

[研究简报]

高效液相色谱电生 Mn(Ⅲ) 化学发光法检测 人体血清和尿样中的卡托普利

张琰图^{1,2}, 章竹君¹, 孙永华¹, 魏月¹

(1. 陕西师范大学化学与材料科学学院, 西安 710062; 2. 延安大学化学与化工学院, 延安 716000)

关键词 高效液相色谱; 化学发光检测器; 在线电生 Mn(Ⅲ); 卡托普利; 人体血清; 尿样
中图分类号 O653 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2007)05-0862-03

卡托普利[Captopril, CP, 1-2-(2-甲基-3-巯基-氧代丙基)-L-脯氨酸]作为临床上应用的第一个血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI), 已被广泛用于治疗高血压和充血性心力衰竭等疾病. 已报道测定血浆和尿液中 CP 的方法主要有放射免疫法^[1]、气相或液相色谱-质谱法^[2,3]和高效液相色谱 UV 检测法^[4~6]. 由于 CP 的化学结构中缺乏有效的吸收紫外光基团, 测定时通常需要进行衍生化反应, 操作繁冗. 化学发光法测定 CP 已有报道^[7,8], 但多应用于一些药物制剂的分析. 化学发光反应大多是氧化还原反应, 普遍使用的氧化剂为 H₂O₂, O₂, KMnO₄, [Fe(CN)₆]³⁻和 Ce⁴⁺等, 某些氧化剂如 Mn(Ⅲ), Co(Ⅲ), Ag(Ⅱ)和 BrO⁻等也能与发光试剂反应产生化学发光, 但由于它们很不稳定, 甚至存在的时间很短, 所以无法实际应用. 在电化学发光反应中, 虽然能利用电化学手段使一些不稳定试剂在电极表面产生化学发光, 但常因电化学反应和化学发光反应在同一个检测池中进行, 存在电极发光面积小且易被污染等缺点^[9], 在实际应用时受到了限制. 我们^[10]曾采用一种在线电生试剂化学发光检测法很好地解决了这一问题. 本文基于这一原理, 设计了一个 HPLC 在线电生 Mn(Ⅲ)化学发光检测器, 实现在线电化学反应, 从而产生反应活性很高的初生态氧化剂 Mn(Ⅲ), 并与色谱柱后 CP 混合产生化学发光. 同时还能够根据需要调节电极反应和发光反应两者的介质, 满足柱后发光反应的最佳环境. 在优化流动相和化学发光检测条件的基础上, 将该检测器应用于人体血清和尿液中 CP 的测定.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂 LC-6A 高效液相色谱仪(Shimadzu, Japan), 7125 型手动进样器(上海科学仪器厂), Nucleosil RP-C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm), IFFL-D 型流动注射化学发光仪(西安瑞科电子有限公司), 过滤器(大连江申分离科学技术公司); HS-120D 超声波清洗机(宁波北仑桦升超声波机械厂), 微超滤管(VIVASPIN, 100 μL), HL-2 恒流泵(上海青浦沪西仪器厂), JH2C 恒电位仪(上海电子仪器厂); 流通电解池由一块 3 cm × 2.5 cm × 2 cm 的圆柱形有机玻璃加工而成, 采用两电极体系, 工作电极和对电极均采用面积为 2 cm² 的铂片, 阴阳电解室用玻璃砂芯隔开. 整个分析过程中实验数据的采集及处理均在 Windows XP 系统下由 IFFL-D 软件完成.

卡托普利(中国药品生物制品检定所提供)储备液质量浓度为 100 μg/mL, 配制时加适量甲醇溶解后用流动相定容并贮存于 4 °C 冰箱内; 0.50 mol/L MnSO₄(西安化学试剂厂)用 4.0 mol/L 的 H₂SO₄ 配制. 流动相[CH₃CN/1% (体积分数)醋酸水溶液(体积比 6:4)]用 0.45 μm 滤膜过滤, 经超声脱气后使用. 实验所用乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为石英亚沸蒸馏水.

1.2 实验过程 使用恒流泵将电解液以 2.0 mL/min 的流速泵入分析系统. 同时开启恒电位仪和高压泵, 待基线平稳后, 用进样器将 20 μL 的 CP 标准(或样品)溶液注入色谱柱, 经色谱柱分离后与电生

收稿日期: 2006-07-06.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30470886)资助.

联系人简介: 章竹君(1938 年出生), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事分子发光研究. E-mail: zzy18@hotmail.com

Mn(III) 混合, 在流通池中产生化学发光, 记录色谱图, 根据色谱峰高进行定量分析.

