

酸性药物的反向电渗流高效毛细管电泳分离分析研究*

林 梅 冯 敏 张正行 安登魁

范围荣

(中国药科大学药物分析室 南京 210009)

(上海长海医院临床药理室 上海 200433)

提 要 以水杨酸、乙酰水杨酸为代表药物,采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)为电渗流改向剂,考察了酸性药物在反向电渗流高效毛细管电泳体系中的分离行为,并对其中影响迁移时间、峰形及柱效的诸多因素进行了系统研究。研究结果表明,以阳离子表面活性剂作为电渗流改向剂的反向电渗流高效毛细管电泳体系能显著加快酸性药物的分析速度。对于 CTAB 与酸性药物相互作用导致峰形展宽、柱效降低的现象,可通过加入合适的有机添加剂(如 β -环糊精或乙腈)加以改善。

关键词 高效毛细管电泳法,反向电渗流,酸性药物,水杨酸,乙酰水杨酸

分类号 O658/R91

1 前言

高效毛细管电泳(HPCE)是近年发展起来的一种高效、快速的新型分离分析技术,在分析化学及分析生物化学界有着广泛应用,药物分析是它的一个重要应用领域。HPCE 的分离是以电场中溶质淌度的差异为基础的,由于电渗流的存在,溶质的表观淌度为电泳淌度与电渗流淌度两者的矢量和。在一般情况下,电渗流的方向是由正极到负极,因此对于常规的正极进样、负极检测的正向电渗流 HPCE,阴离子由于其电泳方向与电渗流方向相反,从而导致迁移时间较长,甚至不能被检测。文献[1~4]报道采用阳离子表面活性剂,通过改变毛细管表面电荷,可以抑制电渗流或使之反向。对阴离子而言,控制电渗流使其改向,从而使电泳淌度与电渗流淌度方向一致,可以得到快速分离、检测。为了研究酸性药物在反向电渗流 HPCE 中分离分析的一般规律,本文以乙酰水杨酸(ASA)及其杂质水杨酸(SA)为代表药物,采用常见的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)为电渗流改向剂,对酸性药物在反向电渗流 HPCE 中的电泳迁移行为进行了较为细致的研究。

2 实验部分

2.1 仪器

美国 Bio-Rad 公司 HPE-100 型高效毛细管电泳仪;40cm(有效长度) \times 50 μ m 未涂渍石英毛细管柱(河北永年光导纤维厂),装于卡盒上;日本岛津 C-R6A 色谱数据处理机。

2.2 试剂和样品

磷酸二氢钠、盐酸、氢氧化钠、CTAB、乙腈、 β -

环糊精等均为分析纯,水为二次重蒸水。SA 和 ASA 对照品由江苏省药检所提供。

2.3 操作步骤

按要求配制实验用操作缓冲液,运行前均用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤。毛细管柱使用前依次用 0.1mol/L HCl, 0.1mol/L NaOH 和过滤重蒸水及缓冲液冲洗 3min 后,在运行电压下平衡 30min。以后每次进样前均用缓冲液冲柱,并在运行电压下平衡 5min。本实验采用电迁移进样(5kV, 5s)方式,负极进样,在正极柱上检测,检测波长 210nm。

3 结果和讨论

3.1 阳离子表面活性剂浓度对电迁移的影响

阳离子表面活性剂可通过作用于毛细管内壁来改变其电荷性质,从而使电渗流改变方向。图 1 为阳离子表面活性剂 CTAB 浓度系列对电渗流速度及酸性药物迁移时间的影响。当 CTAB 浓度为 0.1mmol/L 时,SA 先于 ASA 出峰;随着 CTAB 浓度的增大,SA 与 ASA 峰位颠倒;当 CTAB 浓度大于 0.4mmol/L 时,反向电渗流趋向稳定,说明此时毛细管表面正电荷趋向饱和,逐渐形成恒定的反向电渗流。由 SA 和 ASA 的 pKa 及分子量可知,在本实验条件下,保持缓冲液 pH 5.0,从 SA 和 ASA 质荷比来看,SA 应先于 ASA 出峰。峰位反置现象说明 CTAB 除了与毛细管内壁发生相互作用使电渗流方向改变外,还与溶质 SA 发生了较强的相互作用,使 SA 峰形明显展宽,这不利于组分的优化分离。

3.2 缓冲液 pH 值对电迁移的影响

缓冲液的 pH 值通过影响组分解离程度及毛细管内壁表面电荷,进而影响了溶质的淌度、体系的电

* 本文收稿日期:1997-09-16,修回日期:1998-02-03

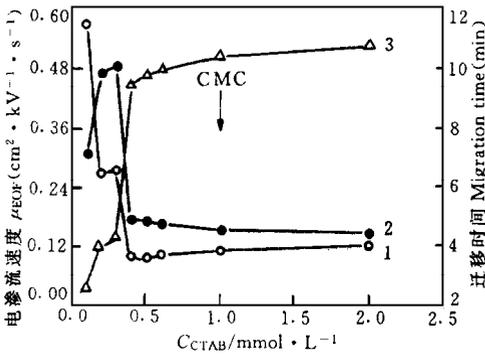


图 1 CTAB 浓度对电渗流速度及酸性药物迁移时间的影响

Fig. 1 Effect of CTAB concentration on EOF velocity and migration time of acidic drugs

缓冲液 (buffer): 0.05 mol/L NaH₂PO₄ (pH 5.0); 电压 (voltage): 11 kV; EOF 标记物 (marker): 二甲亚砜 (DM-SO).

