

# 芯片毛细管电泳激光诱导荧光快速分离检测麻黄碱类兴奋剂

苑广信 何巧红 陈恒武\* 方群 张燕冰

(浙江大学化学系,微分析系统研究所,杭州 310028)

**摘要** 研究用芯片毛细管电泳激光诱导荧光检测系统分离测定经 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) 衍生的麻黄碱和伪麻黄碱的实验条件。采用胶束毛细管电动色谱分离体系 (12 mmol/L SDS + 10 mmol/L 硼砂缓冲液, pH 9.0), 在 45 mm 长的通道上实现了麻黄碱和伪麻黄碱的快速分离, 一次分离小于 1.5 min。10 ~ 100 mg/L 范围内, 峰高与浓度呈良好的线性关系, 麻黄碱、伪麻黄碱的检出限分别是 0.83 mg/L 和 1.10 mg/L。所建立的方法应用于尿中麻黄碱和伪麻黄碱的分离测定, 取得满意的结果。

**关键词** 麻黄碱, 伪麻黄碱, 芯片毛细管电泳, 激光诱导荧光

## 1 引言

麻黄碱 (ephedrine, EP) 和伪麻黄碱 (pseudoephedrine, PEP) 是一类拟肾上腺素药, 具有松弛平滑肌、收缩血管、兴奋中枢神经等作用。在临床上常与消热解痛药一起用于治疗感冒。它们也常被滥用为竞技体育的兴奋剂, 已被国际奥委会列为违禁药物<sup>[1]</sup>。

尿样中 EP 类药物常用 GC、HPLC 等方法测定, 但是分离时间较长。毛细管电泳分离检测 EP 类药物所需时间较短, 但用 UV 检测<sup>[2,3]</sup>灵敏度较低。Chen 等<sup>[4]</sup>将流动注射在线试样预富集与毛细管电泳联用, 使联用系统对 EP 的检测限达到 12 mg/L, 成功应用于药代动力学研究。最近, Zhang 等<sup>[5]</sup>用荧光试剂 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) 柱前衍生, 毛细管电泳激光诱导荧光法测定了中药中的 EP 和 PEP, 提高了检测灵敏度。芯片毛细管电泳与常规毛细管电泳相比, 具有分析速度快、仪器易于微型化等优点, 适合现场的快速检测。本研究建立了 NBD-Cl 衍生、芯片毛细管电泳分离、激光诱导荧光检测尿液中 EP 和 PEP 的快速分析方法。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器和试剂

GY-6 型四路高压电源 (东北大学); 共聚焦式激光诱导荧光检测系统由半导体激光器 (473 nm 500 mW, 长春新产业光电有限公司)、倒置显微镜、CR14 型光电倍增管等按文献 [6] 的方法组成, 激发和检测波长分别为 480 和 520 nm。盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱标准品 (中国药品生物制品检定所), NBD-Cl 和十二烷基磺酸钠 (SDS) (Sigma-Aldrich)。用水配制 EP 和 PEP 标准溶液 (300 mg/L), 用乙腈配制 NBD-Cl 溶液。所用试剂均为分析纯。实验用水为 Milipure 系统制备的超纯去离子水。

### 2.2 实验方法

**2.2.1 芯片的制作** 十字通道玻璃芯片参照文献 [7] 的方法制备。分离通道总长 45 mm (有效长度 38 mm), 进样通道总长 10 mm, 通道顶宽 50  $\mu\text{m}$ , 深 15  $\mu\text{m}$ 。

**2.2.2 尿样预处理** 取 5 mL 尿样于 20 mL 离心管, 加入 2 mL 乙醚和 1 g 无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 振荡 5 min 后离心分离。移取上层有机相于 2 mL 离心管, 用  $\text{N}_2$  吹干, 加 100  $\mu\text{L}$  水溶解残留物。所得溶液按 2.2.3 节衍生。

**2.2.3 待测物的衍生** 移取 EP 和 PEP 混合标准溶液 (或上述溶液) 100  $\mu\text{L}$  于 2 mL 的离心管, 加入 100  $\mu\text{L}$  100 mmol/L 硼砂缓冲液 (pH 8.4), 25 mmol/L NBD-Cl 溶液 200  $\mu\text{L}$ , 用水稀释至 1 mL 后, 50  $^\circ\text{C}$  水中温浴 30 min。

