

毛细管电泳法同时测定血清中的左旋多巴和甲基多巴

王 春¹, 王 志¹, 韩丹丹², 胡彦学², 赵 锦², 杨秀敏², 宋双居¹

(1. 河北农业大学理学院, 河北 保定 071001; 2. 河北农业大学食品科技学院, 河北 保定 071001)

摘要:建立了毛细管电泳-紫外检测同时测定血清中左旋多巴和甲基多巴的方法。以40 mmol/L硼砂(pH 9.5)为分离缓冲溶液,在3.45 kPa(0.5 psi)压力下进样7 s,分离电压22 kV,检测波长200 nm、温度25 ℃的条件下进行测定,两种物质获得了较好的分离。甲基多巴和左旋多巴分别为1.0~64.0 mg/L和1.0~71.0 mg/L时与峰面积呈良好的线性关系,线性相关系数分别为0.999 8和0.999 4,检出限分别为0.6和0.8 mg/L(以信噪比为3计)。将该法用于血清中甲基多巴和左旋多巴的测定,回收率为82.8%~88.8%,相对标准偏差为2.10%~2.63%。

关键词:毛细管电泳法;左旋多巴;甲基多巴;血清

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2006)04-0389-03 栏目类别:研究论文

Simultaneous Determination of Levodopa and Methyldopa in Human Serum by Capillary Electrophoresis

WANG Chun¹, WANG Zhi¹, HAN Dandan², HU Yanxue², ZHAO Jin²,
YANG Xiumin², SONG Shuangju¹

(1. College of Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 2. College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: A simple capillary electrophoresis method was developed for the determination of levodopa and methyldopa in human serum. The effects of pH and concentration of buffer, voltage and injection time on separation were investigated. As a result, an optimized separation was obtained with a fused-silica capillary of 60.2 cm (50 cm effective length) × 75 μm i. d. in a running buffer of 40 mmol/L sodium tetraborate (pH 9.5) with an applied voltage of 22 kV at 25 ℃. Sample introduction was performed at 3.45 kPa (0.5 psi) for 7 s and on-column detection was made with a diode array detector at 200 nm. The linear responses covered the ranges from 1.0 to 64.0 mg/L ($r = 0.9998$) for methyldopa and from 1.0 to 71.0 mg/L ($r = 0.9994$) for levodopa. The detection limits ($S/N = 3$) of methyldopa and levodopa were shown to be 0.6 mg/L and 0.8 mg/L, respectively. The recoveries for levodopa and methyldopa in human serum were between 82.8% and 88.8% with relative standard deviations between 2.10% and 2.63%.

Key words: capillary electrophoresis; levodopa; methyldopa; serum

左旋多巴和甲基多巴是结构极为相似(见图1)的两种药物,分别具有抗震颤和抗高血压的功能。通常,甲基多巴是左旋多巴药物中的一种主要杂质,它们在体内均可转化成多巴胺衍生物,而体内高浓度的多巴胺类化合物会引起人体的不良反应,因此检测这些药物在血液中的浓度具有重要的临床意义^[1-2]。因它们结构相似,分离困难,故相关报道较少^[3-8]。Sarre等^[4]采用离子对液相色谱法测定了

左旋多巴和甲基多巴,但所用流动相组成复杂,操作繁琐,朱爱芝等^[5]采用高效液相色谱-电化学检测,

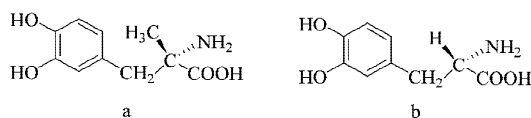


图1 (a)甲基多巴和(b)左旋多巴的化学结构式
Fig.1 Chemical structures of (a) methyldopa and (b) levodopa

收稿日期 2005-08-18

第一作者:王 春,男,博士研究生,讲师。

通讯联系人:王 志,男,教授,博士生导师,Tel (0312)7521513,E-mail:wangzhi@mail.hebau.edu.cn.

