

微流控芯片非接触电导法测定左卡尼汀注射液的含量*

肖羽^{1,2} 张琳² 施亦斌¹ 陈缙光^{2**}

(1. 广州市药品检验所, 广州 510160; 2. 中山大学药学院, 广州 510006)

摘要 目的: 建立以微流控芯片非接触电导检测法快速测定左卡尼汀注射液中左卡尼汀含量的新技术。方法: 以芯片毛细管为分离通道, 以高压电场为驱动力实现左卡尼汀的高效快速分离, 配以非接触电导检测器进行在线检测; 探讨并优化缓冲溶液的种类和浓度、添加剂、分离电压和进样时间等因素。结果: 优化并选择了 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水吗啉乙磺酸 (MES) - $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-组氨酸 (L-His) (pH 6) 为缓冲溶液, 分离电压 2.00 kV 、进样时间 10 s , 1 min 内可实现左卡尼汀的快速测定; 线性范围为 $10 \sim 150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9902$) 检出限 ($S/N=3$) 为 $3.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加标回收率为 $95.5\% \sim 99.4\%$; 3 批样品中左卡尼汀含量分别为 98.3% 、 101.2% 、 101.4% 。结论: 该方法经方法学验证适用于左卡尼汀的含量测定。

关键词: 左卡尼汀; 左肉毒碱; 氨基酸药物; 微流控芯片技术; 非接触电导检测; 快速含量测定; 方法学验证

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2015)04-0728-04

doi: 10.16155/j.0254-1793.2015.04.029

Determination of levocarnitine injection by microfluidic chip with contactless conductivity*

XIAO Yu^{1,2} ZHANG Lin² SHI Yi-bin¹ CHEN Zuan-guang^{2**}

(1. Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract Objective: To establish a new and simple method for the rapid determination of levocarnitine in levocarnitine injection by method of microfluidic chip with contactless conductivity. **Methods:** Levocarnitine was rapidly separated by microfluidic chip under high electric field and detected with contactless conductivity detector. The electrophoretic parameters, such as the variety and concentration of buffer solution and additive, the separation voltage and the injection time, etc., were investigated and optimized. **Results:** In optimal conditions, using $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MES - $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-His (pH 6) as the buffer solution at the separation voltage of 2.00 kV and the injection time of 10 s , levocarnitine was separated and detected within 1 min . The linear dependence of the concentration of levocarnitine ranged from $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ to $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the linear equation was $Y = 17.08X + 610.6$ with a correlative coefficient of 0.9902 , the limit of detection reached $3.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($S/N=3$), and the recoveries were $95.5\% \sim 99.4\%$. The contents of levocarnitine in 3 batches of samples were 98.3% , 101.2% , and 101.4% . **Conclusion:** It is proved that the method could be used for rapid determination of levocarnitine with satisfactory results. **Keywords:** levocarnitine; L-carnitine; amino acid drugs; microfluidic chip technology; contactless conductivity detection; fast content determination; methodology validation

左卡尼汀 (levocarnitine) 是人体内长链脂肪酸代谢所必需的一种物质, 其主要功能是促进脂类代谢, 适用于慢性肾衰长期血透病人因继发性肉碱缺

乏产生的一系列并发症^[1-2], 左卡尼汀属于氨基酸衍生物, 其分子内含有季铵结构, 同时也有内盐结构, 亲水, pK_a 值为 3.8 。常规的检测方法有: 非水滴

* 国家自然科学基金 (Nos. 21075139, 21375152) 资助

** 通信作者 Tel: 13751821168; E-mail: chenzg@mail.sysu.edu.cn

第一作者 Tel: 13751821168; E-mail: vikowings@sina.cn

定法^[3],方法简便,但其精密度、重复性较差;高效液相色谱法^[4-5],分析成本高,操作复杂且容易破坏色谱柱;酶法^[6],试剂成本高,分析时间长。

微流控芯片具有分离效能高,速度快,试剂和样品消耗量少,成本低等特点,已应用于药物分析领域^[7-8]。非接触电导检测法避免了电极与溶液接触造成的污染中毒,寿命长,灵敏度较高^[9-11]。本文采用微流控芯片-非接触电导检测法测定左卡尼汀注射液中左卡尼汀的含量,目前在国内外尚未见报告,该法快速、灵敏、低耗,样品处理简单,操作方便,重现性好。与常用的高效液相色谱含量测定法相比,大大缩短了检测时间,成本显著降低,虽然准确度和精密度仍有待改进,但为左卡尼汀的快速检测提供了一种新的方法。

