

毛细管电泳-电化学发光联用测定琥乙红霉素*

谭贵良¹, 李向丽², 江迎鸿¹, 林 里³

(1. 中山火炬职业技术学院生物医药系, 广东 中山 528436;

2. 广东省中山市质量计量监督检测所, 广东 中山 528403;

3. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 基于琥乙红霉素对联吡啶钌($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)电化学发光的增强作用, 结合高效毛细管电泳分离技术, 建立了一种毛细管电泳-电化学发光联用检测琥乙红霉素的新方法。分别对分离和检测条件进行了优化。优化条件下, 琥乙红霉素的线性范围为 $0.7 \sim 10.0 \mu\text{mol/L}$, 检测限为 $0.23 \mu\text{mol/L}$, 峰高相对标准偏差RSD为4.1%。采用堆积放大进样技术可进一步提高检测灵敏度。本方法用于生物体液中琥乙红霉素的测定, 回收率为81.3%~93.0%。

关键词: 毛细管电泳; 电化学发光; 琥乙红霉素

中图分类号: O657.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579(2009)05-0082-04

Determination of Erythromycin Ethylsuccinate Using a Capillary Electrophoresis Coupled with Electrochemiluminescence Method

TAN Guiliang¹, LI Xiangli², JIANG Yinghong¹, LIN Li³

(1. Department of Biomedicine, Zhongshan Torch Technology College, Zhongshan 528436, China;

2. Zhongshan Supervision Testing Institute of Quality & Metrology, Zhongshan 528403, China;

3. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A new method was developed for detection of erythromycin ethylsuccinate (EES) using capillary electrophoresis (CE) coupled with electrochemiluminescence (ECL), based on the enhancement of ECL on EES to tris (2, 2 - bipyridyl) ruthenium (II) ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$). Some parameters affected separation and detection of EES were optimized. The results showed that the EES had a good linearity in the range of $0.7 \sim 10.0 \mu\text{mol/L}$ and low detection limit of $0.23 \mu\text{mol/L}$. The RSD was 4.1%. A sweeping stacking method was used to improve the detection sensitivity. The developed method was available for the detection of EES on plasma and urine from human body with recoveries of 81.3%~93.0%.

Key words: capillary electrophoresis; electrochemiluminescence; erythromycin ethylsuccinate

琥乙红霉素(erythromycin ethylsuccinate, EES)是琥乙红霉素属大环内酯类抗生素, 为红霉素的琥珀酸乙酯, 在胃酸中较红霉素稳定。琥乙红霉素的药理作用与红霉素相似, 可在体内水解后释放红霉素, 透过细菌细胞膜, 与细菌70S核糖体的50S亚基结合, 阻断细菌蛋白质合成, 从而产生抑

菌或杀菌作用, 已成为临床上广泛应用的一类大环内酯类抗生素。

我国药典中采用抗生素微生物检定法对琥乙红霉素进行测定^[1], 该方法测定结果准确可靠, 但条件要求严格、操作繁琐、检验周期长且专属性差, 达不到快速检验的目的。目前琥乙红霉素的检

* 收稿日期: 2009-04-20

基金项目: 国家质检总局科技计划资助项目(2008QK282); 中山市科技局科技计划资助项目(20083A280); 中山火炬职业技术学院校级重大课题资助项目(2008Y02)

作者简介: 谭贵良(1977年生), 男, 博士; 通讯作者: 李向丽; E-mail: bluecloudli@126.com

测方法还有:高效液相色谱法、高效液相色谱串联质谱法、分光光度法、电化学法、化学发光法、电化学发光法和毛细管电泳^[2-8]。其中,电化学发光法(ECL)和毛细管电泳方法(CE)以及两者的联用颇受关注。ECL是在电极表面产生的化学发光现象,结合电化学固有的灵敏度和化学发光方法的宽线性范围,ECL已经被证明是一种有力的分析工具。然而,CE与ECL的联用更是一种高效分离与高灵敏度的新方法,其运行缓冲液为无机盐,不需使用有机溶剂,因而可为复杂基质中物质的分析提供一种环境友好的方法^[9]。近年来该方法得到了较大的应用^[9-10],但目前未见CE-ECL联用检测琥乙红霉素的报道。

本研究基于琥乙红霉素对三(2,2-联吡啶)钌(II)($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)电化学发光的增强作用,建立了一种毛细管电泳分离后ECL检测的新方法。该方法可应用于人血浆和尿样中琥乙红霉素的测定。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