2 结果与讨论

2.1 化学发光条件的优化 固定 HPLC 流动相流速和其它条件, 以 5.0 ng/mL 的 CP 考察了电解池出口与发光反应池入口间距离对化学发光强度的影响. 结果表明, 两池间的距离为 6 cm 时获得的化学发光强度值大而且稳定. 实验考察了化学发光氧化剂 Mn(III) 的前体 MnSO_4 浓度的变化 (0 ~ 0.3 mol/L) 对 CP 化学发光强度的影响, 当 MnSO_4 浓度大于 0.15 mol/L 时, 化学发光强度达最大且保持恒定. 实验结果表明, Mn(III) 和卡托普利只有在酸性条件下才能产生强的化学发光信号, 考察了常见的 H_2SO_4 和 HNO_3 等 5 种酸的影响, 发现 H_2SO_4 是最适合的反应介质. 同时还发现 H_2SO_4 浓度低于 2.5 mol/L 时, Mn(III) 易发生歧化反应, 产生 MnO_2 , 沉积于电极表面; 当 H_2SO_4 浓度在 4 ~ 5 mol/L 时化学发光强度恒定而且最大; 浓度大于 5.0 mol/L 时, 化学发光强度减小. 这是由于 H_2SO_4 浓度太大, 对管路造成一定的腐蚀所致, 因而选取 H_2SO_4 浓度为 4.0 mol/L. 此外, 还考察了电解电流和电解液流速对化学发光强度的影响, 最终确定电解电流为 12.0 mA, 流速为 2.0 mL/min.

2.2 色谱条件的优化 分别以甲醇和乙腈的醋酸水溶液为流动相进行实验, 结果表明, 甲醇和乙腈都对发光反应有抑制作用, 且使用甲醇时还会产生较大的噪声, 柱后峰展宽现象严重, 而乙腈-醋酸水溶液则是比较理想的流动相, 所得信号的基线稳定且具有低的背景. 实验中对乙腈体积分数为 20% ~ 80% 的醋酸水溶液作为流动相进行了优化, 兼顾分离度和灵敏度的要求, 最终确定以 1.2 mL/min 乙腈/1% (体积分数) 乙酸水溶液 (体积比 6:4) 为流动相.

2.3 卡托普利的色谱行为 在选定实验条件下, 准确移取 20 μL 标准 (或样品) 溶液进行色谱分离, 其流出曲线见图 1. 可见, 血清和尿液中的内源性成分对测定无干扰. 卡托普利的保留时间为 2.5 min.

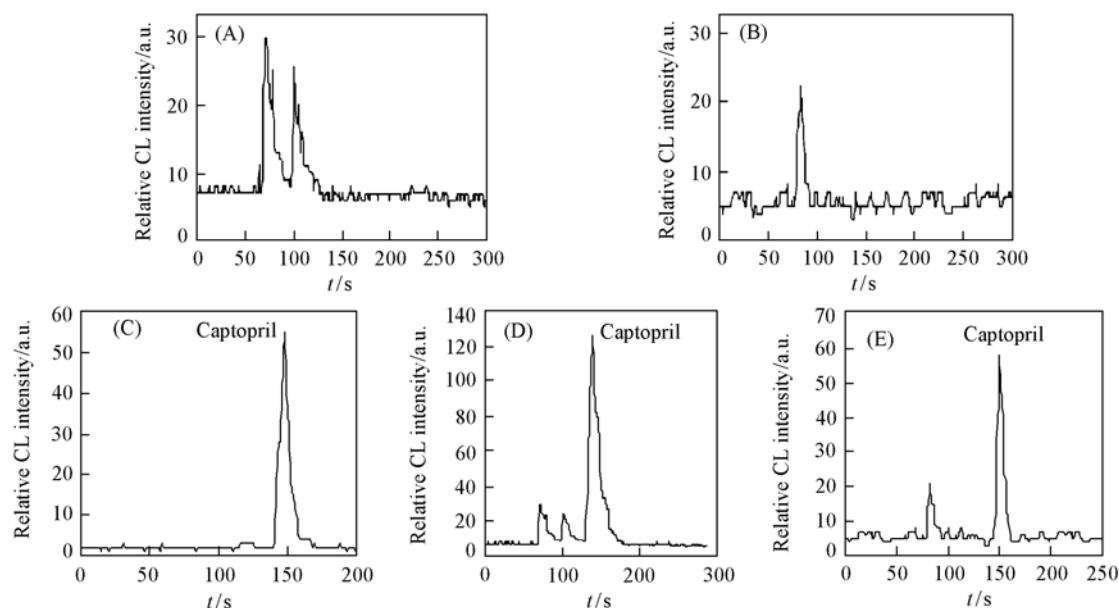


Fig. 1 Chromatograms of blank human serum (A), blank urine (B), standard captopril solution (10.0 ng/mL) (C), blank human serum spiked with captopril (25.0 ng/mL) (D) and blank urine spiked with captopril (10.0 ng/mL) (E) by HPLC with on-line electrogenerated Mn(III) CL detection

2.4 分析特性 卡托普利质量浓度在 5 ~ 800 ng/mL 范围内与发光强度呈良好的线性关系, 其校准曲线为 $I_{\text{CL}} = 4.907c + 3.251$ ($R^2 = 0.9992$). 对 10.0 ng/mL 的卡托普利平行测定 11 次, 其标准偏差为 2.2%, 方法的检出限为 0.9 ng/mL.

