

柱前衍生化的人血浆中(+)、(-)棉酚的 HPLC测定法

吴大方 於毓文 郑多楷

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

提要 本文报道分别定量检测人血浆中(+)、(-)棉酚含量的高效液相色谱测定法。棉酚人血浆样品经乙腈沉淀蛋白后, 上清液加手性试剂——(+)-2-氨基-1-丁醇, 75°C加热45 min。反应液加NaCl进行溶剂反混合处理后, 取乙腈层50~100 μ l进样。选用ODS固定相, 紫外254 nm检测, 以甲醇-异丙醇-水-磷酸(80:20:20:0.1 V/V)为流动相, 流速1.2 ml/min时, (+), (-)棉酚衍生物的保留时间分别为4.2, 7.7 min。检测人血浆中(+)、(-)棉酚在0.125~2.0 μ g/ml范围内呈线性关系。棉酚回收率达94~98%, 此法已用于棉酚的临床血药浓度监测和动物实验研究。

关键词 棉酚; 对映体; 高效液相色谱法; 化学衍生化

作者曾建立了棉酚人血样品的电化学高效液相色谱测定法⁽¹⁾, 该方法灵敏特异, 已用于该药的临床药代动力学研究和血药浓度监测。但是, 该方法的不足之处是不能分别测定(+), (-)棉酚。近几年来, 随着棉酚研究工作的深入, 化学工作者已成功地将消旋棉酚拆分为(+), (-)棉酚⁽²⁾。药理试验证明, (-)棉酚有效有毒, (+)棉酚无效低毒⁽³⁾。作者也在实验中发现⁽⁴⁾, (+)棉酚在人、犬体内的半衰期显著长于(-)棉酚。因此, 很有必要建立一种能够分别检测(+), (-)棉酚的新方法, 借以深入探讨棉酚异构体的作用特点和毒性机制。

在本所合成室拆分消旋棉酚工作的启发下, 作者选用(+)-2-氨基-1-丁醇作为手性衍生化试剂(图1), 衍生化后的(+), (-)棉酚在反相高效液相色谱条件下分离良好。本文对棉酚衍生化以及(+), (-)棉酚衍生物的分离测定条件进行了初步探讨。

材料与方 法

一. 仪器、药品及色谱条件

高效液相色谱仪, 法国Gilson公司(Model 303型恒流泵, Model III B型紫外检测器)。台式自动平衡记录仪, 上海大华仪表厂。不锈钢色谱柱, 250 \times 4.6 mm, Zorbax ODS填料(5 μ m), 日本。

(+), (-)棉酚, 消旋棉酚纯品均由本所合成室提供。2,6-二甲基萘(内标), 瑞士Merck公司。棉酚和内标均用乙腈配成1 mg/ml母液, -30°C冰箱中保存, 每月更换一次。临用前用乙腈将棉酚溶液稀释至20 μ g/ml, 内标为40 μ g/ml。(+)、(-)-2-氨基-1-丁醇系东北制药厂赠品, 临用前用异丙醇配成20% (V/V)的溶液。冰乙酸, 磷酸及甲醇均为分析纯, 北京化工厂产品。乙腈, 色谱纯, 浙江黄岩化学试验厂。异丙醇, 色谱纯, 美国Baker化学

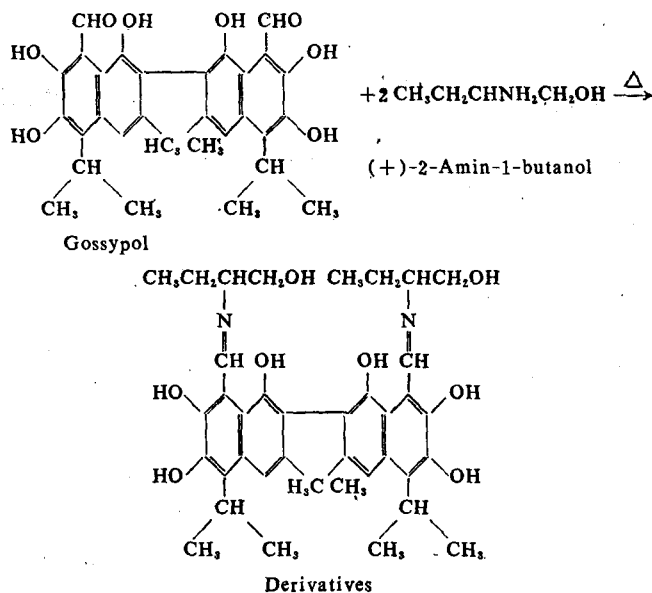


Fig 1. Diagram of the derivatization reaction.

