

## 毛细管电泳-柱端喷壁式电化学检测法用于 利尿剂氢氯噻嗪和氨苯喋啶的研究

张 兰, 童 萍, 何 聿, 黄端华, 陈国南

(福州大学化学化工学院, 福建 福州 350002)

**摘要** :应用毛细管电泳-电化学检测法对利尿剂氢氯噻嗪和氨苯喋啶进行了研究。考察了电化学检测和电泳分离条件对氢氯噻嗪和氨苯喋啶分离、检测的影响,结果表明在最佳分离、检测条件下,两种待测物在 8 min 内达到基线分离。氨苯喋啶和氢氯噻嗪的检测限分别达到 0.29 和 0.25 mg/L。对两物质于日内和日间重复测定 7 次,迁移时间的日内相对标准偏差(RSD)不大于 1.6%,峰电流的日内 RSD 不大于 3.1%;迁移时间的日间 RSD 不大于 1.7%,峰电流的日间 RSD 不大于 4.9%。将该方法用于复方氨苯喋啶成药中氨苯喋啶和氢氯噻嗪的分离和测定,成药的检测结果与标示量比较,相对误差小于 4.6%。在模拟尿样中对氢氯噻嗪和氨苯喋啶进行标准溶液添加回收实验,其回收率分别为 93.5%~96.7%和 96.6%~97.2%,结果令人满意。

**关键词** :毛细管电泳;电化学检测;利尿剂;氨苯喋啶;氢氯噻嗪

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)01-0022-04

## Study of Capillary Electrophoresis with End-Column Electrochemical Detection for the Diuretics of Hydrochlorothiazide and Triamterene

ZHANG Lan, TONG Ping, HE Yu, HUANG Duanhua, CHEN Guonan

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract** : A method based on capillary electrophoresis with end-column electrochemical detection (HPCE-ED) was developed for the determination of the diuretics of hydrochlorothiazide (HCT) and triamterene (TAT) simultaneously. The detection electrode was a 300  $\mu\text{m}$  carbon disc electrode at a working potential of +1.1 V versus Ag/AgCl electrode. The two analytes could be well separated within 8 min in a 50 cm long capillary at a separation voltage of 24 kV with a 10 mmol/L phosphate buffer (pH 7.5). Under optimum conditions, the current response was linear over about two orders of magnitude with detection limits ( $S/N = 3$ ) of 0.29 and 0.25 mg/L for triamterene and hydrochlorothiazide, respectively. The proposed method was successfully applied to determine the synthetic urine and real pharmaceuticals samples. The recoveries were found to be in the range of 93.5%–97.2%.

**Key words** : capillary electrophoresis; electrochemical detection; diuretics; triamterene; hydrochlorothiazide

氢氯噻嗪是一种有效的噻嗪类利尿剂(它能抑制 Henle 氏环上对氯离子的再吸收,从而阻止钠离子的吸收),此类利尿剂常用于治疗肾病、心脏病、水肿和高血压等<sup>[1]</sup>。然而持续服用氢氯噻嗪会造成体内离子的大量遗失从而导致低钾和低氯中毒<sup>[2]</sup>。因而在服用噻嗪类利尿剂时,通常要同时服用钾补充剂或钾平衡剂。氨苯喋啶是一种广泛使用的钾平衡剂,为了达到更好的治疗效果,减少副作用,研究人员开发了复方氨苯喋啶片。同时测定氨

苯喋啶和氢氯噻嗪,对于指导病人服药量以及了解药物服用后在体内吸收排泄后的含量,更好地发挥药物疗效和疾病的控制都很有意义。

高效毛细管电泳(HPCE)对于复杂样品的分析具有独到之处,一般无需样品预处理,因而分析快速。HPCE 更具有进样量少、分离度高、污染少和分离柱易于清洗等特点,近年来在药理分析及生物分析领域得到快速的发展<sup>[3-7]</sup>。HPCE 可以与多种检测方法(如紫外检测(UV)、电化学检测(ED)、激光

诱导荧光检测( LIF )和化学发光检测( CL )等)联用。电化学检测法对于电活性物质来说,具有检测灵敏度高、选择性好的优点,采用喷壁式方法将毛细管终端直接与工作电极相连接,不必采用隔离高压连接口,使得仪器和操作简单化,因此将 HPCE-ED 用于药物分析的研究是一项很有意义的工作。方禹之等<sup>[8]</sup>曾用 HPCE 与安培检测法( AD )联用测定了中药中的氢氯噻嗪和芦丁;Horstkotter 等<sup>[9]</sup>采用 HPCE-UV 和 HPCE-LIF 测定了尿样中的氨苯喋啶及其主要代谢物。但同时分离和检测氨苯喋啶和氢氯噻嗪还未见报道,本文采用毛细管电泳-电化学检测法同时测定了利尿剂氢氯噻嗪和氨苯喋啶。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

