

# 毛细管电泳分离-激光诱导荧光 检测血清中的巴氯芬<sup>①</sup>

曹丽伟<sup>②</sup> 胡杨

(暨南大学化学系 广州市黄埔大道西路 601 号 510632)

**摘要** 首次将新合成的柱前衍生试剂 6-氧-(*N*-琥珀酰亚胺乙酸酯)-9-(2'-甲氧羰基)荧光素 (SAMF) 用于巴氯芬 (Baclofen) 的衍生标记, 并采用毛细管电泳分离-激光诱导荧光 (CE-LIF) 法分离检测衍生物。研究表明, 在磷酸盐缓冲溶液 (pH=7.5) 介质中, 30℃ 下 10min 即可完成衍生反应。反应物在 pH 5.6, 35mmol·L<sup>-1</sup> 的磷酸盐缓冲溶液中 12min 内达到分离, 检出限为 6×10<sup>-10</sup>mol·L<sup>-1</sup>。本法用于血清中巴氯芬的分析测定, 回收率为 95.8%—101.0%。

**关键词** 巴氯芬; 毛细管电泳分离-激光诱导荧光法; 6-氧-(*N*-琥珀酰亚胺乙酸酯)-9-(2'-甲氧羰基)荧光素; 衍生

中图分类号: R917; O657.8

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2011)04-1659-04

## 1 引言

巴氯芬作为骨骼肌松弛药用于临床, 还具有镇咳、抗癫痫等作用, 其化学结构类似于  $\gamma$ -氨基丁酸。至今测定生物流体中巴氯芬的文献仍然较少。因此, 研究新的测定巴氯芬的有效的分析方法具有重要的意义。

目前检测巴氯芬的方法主要有气相色谱法<sup>[1]</sup>、高效液相色谱法<sup>[2]</sup>、毛细管电泳法<sup>[3]</sup>等。其中毛细管电泳-激光诱导荧光法是一种高效、快速、灵敏、仪器简单、耗费样品量少, 操作成本低的分离检测方法。

由于巴氯芬本身不发荧光, 且仅在  $\lambda=220\text{nm}$  处有紫外吸收, 采用直接检测的分析方法不能得到较高的灵敏度。目前, 已报道用于巴氯芬的衍生试剂主要有 2, 3, 4, 6-乙酰基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基异硫氰酸酯 (GITC)<sup>[2]</sup>, 2, 3-萘基二缩醛 (NDA)<sup>[4]</sup> 等。然而, GITC 的衍生产物没有荧光, 须用紫外-可见检测, 灵敏度不高。NDA 是标记胺类化合物的最常用的荧光衍生试剂之一。它与胺类化合物反应温和, 衍生产物稳定, 灵敏度较高, 然而该试剂须在氰离子的存在下与一级胺反应, 具有较强的生物毒性。因此, 选择性能优良的荧光衍生试剂用于巴氯芬的分析测定具有重要的意义。

6-氧-(*N*-琥珀酰亚胺乙酸酯)-9-(2'-甲氧羰基)荧光素 (SAMF, 图 1) 是本实验室合成的一种新型的性能优良的荧光衍生试剂。它具有衍生反应迅速、光稳定性好、荧光强度受 pH 值影响较小等优点, 已成功用于脂肪胺<sup>[5]</sup>等胺类化合物的研究。鉴于 SAMF 优良的衍生和色谱性能, 本研究将它应用于巴氯芬的分析测定。

① 中央高校基本科研业务费专项资金资助(11609702)

② 联系人, 电话: (020) 85220223; 传真: (020) 85221697; E-mail: lwcao@126.com

作者简介: 曹丽伟 (1976—), 女, 湖南省衡东县人, 副教授, 博士, 主要从事生物分子探针的合成与标记研究工作。

收稿日期: 2010-08-03; 接受日期: 2010-08-26

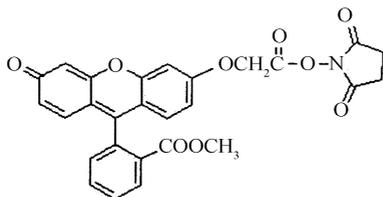


图 1 SAMF 的化学结构式

## 2 实验部分

### 2.1 仪器及试剂

毛细管电泳仪由实验室自组装,由高压电源(0—30kV,天津市东文高压电源厂)和蓝光半导体激光器(中国科学院大连物理研究所)组成;波长为 473nm 的 LD-DPSS 激光器(10mW,长春新科技术有限公司);50cm 石英毛细管(40cm × 75 $\mu$ m, ID, 河北永年光纤厂)。新毛细管分别用水、1mol · L<sup>-1</sup> NaOH、水、1mol · L<sup>-1</sup> HCl、水各活化 30min。每天开始分离前,毛细管用水、0.1mol · L<sup>-1</sup> NaOH、水、电泳缓冲溶液淋洗。

巴氯芬(厦门市台迈化工有限公司);加巴喷丁(北京百灵威化学试剂公司);SAMF 由本实验室合成,用无水乙腈配成 1 × 10<sup>-4</sup> mol · L<sup>-1</sup> 溶液备用;实验所用试剂均为分析纯(上海化学试剂有限公司)。实验用水为四次蒸馏水。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 衍生过程

