



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101799423 A

(43) 申请公布日 2010.08.11

(21) 申请号 201010123672.3

(22) 申请日 2010.03.15

(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 唐小风 袁柏青 李霞

(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 21/76 (2006.01)

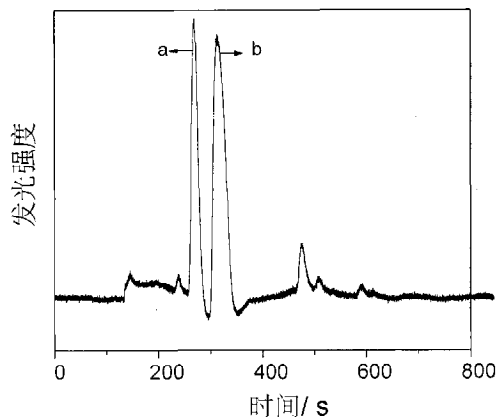
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种分离检测丙咪嗪和三甲丙咪嗪的方法

(57) 摘要

本发明实施例公开了一种分离检测丙咪嗪和三甲丙咪嗪的方法,以毛细管为分离通道,三羟甲基氨基甲烷、β-环糊精和乙腈的混合溶液为分离溶液,使得丙咪嗪和三甲丙咪嗪得到分离,然后在毛细管柱末端,通过三联吡啶钌电化学发光体系对丙咪嗪和三甲丙咪嗪进行检测,最终实现对丙咪嗪和三甲丙咪嗪的分离检测。本发明提供的利用毛细管电泳电化学发光联用装置对丙咪嗪和三甲丙咪嗪分离检测具有实验装置简单、操作方法简单易行、成本低、分离效率高、检测灵敏度高等优点。通过本发明提供的方法对丙咪嗪和三甲丙咪嗪进行分离检测时,丙咪嗪和三甲丙咪嗪的检测限分别为 $5.0 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 和 $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 。



1. 一种分离检测丙咪嗪和三甲丙咪嗪的方法,其特征在于,步骤包括:

连接好毛细管电泳电化学发光装置,将配制好的丙咪嗪和三甲丙咪嗪混合样品放在所述装置的样品池内,在所述装置的毛细管内运行分离溶液,待基线稳定后,使得丙咪嗪和三甲丙咪嗪混合样品进入所述装置的毛细管,所述分离溶液是由三羟甲基氨基甲烷、 β -环糊精和乙腈组成的混合溶液;

以所述装置的毛细管为分离通道,将所述样品在分离电压的作用下得到分离;

在所述毛细管柱末端的电化学发光检测池内进行检测,所述检测池内为三联吡啶钌和 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 的混合溶液。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述 β -环糊精的浓度为 $0.15 \sim 0.30\text{mmol/L}$ 。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述 β -环糊精的浓度为 0.20mmol/L 。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述三羟甲基氨基甲烷的浓度为 $10 \sim 50\text{mmol/L}$ 。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述三羟甲基氨基甲烷溶液的pH为 $2.0 \sim 4.0$ 。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述乙腈溶液的体积百分比浓度为 $15 \sim 25\%$ 。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述三联吡啶钌的浓度为 $1 \sim 5\text{mmol/L}$ 。

8. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 的浓度为 $40 \sim 60\text{mmol/L}$ 。

9 根据权利要求8所述的方法,所述 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 溶液的pH值为 $6.0 \sim 9.0$ 。

10. 根据权利要求1~9任一项所述的方法,其特征在于,所述毛细管为内径为 $75 \mu\text{m}$ 的未涂层融硅毛细管。

一种分离检测丙咪嗪和三甲丙咪嗪的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及丙咪嗪和三甲丙咪嗪技术领域,更具体地说,涉及一种分离检测丙咪嗪和三甲丙咪嗪的方法。

背景技术

[0002] 丙咪嗪和三甲丙咪嗪属于三环类抗抑郁药物。三环类抗抑郁药物自 20 世纪 60 年代开始应用于治疗抑郁症,目前还用于治疗其他精神疾患,如强迫性障碍、注意力缺乏性疾病、恐慌、恐惧症、慢性疼痛综合征、周围神经病、夜间遗尿、焦虑症、进食障碍及偏头痛等。

