

几种苯甲酰胺类抗精神病药物的手性色谱拆分 及其对映体含量的测定

王李平, 范华均*, 巫坤宏, 彭晓升, 江子滔, 臧林泉

(广东药学院药科学院, 广东 广州 510006)

摘要: 采用直链淀粉-三(5-氯-2-甲基苯基氨基甲酸酯)手性固定相(CSP),以0.1%二乙胺正己烷和0.1%二乙胺乙醇为流动相梯度洗脱,以舒必利、阿米舒必利和莫沙必利为目标物,利用高效液相色谱法研究了这3种苯甲酰胺类药物的手性色谱分离行为。分别考察了流动相组成、添加剂及柱温对3种药物对映体分离的影响,从热力学和结构上探讨了色谱拆分的机理。结果表明:在优化的色谱条件下,舒必利、阿米舒必利和莫沙必利对映体的分离度 $R_s > 1.5$;计算了3种药物对映体的色谱保留因子 k 和分离因子 α ,以及与CSP相互作用的热力学函数,其相互作用大小依次为舒必利>阿米舒必利>莫沙必利。已将该方法成功地应用于上述3种药物片剂和血清中其对映体的测定,方法简便、准确、可靠。

关键词: 高效液相色谱法; 舒必利; 阿米舒必利; 莫沙必利; 药物; 手性拆分

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2012)12-1265-06

Chiral separation of benzamide antipsychotics and determination of their enantiomers by high performance liquid chromatography

WANG Liping, FAN Huajun*, WU Kunhong, PENG Xiaosheng, JIANG Zitao, ZANG Linquan

(College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: A new method of the chiral separation of three drugs such as sulpiride, amisulpride and mosapride was developed on the chiral stationary phase of amylose-tris-(5-chloro-2-methyl-phenylcarbamate) (ACMPC) by high performance liquid chromatography. The chromatographic behaviors of enantiomers of the three drugs were investigated in the mobile phases consisted of ethanol and *n*-hexane (containing 0.1% (v/v) diethylamine). The chromatographic conditions including the composition of the mobile phase, additives and temperature were further optimized for the chiral separation. The mechanism of racemic resolution for the mentioned drugs is discussed thermodynamically and structurally. The results indicated that these three chiral drugs could be separated on an ACMPC column under the optimum conditions, and their chiral resolutions were improved up to more than 1.5. The chromatographic parameters such as the retention factor k , separation factor α are presented, and the thermodynamic functions were calculated for the separation of the enantiomers of the three drugs. The method has been successfully applied to the determination of the enantiomers of the three drugs in tablets and blood serum. It is simple, reliable and accurate.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); sulpiride; amisulpride; mosapride; drugs; chiral separation

舒必利(sulpiride, SUL) 由于具有强烈的止吐作用,主要用于中枢性止吐,被称为止吐灵。自从发

* 通讯联系人: 范华均, 博士, 教授, 主要从事药物提取分离及药物分析。E-mail: junhuafan@126.com.

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09102-001-31)和广东药学院师资队伍建设基金项目(52104109)。