1 仪器与试剂

PMMA 芯片(微通道上宽 30 μm,下宽 100 μm,深 30 μm,进样通道为十字结构,分离通道长 44 mm,有效分离长度 43 mm),自制;高压电源^[12]和非接触电导检测器^[13],自制;循环水式真空泵,SHZ-D(Ⅲ)型,巩义市予华仪器有限责任公司;色谱工作站,自制;数据记录处理在普通电脑上完成。

水吗啉乙磺酸(MES,购自 Aladdin Industrial Corporation)L-组氨酸(L-His,购自 Aladdin Industrial Corporation);其他试剂为国产分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

左卡尼汀对照品(购自 Chemical Development 公司,批号 C009143WS);左卡尼汀注射液(Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S. P. A. 生产,批号 130202、130203、130086,规格为 10 mL:1 g)

2 实验方法

准确称取左卡尼汀对照品 0.010 0 g,用二次蒸馏水溶解并定容于 10 mL 量瓶中,得 1.00 g·L⁻¹左卡尼汀对照品溶液,4℃下保存,使用时用水稀释到 1.00 mg·mL⁻¹浓度。左卡尼汀注射液,用水稀释至 100 μg·mL⁻¹,作为供试品溶液。MES 和 L-His 用水配成 40 mmol·L⁻¹的储备液,临用时稀释成不同浓度配比的缓冲液。

微流控芯片使用前依次用 0.2 mmol·L⁻¹硝酸、0.2 mmol·L⁻¹氢氧化钠、水、运行缓冲溶液各清洗 10 min;每次实验前,芯片分别用 0.1 mmol·L⁻¹氢氧化钠溶液、水、运行缓冲溶液各清洗 5 min。检测器激发频率为 60 kHz,激发电压为 60 V。300 V 电压下电迁移进样,进样 10 s,切换至 2.00 kV 分离状态并同时启动色谱工作站记录。

3 结果与讨论

3.1 缓冲溶液和添加剂的选择 考察了缓冲溶液的种类、浓度、pH 及添加剂对分离检测的影响。结果发现:在柠檬酸-柠檬酸钠、磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲体系中左卡尼汀不出峰;在硼酸-乙二胺、磷酸-三乙胺缓冲体系中,组分出峰不明显;在柠檬酸-Tris、盐酸-Tris、醋酸-醋酸钠缓冲体系中基线不稳,峰形差,MES-Tris 缓冲体系中基线平稳,出峰较高,但与系统峰相连;在硼酸-Tris、MES-L-His 缓冲体系中峰形较好,两者中,以 MES-L-His 缓冲体系的信噪比最大,基线平稳,且峰形和分离度都更好。综合考虑,选择 MES-L-His 缓冲体系为分离介质。左卡尼汀在几种缓冲溶液中的出峰情况如图 1 所示。反向出峰是因为检测器内使用反相发生器,不影响定量。

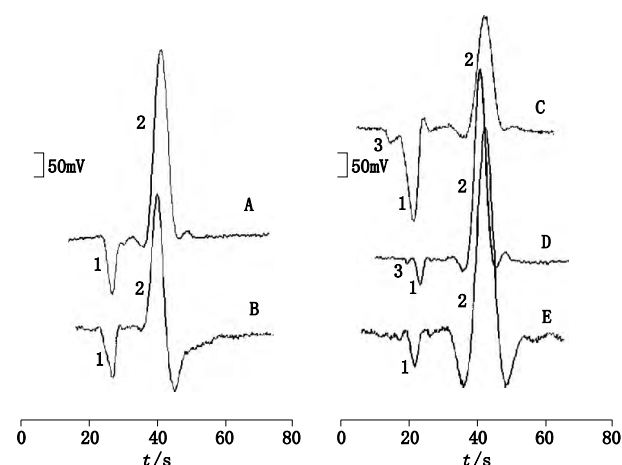


图 1 左卡尼汀在不同缓冲体系中的芯片毛细管电泳色谱图

Fig. 1 Electrophoregrams of levocarnitine in different buffers

1. 左卡尼汀(levocarnitine) 2. 水(water) 3. 系统峰(system peak)