**2.2.4 分离测定** 十字通道依次用 0.1 mol/L NaOH、水、运行缓冲溶液各冲洗 20、10、20 min。在芯片

2006-03-19 收稿; 2006-08-13 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 20299030) 和科技部 863 (No. 2002AA404240) 资助项目

的试样废液池、缓冲液池、缓冲液废液池中加入运行缓冲液,并使通道内充满运行缓冲液;在试样液池中加入试样溶液,使激光束聚焦于芯片分离通道下游十字交叉口 38 mm 处。按下列程序分别向 4 个储液池施加电压,进行进样和分离操作:进样 30 s,试样液池、试样废液池、缓冲液池、缓冲液池分别施加 1000、0、830、1000 V;分离 120 s,试样液池、试样废液池、缓冲液池分别施加 2170、2170、2600 和 0 V 电压。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 衍生反应及衍生物的荧光特性

参照文献 [5] 的条件,用 NBD-Cl 衍生 EP 和 PEP,并研究了该荧光试剂及其 EP、PEP 衍生物的荧光特性。发现 NBD-Cl 及其衍生物的最大激发波长均在 480 nm,最大荧光波长均在 550 nm,但同浓度的衍生物荧光强度比试剂本身的荧光大 5 倍左右。

#### 3.2 夹流电压的选择

实验考察最佳夹流进样电压。由于荧光素钠有很高的荧光量子效率,在通道中充入荧光素钠溶液后,用白光照射芯片即可在显微镜下观察通道中荧光素钠溶液的流动状况。在试样池中加入荧光素钠溶液,其它储液池中加入运行缓冲液,各储液池加上适当电压后,十字交叉口处试样(荧光素钠)带的分布情况如图 1 所示。a 图为简单的悬浮进样,荧光素钠溶液流经十字口时,向分离通道两端显著扩散。固定试样池和缓冲液废液池的电压为 1000 V、试样废液池的电压为 0 V,缓冲液池的电压从 750 V 升高到 900 V 所观察到夹流进样情况如图 1b~d 所示。当缓冲液池电压 750 V 时(图 1b),经十字交叉口的试样带变细,但是靠近缓冲液池一端通道中试样有明显泄漏;当电压升高到 830 V 时(图 1c),经十字交叉口后试样带变得更细,在十字通道口处呈近似的三角形试样带;继续升高电压到 900 V(图 1d),试样带继续压缩,并偏向缓冲废液池。将荧光素钠换成 PEP 的 NBD-Cl 衍生物,在与图 1 相同条件下进样分离,考察缓冲液池电压变化对柱效和灵敏度的影响,得到图 2。可见,随着缓冲液池电压从 750 V 升高到 900 V,柱效不断升高,峰高不断降低;当电压为 900V 时,柱效最高,但峰高较低,与图 3 相符。综合考虑峰高和柱效,选择 2.2.4 节所述的进样电压。

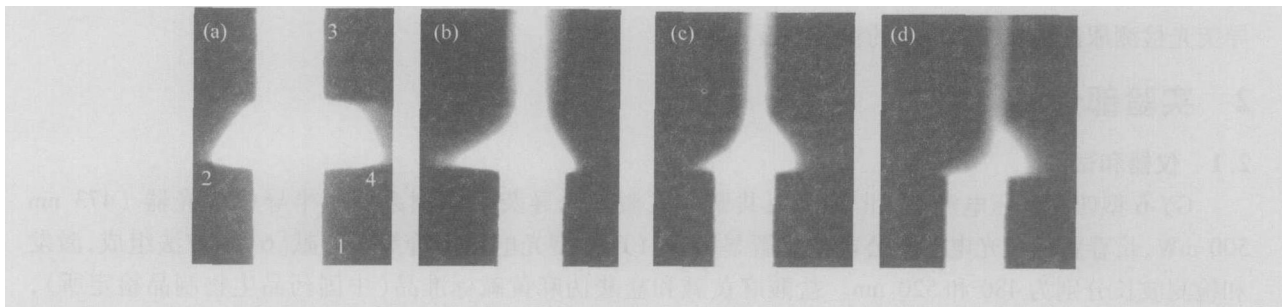


图 1 不同夹流电压下荧光素钠液流在十字交叉口附近的 CCD 图像

Fig 1 CCD images of the stream of a fluorescein solution taken at the vicinity of the channel-cross under different pinched injection voltages