基金项目:教育部留学回国人员启动基金资助项目、河北省教育厅自然科学基金资助项目(No. 2005113)和河北农业大学非农学科基金资助项目。

运用离子抑制机理测定了尿样中的 4 种多巴类似物, Saxer 等^[6]则用类似方法测定了人血浆中的左旋多巴和 3-甲氧基多巴, 液相色谱-质谱检测也用于甲基多巴的测定^[7]。最近 Talebpour 等^[8]用核磁共振氢谱法测定了人血清中的卡比多巴、左旋多巴和甲基多巴。

毛细管电泳作为一种高效分离分析方法, 具有分析速度快、分离效率高、运行成本低等优点, 目前已广泛应用于药物分析、环境监测等领域^[9-10]。采用毛细管电泳法测定多巴类药物已有报道, 如吕元琦等^[11]报道了利用毛细管电泳法测定美多芭片剂中的左旋多巴和羟苯丝肼, 孟慧^[12]报道了利用毛细管电泳法测定血清中单一左旋多巴的方法。而采用毛细管电泳法同时测定左旋多巴和甲基多巴尚未见文献报道。本文建立了一种快速、可靠地测定左旋多巴和甲基多巴的毛细管电泳方法, 可用于血清中左旋多巴和甲基多巴含量的同时测定。与现有文献方法相比, 本方法操作步骤简单、成本低廉。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Beckman P/ACE MDQ 型毛细管电泳仪, 配二极阵列检测器(美国 Beckman 公司); 未涂层熔融石英毛细管柱(内径 75 μm , 总长 60.2 cm, 有效长度 50 cm, 河北永年光导纤维厂); 数据采集与处理由 32 Karat Software Version 7.0 完成; PHS-3C 型数字酸度计(杭州东星仪器设备厂)。

左旋多巴、甲基多巴对照品(中国药品生物制品检定所)。用 0.01 mol/L HCl 配制二者质量浓度均为 2.0 g/L 的混合标准储备液, 使用前用水稀释至所需浓度。其他试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

1.2.1 毛细管的预处理和冲洗

新毛细管在使用前依次用 1 mol/L NaOH、甲醇、0.1 mol/L NaOH、水各冲洗 20 min, 再用分离缓冲溶液冲洗 10 min。每天使用前依次用 0.1 mol/L NaOH、水、分离缓冲溶液于 137.9 kPa (20 psi) 压力下冲洗 10 min, 两次测定之间用分离缓冲溶液于 137.9 kPa (20 psi) 压力下冲洗 5 min。

1.2.2 电泳条件

缓冲溶液为 40 mmol/L 硼砂(用 0.01 mol/L NaOH 调 pH 至 9.5), 于 3.45 kPa (0.5 psi) 下进样 7 s, 分离电压 22 kV, 检测波长 200 nm, 温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.3 标准曲线、精密度和检出限的测定

将一定量的左旋多巴和甲基多巴混合储备液用

水稀释, 得到一系列不同浓度的左旋多巴和甲基多巴的混合标准溶液。在上述电泳条件下, 对甲基多巴和左旋多巴的系列混合标准溶液进行测定, 绘制标准曲线。

将左旋多巴和甲基多巴储备液逐级稀释, 以信噪比为 3:1 测定其检出限。

1.2.4 回收率的测定

在 1 mL 离心管中加入正常人空白血清 100 μL , 然后加入 50 μL 一定浓度的左旋多巴和甲基多巴混合标准溶液和 150 μL 乙腈, 混匀后在 10 000 r/min 下离心 10 min 以除去蛋白, 取上清液用于毛细管电泳分析。

2 结果与讨论

2.1 缓冲溶液的选择

缓冲溶液的组成、浓度和 pH 值是影响电泳分离的重要因素。由于缓冲溶液的组成和浓度影响溶液的粘度、分析物的扩散系数和 ζ 电位, 因此在毛细管电泳分离过程中二者会影响分析物的迁移时间、分离度和体系的电流值; 缓冲溶液的 pH 影响 ζ 电位、电渗流和分析物的荷电情况, 从而会影响分析物的迁移时间和分离效率。

