



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101726530 A

(43) 申请公布日 2010.06.09

(21) 申请号 200910265400.4

(22) 申请日 2009.12.30

(71) 申请人 中国科学院长春应用化学研究所
地址 130000 吉林省长春市人民大街 5625 号

(72) 发明人 由天艳 于彩霞 袁柏青 唐小凤

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 魏晓波 逯长明

(51) Int. Cl.

G01N 27/447(2006.01)

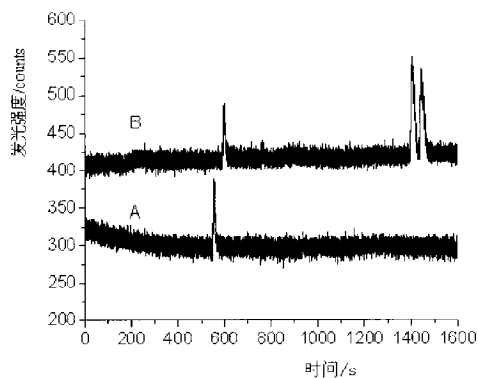
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种分离检测手性三甲丙咪嗪的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种毛细管电泳电化学发光检测联用分离检测手性三甲丙咪嗪的方法,分析条件为:检测电位 1V ~ 1.4V,进样时间 2s ~ 8s,进样高压 10kV ~ 20kV,分离高压 13kV ~ 20kV,光电倍增管电压为 700V ~ 900V;检测池溶液为三联吡啶钌,NaH₂PO₄-Na₂HPO₄缓冲溶液;分离溶液为β-CD 溶液,HP-β-CD 溶液,Tris 缓冲溶液,体积百分比浓度为 20% ~ 30% 的乙腈溶液。本发明对三甲丙咪嗪的分离检测方法成本低、操作简单、分离能力强,检测灵敏度高,重现性好。



1. 一种分离检测手性三甲丙咪嗪的方法,其特征在于,使用毛细管电泳电化学发光检测联用装置对三甲丙咪嗪进行分析,分析条件为:

检测电位 1V ~ 1.4V,进样时间 2s ~ 8s,进样高压 10kV ~ 20kV,分离高压 13kV ~ 20kV,光电倍增管电压为 700V ~ 900V;

检测池内溶液为 1mmol/L ~ 4mmol/L 的三联吡啶钌,40mmol/L ~ 60mmol/L、 $6.0 \leq \text{pH} \leq 9.0$ 的 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲溶液;

分离溶液为 0.5mmol/L ~ 2mmol/L 的 β -CD 溶液,0.5mmol/L ~ 2mmol/L 的 HP- β -CD 溶液,300mmol/L ~ 700mmol/L、 $2.0 \leq \text{pH} \leq 5.0$ 的 Tris 缓冲溶液,体积百分比浓度为 20% ~ 30% 的乙腈溶液。

2. 根据权利要求 1 所述的分离检测手性三甲丙咪嗪的方法,其特征在于,所述分析条件为:

检测电位 1.2V,进样时间 4s,进样高压 20kV,分离高压 15kV,光电倍增管电压为 800V;

检测池内溶液为 2mmol/L 的三联吡啶钌,50mmol/L、 $\text{pH} = 7.0$ 的 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲溶液;

分离溶液为 1.5mmol/L 的 β -CD 溶液,1.5mmol/L 的 HP- β -CD 溶液,500mmol/L、 $\text{pH} = 3.5$ 的 Tris 缓冲溶液,体积百分比浓度为 20% 的乙腈溶液。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的分离检测手性三甲丙咪嗪的方法,其特征在于,还包括对毛细管进行预处理,所述预处理为在第一次使用毛细管电泳装置前将毛细管用 80mmol/L ~ 120mmol/L 的 NaOH 溶液冲洗后过夜,在每次使用毛细管电泳装置前,依次用 80mmol/L ~ 120mmol/L 的 NaOH 溶液冲洗 5min ~ 15min、二次水冲洗 2min ~ 6min 以及用所述 Tris 缓冲液冲洗 5min ~ 15min。