A. MES-L-His B. 硼酸(boric acid)-Tris C. MES-Tris D. 盐酸(hydrochloric acid)-Tris E. 醋酸(acetic acid)-醋酸钠(sodium acetate)

MES 是一种生物缓冲液,能调节氢离子浓度的变化;L-His 分子含咪唑基,可作为质子供体或质子受体。实验进一步考察了不同比例的 MES-L-His 缓冲体系对分离度影响,优化比例为 1:1。随着 MES-L-His 总浓度的提高,分离度变好,但电泳电流升高,焦耳热随之加大;检测器的噪音也变大,信噪比下降。优化两者浓度均为 10 mmol·L⁻¹。

考察了添加剂对分离检测的影响。缓冲溶液中加入 1%~10% 甲醇,对分离检测影响不大;加入 0.1~0.5 mmol·L⁻¹ 十二烷基硫酸钠(SDS) 峰高略有增加,但会造成基线漂移,噪声增大。综合考虑,优化选择不加添加剂。

3.2 分离电压和进样时间的选择 分离电压是影响

分离效果的一个重要参数。实验发现,在分离电压 1.00~2.00 kV 区间,随着分离电压的升高,出峰时间缩短,分析速度加快,分离度变好;但高于 2.00 kV 后,噪声增大,基线不稳,可能因为电流增大,焦耳热增大。综合考虑,优化选择 2.00 kV 的分离电压。

进样量受进样时间影响,试验考察进样时间 5.0~20.0 s 范围内对检测的影响,发现随着进样时间的延长有更多的样品进入检测,峰高和峰面积都有增大的趋势,但会造成峰形拖尾,峰展宽等影响;而进样时间太短时,出峰不明显。综合考虑,优化进样时间为 10.0 s。

3.3 线性范围、检出限和重复性 在优化实验条件下,对 1.0~300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 系列 8 个质量浓度的左卡尼汀对照品溶液进行测定。左卡尼汀质量浓度 X ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 在 10~150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 5 个浓度点范围内,与左卡尼汀峰面积 Y 呈良好线性关系,线性方程:

$$Y = 17.078X + 610.64 \quad r = 0.9902$$

检出限为 3.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($S/N=3$)。

在优化实验条件下,精确量取 1.00 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 左卡尼汀对照品溶液 5.00 mL,加水稀释 10 倍,得 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 左卡尼汀对照品溶液,连续 3 d 重复进样(每天重复进样 6 次),测得左卡尼汀峰面积的 RSD 为 1.7%。

3.4 样品分析和回收率 在优化实验条件下,取左卡尼汀供试品溶液、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品溶液分别进样,均在 1 min 内完成分离和检测,记录电泳图如图 2,电泳图谱基本一致,说明供试品辅料不出峰,不干扰测定。

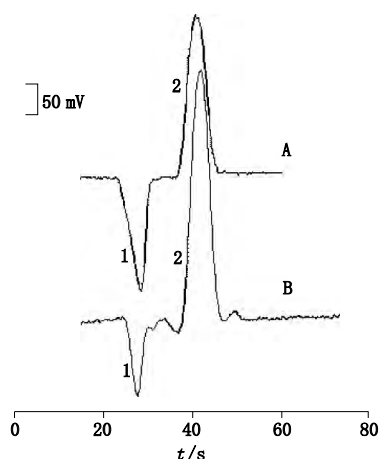


图 2 左卡尼汀对照品(A)与供试品(B)芯片毛细管电泳图谱
Fig. 2 Electropherograms of levocarnitine reference substance(A) and sample(B)

1. 左卡尼汀(levocarnitine) 2. 水(water)

取 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 供试品溶液,分别进样 3 次,记录电泳图,计算左卡尼汀检出浓度和标示量百分含量,结果见表 1。

精密量取 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 左卡尼汀注射液供试品溶液 3 mL 共 3 份,分置于 3 个 10 mL 量瓶中,分别加入 1.00 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 左卡尼汀对照品溶液 0.200、0.300、0.400 mL 并用水定容,分别进样 3 次,计算回收率,结果见表 2。

表 1 左卡尼汀注射液样品测定结果($n=3$)

