佳分離條件進行毛細管電泳分析三次。以八種苯二氮平之波峰面積對濃度作圖，製備標準校正曲線。另針對分析物之遷移時間及波峰面積進行再現性比較分析，個別計算相對標準偏差值(RSD)。

4.4.6.5 苯二氮平真實藥片樣品之檢測

先量測苯二氮平類藥片之單一藥錠總重，再使用研鉢將藥錠磨碎，取出少量精稱後之藥錠粉末，置入 20 ml 樣品瓶中，添加 10 ml 甲醇-乙醇(50:50,v/v)之萃取溶劑，加蓋以超音波震盪方式震盪 30 分鐘，完成萃取程序靜置 20 分鐘，吸取上層澄清液通過 0.2 μm 之濾片

過濾，最後將濾液注入毛細管電泳儀中以前述最佳分離條件進行定量分析。

4.5 結果與討論

4.5.1 水相酸性緩衝溶液測試結果

使用酸性水相 buffer 進行分離,由實驗結果 Fig.4-2 可以清楚的顯示其分離欠佳的情況，僅 pK_a^* 較大的 chlordiazepoxide、clorazepate、diazepam 可以完全分離，其餘分析物則部份重疊。這是因分析物本身具疏水性，對水溶解度較差，致使影響分離解析度。而且於酸性條件下苯二氮平接受 $[H^+]$ 帶正電，容易吸附毛細管管壁，因此 peak 明顯呈現拖尾變寬的跡象。整體而言分離解析程度不佳，分析物間與電滲流訊號部份重疊，無法完全分離八種苯二氮平類藥物。由分離理論板數比較表 Table 4-3 亦可發現水相酸性緩衝溶液系統，其分離理論板數較低。



4.5.2 利用弱酸性有機酸(甲酸系,乙酸系)非水相緩衝溶液測試結果

由 Fig.4-3 發現於乙酸系緩衝溶液中，八種分析物訊號與電滲流訊號完全重疊，增加乙酸濃度亦無明顯效果；而改用甲酸系緩衝溶液，情況稍有改善，但亦僅 chlordiazepoxide 能從重疊訊號中分離。查閱有機酸在甲醇與水溶液之解離常數表 Table 4-2[43]即可豁然開朗，發現一切現象皆是有機酸在不同溶劑中，提供(釋放) $[H^+]$ 能力有所差異所引起。有機酸於甲醇溶液中 pK_a^* 值明顯高於水中之 pK_a 值(大約提高 4~5 單位)，這表示在甲醇溶劑有明顯抑制有機酸提供 $[H^+]$ 的能力。因此使用乙酸 buffer 時，因乙酸釋放 $[H^+]$ 能力較小，在甲醇溶劑中抑制有機酸提供 $[H^+]$ 的情況下幾乎不能使苯二氮平分子帶電，於是分析物訊號與 EOF peak 完全重疊；而改用甲酸系 buffer 後，雖然甲酸 pK_a 小於乙酸

pK_a ，推測即使在甲醇溶液中，甲酸提供氫質子能力仍大於乙酸，可使八種苯二氮平中 pK_a^* 較大的 chlordiazepoxide (pK_a 4.6)接受質子帶上正電，形成已質子化的苯二氮平，而與中性的 EOF 訊號完成分離，但其餘七種苯二氮平仍因 pK_a^* 較小，致使甲酸於甲醇溶劑中無法使其充分接受 $[H^+]$ 而質子化。歸納此一趨勢：雖然非水相溶劑能對疏水性之苯二氮平藥物有良好的溶解力，可以克服分析物吸附於負電管壁造成 peak 拖尾之現象，但苯二氮平分子因化學結構的因素(氮原子周圍無強而有力的推電子基且附近又有苯環共振結構穩定氮原子之電子對)影響下，接受質子的能力不強，又在大量甲醇溶劑存在情況，一般有機酸是無法使苯二氮平分子完全質子化而帶上電荷的。在此我們審慎考慮後，選用草酸(乙二酸)作為質子化試劑，由於草酸具有更小的 pK_a 值，這使得我們利用非水相電泳分離苯二氮平的工作又露出一線曙光。

