

文章编号: 1006-6144(2009)03-0313-04

# 使用限进介质色谱柱的柱切换高效液相色谱法 直接进样测定大鼠血浆中舒必利

邓文华<sup>1</sup>, 高建平<sup>2</sup>, 许旭<sup>3</sup>, 李通化<sup>\*1</sup>

(1. 同济大学理学院化学系, 上海 200092; 2. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203;  
3. 中国科学院上海有机化学研究所, 上海 200032)

**摘要:**提出一种直接进样测定大鼠血浆中舒必利浓度的高效液相色谱方法, 使用限进介质色谱柱作为预柱在线去除血浆蛋白后, 将舒必利通过柱切换转移到分析柱中进行分析。限进介质色谱柱为 CAPCELL PAK MF SCX 阳离子交换柱(20 ×4.0 mm i. d., 5 μm), 分析柱为 Kromasil C18 柱(150 ×4.6 mm i. d., 5 μm), 限进介质柱预分离时流动相为 pH = 6.88 的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液-乙腈(100:5, V/V), 切换后分析流动相为 pH = 6.83 的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液-乙腈(100:10, V/V)。流速均为 1 mL/min, 检测波长为 240 nm。该方法检出限为 17 ng/mL, 定量限为 50 ng/mL。舒必利在 50 ~ 1400 ng/mL 之间线性良好( $r = 0.9997$ ), 高中低浓度的日内、日间相对标准偏差分别为 1.5% ~ 4.2% 及 2.0% ~ 5.2%, 方法回收率为 98.8% ~ 104.1%。

**关键词:**柱切换; 限进介质色谱柱; 血浆; 舒必利

**中图分类号:** O657.7<sup>+</sup>2      **文献标识码:** A

舒必利(Sulpiride)属苯甲酰胺类药物, 是特异性多巴胺 D<sub>2</sub> 受体拮抗剂, 临床主要用于精神分裂症的系统治疗, 顽固性恶心、呕吐的对症治疗, 也可用于治疗胃及十二指肠溃疡、眩晕、偏头痛等。测定体液中舒必利的方法有荧光分光光度法<sup>[1]</sup>、气相色谱法<sup>[2,3]</sup>、高效液相色谱紫外检测法<sup>[4-7]</sup>和高效液相色谱荧光检测法<sup>[8,9]</sup>。荧光法由于灵敏度及专一性的原因在临床上使用不多, 使用气相色谱检测舒必利时需要衍生化。高效液相高效法虽然使用较多, 但通常需要大量的体液样品及费时的样品预处理。

限进介质(Restricted-access Media)色谱柱最早于 1985 年由 Helene Hagestam 和 Pinkerton<sup>[10]</sup>制成, Desilets 等人<sup>[11]</sup>在 1991 年第一次提出限进介质柱的概念。限进介质填料是在硅胶表面键合一层亲水层, 亲水层允许小分子物质如药物自由出入, 同时小分子物质能与固定相的疏水层相互作用, 而大分子物质如蛋白质不能渗透进入, 从而防止大分子物质如蛋白质与固定相中疏水基团相互作用, 而小分子物质获得保留。因此该柱适合直接进样分析体液样品中小分子物质(如药物)<sup>[12-14]</sup>, 而不会引起体液蛋白在色谱柱上沉淀或不可逆吸附而造成色谱柱柱压升高及毁坏。近来有些综述对限进介质色谱柱做了很好描述及说明<sup>[15,16]</sup>。为了方便快速的测定血浆中舒必利的浓度, 本文使用混合相键合型<sup>[15]</sup>阳离子交换限进介质色谱柱(Shiseido Capcell Pak MF SCX)作为预柱通过柱切换法直接进样分析加标血浆样品, 从而使得血浆样品不需经过繁琐、费时的样品预处理而能直接上柱。该方法有很好的准确度、精密度及回收率。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

800 型离心沉淀器(上海手术器械厂), pH S-3CT 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂), sartorius M2p 型

收稿日期: 2008-04-29      修回日期: 2008-10-20

\* 通讯联系人: 李通化, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为化学信息学和生物信息学。

分析天平(德国)。

乙腈(国产色谱纯,上海星狮生物工程有限公司),蒸馏水为屈臣氏蒸馏水,磷酸盐(磷酸氢二钠和磷酸二氢钠均为国产分析纯)。流动相在使用前都经 0.46 μm 滤膜过滤。