指示剂(indicator):  $10^{-3}$  mol/L 荧光素钠溶液(sodium fluorescein); 缓冲溶液(buffer): 20 mmol/L  $\text{Na}_2\text{B}_7\text{O}_{13}$ 。(a)简单进样(simple injection),图中 1、2、3、4 分别表示试样池(1000 V)、缓冲液池(悬浮)、试样废液池(0 V)和缓冲废液池(悬浮)的相对方位(1, 2, 3 and 4 represent the relative positions of sample reservoir, buffer reservoir, sample waste reservoir and buffer waste reservoir); (b~d). 夹流进样(pinch injection),试样池(sample reservoir) 1000 V,试样废液池(sample waste) 0 V,缓冲废液池(buffer reservoir) 1000 V;缓冲液池(buffer reservoir) 750 V (b), 830 V (c) and 900 V (d)。

#### 3.3 SDS对分离的影响

文献 [5] 采用毛细管区带电泳,用 pH 9.9 硼砂溶液做运行缓冲液,以 47 cm 的毛细管分离了 EP、PEP 和 NBD-Cl 试剂峰和。本实验有效分离长度只有 38 mm,在 pH 9.0~10.5 范围内改变缓冲液的酸度,都不能使 PEP 和试剂峰 I 完全分离。参考 Wallenborg 等<sup>[8]</sup>采用含有 50 mmol/L SDS 运行缓冲液以芯片毛细管电动色谱分离了 7 种 NBD-Cl 衍生的安非它明类手性药物。本研究考察了 SDS 对分离

的影响,结果见图 3。当加入 7.5 mmol/L SDS 后 (SDS 的临界胶束浓度 (CMC) 为 8.75 mmol/L), 试剂峰 II 前移至试剂峰 I 后, 但与 EP 重叠; 随着 SDS 浓度 > CMC, 分离模式转变为胶束电动色谱后, 分离效果逐渐变好。当浓度为 12 mmol/L 时得到很好的分离效果。继续增加 SDS 浓度分离效果不再改善。故实验选择 SDS 浓度为 12 mmol/L。

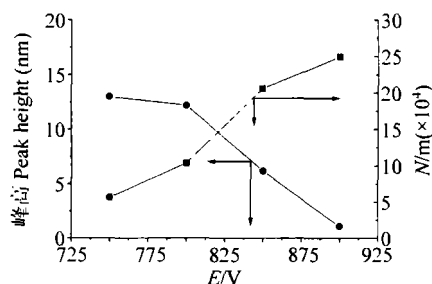


图 2 夹流电压对伪麻黄碱峰高和柱效的影响

Fig 2 Effect of pinch-injection voltages on the signals and the separation efficiency of pseudoephedrine

缓冲液 (buffer): 10 mmol/L  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  + 12 mmol/L sodium dodecyl sulfonate (SDS), pH 9.4; 伪麻黄碱 (pseudoephedrine): 14 mg/L; 进产和分离电压 (voltages for injection and separation): 试样池 (sample), 1000 V (injection), 1500 V (separation); 缓冲液池 (buffer), 750 ~ 900 V, 1800; 试样废液池 (sample waste), 0 V; 1500 V, 缓冲废液池 (buffer waste), 1000 V, 0 V。 ( ) 峰高 (peak height); ( ) 柱效 (separation efficiency)。

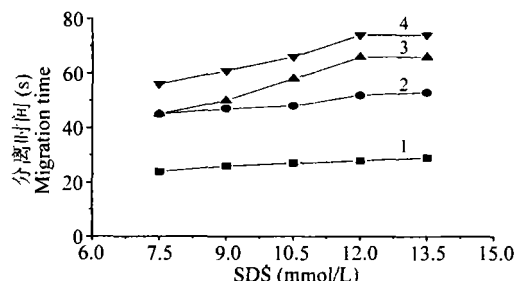


图 3 SDS 浓度对分离的影响

Fig 3 Effect of SDS concentration on the separation of ephedrines

pH = 9.0 以外, 其它条件同图 2 (except for pH 9.0 sodium tetraborate buffers containing various concentrations of SDS, other conditions were the same as described in Fig 2), 1. 试剂峰 (component I of the 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazole (NBD-Cl) reagent); 2. 试剂峰 (component II of the NBD-Cl reagent); 3. 麻黄碱 (ephedrine); 4. 伪麻黄碱 (pseudoephedrine)。