自组装毛细管电泳-柱端喷壁式安培检测系统<sup>[10]</sup>:采用三电极系统( 0.3 mm 碳圆盘电极为工作电极,Ag/AgCl 为参比电极,Pt 丝为辅助电极);BAS LC-4C 恒电位安培检测仪(美国 Bioanalytical 公司)0 ~ ±30 kV 高压电源(上海原子核研究所);TL9900 色谱数据工作站(北京泰立化电子技术有限公司);硅熔毛细管 25 μm i. d. × 50 cm(河北永年光导纤维厂)。

CHI660 电化学检测器(上海辰华仪器公司);PHS-2C 型精密酸度计(上海雷磁仪器厂);超声波清洗器( Branson, USA )。

氢氯噻嗪和氨苯喋啶标准品购自美国 Sigma 公司。复方氨苯喋啶片购自上海的普通药店。其他试剂均为分析纯,水为超纯水。氢氯噻嗪和氨苯喋啶的分子结构见图 1。

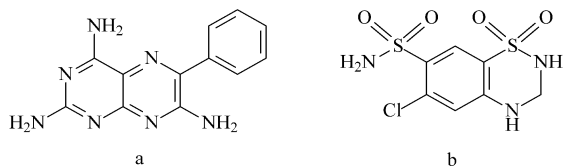


图 1 氨苯喋啶( a )和氢氯噻嗪( b )的结构式  
Fig. 1 Structures of triamterene ( a ) and hydrochlorothiazide ( b )

### 1.2 实验方法

标准溶液的配制:准确称取一定量的氢氯噻嗪和氨苯喋啶标准品分别溶于乙醇和冰醋酸溶液中,配制成质量浓度为 0.50 g/L 的贮备液。用 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲溶液( pH 7.5 )稀释成所需的浓度即得标准溶液。

复方成药样品的配制:仔细研磨 10 片药片,准确称取其中 1/10 的粉末,用乙醇和冰醋酸混合溶液

溶解,并用上述缓冲溶液稀释、定容至 100 mL。

模拟尿样的配制:取一定体积的氢氯噻嗪和氨苯喋啶贮备液加入尿样中,使上述两种利尿剂在尿样中的质量浓度分别为 25.0 和 50.0 mg/L。

电泳分析前,毛细管依次用 0.1 mol/L NaOH、超纯水和缓冲溶液清洗 5 min,所有溶液需经 0.22 μm 滤膜过滤并用超声波除去气泡后方可使用。实验温度为 25 °C,分离在 10 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液( pH 7.5 )中进行;电动分离、电动进样;采用 0.3 mm 碳圆盘工作电极、Ag/AgCl 参比电极、Pt 丝辅助电极的三电极系统,检测电极电位为 1 100 mV。

## 2 结果与讨论

### 2.1 电化学检测最佳条件

据文献[ 8, 11 ]报道,氢氯噻嗪和氨苯喋啶均为电化学活性物质,这是采用电化学检测的主要基础和依据。动态伏安实验表明:氢氯噻嗪和氨苯喋啶的氧化峰电流随工作电位( 400 ~ 1 100 mV )的加大而增大,但当电极电位大于 1 100 mV( vs. Ag/AgCl )时,两组分峰电流的增大趋于平缓,而基流却快速增大(见图 2)。基流的增大影响检测灵敏度和重现性,因此选择 1 100 mV 为检测电极电位,此时信噪比为最大。在此条件下,工作电极和检测系统在 20 d 内呈良好的稳定性和重现性。

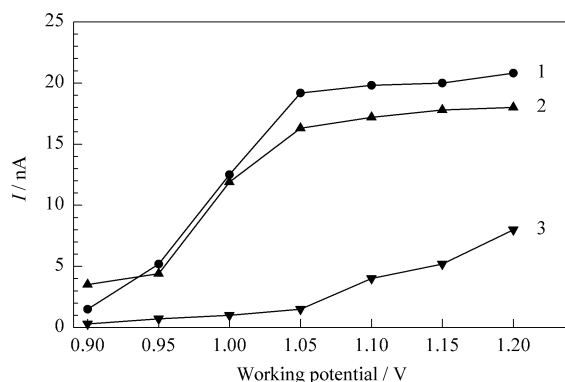


图 2 电极电位对峰电流的影响

Fig. 2 Effect of the working potentials on peak current

Capillary: 50 cm × 25 μm i. d.; injection: 24 kV × 10 s; separation voltage: 24 kV; buffer solution: 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ( pH 7.5 ); temperature: ( 20 ± 0.5 ) °C; working electrode: 0.3 mm carbon disk electrode; supporting electrode: platinum wire; reference electrode: Ag/AgCl; concentration of triamterene and hydrochlorothiazide: 50.0 mg/L and 25.0 mg/L.