舒必利样品由上海玉安药业有限公司提供。

### 1.2 溶液的制备和血浆的处理

准确称取 10.0 mg 舒必利置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解得到 1 mg/mL 标准溶液,置于冰箱中保存,临用前用甲醇配制成各浓度的工作溶液。实验用的空白血浆取自 SD 大鼠(清洁级,由上海中医药大学提供),血浆置于冰箱中保存。使用时空白血浆在室温下融化后再离心(1834 ×g 5 min)。加标血浆样品是取空白血浆 180 μL,加入 20 μL 舒必利工作液,置于混匀器上混匀。

### 1.3 柱切换 HPLC 系统

双柱的柱切换 HPLC 系统由两个 Waters 510 泵,Waters 486 紫外检测器,0.22 μm 在线过滤器(北京迪马有限公司),带 20 μL 定量环的 Rheodyne 7725 进样阀和 7000 十通阀(Rheodyne,美国)构成,结构如图 1 所示。色谱信号由 HS2000 软件控制(杭州英谱科学技术有限公司)。

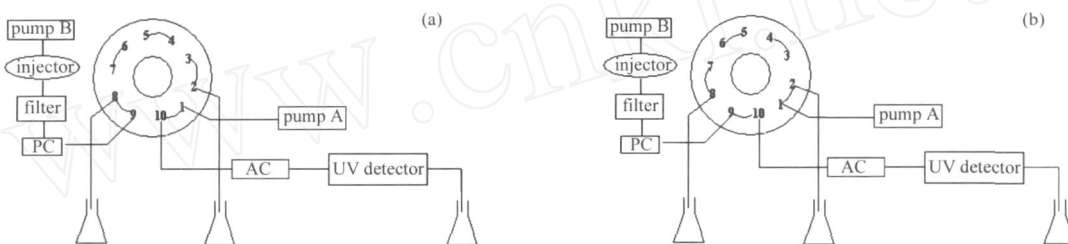


图 1 柱切换的 HPLC 系统示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the column-switching HPLC system

(a) valve position A and (b) valve position B. Surplus orifices 3-7 were sealed. PC: precolumn, AC: analytical column.

### 1.4 色谱分析条件及过程

以 Shiseido Capcell Pak MF SCX 柱 (20 ×4.6 mm i. d., 5 μm) 作为预柱,将目标化合物舒必利与血浆蛋白分离。然后通过柱切换将舒必利转移到分析柱 Kromasil C18 (150 ×4.6 mm i. d., 5 μm) 上。检测波长 240 nm,流动相 A 为 pH = 6.83 的 0.05 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>CN(100:10,V/V),流动相 B 为 0.05 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>CN(100:5,V/V),流速均为 1.0 mL/min。

每次开始分析时阀都处于 A 位置(图 1a),两根色谱柱均用各自的流动相平衡。20 μL 血浆样品被直接注入预柱中以流动相 B 分离,去除蛋白及其它强亲水内源杂质。在 14.5 min 时将阀切换到 B 位置,血浆中的药物分子在流动相 B 的作用下逐渐被转移到分析柱中。在 22 min 时将阀切换回 A 位置,以流动相 A 进行分离,同时预柱用流动相 B 进行平衡以便下一次进样。一次运行的总时间大约为 35 min。典型的空白血浆和加标血浆色谱图见图 2。

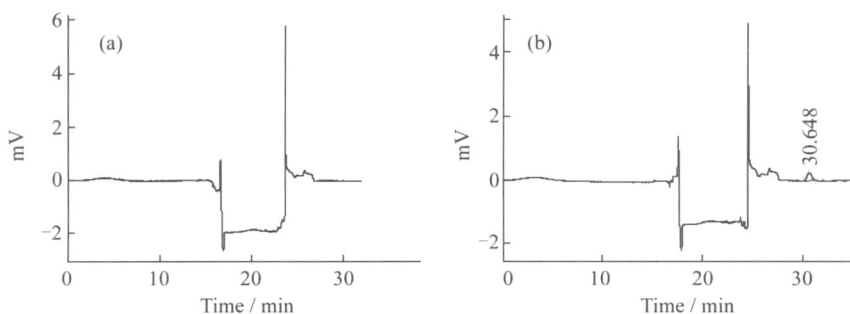


图 2 空白血浆(a)及加标血浆(b)色谱图

Fig. 2 Representative chromatograms of blank plasma(a) and spiked plasma with sulpiride(b)