### 3.4 pH 值的选择

在 SDS 存在下, 考察了缓冲液 pH 值对分离的影响。由图 4 可见, pH 从 8.0 ~ 10.0 组分都能得到良好分离; 但在 pH 9.0 时, 保留时间最短并且柱效最高 (以 PEP 峰计), 最后选择 pH 9.0。

### 3.5 分离电压的选择

在缓冲液池所加分离电压从 900 V 逐步增大到 2600 V, NBD-Cl 试剂峰 I 和 II, EP, PEP 4 个峰均能完全分离。但随着分离电压的升高, 保留时间缩短, 柱效增加, 最后选择分离电压为 2600 V, 同时在样品池和样品废液池施加 2170 V 的“反拉电压”, 防止在分离阶段试样溶液从试样通道泄漏入分离通道。在此条件下的电泳图谱见图 5(a), 一次分离时间小于 90 s, 以 PEP 峰为代表所得的柱效为  $3.2 \times 10^5$  /m。

### 3.6 性能分析和应用

在上述优化条件下, 分离测定水溶液中 EP 和 PEP 的分析性能分别为: 检出限 (3 $\sigma$ ) 1.10 和 0.83 mg/L, 浓度为 15 mg/L 时的精密度 RSD ( $n=7$ ) 分别为 6.7% 和 7.9%; 10 ~ 100 mg/L 浓度范围内线性回归方程的相关系数为 0.9986 和 0.9988。

将所建立的方法应用于尿中 EP 和 PEP 的分离测定。取健康志愿者尿样做空白, 加入一定量的 EP 和 PEP, 按实验方法处理后, 分离得到的电泳谱图见图 5b 和图 5c。可见尿液经萃取后, 共存物质不干扰 EP 和 PEP 的分离测定。加入低、高两种浓度待测物的回收率见表 1。以 3 倍检出限作为定量下限, 以取 5 mL 尿为基础, 本法可以测得尿中 EP 和 PEP 的最低浓度为 0.66 mg/L 和 0.52 mg/L, 远低于运动员尿检阳性的标准 (EP > 10 mg/L, PEP > 25 mg/L<sup>[11]</sup>)。

表 1 尿样加标回收率测定结果

Table 1 Analytical results of the ephedrines spiked into urine samples

| 待测物<br>Analyte   | 加入 Spiked<br>(mg/L) | 测得 Found (mg/L)<br>mean $\pm$ S.D. ( $n=3$ ) | 回收率<br>Recovery (%) | 待测物<br>Analyte          | 加入 Spiked<br>(mg/L) | 测得 Found (mg/L)<br>mean $\pm$ S.D. ( $n=3$ ) | 回收率<br>Recovery (%) |
|------------------|---------------------|--|---------------------|-------------------------|---------------------|--|---------------------|
| 麻黄碱<br>Ephedrine | 6.00                | 6.06 $\pm$ 0.29                              | 101 $\pm$ 4.8       | 伪麻黄碱<br>Pseudoephedrine | 6.00                | 5.53 $\pm$ 0.11                              | 92.2 $\pm$ 1.9      |
|                  | 30.0                | 31.5 $\pm$ 1.61                              | 105 $\pm$ 5.1       |                         | 30.0                | 27.8 $\pm$ 1.78                              | 92.8 $\pm$ 6.4      |

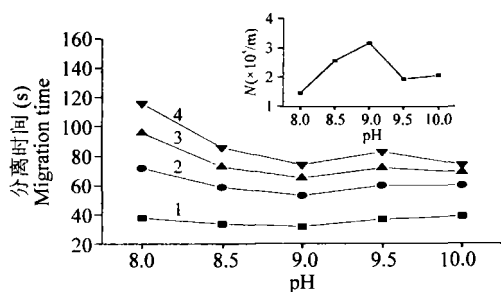


图 4 缓冲液 pH 对分离的影响

Fig 4 Effect of buffer pHs on the separation of ephedrines. 实验条件同图 2 (except for the buffer pHs, other conditions were the same as described in Fig 2). 1. 试剂峰 (component I of the NBD-Cl reagent); 2. 试剂峰 (component II of the NBD-Cl reagent); 3. 麻黄碱 (ephedrine); 4. 伪麻黄碱 (pseudoephedrine). 插图 为理论塔板数与 pH 的关系 (the insert is a diagram plotted with the number of theoretical plate against the pHs).