本研究试验了 Na_3PO_4 、硼酸钠、硼砂体系, 结果表明硼砂体系效果最佳。

考察了缓冲溶液 pH 为 8~10 和缓冲溶液浓度为 20~80 mmol/L 时对甲基多巴和左旋多巴分离度和峰形的影响。实验结果表明, 随着 pH 值的增大, 分离度逐渐增大。在缓冲溶液的 pH 为 9.5 时, 分离度较大, 峰形好, pH 超过 9.5 后, 虽然分离度加大, 但峰形变差, 因此本实验选择缓冲溶液的 pH 为 9.5。随着缓冲溶液浓度的增大, 左旋多巴和甲基多巴的迁移时间增加, 分离度增加, 但由于焦耳热效应的作用, 基线噪声也同时增加, 导致分离效率降低。考虑到左旋多巴和甲基多巴在本体系中的分离度较好, 在保证分离的前提下, 为了缩短分析时间和降低焦耳热, 本研究选用 40 mmol/L 硼砂为分离缓冲溶液。由于左旋多巴和甲基多巴的结构相近, 文献[4]用高效液相色谱法分析时所用流动相较为复杂。本文采用毛细管电泳法使二者获得了较好的分离, 与文献[4]相比, 操作成本大为降低。

2.2 分离电压和进样时间的影响

分离电压直接影响分析物的迁移时间和分离效率。分离电压增大, 迁移时间减小, 分离速度提高, 但高电压会增加焦耳热, 造成基线噪声增加, 影响灵敏度, 降低分离电压, 虽然分离度增加, 但分析时间延长, 甚至引起峰展宽。本文考察了分离电压为 15

~30 kV 时对分离效率的影响,综合考虑分离度和分析速度,选择分离电压为 22 kV。

进样量的大小影响峰电流和峰形。随着进样时间的增加,峰电流增加,但进样时间超过一定数值后,峰展宽严重。本文考察了进样时间为 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10 s 时对分离的影响。结果表明,随着进样时间增加,峰面积逐渐增加,但超过 7 s 后,峰形变宽,柱效降低,故本文选用在 3.45 kPa (0.5 psi) 压力下进样 7 s。

2.3 线性范围、重复性和检出限

在优化的实验条件下,对甲基多巴和左旋多巴系列标准溶液进行测定,其质量浓度 X (g/L) 分别为 1.0 ~ 64.0 mg/L 和 1.0 ~ 71.0 mg/L 时与峰面积 Y 呈良好的线性关系。甲基多巴的线性回归方程为 $Y = -1.864 \times 10^3 + 4.937 \times 10^6 X$, $r = 0.9998$; 左旋多巴的线性回归方程为 $Y = -2.860 \times 10^3 + 6.358 \times 10^6 X$, $r = 0.9994$ 。

将含有左旋多巴和甲基多巴各 0.03 g/L 的混合标准溶液连续进样 5 次,测得左旋多巴和甲基多巴迁移时间的日内精密度的(以测定值的相对标准偏差(RSD)表示,下同)分别为 1.5% 和 1.7%,峰面积的日内精密度的分别为 2.0% 和 2.5%;将含有左旋多巴和甲基多巴各 0.03 g/L 的混合标准溶液连续测定 5 d,迁移时间的日间精密度的分别为 2.0% 和 2.2%,峰面积的日间精密度的分别为 2.6% 和 3.1%。

甲基多巴和左旋多巴的检出限分别为 0.6 mg/L 和 0.8 mg/L (以信噪比为 3 计)。

2.4 回收率的测定

本文采用空白血清样品加标的方法进行了回收率测定,结果见表 1。从表 1 可以看出,5 次测定的 RSD 值为 2.10% ~ 2.63%,回收率为 82.8% ~ 88.8%。对于样品基质复杂的血清样品来说,此精密度和回收率值均令人满意。甲基多巴、左旋多巴混合标样和空白血清样品、空白血清加标样品的毛细管电泳图如图 2 所示。

表 1 空白血清样品中左旋多巴和甲基多巴的回收率 ($n = 5$)