### 1.5 切换时间的确定

在确定柱切换时间时,将限进介质柱直接与检测器相连,取舒必利标准液上柱,观察舒必利的出峰时间,然后确定柱切换时间。多次进样后,B 泵柱压会有所升高,因此在每天开始实验前,将过滤器中滤芯超声清洗可以防止泵压过高。由于限进介质色谱柱在分析一定数量血浆样品后,柱效会有所变化,为了确保每天实验正常运行,每天实验前重新确定切换时间是很有必要。

## 2 结果与讨论

### 2.1 检出限和定量限

在选定的色谱条件下,按信噪比等于 3 测定检出限,结果表明:浓度为 17 ng/mL,进样量为 20 μL 时,舒必利峰信号与噪音比  $S/N = 3$ ,即检出限为 17 ng/mL。按信噪比为 10 测定定量限,浓度为 50 ng/mL,进样量为 20 μL 时,舒必利峰信噪比为 10 倍,即定量限为 50 ng/mL。

### 2.2 线性范围

按 1.2 中的方法配制 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.4 μg/mL 的加标血浆样品。取 20 μL 进样,测定峰面积,以峰面积  $Y$  对浓度  $X$  (μg/mL) 进行线性回归,得方程  $y = 39.026x - 258.98$  ( $r = 0.9997$ ),结果表明:浓度在 0.05 ~ 1.4 μg/mL 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

### 2.3 精密度实验及回收率测定

按 1.2 中的方法配制高、中、低 3 种浓度的舒必利加标血浆样品,进行色谱分析,计算样品回收率(表 1)。将同一时间处理的高、中、低 3 种浓度的样品,连续 5 次进样和连续 5 天进样,分别得日内和日间相对标准偏差(RSD)。结果见表 1。

表 1 舒必利高、中、低 3 种浓度下的回收率和精密度测定结果

| Added (ng/mL) | Found (ng/mL) | Recovery (%) | RSD (%)   |           |
|---------------|---------------|--------------|-----------|-----------|
|               |               |              | Intra-day | Inter-day |
| 80.0          | 83.3          | 104.1 %      | 2.8 %     | 3.4 %     |
| 500.0         | 506.8         | 101.4 %      | 1.5 %     | 5.2 %     |
| 1000.0        | 988.4         | 98.8 %       | 4.2 %     | 2.0 %     |

### 2.4 稳定性

按 1.2 中的方法配制 0.3 μg/mL 和 0.6 μg/mL 的加标血浆样品,然后立刻将血浆样品上柱,得到 0 h 血浆样品色谱图。随后将血浆样品置于室温下,在其后的 2、4、6、8 h 进样检测。以不同浓度(ng/mL)对时间作图,结果见图 3。从图 3 中可以看出,加标血浆样品在室温条件下可保持稳定 8 h。

### 2.5 绝对回收率的测定

按 1.2 中的方法配制 0.3 μg/mL 和 1.0 μg/mL 的加标血浆样品,进样检测,记录峰面积为  $A_1$ 。另外取浓度为 3.0 μg/mL 和 10.0 μg/mL 的工作液 100 μL,加 900 μL 甲醇稀释后进样,记录峰面积为  $A_2$ ,以  $(A_1/A_2) \times 100\%$  计算绝对回收率分别为 99.4 %、99.8 %。近 100 % 的回收率表明,舒必利不与血浆中蛋白结合或它们的结合在离子交换柱中被破坏,该结果与文献<sup>[17]</sup>提出的假设相吻合。

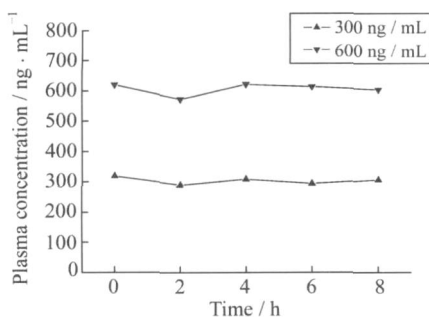


图 3 加标血浆样品的稳定性  
Fig.3 Stabilities of sulphiride in plasma

Capcell Pak MF SCX 柱是混合功能相强阳离子交换限进介质柱,它能洗脱蛋白质等大分子化合物而对小分子物质保留,本文使用混合功能相强阳离子交换限进介质柱直接进样分析大鼠血浆中碱性药物舒必利,由于不需要进行样品预处理,缩短了分析时间及血浆样品消耗,减少了样品预处理过程中由于方法及人为因素造成的误差,提高了分析的准确度及回收率。该方法可用于快速准确的分析体液中舒必利的含量。