[0003] 目前的分析方法有高效液相色谱法,气相色谱法,电化学方法,毛细管电泳,非水毛细管电泳等。高效液相色谱具有很好的分离能力,但成本较高。检测技术包括紫外可见检测、激光诱导荧光、质谱等方法,其中,紫外可见检测作为常用的检测技术,其灵敏度较低;质谱和激光诱导荧光的仪器昂贵,操作复杂。

[0004] A. G. Chen 等报道了一种用高效液相色谱与紫外检测联用分离检测丙咪嗪和三甲丙咪嗪的方法 (A. G. Chen, Y. K. Wing, H. Chiu, S. Lee, C. N. Chen, K. Chan, J. Chromatogr. B 693 (1997) 153)。利用该方法得到丙咪嗪和三甲丙咪嗪的线性范围分别为 $0.2 \sim 1.6 \mu\text{M}$ 和 $0.1 \sim 1.2 \mu\text{M}$;检测限分别为 160nM 和 120nM。该方法检测灵敏度较低,使用仪器价格昂贵,分离检测中消耗溶剂量大。

[0005] 现有技术中, H. Kirchherr 等报道了一种用高效液相色谱与质谱联用分离检测丙咪嗪和三甲丙咪嗪的方法 (H. Kirchherr, W. N. Kuhn-Velten, J. Chromatogr. B 843 (2006) 100)。高效液相色谱和质谱仪器的价格昂贵,操作复杂,分离检测成本高。

[0006] 本发明人考虑,提供一种分离检测丙咪嗪和三甲丙咪嗪的方法,实现对丙咪嗪和三甲丙咪嗪的分离检测,以降低成本、提高灵敏度。

发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明提供一种分离检测丙咪嗪和三甲丙咪嗪的方法,以实现对丙咪嗪和三甲丙咪嗪的分离检测,降低分离检测成本,提高灵敏度。

[0008] 本发明提供一种分离检测丙咪嗪和三甲丙咪嗪的方法,步骤包括:

[0009] 连接好毛细管电泳电化学发光装置,将配制好的丙咪嗪和三甲丙咪嗪混合样品放在所述装置的样品池内,在所述装置的毛细管内运行分离溶液,待基线稳定后,使得丙咪嗪和三甲丙咪嗪混合样品进入所述装置的毛细管,所述分离溶液是由三羟甲基氨基甲烷、 β -环糊精和乙腈组成的混合溶液;

[0010] 以所述装置的毛细管为分离通道,将所述样品在分离电压的作用下得到分离;

[0011] 在所述毛细管柱末端的电化学发光检测池内进行检测,所述检测池内为三联吡啶钌和 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 的混合溶液。

[0012] 优选的,所述 β -环糊精的浓度为 $0.15 \sim 0.30\text{mmol/L}$ 。

[0013] 优选的,所述 β -环糊精的浓度为 0.20mmol/L 。

- [0014] 优选的,所述三羟甲基氨基甲烷的浓度为 10 ~ 50mmol/L。
- [0015] 优选的,所述三羟甲基氨基甲烷溶液的 pH 为 2.0 ~ 4.0。
- [0016] 优选的,所述乙腈溶液的体积百分比浓度为 15 ~ 25%。
- [0017] 优选的,所述三联吡啶钌的浓度为 1 ~ 5mmol/L。
- [0018] 优选的,所述 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 的浓度为 40 ~ 60mmol/L。
- [0019] 优选的,所述 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液的 pH 值为 6.0 ~ 9.0。
- [0020] 优选的,所述毛细管为内径为 75 μm 的未涂层融硅毛细管。
- [0021] 从上述技术方案可以看出,本发明以毛细管作为分离通道,三羟甲基氨基甲烷(简称 Tris)、 β -环糊精和乙腈的混合溶液作为分离溶液,使得丙咪嗪和三甲丙咪嗪得到分离,然后通过三联吡啶钌电化学发光体系对丙咪嗪和三甲丙咪嗪进行检测,最终实现对丙咪嗪和三甲丙咪嗪的分离检测。本发明提供的利用毛细管电泳电化学发光联用装置对丙咪嗪和三甲丙咪嗪分离检测具有实验装置简单、操作方法简单易行、消耗试剂和药品的量少、成本低、分离效率高、检测灵敏度高等优点。通过本发明提供的方法对丙咪嗪和三甲丙咪嗪进行分离检测时,丙咪嗪和三甲丙咪嗪的检测限分别为 $5.0 \times 10^{-9}\text{mol/L}$ 和 $1.0 \times 10^{-9}\text{mol/L}$ 。