4.5.3 緩衝溶液中不同草酸濃度對分離結果之影響

使用草酸作為質子化試劑，果然可以得到不錯的分離結果 (Fig.4-4)，在此我們進行變化草酸濃度的實驗，由實驗結果整理 (Fig.4-5) 發現一個有趣的現象：隨著草酸濃度增加，大部分苯二氮平電泳遷移率均先增大再緩速遞減，惟 pK_a^* 是最大者(pK_a 4.6) chlordiazepoxide 是一路向下降，而 pK_a^* 最小的二個 triazolam、estazolam 則是一路上升。這是何故呢？由前述的分離原理我們知道 pK_a^* 可以視為苯二氮平接受 $[H^+]$ 能力的指標， pK_a^* 愈大愈易接受 $[H^+]$ ，故對 chlordiazepoxide 而言草酸 250 mM 似乎已經足夠，chlordiazepoxide 已充分質子化了，如再增加草酸濃度則相對增加溶液中之離子強度，溶液離子強度愈高則帶電分子周圍電雙層厚度被壓縮，導致粒子周圍之 zeta 電位變小，因此才出現電泳遷移率逐漸變慢的情形。至於 triazolam 與 estazolam 二者則不同，因為其 pK_a^* 小，不易接受 $[H^+]$ ，因此受環境中 $[H^+]$ 濃度影

響較大， $[H^+]$ 愈多，triazolam 與 estazolam 愈易質子化，於是隨著草酸之濃度增加顯示接受質子化機會增加，但整體而言，前述高離子濃度效應仍還不敵質子化能力提升之結果，故針對 triazolam 與 estazolam 而言電泳遷移率當然會隨著草酸濃度的增加而逐步加快了。至於其餘的苯二氮平遷移行為則介於前述二者之間，電泳遷移率先加速再緩慢降低。考量八種苯二氮平分析物的分離解析情況，此項變因之最佳條件：以草酸濃度為 450 mM 時最為適當。

4.5.4 緩衝溶液中不同三乙胺濃度對分離結果之影響

由實驗結果 Fig.4-6、Fig.4-7 顯示：隨著三乙胺濃度的增加，電滲流遷移速率急速變慢。雖然三乙胺增加會對溶液離子濃度提升有正面影響會抑制電滲流強度，但影響的程度還不致如此大（三乙胺濃度很低），推測其主要的原由是：因三乙胺是一種脂肪族直鏈三級胺，在酸性環境中接受質子而帶上正電，因電性異性相吸的關係三乙胺離子容易吸附於負電荷的毛細管管壁，形成中和管壁負電荷大幅抑制電滲流的影響。實驗結果經比較分析後，發現 2.5 mM 三乙胺是分離解析度較好的條件，而緩衝溶液含 3.5 mM 三乙胺以上的條件，圖形解析程度明顯變差。

4.5.5 緩衝溶液中不同比例有機溶液組成對分離結果之影響

實驗結果 Fig.4-8、Fig.4-9 顯示：有機溶液組成會影響分析物遷移速度與分離程度。當緩衝溶液中乙腈組成增加時，電滲流及分析物遷移速度明顯隨之提升，但分析物間分離程度則變差。這樣的情形由前述非水相溶劑物性一覽表 Table 3-1，可推測大概的原因。由於有機溶劑相較於水溶劑具有不同的導電特性與物理特性，一般來說它們的黏度都比水低，而乙腈的 zeta 電位特別高(195.2 mV)，因此含乙腈溶劑

