

# ISRP 色谱新材料在体液药物分析中的应用

武镇忆

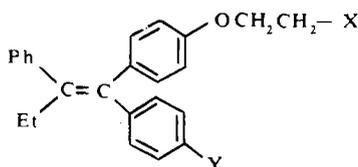
(上海市计划生育科学研究所, 200031)

S. A. Matlin

(英国伦敦城市大学化学系)

内表反相色谱填充物 Internal Surface Reverse Phase (ISRP) 是用于蛋白质存在时进行 HPLC 分析的材料。蛋白质不能被 ISRP 保留, 药物及代谢产物则能被保留并分离。用在线滤片后接 ISRP 微柱代替进样阀中的样品环, 体液样品可直接进样。我们应用这一新技术建立了妇女血清和卵泡液中三苯氧胺的 HPLC 直接分析方法, 研究三苯氧胺在生育调节中的作用, 得到了满意的结果<sup>[1-3]</sup>。

三苯氧胺 (Tamoxifen, 结构式见图1) 是抗雌激素药物。为研究它对卵泡发育的影响, 我们应用 ISRP 建立了妇女体液中药物浓度的分析方法, 在 ISRP 微柱内完成体液中药物的提取, 然后在分析柱内进行分离和分析。



化合物	X	Y
1	NMe <sub>2</sub>	H
2	NHMe	H
3	NMe <sub>2</sub>	OH
4	OH	H
5	NHMe	OH
6	N <sup>+</sup> Me <sub>2</sub> O <sup>-</sup>	H
7	OH	OH

图1 三苯氧胺(1)及其代谢产物(2-7)的化学结构

## 实验部分

### (一) 仪器与试剂

CECIL 1100 泵, Rheodyne 7125 进样器, CECIL CE 1200 可变波长紫外检测器; 三苯氧胺 (Aldrich 化学公司); 乙腈, 四氢呋喃 (HPLC 级)。

### (二) 色谱条件

5μm 25cm × 4.5mm i. d. ODS-Hypersil 分析柱; 30-38μm 3cm × 4.5mm i. d. Whatman 涂表 ODS 保护柱; 进样阀中的样品环由内装 0.5μm 不锈钢滤片的在线过滤器后接 1cm × 3mm i. d. ISRP 微柱 (Regis 化

学公司) 代替。检测波长为 260nm; 检测灵敏度为 0.002AUFS; 流动相: 乙腈: 四氢呋喃: 0.01mol · L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液 (pH 7.8) = 75:5:20。

### (三) 分析步骤

200μl 体液以等体积蒸馏水稀释, 注射到进样阀“加样”位, 以 2ml 蒸馏水洗去杂质。将进样阀切换到“进样”位, 流动相则经 ISRP 和分析柱。检测 260nm 处的色谱峰, 以外标法定量。