收稿日期: 2012-07-21

现它具有较强的抗木僵、退缩、幻觉、妄想、精神错乱作用以及抗抑郁作用后变身为抗精神病药物,并在临床上得到了广泛的应用。此后,与其化学结构相似的苯甲酰胺类药物迅速发展到目前的 20 余种,成为抗精神病药物中的一大类^[1-3]。阿米舒必利和莫沙必利是其经结构修饰的苯甲酰胺类药物,分别用于精神疾病和功能性肠胃疾病的临床治疗。这类苯甲酰胺类手性药物大多存在 2 种或 2 种以上的对映体,近年来逐渐发现它们的对映体在药理、药效作用上存在较大的差异^[4,5],及其在制剂的质量控制研究上也存在局限性^[6-8]。为了减少毒副作用,避免其不良反应发生,提高药物利用度,对其手性对映体药物的研究越来越引起重视。目前主要采用毛细管电泳^[9-11]、超临界流体色谱^[12]和高效液相色谱(HPLC)^[11,13-19]等方法研究手性对映体药物;其中以利用多糖类型、蛋白质型和大环抗生素型的手性固定相(CSP)拆分的 HPLC 方法应用最广,纤维素氨基甲酸酯和直链淀粉氨基甲酸酯两类衍生物的 CSPs 使用最多。利用这两类多达 8 种 CSPs(如 Chiralcel OD-H (cellulose-tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate))、Chiralpak AD-H (amylose-tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)))分离几十种手性药物试验中发现舒必利对映体的分离度(R_s)不高^[13,15,19]。未见有利用直链淀粉-三(5-氯-2-甲基苯基氨基甲酸酯)(amylose-tris-(5-chloro-2-methylphenylcarbamate), ACMPC) CSP 柱分离上述 3 种药物的报道。本工作采用正相高效液相色谱法(NP-HPLC),以舒必利、阿米舒必利(amisulpride, AMSUL)和莫沙必利(mosapride, MOSA)(化学结构见图 1)为目标物,采用二乙胺-正己烷-乙醇作为流动相,研究了这 3 种药物的对映体在 ACMPC 固定相上的色谱分离行为,从热力学角度探讨了手性拆分的机理,建立了测定这 3 种药物对映体的分析方法。结果显示采用 NP-HPLC 可以拆分舒必利、阿米舒必利和莫沙必利消旋体,并应用于血清和有关制剂中 3 种药物的含量分析,结果较为满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司); DL-360A 超声清洗器(上海之信仪器有限公司)。

正己烷(色谱纯,德国默克公司);无水乙醇(分析纯,广州试剂厂);甲醇(分析纯,广州试剂厂);二乙胺(分析纯);舒必利对照品(香港先进技术工业

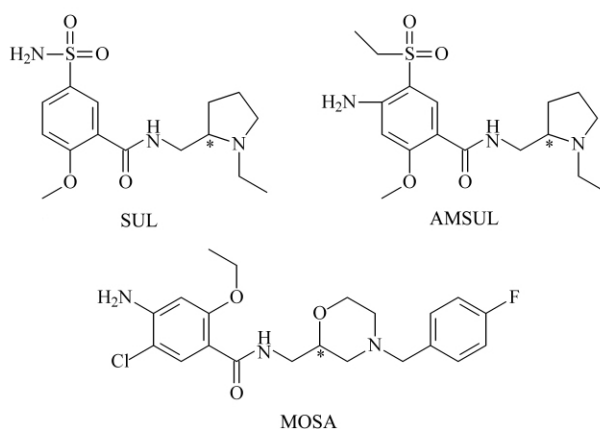


图 1 舒必利、阿米舒必利及莫沙必利的化学结构
Fig. 1 Chemical structures of sulpiride (SUL), amisulpride (AMSUL) and mosapride (MOSA)

有限公司);阿米舒必利(泰兴市新祥医药原料有限公司);枸橼酸莫沙必利片(成都康弘药业集团股份有限公司);舒必利片(北京益民药业有限公司)。

1.2 试液配制

S-舒必利对照品溶液:精密称取 S-舒必利对照品,加乙醇稀释至刻度,摇匀,即得 198 mg/L S-舒必利对照品溶液。

舒必利、阿米舒必利、莫沙必利样品溶液的配制:分别称取一定量的阿米舒必利、莫沙必利,加无水乙醇超声溶解,再用无水乙醇定容至 25 mL,摇匀,过 0.45 μm 滤膜。

1.3 色谱条件

色谱柱:Phenomenon Lux 5u Amylose-2(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)。流动相:0.1% 二乙胺正己烷(A)和 0.1% 二乙胺乙醇(B)。梯度洗脱程序:0~41 min, 85% A; 41~75 min, 60% A。检测波长:234 nm;流速:1 mL/min;柱温:15 $^{\circ}\text{C}$;进样量:20 μL 。

2 结果与讨论

2.1 流动相组成的影响

以正己烷-异丙醇和正己烷-乙醇为流动相,采用等度洗脱在室温下试验了 2 种流动相及其不同比例对舒必利、阿米舒必利和莫沙必利对映体分离的影响,结果见表 1。

由表 1 可知,随着正己烷比例的增大,对映体的保留时间明显增加,分离度也增大;但采用正己烷-乙醇作为流动相,3 种药物对映体分离度明显优于以正己烷-异丙醇为流动相的分离效果,这表明异丙醇由于氢键作用力比乙醇小,使药物分子与固定相的作用更强,因而保留时间更长,因此以乙醇作为极