4. 根据权利要求 3 所述的分离检测手性三甲丙咪嗪的方法,其特征在于,所述毛细管为内径 25 μm 的未涂层融硅毛细管。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的分离检测手性三甲丙咪嗪的方法,其特征在于,所述毛细管电泳电化学发光检测联用装置的电极为 Pt 盘工作电极、Ag/AgCl 参比电极和 Pt 丝对电极。

一种分离检测手性三甲丙咪嗪的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及手性三甲丙咪嗪的研究领域,具体涉及一种分离检测手性三甲丙咪嗪的方法。

背景技术

[0002] 三甲丙咪嗪属于三环类抗抑郁药物,广泛用于抑郁焦虑等疾病的治疗。该化合物是在侧链具有一个手性中心的手性药物,两种手性分子为同分异构体,在活性、代谢以及药动学上存在着差异。早在 1992 年,美国食品药品监督管理局就正式公布了题为《新立体异构药物开发政策声明》的手性药物法规管理指南,规定新药研究单位必需测定每个药物的立体异构体的组成,并要求必须在报批资料中提供单个对映体的药理学和药代动力学研究结果。因此手性药物的研究具有重要意义。

[0003] 目前常用的手性拆分法一般使用高效液相色谱法,高效液相色谱具有很好的分离能力,但是手性固定相的种类和数量有限,成本较高。检测技术中紫外可见检测是最常用的检测技术,但其灵敏度低。

发明内容

[0004] 本发明解决的问题在于提供一种分离检测手性三甲丙咪嗪的方法,分离不需要昂贵的手性固定相,操作成本较低,检测灵敏度高。

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明的技术方案为:

[0006] 一种分离检测手性三甲丙咪嗪的方法,使用毛细管电泳电化学发光检测联用装置对三甲丙咪嗪进行分析,分析条件为:

[0007] 检测电位 1V ~ 1.4V,进样时间 2s ~ 8s,进样高压 10kV ~ 20kV,分离高压 13kV ~ 20kV,光电倍增管电压为 700V ~ 900V;

[0008] 检测池内溶液为 1mmol/L ~ 4mmol/L 的三联吡啶钌,40mmol/L ~ 60mmol/L、 $6.0 \leq \text{pH} \leq 9.0$ 的 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲溶液;

[0009] 分离溶液为 0.5mmol/L ~ 2mmol/L 的 β -CD 溶液,0.5mmol/L ~ 2mmol/L 的 HP- β -CD 溶液,300mmol/L ~ 700mmol/L、 $2.0 \leq \text{pH} \leq 5.0$ 的 Tris 缓冲溶液,体积百分比浓度为 20% ~ 30% 的乙腈溶液。

[0010] 作为优选,所述分析条件为:

[0011] 检测电位 1.2V,进样时间 4s,进样高压 20kV,分离高压 15kV,光电倍增管电压为 800V;

[0012] 检测池内溶液为 2mmol/L 的三联吡啶钌,50mmol/L、 $\text{pH} = 7.0$ 的 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲溶液;

[0013] 分离溶液为 1.5mmol/L 的 β -CD 溶液,1.5mmol/L 的 HP- β -CD 溶液,500mmol/L、 $\text{pH} = 3.5$ 的 Tris 缓冲溶液,体积百分比浓度为 20% 的乙腈溶液。

[0014] 作为优选,还包括对毛细管进行预处理,所述预处理为在第一次使用毛细管电泳

装置前将毛细管用 80mmol/L ~ 120mmol/L 的 NaOH 溶液冲洗后过夜,在每次使用毛细管电泳装置前,依次用 80mmol/L ~ 120mmol/L 的 NaOH 溶液冲洗 5min ~ 15min、二次水冲洗 2min ~ 6min 以及用所述 Tris 缓冲液冲洗 5min ~ 15min。