MPI-B型多功能化学发光检测仪(西安瑞迈分析仪器有限公司)。43 cm长(内径50 μm ,外径320 μm)的熔融石英毛细管(河北永年光学纤维厂)用于CE分离。初次使用前用0.1 mol/L氢氧化钠浸没过夜,每次实验前均用水和运行缓冲液各冲洗5 min。ECL检测采用500 μL ECL电解池和三电极体系完成,其构造如文献[11]所述。直径300 μm 的Pt圆盘电极为工作电极,铂丝作为辅助电极,Ag/AgCl(饱和KCl溶液)电极作为参比电极。每次实验前,电极必须在电位为0.2~1.3 V(对比Ag/AgCl)范围内50 mmol/L磷酸缓冲液(PBS)中经过反复的循环,直至获得可重复的循环伏安图。电化学信号由安装在电化学电解池下面的光电倍增管测量而得。光电倍增管提供700 V的电压。

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$,分析纯,购于Fluka公司。琥乙红霉素购于中国药品生物制品检定所。盐酸、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠,均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司。实验用水为二次蒸馏水。实验中所用试剂和溶液均用0.22 μm 滤膜过滤。

1.2 标准曲线

0.1~10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的琥乙红霉素标准溶液用0.1 mmol/L的盐酸稀释储备溶液制备。随后按照1.1操作获得ECL-时间曲线图。其线性通过分析物的ECL强度加权线性回归获得。检出限为3

倍信噪比对应的浓度。

1.3 生物体液处理

等分的0.1~10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的琥乙红霉素标准溶液被添加到1 mL从健康人体采得的新鲜血浆或尿样中,漩涡震荡30 s混合,接下来添加50 μL 1 mol/L NaOH溶液,再漩涡震荡30 s。随后添加5 mL乙醚,漩涡震荡1.5 min。接着,取出乙醚层置于小试管中,37 $^{\circ}\text{C}$ 在水浴上用氮气吹干。残渣最终溶解于0.1 mmol/L盐酸,并用0.22 μm 膜过滤作为测试样品。用同样的方法处理不含琥乙红霉素的血浆或尿样,测得空白值。通过比较添加琥乙红霉素样品的ECL强度和标准琥乙红霉素ECL强度获得加标回收率。

2 结果与讨论

2.1 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -琥乙红霉素的ECL

研究表明,含有叔胺基团的化合物通常可以大幅度地诱导增强 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的电化学信号^[8]。由于琥乙红霉素的分子结构中存在叔胺基团,理论上其有助于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 和琥乙红霉素之间的ECL。本实验结果证实琥乙红霉素的添加能显著增强 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的电化学发光强度。在最大氧化电极电位下,ECL强度的增加与琥乙红霉素的浓度成一定比例关系。说明用ECL的方法检测琥乙红霉素是完全可行的。

2.2 分离条件的优化

2.2.1 分离电压 研究了不同分离电压(6~20 kV)对琥乙红霉素分析物的分离效率和迁移时间的影响。结果发现,当分离电压为20 kV时,仍保持较好峰宽和峰形,且噪声小,基线稳定。故使用该20 kV作为分离电压。在此电压下,琥乙红霉素的迁移时间为250 s。

2.2.2 运行缓冲液 运行缓冲液(即磷酸缓冲液,PBS)的浓度和pH值可以显著影响分析物的ECL强度和迁移时间。通过对这两个参数进行优化发现,当运行缓冲液浓度为10 mmol/L(图1)、pH值为7.5时(图2),能够获得最大的ECL强度和最短的迁移时间。

2.2.3 进样电压和进样时间 进样电压和进样时间是影响ECL强度的重要参数。实验发现,ECL强度随着进样电压(5~15 kV)和进样时间(5~20 s)的增加而增加,但柱效却相应减小。最后综合考虑ECL强度和分离效率后选定:最佳进样电压为10 kV,进样时间为10 s。此条件下获得的ECL峰形尖锐、强度大。

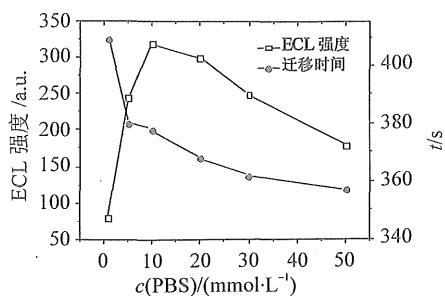


图1 不同运行缓冲液浓度对 EES 的 ECL 强度和迁移时间的影响

Fig. 1 Effect of concentration of running buffer on ECL intensity and migration time of EES

分离电压: 20 kV; 运行缓冲液: pH 7.5; 检测池溶液: 5 mmol/L Ru(bpy)₃²⁺, 50 mmol/L PBS (pH 7.0)