试剂公司。氯化钠，分析纯，天津塘沽化学试剂厂。本试验采用三蒸水配制流动相。

色谱条件 流动相为甲醇—异丙醇—水—磷酸⁻ (80:20:20:0.1)，流速 1.2 ml/min。紫外 254 nm 检测，灵敏度 0.05。纸速 2.5 mm/min。室温下操作。

二. 样品预处理和衍生化条件

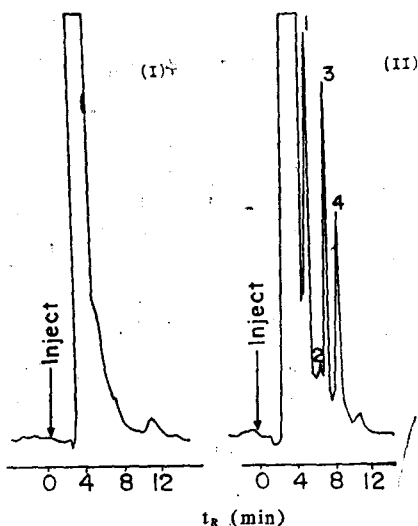


Fig 2. Chromatogram of human plasma containing (\pm)-gossypol and internal standard (II), and drug-free plasma (I). 1. ($-$)-Gossypol derivative; 2. Non-derivatized gossypol; 3. Internal standard; 4. ($+$)-Gossypol derivative.

室温下将血浆融化 10 min，移 0.4 ml 血浆样品至 5 ml 玻璃管内，另取空白血浆两管，各管加乙腈 0.6 ml，混匀后室温下静置 10 min，2500 r/min 离心 15 min，两只空白血浆管分别加消旋棉酚 0.4 和 1.0 μ g 作为随行标准，各管加内标 2.0 μ g，冰乙酸 50 μ l，最后加 20% 的 ($+$)-2-氨基-1-丁醇 100 μ l，摇匀后加塞，75 $^{\circ}$ C 恒温水浴加热 45 min，冰却后各管加氯化钠固体约 50 mg，反复混匀后，2500 r/min 离心 10 min，吸乙腈层 50~100 μ l 直接进样。

在上述色谱条件下，($-$) 棉酚衍生物、棉酚原形药、内标及 ($+$) 棉酚衍生物的保留时间分别为 4.2, 5.4, 6.3 和 7.7 min (图 2)。

结 果

一. ($+$)-2-氨基-1-丁醇的含量对衍生化的影响

在人工配制的含消旋棉酚和内标的乙腈样品中，加入不同量的 ($+$)-2-氨基-1-丁醇 (0.1~4.0%)，75 $^{\circ}$ C 加热 45 min，离心后取上清液直接进样。从图 3 中可见，加入的

(+)-2-氨基-1-丁醇在 0.1~2.0% 的范围内, (+), (-) 棉酚衍生物亦相应增加; 试剂浓度大于 2.0% 时, 对产物形成量影响不大, 故选用 2.0% 的 (+)-2-氨基-1-丁醇作为反应条件。

二. 温度对衍生化反应的影响

固定其它反应条件, 观察不同温度对衍生化反应的影响 (图 4)。很明显, 在 40~70°C 之间, 温度越高, 反应越接近完全。此后, 增高温度对反应影响不大; 另一方面, 乙腈的沸点为 82°C, 温度过高易使反应液挥发, 故选用 75°C。