性改性剂, 更有利于 3 种药物对映体在固定相上分离。3 种药物的保留时间表明, 它们与固定相的作用力差异为舒必利 > 阿米舒必利 > 莫沙必利; 而分

离度大小也表现了固定相拆分对映体的能力, 其拆分差异的大小顺序为舒必利 > 莫沙必利 > 阿米舒必利。因此以正己烷-乙醇作为流动相更适宜。

表 1 不同流动相对 3 种药物对映体分离的影响

Table 1 Effects of different mobile phases on the enantiomeric separation for SUL, AMSUL and MOSA

Mobile phase	Enantiomeric resolutions (R_s)			Retention times (t_{R1}, t_{R2}) /min		
	SUL	AMSUL	MOSA	SUL	AMSUL	MOSA
<i>n</i> -Hexane-isopropanol (65:35, v/v)	1.001	0.502	0.623	36.483, 38.985	21.671, 23.408	9.654, 10.532
<i>n</i> -Hexane-isopropanol (75:25, v/v)	1.213	0.734	1.025	79.326, 83.821	43.408, 45.342	18.361, 19.735
<i>n</i> -Hexane-ethanol (55:45, v/v)	2.023	0.348	0.524	12.005, 16.770	7.234, 7.961	4.623, 5.364
<i>n</i> -Hexane-ethanol (65:35, v/v)	2.637	0.716	1.031	22.485, 30.561	12.483, 13.295	5.732, 6.341
<i>n</i> -Hexane-ethanol (75:25, v/v)	3.543	1.263	1.328	37.132, 50.970	21.671, 23.408	8.047, 8.734

2.2 酸性和碱性添加剂的影响

由于 3 种苯甲酰胺类药物均含有酸性和碱性基团, 本工作考察了在正己烷-乙醇(75:25, v/v) 流动相中分别加入 0.1% 三氟乙酸、0.1% 二乙胺等添加剂后对 3 种药物对映体分离的影响, 结果见表 2。

由表 2 可知, 当流动相中添加 0.1% 二乙胺时,

3 种药物对映体的分离度得到改善。但添加 0.1% 三氟乙酸时, 各对映体的分离度变小, 也发现色谱峰会出现分叉的现象。加入二乙胺作为添加剂可保持药物以分子形式存在, 抑制其电离, 且色谱峰峰形得到改善。故实验中在流动相中加入 0.1% 二乙胺作为抑制剂。

表 2 流动相中添加酸或碱对 3 种药物对映体分离的影响

Table 2 Effects of adding acid or base in the mobile phase of *n*-hexane-ethanol (75:25, v/v) on the enantiomeric separation for SUL, AMSUL and MOSA

Additive	Enantiomeric resolutions (R_s)			Retention factors (k_1)			Retention factors (k_2)			Separation factors (α)		
	SUL	AMSUL	MOSA	SUL	AMSUL	MOSA	SUL	AMSUL	MOSA	SUL	AMSUL	MOSA
Without additive	2.434	0.926	1.321	16.600	10.842	3.496	23.873	12.791	4.884	1.438	1.180	1.397
0.1% Trifluoroacetic acid	0.312	0.514	0.712	14.778	7.743	3.093	17.015	9.308	4.219	1.151	1.202	1.364
0.1% Diethylamine	2.923	1.045	1.344	19.280	11.209	3.397	27.852	13.534	4.773	1.445	1.207	1.405

2.3 温度的影响

以 0.1% 二乙胺-正己烷-乙醇作为流动相, 考察了在 15~35 °C 柱温下 3 种药物对映体的色谱分离行为, 结果见表 3。

由表 3 可知, 在拆分舒必利、阿米舒必利和莫沙必利时, 分离度随着温度的升高而减小。故选择 15 °C 低温条件更有利于上述 3 种药物的对映体的分离。

表 3 温度对 3 种药物对映体分离的影响

Table 3 Effect of temperature on the enantiomeric separation for SUL, AMSUL and MOSA