## 结果与讨论

### 1. 三苯氧胺及其代谢产物的分离

在我们使用的色谱条件下, 三苯氧胺及其代谢产物能完全分离 (图2)。

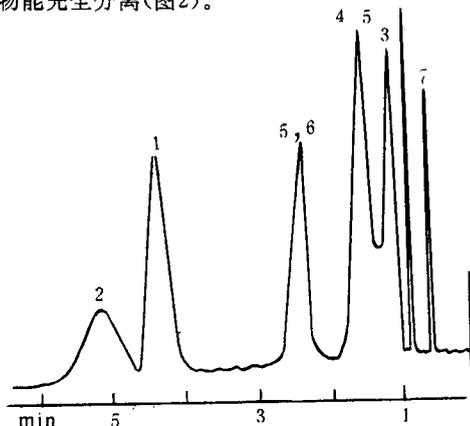


图2 三苯氧胺(1)及其代谢产物(2-7)的分离

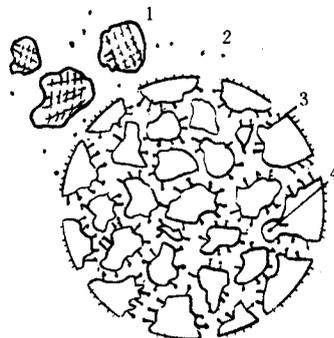


图3 外表亲水性内表疏水性的 ISRP 颗粒

1. 蛋白质, 2. 分析组分, 3. 无吸收作用的外表面, 4. 具有结合选择性的反相担体内表面。

2. 检测波长

三苯氧胺的  $\lambda_{max}$  为 238nm。为避免杂质峰干扰，我们在 260nm 处检测。

ISRP 的内表面和外表面具有不同的性质，如图 3 所示。

ISRP 的优点如图 4 所示<sup>[4,5]</sup>。

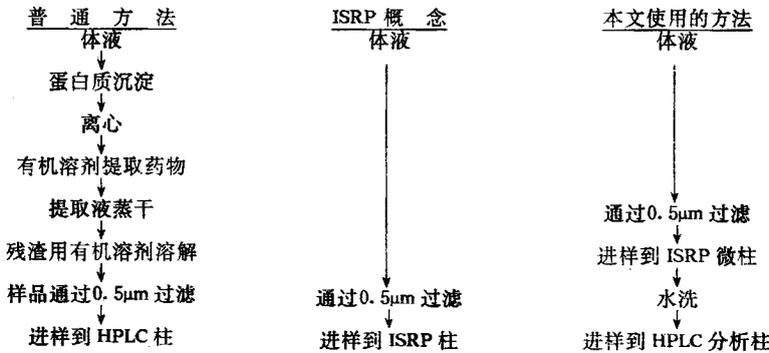


图 4 体液样品预处理方法比较

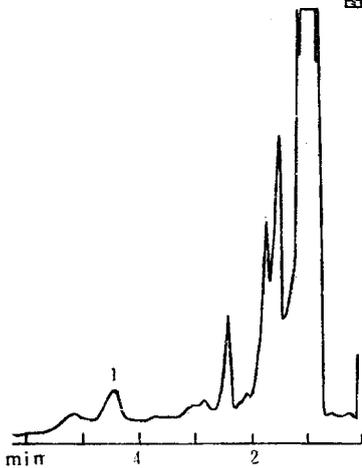


图 5 血清中三苯氧胺的色谱图(1为三苯氧胺)

用上述方法测定血清中三苯氧胺的色谱图见图

5. 三苯氧胺的最低检测量为 2ng。三苯氧胺的精密度如表 1 所列。

在 388.6ng/ml 至 1933.2ng/ml 范围内三苯氧胺线性回归方程为  $Y = -0.025X + 0.093$ ，相关系数  $\gamma = 0.9903$ 。

表 1 三苯氧胺的精密度

浓度(μg/ml)	进样量(μl)	测定次数	CV(%)
2.866	20	10	5.34
100.18	20	8	2.19

回收率：空白血清配成血药浓度为 100.18μg/ml 的样品溶液，按“分析步骤”测定其浓度，实验结果如表 2 所列。平均回收率为 98%，CV=2.87%。

表 2 测定回收率

测量浓度(μg/ml)	99.83	99.42	96.45	92.23	98.15	96.45	100.18	100.68
回收率(%)	99.66	99.24	96.28	92.06	97.97	96.28	100.00	100.50

该方法用于体液中三苯氧胺的含量分析，研究其对妇女卵母细胞和黄体功能的影响，已在有关杂志报道<sup>[1-3]</sup>。

结 论

ISRP 是蛋白质存在情况下测定药物浓度的理想材料，为体液内药物分析提供了快速、方便和回收率高的分析方法。

参 考 文 献

[1] S. A. Matlin et al., HRC & CC, 11, 602(1988).  
 [2] M. L. Swahn et al., Acta Endocrinologica, 121, 417

(1989).  
 [3] N. M. Fisk et al., Human Reproduction, 4, 584(1989).  
 [4] T. J. Szczerba et al., Chromatography International, 25, 26(1987).  
 [5] T. C. Pinkerton et al., Bio-Chromatography, 1, 96 (1986).

