

人血清白蛋白与手性药物相互作用的毛细管电泳研究

I. 液相预柱毛细管电泳技术定量可靠性的考察*

丁永生 林炳承**

(中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)

提 要 以药物 Verapamil (VER) 与人血清白蛋白(HSA)相互作用体系中游离的药物对映体浓度定量测定为目标,建立了一项适用于相互作用研究的液相预柱毛细管电泳(LPC-CE)技术。通过对该技术的考察,确定了这项技术的定量可靠性。在生理 pH 值条件下(pH 7.4, 离子强度 $I=0.17$),使药物与人血清白蛋白达到结合平衡。在毛细管电泳手性拆分(pH 2.5 缓冲液;三甲基- β -环糊精(TM- β -CD)浓度为 45 mmol/L)柱(32 cm \times 50 μ m)内预先注入一段生理 pH 缓冲液,形成一段液相预柱(2.8 cm)。在预柱中,利用蛋白和药物在生理 pH 下的电泳特性差异,使 HSA 不进入手性拆分区域,而药物以平衡浓度进入拆分系统。结合毛细管电泳前沿分析技术,药物对映体在相互作用体系中的游离浓度的测定通过手性拆分实现。对 7 个不同浓度比的药物-白蛋白样品体系进行考察,具有良好的重现性(相对标准偏差 $RSD=2.17\% \sim 5.02\%$, $n=4$);定量分析的相对误差在 1.4%~5.8% 范围内。

关键词 毛细管电泳,液相预柱,相互作用,人血清白蛋白,药物

分类号 O658

1 前言

生物蛋白分子与药物分子相互作用的立体选择性的研究一直受到重视。常规的基于 HPLC 的渗析或超滤技术样品需要量较多,在预处理过程中难以避免药物在膜上的吸附或一定程度的膜泄漏或透析不足^[1]。亲和毛细管电泳(ACE)也存在着运行电解质中的蛋白在管壁的吸附、蛋白的紫外吸收对低浓度药物测定的干扰以及淌度变化的不重复性等因素^[2]。1995 年,Ohara 等人^[3]首次使用了在进样前注入一段与背景溶液不同的缓冲液的毛细管电泳方法。由于缓冲液的 pH 值对生物分子的电泳特性有重要的影响,而且可以改变其迁移方向^[4],因此,这一方法的出现为以样品预处理为目的的液相预柱毛细管电泳(LPC-CE)技术提供了应用的可能性,例如有可能解决在一次进样中完成微量样品的预处理、分离、手性拆分和微量定量等全过程。但是,应用的前提是这种技术在整体上的可靠性,而这种可靠性在很大程度上是通过定量的可靠性来体现的。本文所进行的工作是以碱性药物 Verapamil(VER)与人血清白蛋白(HSA)为 LPC-CE 的应用对象,首次对 LPC 技术的定量可靠性进行了考察。

2 LPC-CE 基本原理

在生理 pH (7.4)条件下,HSA 与 VER 表现出

不同的电泳特性^[5,6]。HSA 的等电点为 4.9,在此条件下带负电荷,而碱性药物则带正电荷。采用没有电渗流的涂渍毛细管柱,在电场(从正到负)作用下,碱性药物向负极迁移,进入手性拆分缓冲液。HSA 向正极迁移,不进入手性拆分系统,达到筛除目的。

3 实验部分

3.1 试剂与材料

药物 Verapamil 由德国 Tuebingen 大学提供;HSA(脱脂脂肪酸和球蛋白, Sigma No. 3782)购于 Sigma (St. Louis, MO, USA);三甲基- β -环糊精(TM- β -CD)购于 Cyclolab 公司(匈牙利);手性拆分运行缓冲液:pH 2.5 磷酸盐缓冲液, TM- β -CD 浓度 45 mmol/L; (\pm)VER 和 (\pm)VER-HSA 混合液由生理 pH 缓冲液(pH 7.4 磷酸盐缓冲液, 离子强度 $I=0.17$)溶解配制;实验用水均为自制亚沸去离子水。

3.2 仪器

Bio-FocusTM 3000 型毛细管电泳仪(Bio-Rad, CA, USA); 32 cm \times 50 μ m 石英毛细管柱(河北永年光导纤维厂),检测窗口距离入口端 27 cm,内壁用聚丙烯酰胺涂渍。检测波长设定为 200 nm;柱温 25 $^{\circ}$ C;压力进样 28 kPa \cdot s,运行电压 10 kV,由正到负,每次运行前柱内水洗 30 s,运行缓冲液洗 30 s,