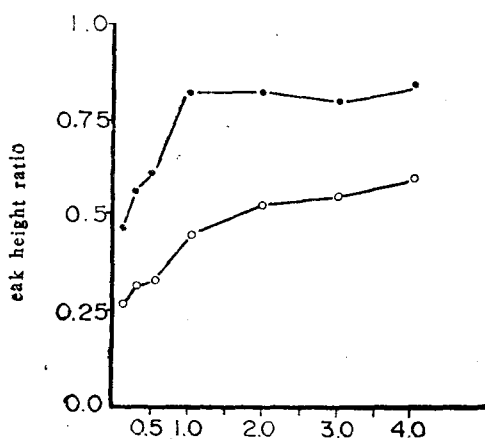


Fig 3. Effect of different amounts of (+)-2-amino-1-butanol on the derivatization reaction. •—• (-)-Gossypol derivative; ○—○ (+)-Gossypol derivative.

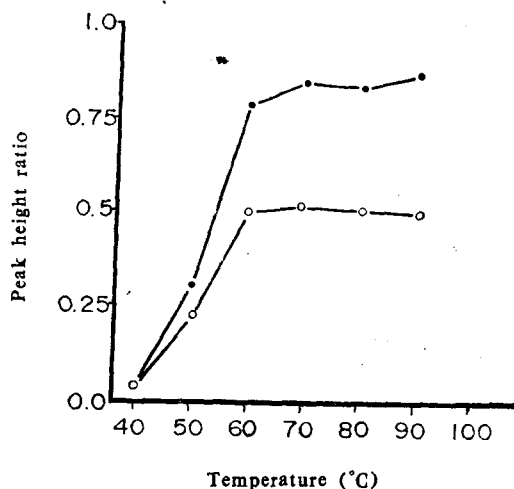


Fig 4. Effect of temperature on the derivatization reaction. •—• (-)-Gossypol derivative; ○—○ (+)-Gossypol derivative.

三. 衍生化所需要的反应时间

综合上述条件, 最后考察了加热不同时间对衍生化反应的影响。从图 5 中可见, 加热 30 min, 产物量最高。以后随着时间延长, 反应产物反而略有减少, 故选择 45 min 为加热时间, 这样既可以保证衍生化反应基本完全, 又可以避免因加热过久而造成的样品损失。

四. 棉酚异构体纯度考察

用 (+), (-) 棉酚纯品溶液配制的人血浆样品, 经乙腈处理后, 加 (+)-2-氨基-1-丁醇衍生化, 高效液相色谱上证实了拆分棉酚纯度较高, 含对映体极微 (图 6)。

五. 对方法的考察与应用

(一) 线性关系和灵敏度 取血浆每份 0.4 ml, 经乙腈去蛋白后, 加入不同量的消旋棉酚, 各管加内标 2.0 μg , 衍生化后以样品的峰高比为应变量 (Y), 血浆中 (+), (-) 棉酚浓度为自变量 (X), 数据经回归处理后表明, (+), (-) 棉酚血浓度在 0.125~2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内, 线性关系良好, 相关系数均在 0.9995 以上。(-) 棉酚的回归方程为 $Y = 1.05X - 0.03$, (+) 棉酚为 $Y = 0.66X$, 可见 Y 轴上截距甚小。两种异构体的检测下限均为 0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

(二) 样品回收试验 空白血浆先加乙腈沉淀蛋白后, 加入已知量的消旋棉酚和内标, 按上述衍生化步骤处理后, 测出的相应峰高与直接进样的 (+), (-) 棉酚衍生物及内标的标准液的峰高相比较, 求出 (-) 棉酚回收率为 94.05, (+) 棉酚 98.17%, 内标 94.62%。

(三) 精密度的应用 应用本方法检测人工配制的消旋棉酚血浆样品的结果表明, 该方法测定

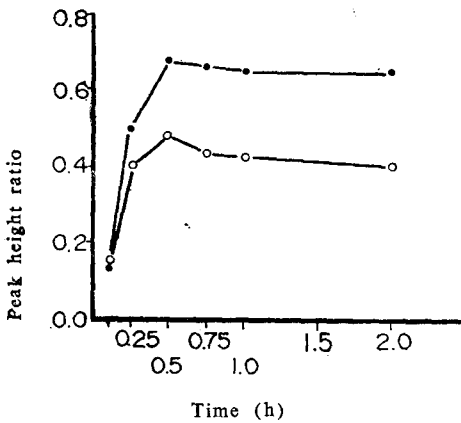


Fig 5. Effect of reaction time on the derivatization reaction. •—• (-)-Gossypol derivative; ○—○ (+)-Gossypol derivative.