**参考文献:**

- [1] Kleimola T, Leppänen O, Kanto J, Mäntylä R, Syvälahti E. *Annals of Clinical Research*[J], 1976, **8**:104.
- [2] Staveris S, Jung L, Jamet G, Koffel J C. *Journal of Chromatography*[J], 1985, **338**:79.
- [3] Frigerio A, Pantarotto C. *Journal of Chromatography*[J], 1977, **130**:361.
- [4] Norman Trevor R, James Robyn H, Gregory Margaret S. *Journal of chromatography*[J], 1986, **375**:197.
- [5] Bressolle F, Bres J. *Journal of Chromatography*[J], 1985, **341**:391.
- [6] Nicole Verbiese-Genard, Michel Hanocq, Leopold Molle. *Journal de Pharmacie de Belgique*. [J], 1980, **35**:24.
- [7] Bressolle, Françoise, Bres Janine, Blanchin, Marie Dominique, Gomeni, Roberto. *Journal of Pharmaceutical Sciences*[J], 1984, **73**:1128.
- [8] Alfredsson Gunnel, Sedvall Goran, Wiesel Frits-Axel. *Journal of Chromatography*[J], 1979, **164**:187.
- [9] Nicolas P, Fauvelle F, Ennachachibi A, Merdjan H and Petitjean O. *Journal of Chromatography*[J], 1986, **381**:393.
- [10] Helene Hagestam I and Pinkerton Thomas C. *Analytical Chemistry*[J], 1985, **57**:1757.
- [11] Desilets Carla P, Ann Rounds Mary and Regnier Fred E. *Journal of Chromatography*[J], 1991, **544**:25.
- [12] Oliveira Regina V, Cass Quezia B. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*[J], 2006, **54**:1180.
- [13] Belaz Káia Roberta A, Cass Quezia B, Oliveira Regina V. *Talanta*[J], 2008, **76**:146.
- [14] Jarmalavičienė, Kornysšova, Bendokas Vidmantas, Westerlund Douglas, Buszewski Boguslaw, Marusk Audrius. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*[J], 2008, **391**:2323.
- [15] Souverain S, Rudaz S, Veuthey J L. *Journal of Chromatography B*[J], 2004, **801**:141.
- [16] Sadělek Petr, Satěnský Dalibor, Solich Petr. *Trends in Analytical Chemistry*[J], 2007, **26**:375.
- [17] Čepka Vladiměf, Xu Yan. *Journal of Chromatography B*[J], 2001, **762**:181.

## Determination of Sulpiride in Rat Plasma by Column-switching High Performance Liquid Chromatography Using Restricted-access Media

DENG Wen-hua<sup>1</sup>, GAO Jian-ping<sup>2</sup>, XU Xu<sup>3</sup>, LI Tong-hua<sup>\*1</sup>

(1. *Department of Chemistry, Tongji University, Shanghai 200092;*

2. *School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203;*

3. *Shanghai Institute of Organic Chemistry, CAS, Shanghai 200032)*

**Abstract:** A simple HPLC method for the determination of sulpiride in rat plasma was developed using column-switching and ultraviolet detection. Plasma samples were injected directly into a "restricted-access media" pre-column to remove plasma protein and endogenous plasma constituents using mobile phase of 50 mmol/L phosphate sodium (pH = 6.88)-acetonitrile (100/5, V/V). The drug containing fraction were transferred to a Kromasil C18 column (150 × 4.6 mm i. d.) and separated using the mobile phase of 50 mmol/L phosphate sodium (pH = 6.83)-acetonitrile (100/10, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The calibration curve showed excellent linear relationship ( $r = 0.9997$ ) in the concentration range of 50 ~ 1400 ng/mL for sulpiride in rat plasma. The limit of detection and limit of quantitation for sulpiride in rat plasma was 17 ng/mL and 50 ng/mL, respectively. The intra-day and inter-day assay precisions of analyte were in the range of 1.5% ~ 4.2% and 2.0% ~ 5.0%, respectively. The recoveries of sulpiride ranged from 98.8% ~ 104.1%.

**Keywords:** Column-switching; Restricted access media; Plasma; Sulpiride