附图说明

[0022] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0023] 图 1 为本发明实施例公开的三联吡啶钌与丙咪嗪、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;

[0024] 图 2 为本发明实施例公开的丙咪嗪、三甲丙咪嗪标准溶液的电泳图谱。

具体实施方式

[0025] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0026] 本发明实施例公开了一种分离检测丙咪嗪和三甲丙咪嗪的方法,以实现丙咪嗪和三甲丙咪嗪的分离检测,降低分离检测成本,提高灵敏度。

[0027] 本发明提供一种分离检测丙咪嗪和三甲丙咪嗪的方法,步骤包括:

[0028] 连接好毛细管电泳电化学发光装置,将配制好的丙咪嗪和三甲丙咪嗪混合样品放在所述装置的样品池内,在所述装置的毛细管内运行分离溶液,待基线稳定后,使得丙咪嗪和三甲丙咪嗪混合样品进入所述装置的毛细管,所述分离溶液是由三羟甲基氨基甲烷、 β -环糊精和乙腈组成的混合溶液;

[0029] 以所述装置的毛细管为分离通道,将所述样品在分离电压的作用下得到分离;

[0030] 在所述毛细管柱末端的电化学发光检测池内进行检测,所述检测池内为三联吡啶

钉和 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 的混合溶液。

[0031] 按照本发明,对所述毛细管电泳电化学发光联用装置并无特别限制,例如可以选用西安瑞迈分析仪器有限公司出售的 MPI-A 型毛细管电泳电化学发光检测仪。按照本发明,光电倍增管的电压优选为 700V ~ 900V,更优选为 800V。

[0032] 所述检测池内为三电极体系,所述三电极体系优选为:直径为 500 μm 的 Pt 盘工作电极、Ag/AgCl 参比电极 (KCl 饱和溶液) 和 Pt 丝对电极。

[0033] 按照本发明,分离后的样品进入电化学发光检测池内进行检测。本发明对所述检测电位优选为 1.0 ~ 1.4V,更优选为 1.2V。所述检测池内为三联吡啶钉和 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 的混合溶液,所述三联吡啶钉的浓度优选为 1 ~ 5mmol/L,更优选为 2mmol/L。所述 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液的 pH 值优选为 6.0 ~ 9.0,更优选为 7.0。所述 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液浓度优选为 40mmol/L ~ 60mmol/L,更优选为 50mmol/L。

[0034] 按照本发明,进样电压和进样时间影响进样量。进样时间优选为 2 ~ 8s,更优选为 4s。所述进样电压优选为 10 ~ 20kV,更优选为 20kV。

[0035] 所述毛细管内为分离溶液,所述分离溶液包括三羟甲基氨基甲烷 (简称 Tris)、 β -环糊精和乙腈溶液,所述 Tris 缓冲溶液的 pH 值优选为 2.0 ~ 4.0,更优选为 2.0;所述 Tris 缓冲溶液浓度优选为 10mmol/L ~ 50mmol/L,更优选为 20mmol/L。

[0036] β -环糊精能与丙咪嗪和三甲丙咪嗪形成包合物,由于丙咪嗪和三甲丙咪嗪结构的不同,与 β -环糊精形成的包合物的稳定常数不同,从而最终实现两种物质的分离。所述 β -环糊精的浓度为 0.15mmol/L ~ 0.30mmol/L,优选为 0.20mmol/L。

[0037] 现有技术中,检测过程中电极表面容易形成氧化膜,并且被分析物的氧化产物会吸附在电极表面,对电极造成污染,因此,为了得到高的灵敏度和好的重现性,电泳每进样运行一次,电极就需要进行活化处理一次。本发明中,所述分离溶液包括乙腈溶液,由于乙腈为有机溶剂,因此,吸附在电极表面的物质可以溶解在乙腈溶液中。电极不容易受到污染,无需活化处理,从而简化了操作步骤,节省了分析时间。所述乙腈溶液体积百分比浓度优选为 15% ~ 25%,更优选为 20%。