在 1.5mL 塑料离心管中依次加入一定量的巴氯芬、加巴喷丁、缓冲溶液混合均匀,再加入 SAMF 溶液,加水稀释至 1.5mL,衍生数分钟后,用 0.45 $\mu$ m 的滤膜过滤后进行毛细管电泳分离。

#### 2.2.2 血清样品衍生过程

血液取自志愿者。取一定量血液,离心除去血细胞取上清液,加入乙腈离心去蛋白,过滤后备用。取一定量的处理好的血清于 1.5mL 塑料离心管中,依次加入巴氯芬、内标、缓冲溶液,再加入一定量的 SAMF 乙腈溶液,用水稀释至 1.5mL,衍生数分钟后,过滤进行毛细管电泳分离。

#### 2.2.3 电泳条件

在常温下,以 35mmol · L<sup>-1</sup> (pH= 5.6) 磷酸盐为电泳缓冲液,在 10kV 恒压下进行电泳分析。激发波长为 473nm,进样方式为流体进样,毛细管的进样口与流出口之间的高度差为 5cm,进样时间为 20s。

## 3 结果与讨论

### 3.1 内标物的选择

加巴喷丁(Gabapentin)也是一种结构类似于  $\gamma$ -氨基丁酸的药物。它与巴氯芬有着相似的物理与化学性质,在电泳中迁移时间与巴氯芬相近,因此选择加巴喷丁作为内标物。

### 3.2 衍生条件的优化

#### 3.2.1 SAMF 浓度的影响

SAMF 的衍生反应通常在水相中进行,由于试剂的水解和衍生是一对竞争反应,为了保证反应的重现性和衍生转化率,过量试剂的使用是非常必要的。本实验研究了衍生试剂浓度在

$3 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时对衍生峰面积的影响(见图 2A), 结果表明巴氯芬衍生物的峰面积在衍生试剂浓度为  $8 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时达到最大且稳定。故选用  $8 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  为 SAMF 最佳浓度。

### 3.2.2 缓冲溶液的影响

N-羟基琥珀酰亚胺活性酯与胺类化合物的衍生反应一般都在弱碱性环境下进行。研究了 pH 6.5—10 的磷酸盐缓冲溶液和硼砂缓冲溶液对巴氯芬衍生物峰面积的影响(如图 2B 所示)。结果表明, 在 pH 为 7.5 的衍生物峰面积达到最大且稳定。因此, 本实验选择衍生反应的 pH 为 7.5。

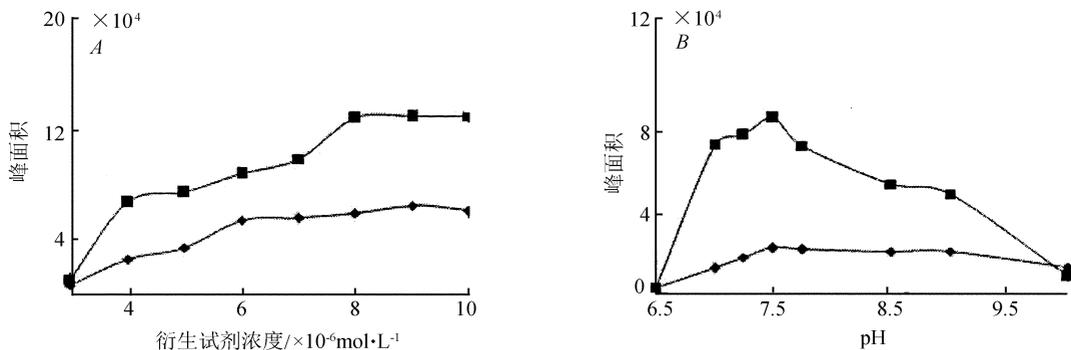


图 2 衍生试剂浓度(图 A)与衍生缓冲溶液 pH(图 B)对衍生峰面积的影响

◆ —— 加巴喷丁衍生峰; ■ —— 巴氯芬衍生峰。

### 3.2.3 衍生温度和时间的的影响

研究了 10—40℃ 温度对衍生反应的影响。实验表明, 温度为 30℃ 时的所得的巴氯芬衍生物的峰面积最大。因此选用 30℃ 作为衍生反应温度。在 30℃ 下, 研究了 3—30min 范围内衍生反应时间对巴氯芬衍生物的峰面积的影响。结果表明, 巴氯芬衍生物峰面积在 10min 时达到最大, 继续延长反应时间, 其峰面积都无太大改变。本实验选择衍生时间为 10min。

### 3.3 电泳分离条件的优化

实验了 pH 值在 5—7 的范围内毛细管电泳背景电解质对分离的影响。淌度是电泳分离的一个重要参数, 电流淌度是单位场强下离子的平均电泳速度。实验表明淌度随着 pH 值的升高而升高, 当 pH 为 5.75 时, 内标物与巴氯芬的衍生峰分离效果较差, 当 pH 继续升高时, 2 个峰合二为一。最后选定 5.6 作为背景电解质的 pH 值。