Temperature / °C	Enantiomeric resolutions (R_s)			Retention factors (k_1)			Retention factors (k_2)			Separation factors (α)		
	SUL	AMSUL	MOSA	SUL	AMSUL	MOSA	SUL	AMSUL	MOSA	SUL	AMSUL	MOSA
15	3.807	1.702	1.451	36.292	29.958	7.5223	38.028	32.641	8.662	1.048	1.090	1.152
20	3.936	1.664	1.375	36.036	27.894	7.042	37.632	30.794	8.044	1.044	1.104	1.142
25	3.955	1.597	1.361	35.443	26.185	6.792	36.881	28.939	7.726	1.041	1.105	1.138
30	3.776	1.572	1.308	35.135	24.787	6.508	36.484	27.405	7.370	1.038	1.106	1.132
35	3.596	1.559	1.238	34.989	23.621	6.275	36.288	26.204	7.098	1.037	1.109	1.131

2.4 流动相比例对对映体分离的影响

在上述实验的基础上选择柱温 15 °C, 在 0.1% 二乙胺添加剂存在下, 进一步优化调整正己烷与乙醇的比例。结果表明: 当流动相中正己烷与乙醇的比例分别为 55:45、85:15、85:15 时, 舒必利、阿米舒必利和莫沙必利 3 种药物分离度均大于 1.5, 色谱

峰峰形完整、对称, 理论塔板数大于 3 000, 可满足分析的要求; 经与对映体标准品溶液对比和文献对比, 舒必利、阿米舒必利的 S-型对映体均先出峰^[16]; 但莫沙必利对映体的保留行为则易受介质和温度的影响, 其 R-型对映体先出峰^[17, 20]。舒必利、阿米舒必利和莫沙必利色谱图见图 2。

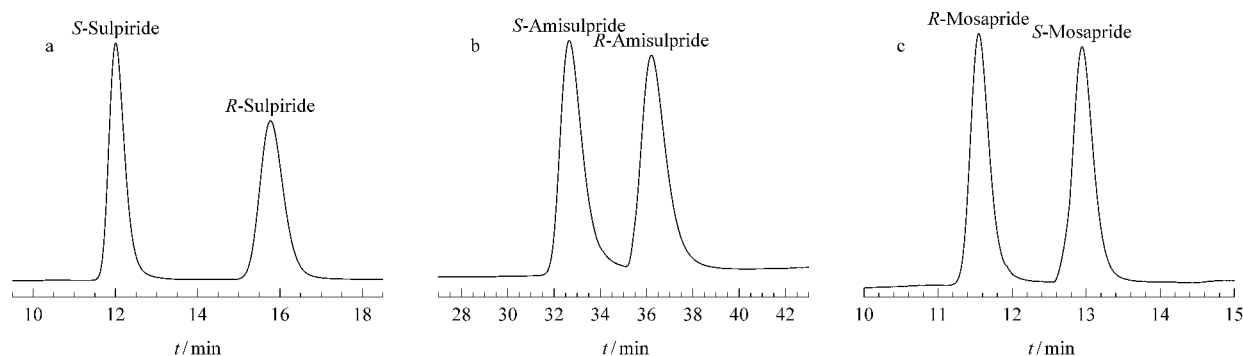
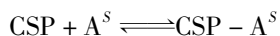
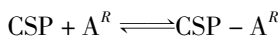


图 2 (a) 舒必利、(b) 阿米舒必利和 (c) 莫沙必利对映体分离的色谱图
Fig. 2 HPLC chromatograms of the enantiomeric separation of (a) sulpiride, (b) amisulpride and (c) mosapride

2.5 对映体拆分机理的探讨

2.5.1 对映体拆分的热力学过程

手性药物(A)的R和S对映体(分别用A^R和A^S表示)在CSP上存在以下吸附/解吸平衡:



在液相色谱分析中,分离自由能的变化关系为:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = -RT \ln \frac{k}{\Phi}$$

$$\text{即: } \ln k = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R}$$

其中 ΔH^0 、 ΔS^0 分别为溶质在固定相和流动相间分配的焓变和熵变, Φ 为相比(固定相和流动相的体积比)。测定各对映体的保留因子 k ,再通过 $\ln k \sim 1/T$ 作图,根据其斜率和截距可计算各对映体的 ΔH^0 、 ΔS^0 。舒必利的线性回归方程: $\ln k_1 = 175.25/T + 2.9836$ ($r = 0.9823$), $\ln k_2 = 221.96/T + 2.8677$ ($r = 0.9843$); 阿米舒必利的线性回归方程: $\ln k_1 = 1055.6/T - 0.2686$ ($r = 0.9983$), $\ln k_2 = 988.35/T + 0.0547$ ($r = 0.9991$); 莫沙必利的线性回归方程: $\ln k_1 = 785.63/T - 0.717$ ($r = 0.9945$), $\ln k_2 = 864.75/T - 0.8524$ ($r = 0.9934$)。