[0038] 按照本发明,分离高压影响灵敏度和迁移时间,对于所述分离电压优选为 9kV ~ 18kV,更优选为 15kV。

[0039] 为了保证检测的灵敏度和及分析结果的重现性,本发明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 100mmol/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 100mmol/L 的 NaOH 溶液冲洗 5min ~ 15min、二次水冲洗 2min ~ 6min 以及用 20mmol/L、pH = 2.0 的 Tris 缓冲溶液缓冲溶液冲洗 5min ~ 15min。

[0040] 本发明以毛细管作为分离通道,Tris、 β -环糊精和乙腈的混合溶液作为分离溶液,使得丙咪嗪和三甲丙咪嗪得到分离,然后通过三联吡啶钉电化学发光体系对丙咪嗪和三甲丙咪嗪进行检测,最终实现对丙咪嗪和三甲丙咪嗪的分离检测。本发明提供的利用毛细管电泳电化学发光联用装置对丙咪嗪和三甲丙咪嗪分离检测具有实验装置简单、操作方法简单易行、消耗试剂和药品的量少、成本低、分离效率高、检测灵敏度高等优点。通过本发明提供的方法对丙咪嗪和三甲丙咪嗪进行分离检测时,丙咪嗪和三甲丙咪嗪的检测限分别为 $5.0 \times 10^{-9}\text{mol/L}$ 和 $1.0 \times 10^{-9}\text{mol/L}$ 。

[0041] 为了进一步了解本发明的技术方案,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。

[0042] 实施例 1

[0043] 按照以下步骤配制 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液

[0044] 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;

[0045] 将同浓度的上述溶液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。

[0046] 实施例 2

[0047] 按照以下步骤配制 Tris 缓冲溶液

[0048] 配制浓度为 100mmol/L 的 Tris 溶液;

[0049] 用二次水稀释上述 Tris 溶液至 20mmol/L;

[0050] 用浓 H_3PO_4 溶液调节 20mmol/L 的 Tris 溶液至 pH 为 2.0。

[0051] 实施例 3

[0052] 使用的装置为:MPI-A 型毛细管电泳电化学发光检测仪,内径 75 μm 的未涂层融硅毛细管柱,传统的三电极体系包括直径 500 μm 的 Pt 盘工作电极,Ag/AgCl 参比电极,Pt 丝对电极。

[0053] 以实施例 1 中配制的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液作为背景电解质,向背景电介质中加入 2mmol/L 三联吡啶钌,扫描电位范围为 0.20 ~ 1.30V,记录稳定时的循环伏安曲线和电化学发光曲线,如图 1 中的 a 曲线和 a' 曲线;

[0054] 分别向含上述溶液中加入 0.3mmol/L 丙咪嗪和三甲丙咪嗪,扫描电位区间均为 0.20 ~ 1.30V,记录稳定时的循环伏安曲线和电化学发光曲线,如图 1 中的 b、c 曲线和 b'、c' 曲线。图 1 为本发明提供的三联吡啶钌与丙咪嗪、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 的上半部分为循环伏安曲线,下半部分为电化学发光曲线,由图中可以看出加入丙咪嗪或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,丙咪嗪、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丙咪嗪、三甲丙咪嗪是可行的。

[0055] 实施例 4

[0056] 使用的装置为:MPI-A 型毛细管电泳电化学发光检测仪,内径 75 μm 的未涂层融硅毛细管柱,传统的三电极体系包括直径 500 μm 的 Pt 盘工作电极,Ag/AgCl 参比电极,Pt 丝对电极。

[0057] 对毛细管进行预处理步骤为: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。

[0058] 在下述分析条件下运用毛细管电泳电化学发光联用技术对丙咪嗪和三甲丙咪嗪的混合样品进行分离检测。

[0059] 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、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 0.20mmol/L 的 $\beta\text{-CD}$ 溶液,20mmol/L、pH = 2.0 的