进一步研究了电泳缓冲溶液浓度对分离的影响。最终选用  $35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  作为背景电解质的浓度。

### 3.4 标准电泳图、线性回归分析和检出限

标准电泳图(图 3)在最佳衍生和分离条件下获得, 反应产物在 12min 内达到完全分离。线性范围为  $4 - 400 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 线性回归方程为  $A = 0.008 \times 10^9 C + 0.0408$ , 其中  $C$  是巴氯芬的浓度, 而  $A$  是巴氯芬衍生峰和内标衍生峰面积的比值, 相关系数  $r = 0.9978$ 。通过 5 次连续分析得出峰面积和

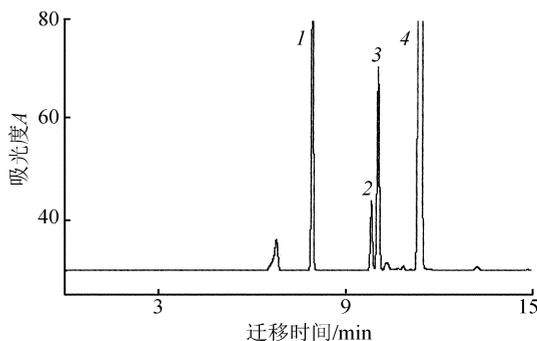


图 3 标准电泳图

1——未知峰; 2——内标物衍生峰;  
3——巴氯芬衍生峰; 4——SAMF 的水解峰。

迁移时间的 RSD 分别是 3.60% 和 2.30%, 检出限为  $6 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 3.5 分析应用

将该方法应用于血清中巴氯芬的测定, 分析结果见表 1。回收率在 95.8%—101.0% 之间, RSD 在 0.7%—3.4% 之间。实验证明, 该方法可适用于血浆中巴氯芬的分析检测。

表 1 血清样品分析结果

检测方法	原含量 ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	加入的量 ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	总量 ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	回收率 (%)	RSD(% , n= 5)	
					峰面积	迁移时间
		0	0		0	0
CE-LIF	0	$1.00 \times 10^{-7}$	$1.01 \times 10^{-7}$	101.0	3.4	0.7
		$5.00 \times 10^{-8}$	$4.79 \times 10^{-8}$	95.8	3.1	3.4

## 4 结论

6-氧-(N-琥珀酰亚胺乙酸酯)-9-(2'-甲氧羰基) 荧光素是本实验室合成的具有优良性能的标记试剂。本文首次采用 SAMF 衍生巴氯芬, 加巴喷丁作内标, 用 CE-LIF 法分析测定巴氯芬衍生物。30℃ 下 10min 完成反应, 衍生物在 12min 内分离, 检测限为  $6 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该法成功应用于血清中巴氯芬的测定, 具有高效、快速、灵敏、仪器简单、耗费样品量少, 操作成本低的特点。

## 参考文献

- [1] Sioufi A, Kaiser G, Leroux F *et al.* Determination of the S(+)- and R(-)-Enantiomers of Baclofen in Plasma and Urine by Gas Chromatography Using a Chiral Fused-Silica Capillary Column and an Electron-Capture Detector[J]. *Journal of Chromatography A*, 1988, **450**(2): 221—232.
- [2] 张春艳, 袁牧, 黄碧云等. 柱前衍生化 RP-HPLC 分离巴氯芬的对映异构体[J]. 华西药学杂志, 2008, **23**(3): 342—343.
- [3] Gu Y S, Whang C W. Capillary Electrophoresis of Baclofen with Argon-Ion Laser-Induced Fluorescence Detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2002, **972**(2): 289—293.
- [4] Chiang M T, Chang S Y, Whang C W. Analysis of Baclofen by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, **877**(1—2): 233—237.
- [5] Cao L W, Wang H, Zhang H S. Analytical Potential of 6-Oxy-(N-Succinimidyl Acetate)-9-(2'-Methoxycarbonyl) Fluorescein for the Determination of Amino Compounds by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection [J]. *Electrophoresis*, 2005, **972**(10): 1954—1962.

## Detection of Baclofen in Serum by Capillary Electrophoresis-Laser Induced Fluorescence Method

CAO Li-Wei HU Yang

(Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632, P. R. China)

**Abstract** A sensitive and efficient analytical method for separation and detection of baclofen in human serum by capillary electrophoresis coupled laser induced fluorescence (CE-LIF) method was established, 6-oxy-(N-succinimidylacetate)-9-(2'-methoxycarbonyl) fluorescein (SAMF), a new synthesized precolumn derivatization reagent, that was used as mark of derivatization for baclofen. The derivative reaction was completed in phosphate buffer (pH 7.5) at 30℃ for 10min. Optimal separation and detection were obtained in phosphate buffer (pH 5.6) of  $35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  for 12min and limit of detection of  $6 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . The sensitive method was used to the determination of baclofen in serum samples, and recovery was from 95.8% to 101.0%.

**Key words** Baclofen; Capillary Electrophoresis-Laser Induced Fluorescence Method; 6-Oxy-(N-Succinimidylacetate)-9-(2'-Methoxycarbonyl) Fluorescein; Derivatization