两对映体在色谱柱内两相之间的手性识别作用不同,从而可以实现色谱拆分。这种作用差异可用

相互作用的自由能差来表征: $\Delta(\Delta G^0) = \Delta(\Delta H^0) -$

$$T\Delta(\Delta S^0) = -RT \ln \frac{k_2}{k_1} - RT \ln \alpha, \text{ 即 } \ln \alpha = \ln k_2 - \ln k_1$$

$$= -\frac{\Delta(\Delta H^0)}{RT} + \frac{\Delta(\Delta S^0)}{R}$$

据此可分别计算出舒必利、阿米舒必利和莫沙必利3种药物对映体分离的色谱过程热力学函数 $\Delta(\Delta H^0)$ 和 $\Delta(\Delta S^0)$ 、保留因子 k_1 和 k_2 、分离因子 α 以及 T_{iso} ($\Delta(\Delta G^0) = 0$ 时焓熵相互抵消的转折温度)结果见表4。

由表4可知,在15~35℃条件下,3种药物对映体分离的 $\Delta(\Delta G^0)$ 均小于零,表明色谱拆分过程具有可行性。当 $\Delta(\Delta G^0) = 0$ 时,意味着 $\alpha = 1$,在该转折温度 T_{iso} 下两个对映体将在色谱行为上表现为完全不能分离。当 $T < T_{\text{iso}}$,对映体的色谱分离过程为焓变占优势, α 随着温度的升高而逐渐减小。当 $T > T_{\text{iso}}$,对映体的色谱分离过程为熵变控制, α 随着温度的升高而逐渐增大。3种药物对映体的手性拆分为焓驱动为主的分离过程,温度升高不利于对映体与色谱固定相的相互作用,使对映体与固定相的拆分作用力减弱,其分离度也减小。但阿米舒必利的手性拆分是吸热熵增过程,温度对阿米舒必利的保留行为影响更大,其对映体拆分为不仅受焓驱动的影响,也受熵驱动的影响;与舒必利和莫沙必利相比,温度升高其保留作用明显减小。

表 4 舒必利、阿米舒必利和莫沙必利的色谱过程热力学函数计算结果

Table 4 Thermodynamic data obtained for the enantiomeric separation of sulpiride, amisulpride and mosapride

Compound	Regression equation	r	$\Delta(\Delta H^0) / (\text{J/mol})$	$\Delta(\Delta S^0) / (\text{J}/(\text{mol} \cdot \text{K}))$	$-\Delta(\Delta G^0) / (\text{J/mol})$	$T_{\text{iso}} / \text{K}$
Sulpiride	$\ln \alpha = 46.775/T - 0.1164$	0.9851	-388.9	-0.9677	112.0 - 93.47	401.9
Amisulpride	$\ln \alpha = -67.311/T + 0.3235$	0.8908	559.6	2.689	220.8 - 266.1	208.1
Mosapride	$\ln \alpha = 79.219/T - 0.13553$	0.9711	-658.6	-1.127	355.80 - 304.3	584.6

2.5.2 对映体与固定相的相互作用

本工作采用的固定相为直链淀粉-三(5-氯-2-甲基苯基氨基甲酸酯),属于多糖衍生物,其结构见图

3。实验中利用莫沙必利、阿米舒必利和舒必利混合标准溶液进样,以0.1%二乙胺正己烷和0.1%二乙胺乙醇为流动相,按1.3节的梯度程序洗脱,考察3

种药物及其对映体在该固定相上的色谱分离行为,其色谱图见图 4。

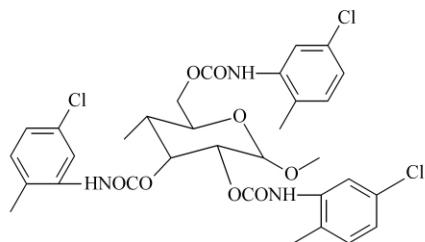


图 3 直链淀粉三(5-氯-2-甲基苯基氨基甲酸酯)色谱固定相的化学结构

Fig. 3 Chemical structure of the stationary phase of amylose-tris-(5-chloro-2-methyl-phenylcarbamate)