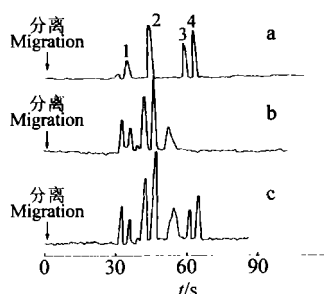


图 5 麻黄碱和伪麻黄碱的电泳分离谱图

Fig 5 The electropherograms of ephedrines

1. 试剂峰 (component I of the NBD-Cl reagent); 2. 试剂峰 (component II of the NBD-Cl reagent); 3. 麻黄碱 (ephedrine); 4. 伪麻黄碱 (pseudoephedrine). (a) 10 mg/L 标样水溶液对照样品 (a standard solution containing ephedrine and pseudoephedrine); (b) 尿空白溶液 (blank urine); (c) 加入麻黄碱和伪麻黄碱各 10 mg/L 的尿样 (a urine sample spiked with Ep and PEP, 10 mg/L for each).

## References

- 1 List of the Prohibited Classes Substances and Prohibited Methods, International Olympic Committee, Lausanne, 2001
- 2 Li G B, Zhang Z P, Chen X G, Hu Z D, Zhao Z F, Hooper M. *Talanta*, 1999, 48: 1023 ~ 1029
- 3 Mateus-Avois L, Mangin P, Saugy M. *J. Chromatogr. B*, 2003, 791: 203 ~ 216
- 4 Chen Hengwu, Fang Zhaolun. *Anal. Chim. Acta*, 1999, 394: 13 ~ 22
- 5 Zhang J Y, Xie J P, Chen X G, Hu Z D. *Analyst*, 2003, 128: 369 ~ 372
- 6 Fang Q, Xu G M, Fang Z L. *Anal. Chem.*, 2002, 74(6): 1223 ~ 1231
- 7 Yin Xuefeng (殷学峰), Shen Hong (沈宏), Fang Zhaolun (方肇伦). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2003, 31(1): 116 ~ 119
- 8 Wallenborg S R, Lurie I S, Arnold D W, Bailey C G. *Electrophoresis*, 2000, 21: 3257 ~ 3263

## Rapid Separation and Determination of Ephedrine Dopes by Chip-based Capillary Electrophoresis and Laser Induced Fluorescence Detection

Yuan Guangxin, He Qiaohong, Chen Hengwu\*, Fang Qun, Zhang Yanbing

(Institute of Microanalytical Systems, Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310028)

**Abstract** A method was developed for the determination of ephedrine (EP) and pseudoephedrine (PEP) dopes in urine with a chip-based capillary electrophoresis and laser induced fluorescence detector system (CE-LIF). The dopes were derivated with 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) to form fluorescent products. By using a separation channel of 45 mm in length, various experimental conditions for CE separation were optimized, and a separation mode of micellar capillary electrokinetic chromatography was adopted. Under the optimized conditions (12 mmol/L sodium dodecyl sulfonate (SDS) + 10 mmol/L tetraborate buffer at pH 9.0, 2600V separation voltage), EP and PEP can be base-line separated from the reagent components as well as the species existing in the urine within 1.5 min. A linear calibration curve was observed in the concentrations ranging from 10 to 100 mg/L for both EP and PEP, the limits of detection obtained were 0.83 mg/L for EP and 1.10 mg/L for PEP. Satisfactory recoveries were achieved when the developed method was used for determination of EP and PEP concentration spiked into human urine.

**Keywords** Ephedrine, pseudoephedrine, chip-based capillary electrophoresis, laser induced fluorescence

(Received 19 March 2006; accepted 13 August 2006)