

一种浸透限制固定相的合成及性能评价

马 骏 谢景文 孙卫胜 贾正平

(兰州军区总医院药剂科, 兰州 730050)

摘要 合成了一种高效液相色谱浸透限制固定相,用于生物体液中的药物直接进样分析。这种固定相不仅可测定体液中的疏水性药物也可测定亲水性药物。原理是使大分子物质蛋白质从色谱死体积中排除,而药物达到分离。通过测定人血清中的药物,证明其回收率近 100%,且有好的重现性。

关键词 高效液相色谱法;浸透限制固定相;体液中药物分析

浸透限制固定相(restricted access stationary phase, RAS)又称浸透限制介质,是在色谱填料的疏水层上覆盖一层亲水层,亲水层允许小分子物质如药物自由出入于固定相的疏水部分,从而立体地阻止了大分子物质如蛋白质与固定相的疏水部分相互作用,再通过选择适当的流动相,使小分子物质得到分离,大分子物质随流动相流出^[1,2]。这种固定相是近年来发展的一种高效液相色谱体液直接进样的新技术,优点是体液(血清、血浆、尿液等)不经过前处理直接注入液相色谱柱,使药物达到分离,从而为临床治疗药物监测、药物分析、药代动力学研究提供快速、准确、简捷的分析方法。我们合成了一种混合功能团浸透限制固定相,并进行了有关柱性能的测试。

材 料 和 方 法

药品及试剂 合成固定相所用试剂为高纯空白硅胶(Sigma, 粒径 5 μm , 孔径 60 \AA , 比表面积 500 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$); 苯基三氯硅烷(东京化城); γ -缩水甘油丙氧基三甲氧基硅烷(哈尔滨化工研究所)。分析所用标准品为空白人血清标准液、卡马西平血清标准液、苯妥因血清标准液、茶碱血清标准液,均来自 TDX 试剂盒(美国,

Abbott); 卡马西平、苯妥因、茶碱对照品(中国药品生物制品检定所), 头孢唑林钠标准品(哈尔滨制药厂), 头孢唑肟钠标准品(重庆西南药业股份有限公司), 各种标准品根据需要配成不同浓度的血清或甲醇标准液, 置 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏, 血样供试品进样前需过 0.45 μm 滤膜(浙江黄岩)。色谱用水为二次重蒸馏并经 G6 漏斗过滤, 乙腈为色谱纯(山东禹王), 其他试剂均为分析纯。

仪器 LC-6A 系列高效液相色谱仪, 配 SPD-6AV 紫外检测器, C-R3A 数据处理仪和 7152 型手动进样器(日本岛津)。色谱柱, RAS 填料在四氯化碳匀浆后由甲醇作顶替液装入 150 $\text{mm}\times 4\text{ mm}$ 不锈钢柱(由中国科学院兰州化物所色谱室填充)。流动相, 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 + 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ K_2HPO_4 溶液(pH 6.9)与不同的乙腈配比。温度为室温。Vario EL 元素分析仪(法国产)。

浸透限制固定相填料的合成 参照文献方法^[3,4], 并加以改进, 有关内容将另文发表。硅胶在活化干燥等处理后, 在无水条件下键合上疏水基—苯基三氯硅烷, 在有水条件下再键合上亲水基— γ -缩水甘油丙氧基三甲氧基硅烷, 再经洗涤、干燥等步骤。

血清首次进样蛋白回收率 注入 20 μl TDX 标准空白血清于 150 $\text{mm}\times 4\text{ mm}$ RAS 柱中, 流动相为 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH

6.9)一乙腈(100:15),流速为 0.8 ml·min⁻¹,进样后即刻用 5 ml 量瓶收集流出液至刻度;另取 20 μl 标准空白血清加入 5 ml 量瓶中,流动相稀释至刻度作标准对比;分别于 280 nm 处测定紫外吸收度,计算蛋白回收率。

结果与讨论

1 元素分析、柱效、蛋白回收率

共合成了 3 批 RAS 填料,在键合上疏水基

和再键合上亲水基后,分别用元素分析仪测定碳元素的含量,并计算出疏水基团和亲水基团的表面覆盖量,以反映疏水和亲水基团的键合程度。蛋白质回收率实验如前所述,目的是了解柱首次进样对蛋白质的吸附程度,第 2 次进样的蛋白质回收率几乎都是 100%。柱效测定条件是流动相 25 mmol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(pH 6.9)一乙腈(100:20),流速为 0.8 ml·min⁻¹,进样卡马西平甲醇标准液(10 μg·ml⁻¹) 20 μl,波长 254 nm。数据见表 1。

Tab 1 Carbon content, surface coverages, recovery of proteins and column efficiency of restricted access stationary phase (RAS)

No.	Carbon content (%)			Surface coverage (μmol·m ⁻²)		Recovery of protein (%)	Column efficiency (plate·m ⁻¹)
	Hydrophobic group	Hydrophobic + Hydrophilic group	Hydrophilic group	Hydrophobic group	Hydrophilic group		
I	8.01	15.78		2.77	2.59	95	8000
II	9.71	11.19		3.53	0.42	30	12000
III	7.68	13.64		2.62	1.84	80	14000

I, II and III represent No. 1, 2 and 3 of RAS packing materials, respectively.