Tris 缓冲溶液, 体积百分比浓度为 20% 的乙腈溶液。

[0060] 在上述分析条件下, 丙咪嗪、三甲丙咪嗪标准溶液在 400s 内得到分离, 检测限分别为 $5.0 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 、 $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$, 线性范围都为 $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L} \sim 5.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 。由于丙咪嗪和三甲丙咪嗪的治疗浓度范围在分别为 175 ~ 300ng/ml ($0.6 \sim 1.0 \mu \text{ M}$) 和 150 ~ 350ng/ml ($0.4 \sim 0.9 \mu \text{ M}$), 因此本发明提供的分离检测方法在临床研究上具有潜在的应用。图 2 为本发明提供的 $1.5 \mu \text{ mol/L}$ 丙咪嗪和 $0.5 \mu \text{ mol/L}$ 三甲丙咪嗪混合样品的电泳图谱, 如图所示, 丙咪嗪、三甲丙咪嗪得到了基线分离。a, b 峰分别对应丙咪嗪和三甲丙咪嗪。

[0061] 对所公开的实施例的上述说明, 使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的, 本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下, 在其它实施例中实现。因此, 本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例, 而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

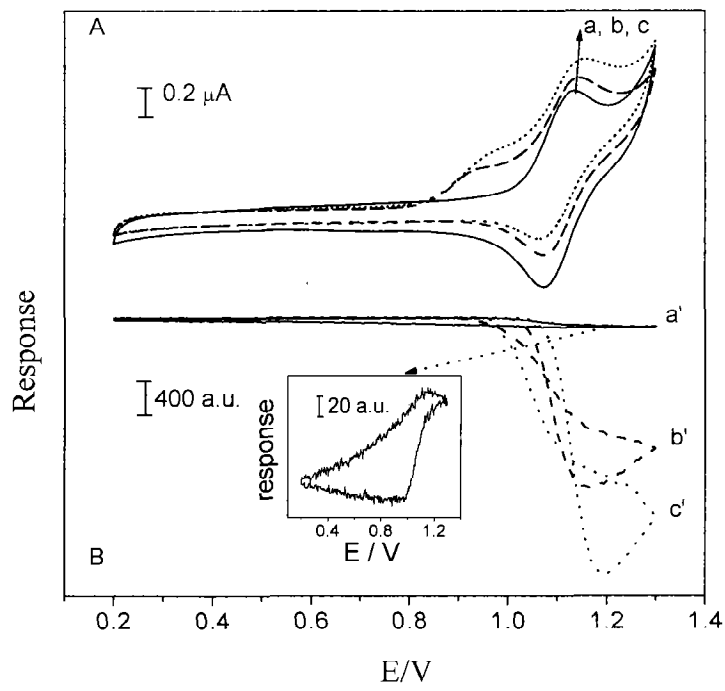


图 1

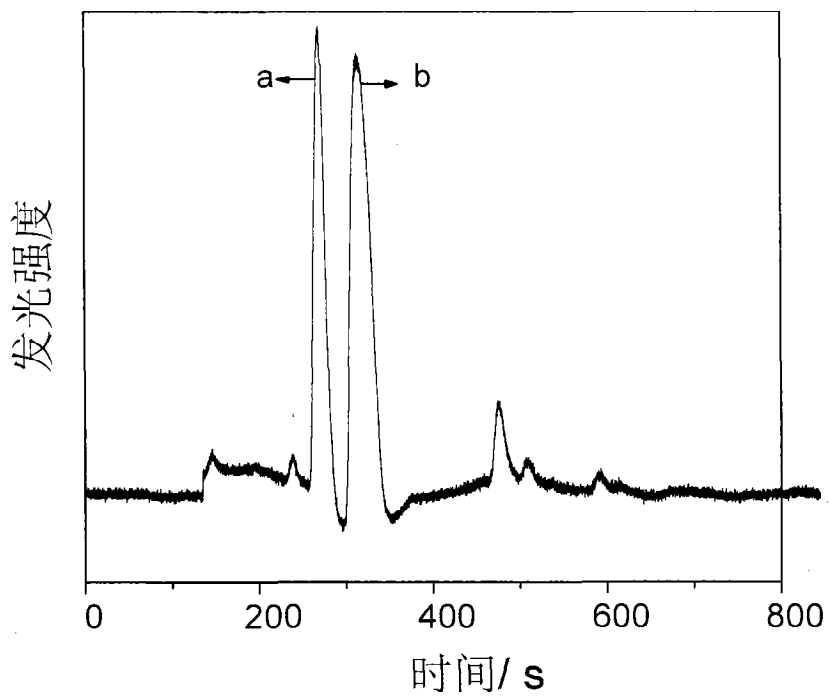


图 2