1. triamterene; 2. hydrochlorothiazide; 3. basic current.

### 2.2 两种利尿剂电泳分离的最佳条件

试验了缓冲液酸度对氢氯噻嗪和氨苯喋啶分离的影响。从图 3 可清楚地看出,在 pH 5.5 ~ 9.0,两组分的迁移时间随着 pH 的增大而减小,这是因为随着 pH 值的增大,毛细管内壁的硅羟基的离解逐

渐趋于完全,电渗流也逐渐增大,因此各组分流出毛细管所需的时间也逐渐减小。图3还表明两组分的分离度在中性溶液达到最大,说明此中性介质对两性药物氢氯噻嗪和氨苯喋啶的电离和分离都是有效的。选择 pH 7.5 的磷酸钠缓冲液作为运行液。

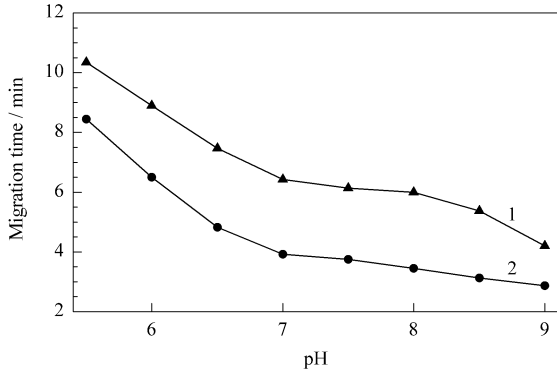


图3 缓冲溶液 pH 值对利尿剂分离的影响  
Fig.3 Effect of pH values of the buffer on the separation of diuretics

Working potential : 1.1 V. Other conditions are the same as in Fig. 2.

1. hydrochlorothiazide ; 2. triamterene.

进一步试验了缓冲液浓度对氢氯噻嗪和氨苯喋啶分离的影响。如同所预料的那样,两组分迁移时间和分离度随着浓度的增大而增大。试验结果表明,当磷酸盐浓度为 10 mmol/L 时两组分已经能够达到基线分离,故选择 10 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.5) 为分离介质,此时不论是分离时间、分离度,还是峰电流都达到最佳。

分离电压也是重要的电泳操作条件之一,直接影响到分离效率。试验了采用不同的分离电压时氢氯噻嗪和氨苯喋啶的迁移时间和分离情况,发现两组分的迁移时间均随着分离电压的增大而缩短,当分离电压低于 24 kV 时,两组分也可以有效分离,但为了缩短分离时间,提高分离效率,选择 24 kV 为分离电压,此时两组分在 8 min 内达基线分离。

采用电动模式进样时,进样时间决定了进样量的大小,因而对灵敏度也有重要的影响。分别测定了进样时间为 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5 和 15 s 时氢氯噻嗪和氨苯喋啶的峰电流,发现:当进样时间小于 10 s 时,两组分峰电流均随进样时间的增大而逐渐增大,当进样时间大于 10 s 以后,峰电流随进样时间增大的趋势迅速减小,而且有明显的峰展宽现象发生。为了在兼顾峰形的同时又不失灵敏度优势,选择进样时间为 10 s。固定进样时间 10 s,考察了进样电压对峰电流的影响,发现:随着进样电压的升高,峰电流逐渐升高,当进样电压大于 24 kV 后,峰电流不再进一步增大,因此选定进样电压为 24 kV。

在上述优化的检测条件和电泳分离条件下,得到了氢氯噻嗪和氨苯喋啶标准溶液的电泳谱图(见图 4-a) 图 4-a 中氢氯噻嗪和氨苯喋啶标准溶液的质量浓度分别为 25.0 和 50.0 mg/L,两组分在 8 min 内完全基线分离。