合成的 3 批填料条件完全相同,只是疏水基团和亲水基团的加入量不同。填料 I 与 II 及 III 相比,柱效有所下降,主要是亲水基团表面覆盖量比较大,使本应由疏水基团来分离药物,但此时亲水基团也起了作用,色谱峰拖尾。填料 II 则首次进样的蛋白质回收率低,从表面覆盖量看出,填料 I 表面覆盖大量的亲水基团,封住了疏水基,使大分子蛋白质顺利流过,因此首次进样蛋白质回收率高;而填料 II 表面主要是疏水基团吸附蛋白质,致使首次进样蛋白质回收率低。文献报道^[5]键合过多的亲水基团和疏水基团,前者改变了分离性质,后者不适合于体液直接进样,都影响孔径,降低柱效和分离度。另外,原料硅胶质量的优劣直接影响柱效,装柱技术和进样技术也影响柱效和蛋白回收率的结果。

2 含有药物的血清直接进样分析

选用 RAS 填料 III 装成 150 mm×4 mm 柱,分别进样治疗水平血浓度的抗癫痫类药、头孢菌素类药、平喘类药,色谱图见图 1~3。

从色谱图可看出,血清中的蛋白质都从死体积中首先被排出,然后药物被洗脱出,这些药物的分离遵循反相色谱的分离原理,即极性大的先出峰,流动相中的有机溶剂增加,药物的保留时间减少。苯妥因和卡马西平分离比较满意;水溶性药物头孢唑林钠和头孢唑肟钠分离不及前者,但考虑如用常规的碳十八柱分析水溶性药物前处理的去蛋白质相当困难^[6],这也是一种行之有效的方法。

3 分析血药样品的回收率、重现性及耐用性

分别测定每一药物同浓度的血清样品和流动相溶解样品,通过面积比计算回收率,并算出相对标准偏差,结果见表 2。

Tab 2 Recovery of drugs in serum and reproducibility of analysis (n = 3)

Drug	Concentration (μg·ml ⁻¹)	Recovery (%)	RSD (%)
Carbamazepine	10	100.6	0.71
Phenytoin	20	98.1	0.83
Theophylline	15	97.9	0.22

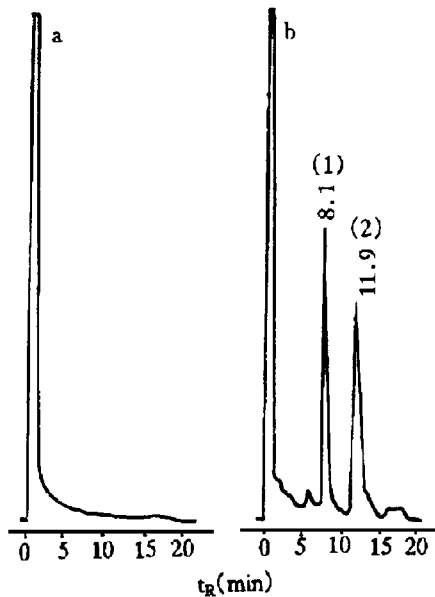


Fig 1 Chromatograms of (a) blank human serum, (b) human serum spiked with (1) carbamazepine ($10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) and (2) phenytoin ($20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) on restricted access stationary phase (RAS) packing materials. HPLC conditions: column size $150 \text{ mm} \times 4 \text{ mm ID}$; Mobile phase: $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ phosphate buffer (pH 6.9)—acetonitrile ($100:20, v/v$); Flow rate: $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; Detection: 254 nm ; Injection volume: $20 \mu\text{l}$.

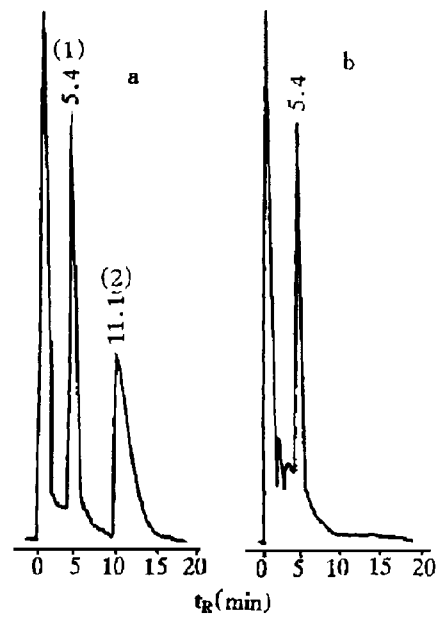


Fig 2 Chromatograms of (a) human serum spiked with (1) theophylline ($15 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) and (2) caffeine ($20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) and (b) human plasma from a patient after oral administration of theophylline on RAS packing materials. HPLC conditions: column size $150 \text{ mm} \times 4 \text{ mm ID}$; Mobile phase: $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ phosphate buffer (pH 6.9)—acetonitrile ($100:4, v/v$); Flow rate: $0.6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; Detection: 254 nm ; Injection volume: $20 \mu\text{l}$.