[0015] 作为优选,所述毛细管为内径 25 μ m 的未涂层融硅毛细管。

[0016] 作为优选,所述毛细管电泳电化学发光检测联用装置的电极为 Pt 盘工作电极、Ag/AgCl 参比电极和 Pt 丝对电极。

[0017] 本发明使用毛细管电泳电化学发光联用来分离检测手性三甲丙咪嗪,成本低、操作简单、分离能力强,检测灵敏度高,重现性好。

附图说明

[0018] 图 1 为本发明提供的三联吡啶钉与三甲丙咪嗪在铂盘电极上的循环伏安曲线及其相对应的电化学发光曲线;

[0019] 图 2 为本发明提供的三甲丙咪嗪标准溶液的电泳图谱;

[0020] 图 3 为本发明提供的空白尿样与添加了三甲丙咪嗪标准溶液的尿样的电泳图谱。

具体实施方式

[0021] 为了进一步了解本发明,下面结合实施例对本发明优选实施方案进行描述,但是应当理解,这些描述只是为进一步说明本发明的特征和优点,而不是对本发明权利要求的限制。

[0022] 毛细管电泳技术高效快速、方法简易,分离模式多且容易改变,不需要昂贵的手性固定相,样品和试剂消耗量小,操作成本相对较低。电化学发光检测是一种高灵敏度的检测方法,已被广泛用于氨基酸、蛋白质、DNA 和有机胺类物质的分析检测,本发明使用毛细管电泳电化学发光联用技术分离检测手性三甲丙咪嗪。

[0023] 其中电极使用 Pt 盘工作电极、Ag/AgCl 参比电极和 Pt 丝对电极。将 Pt 盘工作电极在 1.0mol/L 的 H_2SO_4 溶液中, -0.2V ~ 1.35V 电位范围内循环扫描,可以得到 Pt 电极的特征循环伏安曲线,证实 Pt 具有活性,可以用来作为工作电极,此为本领域所公知。毛细管使用内径为 25 μ m 的未涂层融硅毛细管,为了保证检测的灵敏度及分析结果的重现性,作为优选在用毛细管进行分离前需要对毛细管进行预处理,具体为在第一次使用毛细管电泳装置前将毛细管用 80mmol/L ~ 120mmol/L 的 NaOH 溶液冲洗后过夜,在每次使用毛细管电泳装置前,依次用 80mmol/L ~ 120mmol/L 的 NaOH 溶液冲洗 5min ~ 15min、二次水冲洗 2min ~ 6min 以及用 300mmol/L ~ 700mmol/L、 $2.0 \leq pH \leq 5.0$ 的 Tris 缓冲液冲洗 5min ~ 15min。

[0024] 然后配制一定浓度的三甲丙咪嗪的标准溶液,对其进行静态试验:以 50mmol/L, pH 7.0 的 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲溶液作为背景电解质,扫描电位范围为 0-1.30V,记录稳定时的循环伏安曲线和电化学发光曲线;加入 2mmol/L 三联吡啶钉,并记录稳定时的循环伏安曲线和电化学发光曲线;加入 0.3mmol/L 三甲丙咪嗪,扫描区间同样为 0-1.30V,记录稳定时的循环伏安曲线和电化学发光曲线;将加入三甲丙咪嗪的循环伏安曲线和电化学发光曲线与加入三联吡啶钉的循环伏安曲线和电化学发光曲线对比,请参考图 1,图 1 为本发明提供的三联吡啶钉与三甲丙咪嗪在铂盘电极上的循环伏安曲线及其相对应的电化学发光曲

线。图 1 的上半部分为三联吡啶钌与三甲丙咪嗪的循环伏安曲线,下半部分为三联吡啶钌与三甲丙咪嗪的电化学发光曲线,由图中可以看出加入三甲丙咪嗪的循环伏安曲线和电化学发光曲线中的响应度都比只加入三联吡啶钌要强,三甲丙咪嗪可以增强三联吡啶钌的电化学发光活性,因此使用电化学发光检测三甲丙咪嗪是可行的。

[0025] 用毛细管电泳电化学发光连用技术对三甲丙咪嗪进行分离检测,通过变化分离检测条件对实验的灵敏度、分离度、峰形、重现性进行考察,确定本发明提供的分离检测手性三甲丙咪嗪的方法的分析条件为:

[0026] 检测电位 1V ~ 1.4V,进样时间 2s ~ 8s,进样高压 10kV ~ 20kV,分离高压 13kV ~ 20kV,光电倍增管电压为 700V ~ 900V;检测池内溶液为 1mmol/L ~ 4mmol/L 的三联吡啶钌,40mmol/L ~ 60mmol/L、 $6.0 \leq \text{pH} \leq 9.0$ 的 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲溶液;分离溶液为 0.5mmol/L ~ 2mmol/L 的 β -CD 溶液,0.5mmol/L ~ 2mmol/L 的 HP- β -CD 溶液,300mmol/L ~ 700mmol/L、 $2.0 \leq \text{pH} \leq 5.0$ 的 Tris 缓冲溶液,体积百分比浓度为 20% ~ 30% 的乙腈溶液。这里 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲溶液的浓度指的是 NaH_2PO_4 与 Na_2HPO_4 都为 40mmol/L ~ 60mmol/L。

[0027] 作为优选,分析条件为:检测电位 1.2V,进样时间 4s,进样高压 20kV,分离高压 15kV,光电倍增管电压为 800V;检测池内溶液为 2mmol/L 的三联吡啶钌,50mmol/L、 $\text{pH} = 7.0$ 的 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲溶液;分离溶液为 1.5mmol/L 的 β -CD 溶液,1.5mmol/L 的 HP- β -CD 溶液,500mmol/L、 $\text{pH} = 3.5$ 的 Tris 缓冲溶液,体积百分比浓度为 20% 的乙腈溶液。

[0028] 实施例:

[0029] 使用的仪器装置为:内径 25 μm 的未涂层融硅毛细管柱,直径 500 μm 的 Pt 盘工作电极,AgAgCl 参比电极,Pt 丝对电极,MPI-A 型毛细管电泳电化学发光检测仪。

[0030] 使用的试剂为:三联吡啶钌 ($\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), β -环糊精 (β -CD),羟丙基- β -环糊精 (HP- β -CD),三羟甲基氨基甲烷 (Tris), NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , H_3PO_4 ,三甲丙咪嗪标准品,乙腈,二次水。所用试剂均为分析纯,所配制好的溶液在使用之前均经 0.22 μm 滤膜过滤;

[0031] 1、配制缓冲溶液:

[0032] (1) NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲溶液

[0033] 先配制浓度为 100mmol/L 的 NaH_2PO_4 溶液和浓度为 100mmol/L 的 Na_2HPO_4 溶液,将同浓度的二者混合再用二次水稀释配成浓度为 50mmol/L,再将溶液的 pH 值调成 7.0。

[0034] (2)Tris 缓冲溶液

[0035] 先配制浓度为 1000mmol/L 的 Tris 溶液,接着用二次水稀释至 500mmol/L,之后用浓 H_3PO_4 溶液调节至 $\text{pH} = 3.5$ 。

[0036] 2、对毛细管进行预处理:

[0037] 将毛细管用 100mmol/L 的 NaOH 溶液冲洗后过夜,在使用毛细管电泳装置前,再依次用 100mmol/L 的 NaOH 溶液冲洗 10min、二次水冲洗 5min 以及用配置好的 Tris 缓冲液冲洗 10min。

[0038] 3、通过毛细管电泳电化学发光联用对 1.0mmol/L 的三甲丙咪嗪标准溶液进行分离检测:

[0039] 检测电位 1.2V,进样时间 4s,进样高压 20kV,分离高压 15kV,光电倍增管电压为

800V ;检测池内溶液为 2mmol/L 的三联吡啶钌, 50mmol/L、pH = 7.0 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液 ;分离溶液为 1.5mmol/L 的 $\beta\text{-CD}$ 溶液, 1.5mmol/L 的 HP- $\beta\text{-CD}$ 溶液, 500mmol/L、pH = 3.5 的 Tris 缓冲溶液, 体积百分比浓度为 20% 的乙腈溶液。