* 国家自然科学基金重点基金资助项目(29635020)

** 通讯联系人

本文收稿日期:1999-01-03

液相预柱约 3 cm。入口端和出口端分别使用 pH 7.4 和 pH 2.5 的缓冲溶液。

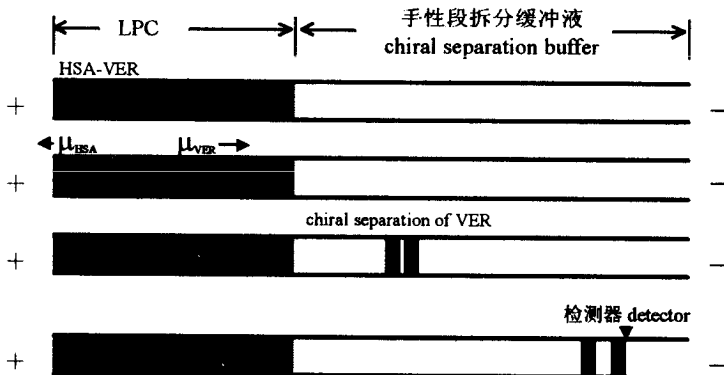


图 1 毛细管电泳液相预柱(LPC-CE)原理示意图

Fig. 1 Schematic diagram of LPC induced capillary electrophoresis

3.3 LPC 长度

LPC 长度由前沿分析法测定。在毛细管电泳柱内充满 pH 7.4 的缓冲溶液, 110 kPa·s 自动压力进样标准(±)VER 溶液, 淌度可由 $\mu = \frac{L_d}{t}$ 计算, 其中, μ 是淌度, L_d 是入口到检测窗距离, t 是保留时间。单位进样量(每 kPa·s)的样品在柱内所占据的长度(定义为转换因子 f)为 $f = \frac{L}{Q} = \frac{\mu \cdot t_w}{Q}$, 其中, L 是样品在柱内所占据的长度(cm), t_w 是峰宽(min), Q 是进样量(kPa·s)。实际进样量 $Q = 110 \text{ kPa} \cdot \text{s}$, 测得淌度 $\mu_{(\pm)\text{VER}} = 3.5 \text{ cm/min}$, $t_w = 1.6 \text{ min}$, 求出 $f = 5.0 \times 10^2 \text{ cm/kPa} \cdot \text{s}$ 。根据 $L_{\text{LPC}} = f \cdot Q_{\text{LPC}}$ 和 LPC 预柱缓冲液进样量 $Q_{\text{LPC}} = 55 \text{ kPa} \cdot \text{s}$, 求得 LPC 预柱长度为 2.8 cm。

为了使手性拆分更充分, LPC 不宜过长, 只要保证白蛋白组分不进入 pH 2.5 的手性拆分缓冲液即可。

3.4 样品进样量控制

虽然进样量大有利于以峰高定量^[4], 但是进样量过大会给手性拆分带来难度, 所以对进样量必须进行合理控制。根据手性拆分分离度公式 $R = \frac{t_2 - t_1}{t_w}$ 可知, 如果峰宽 t_w 主要是由进样量引起的, 而要保证使分离度 $R \geq 1$, 必须使 $t_w \leq \Delta t$, 那么最大允许进样量可以表示为 $Q_{\text{max}} = \frac{L_{\text{max}}}{f} = \frac{\mu \Delta t}{f}$ 。实验测得 $\Delta t = 0.9 \text{ min}$, 求得允许进样量 $Q_{\text{max}} = 63 \text{ kPa} \cdot \text{s}$ 。实际采用进样量为 $28 \text{ kPa} \cdot \text{s}$ 。

3.5 工作曲线

(1) 分别配制浓度为 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的(±)VER 标准溶液, 进行 LPC-CE 分析, 得到

(±)VER 对映体的基线分离。由于对映体浓度各占 50%, 所以(R-VER)和(S)-VER 峰高相等(图 2-a)。峰高与浓度呈良好的线性关系, 相关系数 $r > 0.99$ ($n=5$)。

(2) 将上述 5 种(±)VER 标准溶液按照文献[5]的方法测定, 得到(±)VER 的峰, 其峰高与游离药物总浓度呈线性关系, 相应工作曲线的相关系数 $r > 0.999$ ($n=5$)。