曲线 (Curve): 1. ASA, 2. SA, 3. EOF.

渗流及组分与电渗流改向剂的相互作用。图 2 表明当缓冲液体系中含有 0.5 mmol/L CTAB 时, 在 pH 3.0~8.0 范围内, SA 均在 ASA 之后出峰。在高 pH 值的条件下, ASA 和 SA 的迁移时间均延长, 同时峰形愈宽, 说明在高 pH 值条件下组分与 CTAB 的相互作用愈加强, 且 SA 与 CTAB 的作用强于 ASA 与 CTAB 之间的相互作用。

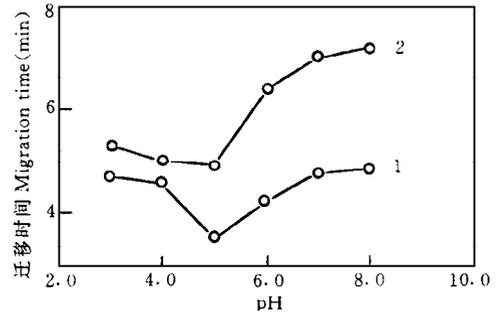


图 2 pH 值对酸性药物迁移时间的影响

Fig. 2 Effect of pH on migration time of acidic drugs
缓冲液 (buffer): 0.05 mol/L NaH₂PO₄, 0.5 mmol/L CTAB; 电压 (voltage): 11 kV.

曲线 (Curve): 1. ASA, 2. SA.

3.3 有机添加剂对电迁移的影响

缓冲液中加入 CTAB 使电渗流改向, 加快了酸性药物的分析速度。但是作为最常见的电渗流改向剂, CTAB 易与组分发生相互作用形成难溶性复合物^[5], 致使峰形变差。因此本文尝试通过有机添加剂来改善峰形, 当在缓冲液中分别添加乙腈或 β-环糊精后, 发现随着加入量的增加, 这两种添加剂均能使 SA 和 ASA 峰位发生颠倒, 峰形改善, 柱效显著增加 (图 3)。这一结果说明, 无论是乙腈还是 β-环糊精均能抑制 CTAB 与组分的相互作用, 改善峰形并使 SA 和 ASA 恢复正常峰序。

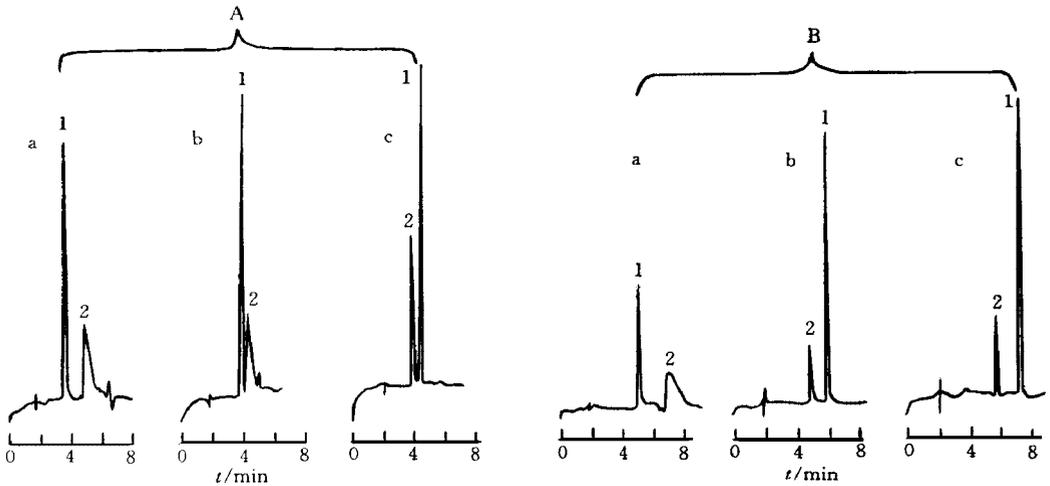


图 3 乙腈 (A) 及 β-环糊精 (B) 对酸性药物电泳分离的影响

Fig. 3 Effect of acetonitrile (A) and β-cyclodextrin (B) contents on electrophoretic separation of acidic drugs

缓冲液 (buffer): 0.05 mol/L NaH₂PO₄ (pH 5.0), 0.5 mmol/L CTAB; 电压 (voltage): 11 kV. A. 乙腈含量 (体积分数) (content of acetonitrile): a. 5%, b. 10%, c. 20%; B. β-环糊精浓度 (concentration of β-cyclodextrin): a. 0.5 mmol/L, b. 2.5 mmol/L, c. 5.0 mmol/L. 峰 (Peak): 1. ASA, 2. SA.