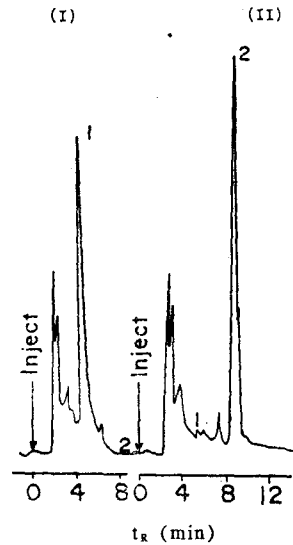


Fig 6. Chromatogram of standard (-)-gossypol (I) and (+)-gossypol (II) added in normal human plasma. 1. (-)-Gossypol derivative; 2. (+)-Gossypol derivative.

(+), (-) 棉酚的日内误差 ($n=12$) 和日间误差 ($n=8$, 15 天内完成) 均小于 6.0%。

试用该方法检测了 3 名男性志愿者接受消旋棉酚抗生育试验 (20 mg/d) 两个月内的 (+), (-) 棉酚血药浓度, 结果列入表 1。

Tab 1. Plasma (+)- and (-)-gossypol levels in three volunteers taking (±)-gossypol at the dosage of 20 mg/d orally

Volunteer	15th day		30th day		45th day		60th day	
	(+)-G ($\mu\text{g/ml}$)	(-)-G ($\mu\text{g/ml}$)	(+)-G ($\mu\text{g/ml}$)	(-)-G ($\mu\text{g/ml}$)	(+)-G ($\mu\text{g/ml}$)	(-)-G ($\mu\text{g/ml}$)	(+)-G ($\mu\text{g/ml}$)	(-)-G ($\mu\text{g/ml}$)
A	0.21	*	0.30	*	0.55	0.16	0.53	0.19
B	0.22	*	0.29	*	0.66	0.17	0.51	0.12
C	0.32	*	0.32	*	0.47	0.17	0.47	0.15

* Less than the limit of detection.

讨 论

棉酚是由两部分相同取代的萘基组成的, 由于连接部位的四个邻位均有取代基团, 使两个萘环不成平面, 分子成手性, 产生位阻光学异构体, 在普通的反相色谱条件下, 这两种异构体是不能分离的。作者选用了 (+)-2-氨基-1-丁醇作为手性试剂, 使其与棉酚反应生成非对映体, 从而使两个异构体的理化性质有所不同, 在现有的色谱条件下, 不但 (+), (-) 棉酚衍生物分离良好, 而且衍生物和棉酚原形药也有较好的分离, 这对观察生化反应的程度以及精确定量等都是至关重要的。

棉酚化学性质活泼, 易被氧化代谢。另一方面, 有文献报道, 棉酚可通过其醛基与蛋白质或多肽上的游离氨基形成共价结合, 所有这些都给样品提取造成困难。作者曾试用先向血

浆中加消旋棉酚,混匀后再加乙腈沉淀蛋白的处理方法,发现(-)棉酚和内标的回收率可达90%以上,但(+)棉酚的回收率只有60%左右,推测可能是外加消旋棉酚后,(+)棉酚和血浆蛋白共价结合的速度较快所致。故在本试验中采用先加乙腈沉淀蛋白,然后向上清液中加消旋棉酚和内标的方法,结果(+),(-)棉酚和内标的回收率均达到94%以上。在实际应用中,病人或志愿者的血浆样品所含的游离棉酚和结合棉酚已达到某种程度上的平衡,因此,上述回收率试验的结果有一定的参考意义。