3.6 游离 VER 对映体和总浓度的测定

分别配制 HSA/VER 浓度比为 500/300, 300/200, 200/100, 400/200, 200/200, 150/200, 100/100 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的(±)VER-HSA 标准溶液, 25 °C 下放置 1 h 达到结合平衡, 分别按照 3.5(1)(LPC-CE 法)和 3.5(2)(前沿分析法)进行测定。由于 HSA 具有手性选择性, 与(R)-VER 的结合作用强于与(S)-VER 的结合, 所以, 混合液中(R)-VER 的游离浓度小于(S)-VER 的游离浓度, 在 LPC-CE 法测得的谱图中, 二者峰高不相等(图 2-b)。游离 VER 对映体的浓度可以由峰高得到。另外, 由前沿分析法测得的谱图由于没有进行手性拆分, 所以是单个平台峰(图 3)。溶液中游离(±)VER 的总浓度可应用 3.5(2)所述方法测定。上述两种测定结果列于表 1 中。

4 结果与讨论

对达到结合平衡的 HSA-CER 混合液, 在一次微量进样(nL 级)中, LPC-CE 实现了从提取游离的 VER、手性拆分到对映体的游离浓度测定的全过程。在标准(±)VER 溶液中, (R)-VER 和(S)-VER 各占 50%, 所以其峰高相等(图 2-a)。而在 HSA-CER

混合液中, HSA 结合 (R)-VER 强于结合 (S)-VER^[7], 游离的 (R)-VER 浓度小于游离的 (S)-VER

浓度(表 1), 所以 (R)-VER 的峰高小于 (S)-VER 的峰高。

表 1 LPC-CE 测定的(±)VER 游离总浓度一致性的比较

Table 1 Agreement of LPC induced CE with normal CE in measuring unbound(±)VER concentration

No.	HSA(μmol/L ⁻¹)/ (±)VER(μmol/L ⁻¹)	CE		LCP		RE (%)
		$C_{f(\pm)VER}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$C_{f(R)-VER}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$C_{f(S)-VER}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$C_{f(\pm)VER}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	
1	500/300	198.1	70.2(1.32)	116.4(8.41)	186.6(5.02*)	5.8
2	150/200	168.5	75.4(3.07)	95.7(0.13)	171.1(2.17)	1.5
3	200/200	160.4	69.8(3.54)	92.8(2.58)	162.6(3.09)	1.4
4	300/200	146.6	57.7(1.43)	83.5(5.97)	141.2(4.34)	3.7
5	400/200	135.2	58.7(3.76)	80.6(3.66)	139.3(4.34)	3.0
6	100/100	87.2	42.0(2.75)	47.5(1.66)	89.5(2.27)	2.6
7	200/100	63.8	31.5(2.61)	43.5(2.87)	65.0(2.75)	1.9

C_f —游离浓度 free concentration; RE—为相对误差 relative error.

* 括号内为相对标准偏差 relative standard deviation—RSD.

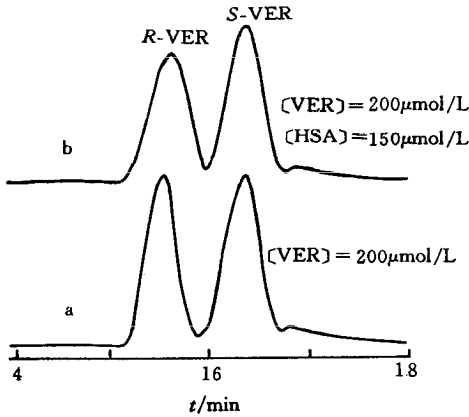


图 2 VER 外消旋体手性拆分的 LPC-CE 谱图

Fig. 2 Electropherograms of verapamil enantiomers by LPC induced method

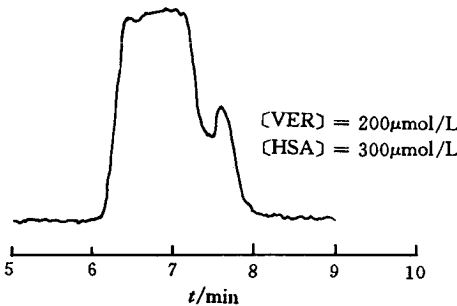


图 3 VER 外消旋体的毛细管电泳/前沿分析谱图

Fig. 3 Electropherogram of racemic verapamil by frontal analysis method

准偏差 RSD=2.17%~5.02%; 另一方面仍然很好地保持着与常规 CE 定量分析结果的一致性, 相对误差 RE=1.4%~5.8%。由此证明, 这项技术用于相互作用等复杂体系的毛细管电泳研究, 具有定量的可靠性。对于 HSA 与药物这类快速可逆结合平衡体系采用压力或电动进样均可, 而对于平衡较慢的相互作用体系以采用电动进样为宜。