2.5 样品分析 从陕西师范大学医院化验室取 3 份人血清样品, 精确量取各样品 1.0 mL, 用适量流动相稀释至 5.0 mL, 然后取 20 μL 经微超滤管分离, 除去血清蛋白等大分子的超滤液进行样品分析, 同时进行加标回收. 尿样为直接取口服 12.5 mg 卡托普利的健康自愿者提供的尿液, 经 0.45 μm 滤膜过滤后进行分析, 同时也进行加标回收, 结果列于表 1.

Table 1 Analytical results of human serum and urine samples by HPLC-CL detection *

Sample	No.	Detected/(ng · mL ⁻¹)	Added/(ng · mL ⁻¹)	Found/(ng · mL ⁻¹)	Recovery(%)	RSD(%) (n = 5)
Serum	1	25.2	50	72.6	94.8	2.9
	2	124.0	100	227.2	103.2	3.4
	3	223.6	250	463.6	96.3	2.5
Urine	1	20.2	50	68.8	97.2	3.2
	2	21.0	100	118.2	97.2	2.8
	3	19.7	250	270.5	100.3	2.6

* Serum samples 1, 2, 3; measurement results of captopril in human serum 30, 50, 90 min after oral administration of 50 mg captopril, respectively. Urine samples 1, 2, 3; measurement results of captopril in urine 20 min after oral administration of 12.5 mg captopril.

参 考 文 献

- [1] Wong K. K. , Lan S. , Migdalof B. H. . *Biochem. Pharmacol.* [J], 1981, **30**(10) : 2643—2648
- [2] Funke P. T. , Ivashkiv E. , Malley M. F. , *et al.* . *Anal. Chem.* [J], 1980, **52**: 1086—1089
- [3] Salem I. I. , Saif W. A. , Jmeian Y. , *et al.* . *J. Pharm. Biomed. Anal.* [J], 2005, **37**(5) : 1073—1080
- [4] Sypniewski S. , Bald E. . *J. Chromatogr. A*[J], 1996, **729**(1/2) : 335—340
- [5] Arroyo C. , Lopez-Calull C. , Garcia-Capdevila L. , *et al.* . *J. Chromatogr. B*[J], 1997, **688**(2) : 339—344
- [6] Amini M. , Zarghi A. , Vatanpour H. . *Pharmaceutica Acta Helvetiae*[J], 1999, **73**(6) : 303—306
- [7] Pulgarin J. A. M. , Bermejo L. F. G. , Lopez P. F. . *Anal. Chim. Acta*[J], 2005, **546**: 60—67
- [8] Zhang X. , Baeyens W. R. G. , Van der Weken G. , *et al.* . *J. Pharm. Biomed. Anal.* [J], 1995, **13**(4/5) : 425—429
- [9] Yin X. , Dong S. , Wang E. . *Trends Anal. Chem.* [J], 2004, **23**(6) : 432—441
- [10] Zhang Z. J. , Li B. X. , Zheng X. W. . *Chin. J. Chem.* [J], 2003, **21**(11) : 1403—1409

Determination of Captopril in Human Serum and Urine Samples by HPLC with On-line Electrogenerated Mn(III) Chemiluminescence Detection

ZHANG Yan-Tu^{1,2}, ZHANG Zhu-Jun^{1*}, SUN Yong-Hua¹, WEI Yue¹

(1. School of Chemistry and Materials Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Yan'an University, Yan'an 716000, China)

Abstract The separation and determination of captopril in human serum and urine samples by means of high performance liquid chromatography (HPLC) with on-line electrogenerated Mn(III) chemiluminescence detection was carried out. The method was based on the direct chemiluminescence reaction between captopril and Mn(III), which was on-line electrogenerated by constant current electrolysis. The chromatographic separation was performed on a nucleosil RP-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm i. d. , 5 μm) column with an isocratic mobile phase consisting of acetonitrile-1% aqueous acetic acid (volume ratio 6:4) at a flow-rate of 1.2 mL/min. The temperature was 25 °C. The effects of several parameters on the HPLC resolution and CL emission were studied systematically. Under the optimal conditions, the linear range and detection limit for captopril are 5—800 ng/mL and 0.9 ng/mL, respectively. The relative standard derivation for 10.0 ng/mL captopril is 2.2% (n = 11). The average recoveries for captopril in human serum and urine samples ranged from 94.8% to 103.2%, and the relative standard deviations of the quantitative results are below 3.4%. The proposed method had been applied to the determination of captopril in human serum and urine samples.

Keywords High performance liquid chromatography; Chemiluminescence detector; On-line electrogenerated Mn(III); Human serum; Urine sample

(Ed. : K, G)