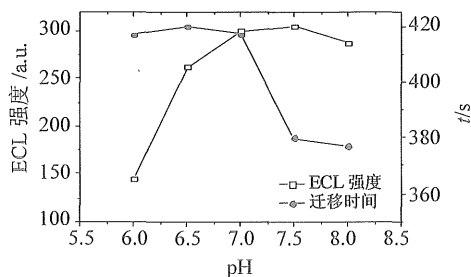


图2 运行缓冲液的 pH 值对 EES 的 ECL 强度和迁移时间的影响

Fig. 2 Effect of pH of running buffer on ECL intensity and migration time of EES

分离电压: 20 kV; 运行缓冲液为 10 mmol/L PBS; 溶液: 5 mmol/L Ru(bpy)₃²⁺, 50 mmol/L PBS (pH 7.0)

2.3 ECL 检测条件的优化

2.3.1 工作电极电位 施加在工作电极上的电位能显著影响 CE 分离后 ECL 的检测。本实验将电极电位控制在 -0.2 ~ 1.40 V 范围内做循环伏安扫描。结果发现, 在 1.2 V 时, 琥乙红霉素有最大氧化电位。因此选择 1.2 V 作为后续实验中 CE - ECL 恒电位检测的最佳电位。

2.3.2 检测池溶液 ECL 检测池中 Ru(bpy)₃²⁺ 的浓度对发光强度的影响较大 (图 3)。控制 Ru(bpy)₃²⁺ 浓度在 1 ~ 10 mmol/L 中变化, 实验发现, 当 Ru(bpy)₃²⁺ 的浓度为 5 mmol/L 时, 有最大的信噪比, 最终选定此浓度为 Ru(bpy)₃²⁺ 的最适浓度。接着还考察了 PBS 浓度在 10 ~ 100 mmol/L 范围内对 ECL 强度的影响, 结果发现, 当 PBS 浓度为 50 mmol/L 时, ECL 强度达到最大。故将 ECL 池中 PBS 浓度选定为 50 mmol/L。在此浓度

下, 进一步研究了缓冲液 pH 对发光强度的影响。pH 值的实验范围从 6.0 ~ 8.0。结果发现, 当 PBS 的 pH 为 7.0 时, ECL 强度达到最大。

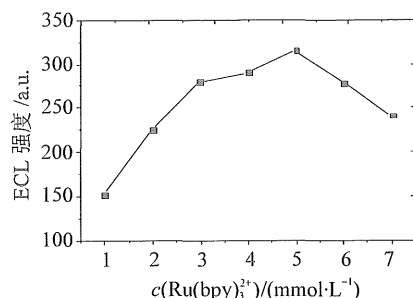


图3 Ru(bpy)₃²⁺ 浓度对 ECL 强度的影响

Fig. 3 Effect of the concentration of Ru(bpy)₃²⁺ on ECL intensity of EES

1 μmol/L 琥乙红霉素; 分离电压: 20 kV; 运行缓冲液: 10 mmol/L PBS (pH 7.5); 检测池溶液: 50 mmol/L PBS (pH 7.0); 工作电极电位: 1.2 V

2.4 堆积场放大效果

为了增强分析的灵敏度, 研究了琥乙红霉素的堆积放大效果。通过测定溶于 10 mmol/L 磷酸缓冲溶液 (pH 7.5) 的琥乙红霉素 (浓度为 0.2、1.0、10.0 μmol/L) 的 ECL 强度与溶于 0.1 mmol/L 盐酸的琥乙红霉素 (浓度为 0.2、1.0、10.0 μmol/L) 的 ECL 后发现, 溶于盐酸的琥乙红霉素能获得更强的 ECL 信号 (大约 3 倍)。

2.5 线性范围、精密度和检出限

在上述获得的最佳优化条件下, 考察了一系列琥乙红霉素标准溶液浓度 (0.1、0.3、0.5、0.7、1.0、3.0、5.0、7.0 和 10.0 μmol/L) 对所建立 CE - ECL 分析系统的响应情况。结果表明, 琥乙红霉素的迁移时间在 180 s 左右, ECL 强度与琥乙红霉素浓度具很好的线性关系, 其线性范围在 0.7 ~ 10.0 μmol/L ($R^2 = 0.9975$), 检测限为 0.23 μmol/L ($S/N = 3$)。该检测限与王建国等^[6]报道的结果相当。用该方法平行测定浓度为 5 μmol/L 的琥乙红霉素 7 次, 其迁移时间和 ECL 强度的相对标准偏差 RSD 分别为 3.8% 和 4.1%。