[0040] 在此检测条件下, 三甲丙咪嗪标准溶液的检测限是 $1.0 \times 10^{-7} \text{mol/L}$, 线性范围是 $5.0 \times 10^{-7} \text{mol/L} \sim 2.0 \times 10^{-5} \text{mol/L}$, 在 25min 内三甲丙咪嗪得到分离, 请参考图 2, 图 2 为本发明提供的三甲丙咪嗪标准溶液的电泳图谱。可以看到在 1500s 附近出现两个峰, 两个峰已经被分开, 分别为三甲丙咪嗪的两个同分异构体的峰。

[0041] 4、对尿样中的三甲丙咪嗪进行分离检测 :

[0042] 由于在临床上检测三甲丙咪嗪时一般是检测血液和尿液, 所以本发明对尿液中的三甲丙咪嗪进行分离检测。

[0043] 取健康人的尿液, 经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 然后用乙腈溶液稀释 10 倍, 作为空白尿样。再将三甲丙咪嗪标准溶液加入空白尿样中配成含三甲丙咪嗪浓度为 $2.0 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 的尿样。

[0044] 通过毛细管电泳电化学发光联用对空白尿样和含 $2.0 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 三甲丙咪嗪的尿样进行检测, 分离检测条件与分离检测三甲丙咪嗪标准溶液时相同, 请参考图 3, 图 3 为本发明提供的空白尿样与添加了三甲丙咪嗪标准溶液的尿样的电泳谱图, A 是空白尿样, B 是含 $2.0 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 三甲丙咪嗪的尿样。B 中 1500s 处出现的是三甲丙咪嗪两个同分异构体的峰, 两个峰已经被分开, 且可以看出尿液的基底对三甲丙咪嗪的分离检测没有干扰。

[0045] 因此临床上检测尿液中的三甲丙咪嗪时使用本发明的方法是可行的, 而且本发明的方法同其他分析方法比较还具有如下特点 : 毛细管电泳电化学发光检测成本低, 同质谱和激光诱导荧光等一些灵敏的检测方法相比, 操作更简单 ; 对三甲丙咪嗪的检测限为 $1.0 \times 10^{-7} \text{mol/L}$, 比最常用的紫外检测方法检测限低 2 个数量级, 线性范围是 $5.0 \times 10^{-7} \text{mol/L} \sim 2.0 \times 10^{-5} \text{mol/L}$; 重现性好, 有机添加剂乙腈能够溶解电极表面的污染物, 操作过程中不用对电极进行活化, 提高了分析的重现性。

[0046] 以上对本发明所提供的一种分离检测手性三甲丙咪嗪的方法进行了详细介绍。本文中应用了具体个例对本发明的原理及实施方式进行了阐述, 以上实施例的说明只是用于帮助理解本发明的方法及其核心思想。应当指出, 对于本技术领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明原理的前提下, 还可以对本发明进行若干改进和修饰, 这些改进和修饰也落入本发明权利要求的保护范围内。