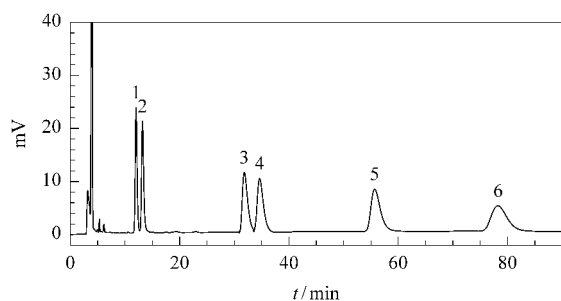


图 4 舒必利、阿米舒必利及莫沙必利的色谱图

Fig. 4 HPLC chromatogram of the mixed sample of sulpiride, amisulpride and mosapride

1. *R*-mosapride; 2. *S*-mosapride; 3. *S*-amisulpride; 4. *R*-amisulpride; 5. *S*-sulpiride; 6. *R*-sulpiride.

实验结果表明:在多聚糖固定相上 3 种药物的出峰的先后顺序为莫沙必利、阿米舒必利、舒必利,即极性大小顺序为莫沙必利 < 阿米舒必利 < 舒必利,3 种药物的母体结构均为苯甲酰胺类药物,但阿米舒必利的结构中引入了乙基,其极性比舒必利小;而莫沙必利在母体结构上进一步引入了苯环及其他烷基,极性更小,因而保留时间最短;按经典的三点作用手性拆分理论,固定相和药物对映体应存在 3

个作用位点。舒必利及阿米舒必利的手性拆分作用力是来自于酰胺基团、吡咯环上的氨基以及磺酰胺基团上的氨基形成的氢键作用;而莫沙必利尽管含有氯代芳香环,但起主要作用的仍然是对苯酰胺基团上的氨基及氯原子形成的氢键作用。相比而言,莫沙必利分子的长度及空间位置匹配程度和作用不如前两种药物,故其吸附作用力稍弱。另外在氯代固定相中除了 D-葡萄糖基的手性作用外,由于氯代苯环上有甲基供电子作用,使得苯环结构上的电子云密度增大,有利于 $\pi-\pi$ 共轭作用;氯原子的吸电子作用、电偶极矩作用使得电子云偏向氯原子,使得固定相的氢键作用加强,有利于空间定位拆分手性对映体。

2.6 样品测定

2.6.1 片剂样品的测定

取舒必利、阿米舒必利及枸橼酸莫沙必利等片剂样品适量,加无水乙醇超声溶解后,取上层清液过滤后,按 1.3 节的色谱条件分离,测定 3 种药物对映体的含量,结果见表 5。3 次测定值的相对标准偏差(RSD)为 1.40%~2.81%,测定值为片剂含量标示量的 98.20%~108.42%。

在舒必利片剂中添加 *S*-舒必利进行片剂中对映体的加标回收试验。6 次测定得到的回收率在 95.9%~100.0% 之间, RSD 为 2.55%。结果表明方法简便、准确、可靠,可用于片剂中对映体含量的测定和质量控制。

2.6.2 血清样品的测定

取大鼠的血清 1.0 mL,加入 1.0 mL 一定浓度的舒必利、阿米舒必利和莫沙必利的溶液,摇匀后加入 2.0 mL 乙腈,涡旋混匀,离心 15 min,过滤,滤液挥干后用乙醇溶解、定容,按 1.3 节的色谱条件进行测定,结果见表 6。

表 5 样品中舒必利、阿米舒必利和莫沙必利对映体的含量及其与标示量的比值($n=3$)

Table 5 Contents of the enantiomers of SUL, AMSUL and MOSA in samples and the ratios between detected contents and marked contents ($n=3$)