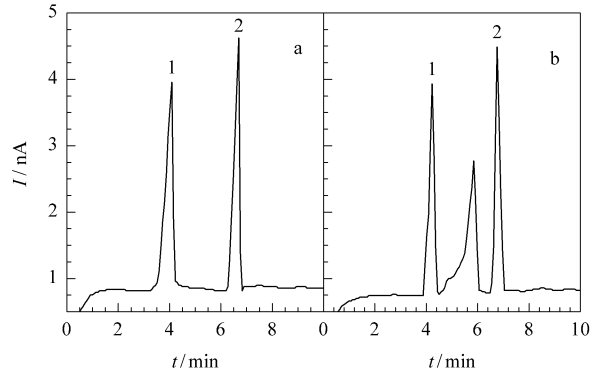


图4 氢氯噻嗪和氨苯喋啶混合标准溶液(a)和模拟尿样(b)的电泳谱图

Fig.4 Electropherograms of the solution of hydrochlorothiazide and triamterene standards ( a ) and a synthetic urine sample ( b )

All conditions as in Fig. 3.

1. triamterene ( 50.0 mg/L ) ; 2. hydrochlorothiazide ( 25.0 mg/L ).

### 2.3 线性关系、检测限和重现性

按照氢氯噻嗪和氨苯喋啶质量浓度比为 2:1 的比例配制混合标准溶液系列,在最佳条件下进行分离,得到下列线性方程:氢氯噻嗪,  $I = 0.0294C + 2.522$  ( $r = 0.9995$ );氨苯喋啶,  $I = 0.0802C + 1.659$  ( $r = 0.9996$ );其中:  $I$  为峰电流 (nA),  $C$  为被分析物的质量浓度 (mg/L),  $r$  为线性相关系数。

实验表明两组分的线性范围均为 1.0 ~ 100.0 mg/L,在此范围内被测物的质量浓度和峰电流呈良好的线性关系,线性相关系数都达 0.999 以上。根据 3 倍信噪比测量峰高,并经过换算,得到氢氯噻嗪和氨苯喋啶的检测限分别为 0.25 和 0.29 mg/L,表明方法具有很高的灵敏度。

在最佳实验条件下,将氢氯噻嗪和氨苯喋啶的混合标样重复进样 7 次,记录迁移时间和峰电流,计算相对标准偏差 (RSD),得到日内重现性。氢氯噻嗪峰电流和迁移时间的 RSD 分别为 3.1% 和 1.6%;氨苯喋啶的峰电流和迁移时间的 RSD 分别为 2.5% 和 1.4%。同时还进行了日间重现性实验 ( $n = 7$ ),峰电流和迁移时间的 RSD 分别为 4.9% 和 1.7% (氢氯噻嗪)、2.8% 和 1.6% (氨苯喋啶)。以上结果表明本实验方法具有很好的重现性。

### 2.4 样品测定

#### 2.4.1 药物方剂中氢氯噻嗪和氨苯喋啶的测定

按照“1.2”节实验方法,将建立的测定方法应

用于复方氨苯喋啶药片中氢氯噻嗪和氨苯喋啶的同时分离和测定,测定了 3 个不同批号的实际药品,测定结果列于表 1。实验结果表明 3 批药品试样的测定量与药品标示量都非常接近,准确度达 95% 以上(相对误差低于 4.6%);5 次测定值的 RSD 分别低于 4.0%(氢氯噻嗪)和 2.8%(氨苯喋啶)。该结果证明了本体系用于同时测定实际药物方剂中的氢氯噻嗪和氨苯喋啶是准确而精密的。

表 1 复方氨苯喋啶药片中氢氯噻嗪和氨苯喋啶的测定结果<sup>1)</sup>( $n=5$ )

Table 1 Assay results of triamterene and hydrochlorothiazide in pharmaceutical samples<sup>1)</sup>( $n=5$ )

Batch No.	Component	Label claimed/ (mg/L)	Found <sup>2)</sup> / (mg/L)	Relative error/%
990511	triamterene	50.0	52.3(2.7)	4.6
	hydrochlorothiazide	25.0	25.7(4.0)	2.8
991015	triamterene	50.0	51.9(2.1)	3.8
	hydrochlorothiazide	25.0	24.5(3.2)	2.0
991208	triamterene	50.0	48.7(2.8)	2.6
	hydrochlorothiazide	25.0	24.1(3.5)	3.6

1) CE conditions as in Fig. 2. 2) The data in brackets were RSD (%).