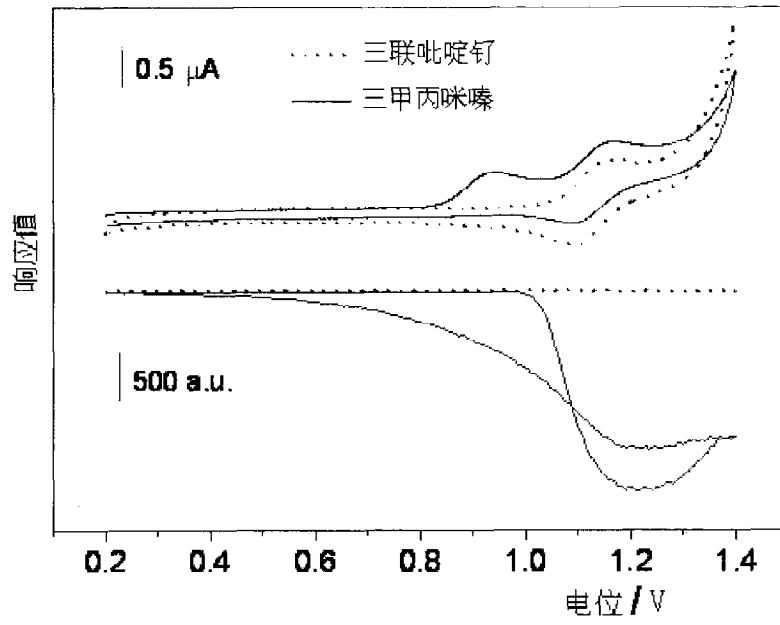


图 1

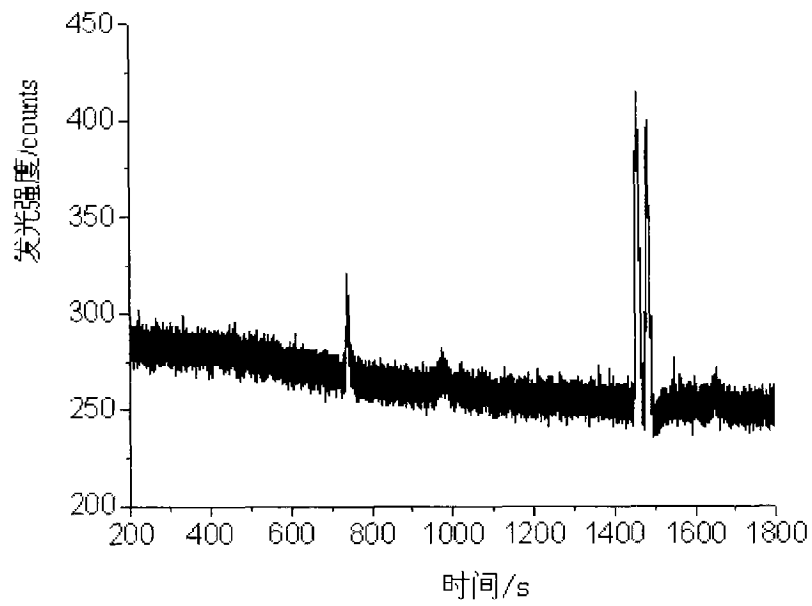


图 2

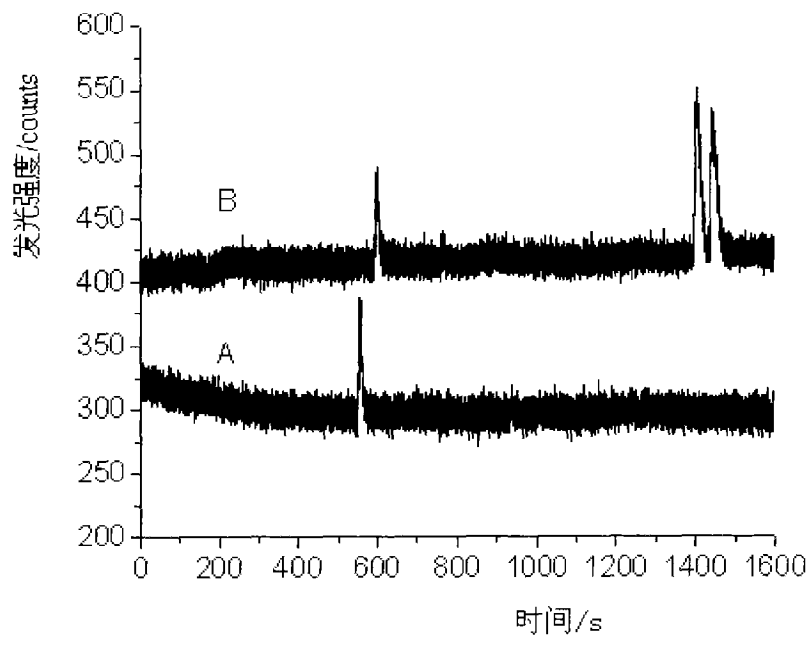


图 3