Table 1 Recoveries of levodopa and methyl dopa from serum samples ($n = 5$)

Analyte	Added/ (mg/L)	Found/ (mg/L)	Recovery/ %	RSD/ %
Levodopa	10.00	8.28	82.8	2.63
	30.00	25.10	83.6	2.52
	60.00	52.61	87.7	2.47
Methyl dopa	10.00	8.65	86.5	2.45
	30.00	26.20	87.3	2.31
	60.00	53.26	88.8	2.10

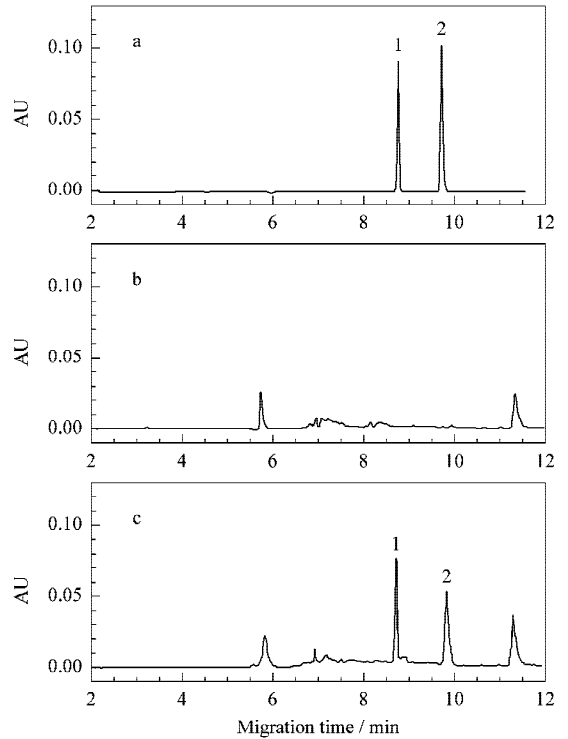


图 2 (a) 甲基多巴和左旋多巴混合标样、(b) 空白血清样品和 (c) 空白血清加标样品的毛细管电泳图

Fig. 2 Electropherograms of (a) mixture of methyl dopa and levodopa standard solutions, (b) blank serum sample and (c) spiked blank serum sample
1. methyl dopa; 2. levodopa.

参考文献:

- [1] Gross C E, Ravenscroft P, Dovero S, Jaber M, Bioulac B, Bezdard E. *J Neurochem*, 2003, 84(6): 1246
- [2] Bezdard E, Brotchie J M, Gross C E. *Nat Rev Neurosci*, 2001, 2(8): 577
- [3] Hassib S T. *Anal Lett*, 1990, 23(12): 2195
- [4] Sarre S, Michotte Y, Herregodts P, Deleu D, Deklippel N, Ebinger G. *J Chromatogr B*, 1992, 575: 207
- [5] Zhu Aizhi, Liu Jun, Fu Chengguang. *Journal of Instrumental Analysis* (朱爱芝, 刘军, 傅承光. *分析测试学报*), 1997, 16(6): 47
- [6] Saxer C, Niina M, Nakashima A, Nagae A, Masuda N. *J Chromatogr B*, 2004, 802(2): 299
- [7] Oliveira C H, Barrientos-Astigarraga R E, Sucupira M, Graudenz G S, Muscara M N, Nucci G. *J Chromatogr B*, 2002, 768(2): 341
- [8] Talebpour Z, Haghgoo S, Shamsipur M. *Anal Chim Acta*, 2004, 506(1): 97
- [9] Simo C, Barbas C, Cifuentes A. *Electrophoresis*, 2005, 26(7/8): 1306
- [10] Anastos N, Barnett N W, Lewis S W. *Talanta*, 2005, 67(2): 269
- [11] Lü Yuanqi, Wu Chunhua, Yuan Zhuobin. *Chemical Reagent* (吕元琦, 邬春华, 袁卓斌. *化学试剂*), 2004, 26(4): 217
- [12] Meng Hui. *People's Military Surgeon* (孟慧. *人民军医*), 2004, 47(6): 323