显然, 手性拆分仅仅是 LPC 应用的类型之一。事实上, 在同一根毛细管电泳柱内分段注入不同缓冲液的应用, 根据不同需求可以应用在不同的方面。Muijselaar^[8]在胶束电动色谱(MEKC)与质谱(MS)联用时, 为了避免 SDS 胶束进入 MS 体系, 采用了部分填充(partial-filling)技术。可见, 如果能够保持较好的准确度和精密度, 这类易于实现的技术会在更广泛的应用中发挥出其特有的效力。

参 考 文 献

- Oravcová J, Bohs B, Lindner W. J Chromatogr B, 1996, 677(1):1-28
- Rundlett K L, Armstrong D W. Electrophoresis, 1997, 18(12-13):2194-2203
- Ohara T, Shibukawa A, Nakagawa T. Anal Chem, 1995, 67:3520-3525
- Ding Y S, Zhu X F, Lin B C. Chromatographia, 1999, 49; in press
- 丁永生, 林炳承. 分析化学, 1999, 27(1):20~23
- 丁永生, 朱晓峰, 林炳承. 色谱, 1999, 27(1):513~515
- Itoh T, Saura Y, Tsuda Y et al. Chirality, 1997, 9(7):643-644
- Muijselaar P G, Otsuka K, Terabe S. J Chromatogr A, 1998, 802:3-5

通过定量分析的考察, 从表 1 的数据比较发现, LPC 技术的引入一方面具有较好的重现性, 相对标

Albumin-Drug Binding Study by Capillary Electrophoresis

I. Quantitative Applicability Examination of Liquid Pre-Column

Ding Yongsheng and Lin Bingcheng

(Dalian Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences, Dalian, 116023)

Abstract To measure the free concentration of verapamil (a basic drug) enantiomers in the binding system of human serum albumin(HSA), a capillary electrophoretic method, liquid precolumn(LCP), was established, and the method was examined systematically. In physiological pH condition (pH 7.4, ionic strength 0.17), HSA migrates in the opposite direction of verapamil. This electrophoretic property basically supposed the probability of preventing HSA from entering the capillary whereas a positive electric field was used. Finally, the drug enantiomers were separated by the chiral selector (45 mmol/L trimethyl- β -cyclodextrin, pH 2.5 phosphate buffer) and the free concentration of each optical isomer in the binding system was measured. Seven samples were examined and their relative standard deviations (RSD) and the relative errors (RE) of unbound drug were 2.1%-5.02% and 1.4%-5.8%, respectively.

Key words capillary electrophoresis, liquid pre-column, binding, human serum albumin, drug

中国色谱学会第三届理事会组成名单

名誉理事长:卢佩章 王治国

顾问:陆婉珍 周同惠 俞惟乐 马立人

理事长:张玉奎

副理事长:袁倚盛 武杰 张汉英 邹汉法 陈义

常务理事(以姓氏笔划为序):

关亚风 刘国诠 孙毓庆 牟世芬 陈义 张玉奎 张汉英 汪正范 吴采樱 邹汉法

武杰 罗国安 林炳承 胡国栋 耿信笃 钱小红 袁倚盛 龚健 戴朝政

秘书长:许国旺

副秘书长:孙生才 任启振

理事(以理事候选人登记表返回先后为序):

傅若农 叶建农 赵秋雯 杨更亮 刘玉华 张玉奎 徐焕斌 史景江 陈立仁 姜庚信

师治贤 吴烈钧 周卯星 姜润喜 侯镜德 黄文凤 吴采樱 龚健 张汉英 戴朝政

刘锦耀 邵嘉兴 李贵友 王远兴 邱宗荫 陆懋荪 邹汉法 杨海鹰 周志华 钱小红

贾庆 李桂珍 张惠之 汪正范 刘国诠 王天松 杨一鸣 胡春华 仇大器 夏立钧

耿信笃 孙毓庆 金美兰 王琴荪 牟世芬 袁倚盛 朱瑞林 胡国栋 罗国安 闫超

李彤 武杰 关亚风 林炳承 陈义 孙建一 寇登民 蒋登高 刘虎威 张玉荣

郑明辉 聂洪勇 许国旺 金熹高 张祥民