The Application of Internal Surface Reversed Phase (ISRP) to Drug Analysis of Body Fluids Wu Zhengyi, Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, 200031; S. A. Matlin, Department of Chemistry, City University, London, UK

色谱柱很快就损坏。本文选用0.02mol/L(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)缓冲液(pH 7.10),不仅峰形尖狭、对称,而且经半年多使用后,柱效基本不变。噻菌灵的保留值

及峰形与流动相中 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>浓度有关,浓度大 t<sub>R</sub> 小,且峰形好(见表3)。

表3 流动相与峰形、t<sub>R</sub> 值的关系

流动相	MeOH:0.2 mol/L NaAc+HAc(pH 6.8) 50:50	MeOH:3.5mmol/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> +KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7.10) 60:40	MeOH:7mmol/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> +KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7.10) 65:35	MeOH:0.02mol/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> +KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7.10) 62:38
t <sub>R</sub> (s)	595	354	297	252
峰形	宽,拖尾严重	宽,稍拖尾	宽,稍拖尾	狭窄,对称

如果使用一段时间后发现峰形变宽,可用甲醇:水:冰醋酸(80:20:6)的流动相冲洗色谱柱半小时,再用甲醇:水(80:20)冲洗至中性,色谱峰又恢复正常。

(五)检测器的选择:噻菌灵在273nm处有一吸收峰可用紫外检测器,由于柑桔皮中杂质多、干扰大,必须再加上柱层析进一步净化,而用荧光检测器不仅灵敏度高,而且选择性也高,可简化不少繁琐的净化步骤。

参 考 文 献

[1] 日本厚生省环境卫生局食品化学课编,《食品中添加剂的分析方法》,中国标准出版社,北京,241—254页,1988。  
 [2] J. J. Moot et al., Proc. Fla. State Hort. Soc., 83, 225 (1970).  
 [3] A. Tanak et al., J. Chromatogr., 117, 146(1976).  
 [4] G. H. Tjam et al., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 62, 769 (1979).  
 [5] P. E. Bardaalye et al., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 69, 114(1986).  
 [6] B. Carlo et al., Pesticide Sci., 25, 355(1989).

[7] F. Tafuri et al., J. Agric. & Food Chem., 28, 1150 (1980).  
 [8] K. Isskiki et al., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63, 747 (1980).  
 [9] P. Cano et al., J. Agric. & Food Chem., 35, 144 (1987).

(收稿日期:1991年1月15日)

High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) Method for Determination of Thiabendazole Residues in Fruits Wang Yi, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100094

A method was developed to determine residues of thiabendazole in fruits. The sample was extracted with ethyl acetate and liquid-liquid partition was used as cleanup method. Liquid chromatographic separation was performed on a Spherisorb ODS column with MeOH-(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) buffer (62:38, pH 7.10) as mobile phase. Recoveries of thiabendazole in citrus peel, pulp and peach cans were 88.2—98.3% in the level of 0.2—6.7ppm. Fluorimetry detection limit was 0.5ng.

(上接第356页)

ISRP packing was designed to be used for HPLC analysis in the presence of protein. Drug and metabolites can be retained and separated by ISRP with no retention for protein. The combined use of an in-line filter and ISRP cartridge in place of conventional sample loop provides a very convenient means for direct analysis of

body fluids. In order to investigate the effect of tamoxifen on fertility regulation, this technique has been applied to HPLC analysis of tamoxifen in serum & follicular fluids from women to whom the drug had been administered. The results are quite satisfactory.

未订到1993年《色谱》杂志的读者可向编辑部补订。单位订购九折优惠,每份全年14.04元;个人订购七折优惠,全年10.92元,三份以上六折优惠,全年9.36元。请从邮局汇款,务写明汇款人详细地址(包括邮政编码)及刊物年代、份数。编辑部尚有过刊及学术会议文集,削价出售,来函后即寄优惠办法。