溶剂反混合(solvent demixing)对于提取极性较大的样品来说是行之有效的。Alric等⁽⁵⁾成功地应用这种方法提取了血浆中丙戊酸(valproic acid,抗癫痫药)。本试验中的反应液以乙腈-水为基质,内含的(+),(-)棉酚衍生物分子量大。作者采用了氯化钠反混合处理方法,使乙腈和水分层,离心后吸乙腈层进样,从而减少了色谱杂峰,又使样品相对浓缩,同时也不影响回收率。

应用该方法检测了三名男性志愿者每天口服消旋棉酚20mg,连续两个月内的样品,发现棉酚血药浓度蓄积现象,其中主要是无抗生育活性的(+)棉酚。因此,在临床上应用纯品(-)棉酚有可能避免一些毒副反应。

由于采用的是紫外检测,(+),(-)棉酚的检测下限均为0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。作者曾报告⁽⁴⁾,男性成人口服单剂量20mg棉酚后24h的血药浓度低于100ng/ml,可见该方法的灵敏度较低,不能完全适合(+),(-)棉酚的临床药代动力学研究的需要。此外,从色谱图中可见,在现有条件下,(-)棉酚衍生物出峰过快,和前沿峰部分重叠,易造成偏差,这些都有待于进一步改进。

致谢 本文经本所分析室王慕邹研究员提供宝贵意见。

参 考 文 献

1. Wang MZ, et al. High-performance liquid chromatography with electrochemical detection of gossypol in human plasma. *J Chromatogr (Biomed Appl)* 1985; 343:387.
2. Zheng DK, et al. Resolution of racemic gossypol. *J Chem Soc Chem Commun* 1985; 168.
3. 王迺功,等. (-)和(+)棉酚对雄大鼠生育能力的影响. *药理学报* 1984; 19:932.
4. Wu DF, et al. Pharmacokinetics of (\pm), (+) and (-) gossypol in humans and dogs. *Clin Pharmacol Ther* 1986; 39:613.
5. Alric R. Performance evaluation of a reversed phase high-performance liquid chromatographic assay of valproic acid involving a "solvent demixing" extraction procedure and precolumn derivatization. *J Chromatogr* 1981; 224:289.

DETERMINATION OF (+)- AND (-)-GOSSYPOL IN HUMAN PLASMA USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH PRE-COLUMN CHEMICAL DERIVATIZATION

DF Wu, YW Yu and DK Zheng

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing*)

ABSTRACT A new assay method for the determination of (+)- and (-)-gossypol using HPLC with pre-column chemical derivatization has been developed. 2, 6-dimethyl-naphthalene was used as internal standard and (+)-2-amino-1-butanol as the chiral derivatizing agent. (+)- and (-)-gossypol derivatives were separated completely on an ODS column. Methanol-isopropanol-water-phosphoric acid (80:20:20:0.1) was used as the mobile phase. The wave length of UV detector was settled at 254 nm. The retention times of (-)- and (+)-gossypol derivatives were 4.2 and 7.7 min, respectively.

Acetonitrile-treated protein-free plasma samples were prepared, and (+)-2-amino-1-butanol was added to a final concentration of 2%. The system was kept at 75°C for 45 min. After solvent demixing by adding sodium chloride, 50~100 μ l of acetonitrile phase was injected into the column.

The linearities with (+)- and (-)-gossypol plasma sample ranged from 0.125 to 2.0 μ g/ml. The absolute recoveries of (+)-, (-)-gossypol and internal standard were found to be 98.2%, 94.1% and 94.6%, respectively, with within-day and day-to-day variations less than 6% for both (+)- and (-)-gossypol. The sensitivity for detection of (+)- or (-)-gossypol was found to be 0.125 μ g/ml (S/N 3:1). This method is considered to be suitable for some clinical and experimental studies of gossypol.

Key words Gossypol; Enantiomers; HPLC; Chemical derivatization

* This work was supported by a grant from the Rockefeller Foundation, U S A.