值得一提的是,复方氨苯喋啶药片的电泳谱图几乎和标样的电泳谱图完全一样,只有氢氯噻嗪和氨苯喋啶两个峰,说明利用 HPCE-ED 测定复方氨苯喋啶药片中的氢氯噻嗪和氨苯喋啶几乎不受药物片剂中赋形剂、防腐剂等背景的影响。

#### 2.4.2 尿样中利尿剂的检测

在健康人尿样中加入氢氯噻嗪和氨苯喋啶的混合标样,即配制成了人体模拟尿样。尿样过滤后,直接进行 HPCE-ED 测定,电泳谱图如图 4-b。图 4-b 中的峰经过标准加入法鉴别,得知峰 1 和峰 2 分别为氨苯喋啶和氢氯噻嗪,中间一个杂质峰经过验证为尿酸,显然此峰对峰 1 和峰 2 的定量测定没有造成影响,也说明了尿样中本底物质不影响利尿剂氢氯噻嗪和氨苯喋啶的检测。

为进一步验证方法的可靠性,对尿样中的氢氯噻嗪和氨苯喋啶分别进行了加标回收率实验。在模拟尿样中分别加入 10.0、20.0 和 30.0  $\mu\text{g}$  3 个不同量的氢氯噻嗪和氨苯喋啶,依据上述建立的实验方法,在最佳电泳操作条件和分离介质中进行测定,根据标准工作曲线,将电流峰值折算成各组分的浓度。实验结果列于表 2 中,氢氯噻嗪和氨苯喋啶的回收率分别为 93.5%~96.7%和 96.6%~97.2%,氢氯噻嗪和氨苯喋啶的 5 次平行测定的氢氯噻嗪和氨苯喋啶的加标 RSD 分别小于 3.5% 和 2.8%。

表 2 模拟尿样中氢氯噻嗪和氨苯喋啶的回收率测定<sup>1)</sup>( $n=5$ )

Table 2 Recoveries of triamterene and hydrochlorothiazide in the synthetic urine samples<sup>1)</sup>( $n=5$ )

Compound	Added/( $\mu\text{g}$ )	Found <sup>2)</sup> / ( $\mu\text{g}$ )	Recovery/%
Hydrochlorothiazide	10.0	9.63(3.5)	96.3
	20.0	18.7(2.6)	93.5
	30.0	29.0(2.6)	96.7
Triamterene	10.0	9.66(2.4)	96.6
	20.0	19.4(2.8)	97.2
	30.0	29.0(2.2)	96.7

1) CE conditions as in Fig. 2. 2) The data in brackets were RSD (%).

### 3 结论

用 HPCE-ED 建立了同时分离测定利尿剂氢氯噻嗪和氨苯喋啶的分析方法。该技术用于实际药物复方氨苯喋啶药片和模拟尿样中氢氯噻嗪和氨苯喋啶的测定,试样不需任何预处理,在 8 min 内就可以分离检测完毕,方法快速、准确、可靠,对利尿剂的药物生产、质量控制检测和药物疗效的评价都不失为一种好的方法。此外,氨苯喋啶和氢氯噻嗪均被列入国际奥委会公布的禁用物质表中,这两种药物主要是在涉及重量级别项目(如举重、拳击等)中用于减轻运动员体重,或用于稀释尿液作掩盖其他禁用药物的一种手段。将该方法用于兴奋剂的检测,要比常规的气相色谱-质谱法简单得多,省去了试样的衍生和预处理等繁杂步骤,因此毛细管电泳-柱端喷壁式电化学检测法用于利尿剂氨苯喋啶和氢氯噻嗪的研究具有广泛的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] Brater D C. Drugs, 1991, 41: 14
- [2] Chen Xinqian, Jin Youyu. New Medicament. Beijing: Public Health Press (陈有谦, 金有豫. 新编药理学. 北京: 人民卫生出版社), 1998. 373
- [3] Shihabi Z K. J Chromatogr A, 1998, 807(1): 27
- [4] Wang A, Fang Y. Electrophoresis, 2000, 21(7): 1281
- [5] Zhang L, Hu Q, Chen G, Fang Y. Anal Chim Acta, 2000, 424: 257
- [6] Zhang L, Liu Y, Chen G. J Chromatogr A, 2004, 1043: 317
- [7] Zhang L, Chen G, Hu Q, Fang Y. Anal Chim Acta, 2001, 431: 287
- [8] Fang Yuzhi, Fang Xiaoming, Ye Jiannong. Chemical Journal of Chinese Universities (方禹之, 方晓明, 叶建农. 高等学校化学学报), 1995, 16(10): 1514
- [9] Horstkotter C, Kober S, Spahn-Languth H, Mutschler E, Blaschke G. J Chromatogr B, 2002, 769: 107
- [10] Wang O, Ding F, Li H, He P, Fang Y. J Pharm Biome Anal, 2003, 30: 1507
- [11] Arvand M, Mousavi M F, Zanjanchi M A, Shamsipur M. J Pharm Biome Anal, 2003, 33: 975