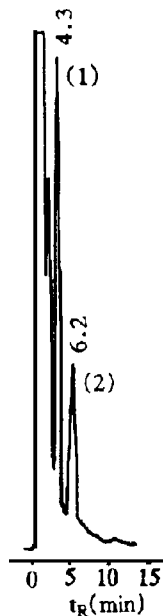


Fig 3 Chromatograms of human serum spiked with (1) ceftizoxime ($40 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) and (2) cefazolin ($40 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) on RAS packing materials. HPLC conditions: column size $150 \text{ mm} \times 4 \text{ mm ID}$; Mobile phase: $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ phosphate buffer (pH 6.9)—acetonitrile ($100:0.5, v/v$); Flow rate: $0.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; Detection: 254 nm ; Injection volume: $20 \mu\text{l}$.

以上结果说明重复测定有良好的重现性,且每个药物的回收率接近 100%。回收率低于 100% 的原因可能是药物与血清蛋白结合及与有机溶剂作用的结果^[7],如果以血清药物标准品作对比测定血清药物样品,回收率几乎是 100%。

RAS 柱首次用卡马西平标准液测得的柱效为 $14300 \pm 500 \text{ plate} \cdot \text{m}^{-1}$,经过 400 次血清进样(合计约 8 ml 血清),柱效为 $12900 \pm 700 \text{ plate} \cdot \text{m}^{-1}$,柱效基本保持稳定。在血清进样 200 多次后压力上升约 $50 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$,但经过酸性流动相冲洗柱及超声波清洗柱头,压力又恢复到原来水平。文献报道^[4]如果通过安装预柱及血清样品进样前经过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤能降低柱压上升。

总之,浸透限制固定相的合成和应用在我国刚开始,相信随着新一代 RAS 的合成,它的柱性能将进一步提高,临床分析应用将更加扩展。

致谢 兰州大学应用有机国家重点实验室田暄教

授给予指导和帮助。

参 考 文 献

- 1 马骏, 谢景文, 贾正平. 浸透限制固定相及其应用. 色谱, 1997, **15**:33
- 2 Anderson DJ. High-performance liquid chromatography (direct injection techniques). *Anal Chem*, 1993, **65**:434R
- 3 Haginaka J, Wakai J, Yasuda H. Synthesis of mixed-functional-phase silica supports for liquid chromatography and their applications to assays of drugs in serum. *J Chromatogr*, 1990, **535**:163
- 4 朱彭龄, 云白厚, 谢光华主编. 现代液相色谱. 兰州大学出版社, 1988:73~272
- 5 Pinkerton TC. High-performance liquid chromatography packing materials for the analysis of small molecules in biological matrices by direct injection. *J Chromatogr*, 1991, **544**:13
- 6 Ohshima T, Johno I, Hasegawa T, *et al.* Determination of cefpiramide in plasma by high-performance liquid chromatography with internal surface reversed-phase silica column. *J Liq Chromatogr*, 1988, **11**:3457
- 7 Pinkerton TC, Miller TD, Janis LJ. Effect of protein binding on the high-performance liquid chromatography of phenytoin and imirestat in human serum by direct injection onto internal surface reversedphase columns. *Anal Chem*, 1989, **61**:1171

SYNTHESIS AND EVALUATION OF RESTRICTED ACCESS STATIONARY PHASES

Ma Jun(Ma J), Xie Jingwen(Xie JW), Sun Weiseng(Sun WS) and Jia Zhengping(Jia ZP)

(Department of Pharmacy, General Hospital of Lanzhou Command of PLA, Lanzhou 730050)

ABSTRACT The restricted access stationary phase (RAS) are a new type of chromatographic packing material having a hydrophobic interior covered with a hydrophilic barrier. The RAS is used for direct injection in high-performance liquid chromatography for determination of drugs in biological fluids. These stationary phases include internal surface reverse phase, semipermeable surface, shielded hydrophobic phase and mixed functional phase (MFP). A kind of MFP packing material was synthesized from a porous silica gel-introduction of hydrophobic phenyl phase and introduction of hydrophilic diol phase. The MFP of RAS, on which proteins were eluted in the void volume, while the drugs were retained and separated, can be used for direct injection analysis of hydrophilic and hydrophobic drugs in serum and plasma. The recovery of the drugs in human serum was almost 100% with good reproducibility.

KEY WORDS HPLC; Restricted access stationary phases; Drug analysis in biological fluids