2.6 生物液体中的琥乙红霉素测定

按照 1.3 的方法, 将一系列不同浓度的琥乙红霉素标准溶液加标到人血浆和尿样中。在优化的 CE - ECL 检测条件下, 测定其回收率。从表 1 可以看出, 人血浆和尿中琥乙红霉素的回收率为

81.3%~92.6%和83.8%~93.0%。当分析物标准的添加量为5.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,两种样品的回收率均为最高。

表1 人血浆和尿样中的琥乙红霉素的加标回收率

Table 1 Recovery of EES in spiked human plasma and urine samples

样品	加入量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	测定值/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) (mean $\pm$ SD, $n=3$)	回收率/%
血浆	0.8	0.65 $\pm$ 0.10	81.3
	1.0	0.82 $\pm$ 0.23	82.0
	5.0	4.63 $\pm$ 0.61	92.6
	10.0	8.88 $\pm$ 1.18	88.8
尿	0.8	0.67 $\pm$ 0.08	83.8
	1.0	0.87 $\pm$ 0.14	87.0
	5.0	4.65 $\pm$ 0.43	93.0
	10.0	8.91 $\pm$ 0.92	89.1

3 结 论

基于所研究化合物对 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的ECL增强作用,本研究建立了用于测定生物体液中琥乙红霉素检测的CE-ECL新方法。与其他已报道的许多方法如分光光度法、高效液相色谱法和毛细管法相比,本方法具有检测灵敏度高、检测速度快、重现性好以及环境友好的特点,适合于复杂基质,特别是极少量生物学样品中琥乙红霉素的痕量检测。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 677.
- [2] 王家蕊, 陈立清, 董伟林, 等. 兔血清中琥乙红霉素的HPLC测定及药代动力学研究[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(1): 46-48.
WANG Jiarui, CHEN Liqing, DONG Weilin, et al. HPLC Determination of erythromycin ethylsuccinate and pharmacokinetic studies in rabbit serum [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2000, 20(1): 46-48.
- [3] 张焯, 张春英, 段宇, 等. LC-MS-MS法研究琥乙红霉素颗粒的生物等效性[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(13): 1164-1167.
ZHANG Xuan, ZHANG Chunying, DUAN Yu, et al. Bioequivalence of erythromycin ethylsuccinate granules evaluated by HPLC-MS-MS [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2008, 17(13): 1164-1167.
- [4] 晏敏红, 俞丽君, 周建忠. 紫外分光光度法测定琥乙红霉素颗粒剂的含量[J]. 中国药业, 2003, 12(1): 42.
- [5] 姚秉华, 陈金云, 白映平, 等. 利君沙有效成分琥乙红霉素的电位分析法测定[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(12): 1537-1539.
- [6] 王建国, 汪敬武. 流动注射化学发光测定琥乙红霉素[J]. 南昌大学学报: 理科版, 2007, 31(4): 370-373.
WANG Jianguo, WANG Jinwu. Determination erythromycin ethylsuccinate by flow-injection chemiluminescence [J]. Journal of Nanchang University: Natural Science, 2007, 31(4): 370-373.
- [7] 张社争, 马红艳. 流动注射电化学发光分析法测定琥乙红霉素[J]. 理化检验: 化学分册, 2007, 43(5): 345-347.
ZHANG Shezheng, MA Hongyan. Flow injection electrochemical chemiluminescence determination of erythromycin ethylsuccinate [J]. Physical Testing and Chemical Analysis(B): Chemical Analysis, 2007, 43(5): 345-347.
- [8] 翟海云, 杨冰仪, 吴燕红, 等. 毛细管电泳法快速测定琥乙红霉素的含量[J]. 化学研究与应用, 2007, 19(4): 437-440.
ZHAI Haiyun, YANG Bingyi, WU Yanhong, et al. Rapid determination of erythromycin ethylsuccinate by capillary electrophoresis [J]. Chemical Research and Application, 2007, 19(4): 437-440.
- [9] YIN X B, QIU H, SUN X, et al. Capillary electrophoresis coupled with electrochemiluminescence detection using porous etched joint[J]. Anal Chem, 2004, 76: 3846-3850.
- [10] 孙汉文, 问海芳, 苏明, 等. 毛细管电泳-联吡啶钌电化学发光法对血浆中丁卡因与普鲁卡因的同时测定[J]. 分析测试学报, 2009, 28(2): 168-172.
SUN Hanwen, WEN Haifang, SU Ming, et al. Simultaneous determination of tetracaine and procaine in human plasma by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2009, 28(2): 168-172.
- [11] QIU H, YAN J, SUN X, et al. Microchip capillary electrophoresis with an integrated indium tin oxide electrode-based electrochemiluminescence detector[J]. Anal Chem, 2003, 75: 5435-5440.