Sulpiride Tablet (100 mg/tablet)			Amisulpride Tablet (100 mg/tablet)			Mosapride Tablet (5 mg/tablet)											
S-SUL	R-SUL	Ratio	S-AMSUL	R-AMSUL	Ratio	S-MOSA	R-MOSA	Ratio									
Found/ mg	RSD/ %	Found/ mg	RSD/ %	Value/ %	RSD/ %	Found/ mg	RSD/ %	Value/ %									
52.86	2.45	52.60	2.81	105.45	2.62	51.21	1.97	49.11	2.08	100.31	2.02	2.5183	1.59	2.5300	1.40	100.97	1.49

表 6 血清中舒必利、阿米舒必利和莫沙必利对映体含量的测定($n=3$)

Table 6 Determination of the enantiomer contents of sulpiride, amisulpride and mosapride spiked in serum samples ($n=3$)

Analyte	Added/ μ g		Found/ μ g		Recovery/%		RSD/%	
	S-form	R-form	S-form	R-form	S-form	R-form	S-form	R-form
Sulpiride	0.114	0.114	0.103	0.100	87.7	90.4	2.2	2.4
Amisulpride	0.123	0.123	0.115	0.116	94.3	93.5	1.8	2.1
Mosapride	0.141	0.141	0.145	0.147	104.3	102.9	2.6	2.3

3 结论

采用 ACMPc 手性固定相,考察了流动相组成、添加剂及柱温对舒必利、阿米舒必利和莫沙必利 3 种苯甲酰胺类药物对映体分离的影响。结果表明:选择柱温 15 °C,以 0.1% 二乙胺、正己烷和乙醇为流动相,采用梯度洗脱,可实现舒必利、阿米舒必利和莫沙必利 3 种药物的手性拆分;3 种药物对映体的手性拆分为焓驱动为主的分离过程,低温有利于对映体分离,温度对阿米舒必利的保留行为影响更大;利用 ACMPc 手性固定相,可建立舒必利、阿米舒必利和莫沙必利 3 种苯甲酰胺类手性药物色谱拆分方法,并应用于 3 种药物片剂和血清中的对映体的同时测定,方法简便、准确、可靠。

参考文献:

- [1] Sean D H, Kenneth G D O, David N. *Psychiatry*, 2007, 6(7): 295
- [2] Wang Q G, Guo J. *Medical Journal of Chinese People's Health* (王庆功,郭君. 中国民康医学), 2011, 23(17): 2140
- [3] Mark J M. *Prog Neurobiol*, 2003, 70(2): 83
- [4] Yu D S. *Sichuan Mental Health* (喻东山. 四川精神卫生), 2010, 23(3): 186
- [5] Stefan W, John R, Volkmar A. *Schizophrenia Research*, 2009, 113(1): 1
- [6] Kanwar V, Paul C, Daniele C, et al. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2012, 36(4): 1188
- [7] Jitka C, Wolfgang T. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(4): 588
- [8] Cho H Y, Yoo H D, Lee Y B. *Neuroscience*, 2010, 169(1): 378
- [9] Xu X H, Stewart James T. *J Pharm Biomed Anal*, 2000, 23(4): 735
- [10] Musenga A, Mandrioli R, Morganti E, et al. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 46(5): 966
- [11] Cai M, Li Z H, Yang D. *Strait Pharmaceutical Journal* (蔡梅,李忠红,杨丹. 海峡药学), 2008, 20(3): 26
- [12] West C, Guenegou G, Zhang Y R, et al. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(15): 2033
- [13] Younes A A, Mangelings D, Heyden Y V. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 56(3): 521
- [14] Wang J Z, Xu X, Hu J G, et al. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis* (王建忠,许旭,胡建国,等. 药物分析杂志), 2005, 25(5): 490
- [15] Zhou Y, Ma C, Wang Y, et al. *J Pharm Anal*, 2012, 2(1): 48
- [16] Ascalone V, Ripamonti M, Malavasi B. *J Chromatogr B*, 1996, 676(1): 95
- [17] Rao R N, Nagaraju D, Narasaraju A. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 40(2): 338
- [18] Rao R. N, Nagaraju D, Alvi S N, et al. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 36(4): 759
- [19] Younes A A, Mangelings D, Heyden Y V. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55(3): 414
- [20] Anders K, Anette S, Kristina O. *J Biochem Biophys Methods*, 2002, 54(1/2/3): 347