Tab. 1 Determination results of levocarnitine injection

批号(lot No.)	平均标示百分含量 (average marked content) / %	RSD / %
130202	98.3	2.0
130203	101.4	1.4
130086	101.2	1.8

表 2 加标回收试验结果

Tab. 2 Result of recovery test

成分 (component)	样品浓度 (background) / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	加标浓度 (added) / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	检出浓度 (found) / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率 (recovery) / %	RSD / %
左卡尼汀		20	48.9	99.4	
(levocarnitine)	29.2	30	57.5	97.1	1.9
		40	66.1	95.5	

参考文献

[1] HUANG XY(黄秀玉). Clinical observation of L-carnitine in treatment of unstable angina pectoris(左卡尼汀治疗不稳定型心绞痛的临床观察) [J]. Chin J Mod Drug Appl(中国现代药物应用) 2013, 7(22): 104

[2] WANG X(王旭), MENG XP(孟晓萍). L-carnitine treatment in patients with chronic heart failure is effective and its correlation with dose(左卡尼汀治疗慢性心力衰竭患者的有效性及其与剂量相关性) [J]. Chin J Gerontol(中国老年学杂志) 2014, 34: 517

[3] FULLER RK, HOPPEL CL. Elevated plasma carnitine in hepatic cirrhosis [J]. Hepatology, 1983, 3(4): 554

[4] GAO LJ(高立军), WANG T(王涛), QUAN DQ(全东琴). An HPLC-method of determination of content of levocarnitine injection(高效液相色谱法测定左卡尼汀注射液的含量) [J]. Sci Technol Eng(科学技术与工程) 2011, 11(30): 7494

[5] Drug Standards of China. New Medicine Transfer Standard. Vol 61 (中国药品标准·新药转正标准第 61 册) [S]. 2008: 220

[6] JX20060188 The Imported Drug Registration Standards(进口药品注册标准) [S]. 2006

[7] LING BC(林炳承). Microfluidic-based lab-on-a-chip and its functionality(微流控芯片实验室及其功能化) [J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报) 2003, 34(1): 1

- [8] GUO MX(郭明星), ZHAO BS(赵保胜), GAO XY(高晓燕). Research progress and prospect of microfluidics in medical field (微流控技术在医药领域的研究进展) [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志) 2012, 18(18): 323
- [9] YANG XJ(杨秀娟), LI OL(李偶连), CHEN ZG(陈缵光), et al. Determination of pseudoephedrine hydrochloride and dextromethorphan hydrobromide in cold tablet by micro-fluidic chip(微流控芯片非接触电导法测定感冒药中盐酸伪麻黄碱和氢溴酸右美沙芬) [J]. Chin J Anal Chem(分析化学) 2008, 36(5): 673
- [10] CAI ZY(蔡自由), LI YC(李永冲), CHEN ZG(陈缵光). Determination of moroxydine hydrochloride tablets by microfluidic chip(微流控芯片测定盐酸吗啡片含量) [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志). 2011, 31(8): 1492
- [11] SONG ZR, XU Y, CHEN ZG, et al. Quantification of lactate in synovia by microchip with contactless conductivity detection [J]. Anal Biochem 2013, 434(1): 73
- [12] CHEN ZG(陈缵光), WANG LS(王立世), MO JY(莫金垣). Development of micro total analysis system for micro power(微全分析系统专用微型电源的研制) [J]. Chem J Chin Univ(高等学校化学学报) 2004, 25(Suppl): 24
- [13] CHEN ZG, LI QW, LI QL, et al. A thin cover glass chip for contactless conductivity detection in microchip capillary electrophoresis [J]. Talanta 2007, 71(5): 1944

(本文于2014年7月21日收到)

《药物分析杂志》编辑部声明

本刊采用在线投稿系统,作者稿件一经本刊审核通过,确定录用,可优先数字出版,同时被中国学术期刊网络出版总库等数据库收录,进入因特网提供信息服务,并通过本刊在线系统等实现全文查询。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

本刊未委托其他任何机构或个人代理征收稿件,所有稿件须登录本刊网站(<http://www.ywfxzz.cn>)在线投稿,并须提交加盖公章的单位介绍信。

本刊未委托其他任何机构或个人代收任何费用,所有收费按本刊缴费通知办理。