之 buffer，在電泳中的電滲流特別快。另因乙腈本身不是質子型溶劑(含量過高不利質子化)且其黏度比甲醇還要低，容易造成分析物擴散，因此溶液中乙腈含量增加，除了分析物遷移速度變快外，也會伴隨 peak 擴散等不利之影響。尤其當乙腈含量過高(>20%)，在質子化效應減弱情況下高 pKa*分析物電泳遷移率開始變慢。總體而言，經比較分析後，發現非水相緩衝溶液中組成含有甲醇-乙腈(95:5,v/v)混合溶劑是較好的分離溶劑。

4.5.6 再現性分析與定量標準校正曲線

為確定非水相毛細管電泳法分離苯二氮平實驗各影響因子之穩定性，以八種苯二氮平分析物進行分離實驗，Table 4-4 係測定分析物遷移時間及 peak 積分面積再現性(reproducibility)之分析結果，在遷移時間方面(Fig.4-10)相對標準偏差值均小於 1.25%，peak 積分面積方面均小於 5%，顯示方法再現性良好。

將八種苯二氮平混合標準溶液以甲醇-乙醇(50:50,v/v)混合溶劑稀釋配製完成後，依上述最佳分離條件來進行製作定量檢量線之實驗，結果八種苯二氮平定量檢量線線性方程式如 Table 4-5 所示，線性相關係數(R^2)介於 0.9910~0.9981 之間，顯示線性關係良好。而使用最適化分離條件，其方法偵測極限為 1.70~3.62 ppm 詳見 Table4-5。

4.5.7 苯二氮平真實藥片樣品之檢測

苯二氮平真實藥片電泳分離圖譜詳見 Fig 4-11。經定量計算後：白朗明膠囊每錠含 chlordiazepoxide 9.92 mg;煩寧錠每錠含 diazepam 4.65 mg。而藥品包裝標示白朗明膠囊每錠含 chlordiazepoxide 10.0 mg;煩寧錠每錠含 diazepam 5.0 mg。

4.6 結論

本次研究成功的利用非水相毛細管電泳法在10分鐘內分析了八種苯二氮平藥物，分析物通過偵測器之出現順序依次為 chlordiazepoxide、clorazepate、diazepam、bromazepam、nitrazepam、alprazolam、triazolam 和 estazolam。使用緩衝溶液為包含 2.5 mM 三乙胺及 450 mM 草酸之甲醇-乙腈(95:5,v/v)混合溶劑，分離電壓 18kV。八種苯二氮平遷移時間相對標準偏差均小於 1.25 %，在定量上我們做了 5 ppm~100 ppm 五種濃度的檢量線，其線性關係係數亦高於 0.991 以上。

本方法亦實際應用於真實醫療藥品之分析，檢測藥品有效成分含量與標示含量的差距。與水相毛細管電泳相較，非水相毛細管電泳法呈現了更好的分離效率與解析能力，對於許多無法以水相電泳分離的化合物，改用非水相毛細管電泳法進行嘗試，不失為一種更好的選擇。

此外實驗過程中亦發現，進行非水相電泳時，仍需考慮有機溶劑之溶合效應。一般來說，有機溶劑對電解質之溶合能力不及於水，故電解質在有機溶劑中解離率偏低(Table 4-1)，這樣效應對已獲得 $[H^+]$ 的胺類分析物而言應該是是有利的。但事實不然，由後續的實驗結果觀察，在水溶液中分析物反而是較容易接受 $[H^+]$ 而與 EOF 分離，而在甲醇中則須較強的有機酸方能得到分離的結果。比較 Table 4-1 與 Table 4-2 之數據更能清楚的了解，雖然分析物之 pK_a^* 有所增加，但有機酸之 pK_a^* 增加的幅度更大，顯示有機酸在甲醇溶液中解離度下降幅度更大(有機酸提供 $[H^+]$ 能力減弱遠大於分析物接受 $[H^+]$ 能力之提升)，所以在甲醇溶液中必須使用較強的有機酸(pK_a^* 小)方能使分析物充分質子化。