

二维毛细管区带电泳/胶束电动毛细管色谱 分离尿样中的药物及其对映体

张效伟^{1*}, 张召香²

(1. 青岛理工大学理学院, 山东 青岛 266033; 2. 青岛科技大学化学与分子工程学院, 山东 青岛 266042)

摘要:建立了毛细管区带电泳(CZE)/胶束电动毛细管色谱(MEKC)二维毛细管电泳分离平台,CZE毛细管和MEKC毛细管通过一段带微孔的聚四氟乙烯(polytetrafluoroethylene,PTFE)套管固定。样品在CZE毛细管中分离后进入MEKC毛细管进一步分离,在二维转换过程中采用动态pH连接-胶束扫集法避免第一维分离区带在接口处扩散。将该方法成功用于鼠尿样品中4种药物及其对映体的分离,各组分的理论塔板数为 $(2.8 \sim 4.3) \times 10^4/m$,检出限为0.015~0.052 mg/L,实际样品中峰面积和迁移时间的相对标准偏差($n=7$)分别为1.7%~3.8%和1.3%~4.6%。方法重现性好、灵敏度和分离度高、峰容量大,适用于尿样中多种药物组分及其对映体的同时分离检测。

关键词:毛细管区带电泳;胶束电动毛细管色谱;二维分离;药物;对映体;尿样

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2010)04-0397-05

Two dimensional capillary zone electrophoresis/micellar electrokinetic capillary chromatography for the analysis of drugs and their enantiomers in urine samples

ZHANG Xiaowei^{1*}, ZHANG Zhaoxiang²

(1. School of Science, Qingdao Technological University, Qingdao 266033, China; 2. College of Chemistry and Molecular Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China)

Abstract: A new two dimensional method, which interfaced capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) by a polytetrafluoroethylene (PTFE) tube with a hole of 30–40 μm diameter on the top, was developed for the analysis of drugs and their enantiomers. The CZE was used as the first dimensional separation, from which the eluting components were transferred and further analyzed by MEKC. Online dual concentration method, pH junction-sweeping, was used to avoid sample zone diffusion at the interface. The separation efficiencies and detection limits were $(2.8 - 4.3) \times 10^4/m$ and 0.015–0.052 mg/L, respectively. The proposed method has successfully demonstrated that in the separation of four drugs and their enantiomers in urine samples, the relative standard deviations (RSDs) of peak area and migration time were in the ranges of 1.7%–3.8% and 1.3%–4.6%, respectively. The method was proved to have good reproducibility, high sensitivity and resolution, large peak capacity. It is reliable and suitable to separate and determine multi-drugs and their enantiomers in urine samples simultaneously.

Key words: capillary zone electrophoresis (CZE); micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC); two dimensional separation; drugs; enantiomers; urine samples

对于复杂样品的分离分析,一维毛细管电泳的分离能力有限。二维毛细管电泳(2D-CE)是近年

来发展起来的新的分离技术,由于其峰容量大、分辨率高,在复杂样品的分离分析中备受关注。然而,迄

* 通讯联系人:张效伟,讲师。Tel:(0532)85071576,E-mail:zhangzhx@qust.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金项目(No.20775039).

收稿日期:2009-09-25

今为止,二维毛细管电泳分析复杂生物样品的报道还很少,主要原因是二维分离模式间的接口难以制作。Dovichi 等^[1-3]制作了十字交叉型接口用于毛细管区带电泳/毛细管区带电泳(CZE/CZE)、毛细管筛分电泳(CSE)/胶束电动毛细管色谱(MEKC)分离蛋白质及其水解物。Mohan 等^[4]用微透析接口连接毛细管等电聚焦(CIEF)/瞬间等速电泳(TITP)/CZE 分离蛋白质。Zhang 和 El Rassi^[5]用微注射器连接 CIEF 和毛细管电色谱(CEC)分离蛋白质、肽及血浆样品。张玉奎等制作了聚砜中空纤维膜接口^[6,7]和蚀刻多孔膜接口^[8,9]用于 CIEF/CZE、CIEF/毛细管凝胶电泳(CGE)分离蛋白质混合物。以上报道的 2D-CE 都存在着在二维切换接口处损失部分待测物^[1-3]、第一维分离区带在接口处扩散^[4-7]等缺陷。Anouti 等^[10,11]研究了在同一根毛细管中进行 2D-CE 分离,样品经第一维分离后,将感兴趣的组分驱动到毛细管入口再进行第二维分离,避免了在两毛细管间使用接口,但在压力驱动过程中存在严重的泰勒扩散效应。张召香等^[12]曾将在线富集技术用于 2D-CE 分离中,在二维切换接口处采用电堆积富集技术不仅避免了第一维分离区带在接口处的扩散,还可进一步浓缩样品区带,提高检测灵敏度。

本文采用微孔接口连接 CZE 和 MEKC,样品离子经 CZE 分离后,进入第二维毛细管进行 MEKC 分离,在二维切换接口处采用动态 pH 连接/胶束扫集法避免了第一维分离区带在接口处的扩散。与文献^[12]相比,其特点是通过在电化学检测池中施加压力来抵消电渗流,无需在接口处使用侧管。采用两个电源开关和柱端电化学检测实现了尿样中 4 种药物及其对映体的同时分离检测,验证了该二维分离体系在实际应用中的可行性和优越的分离性能。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

MPI-A 型多参数化学分析测试系统(西安瑞迈分析仪器有限公司),配有毛细管电泳仪、可调高压直流电源和三电极电化学检测系统(直径 300 μm 铂盘电极为工作电极,铂电极为辅助电极,Ag/AgCl 电极为参比电极)。数据采集及谱图处理采用 N-2000 双通道色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所)。pHSJ-4A 型酸度计(上海精密科学仪器有限公司)。SK3200H 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。未涂层石英毛细管(内径 25 μm ,外径 375 μm ,河北永年锐洋色谱器件公司),

CZE 和 MEKC 毛细管的有效长度分别为 15 cm 和 25 cm。聚四氟乙烯(PTFE)管(内径 300 μm ,有效长度 2 cm,长兴前明特种氟塑制品有限公司)。

吡啶洛尔、普萘洛尔、尼莫地平、尼群地平对照品(Sigma 公司),其外消旋体由青岛药品检验所提供。 β -环糊精(β -cyclodextrin, β -CD)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulphate, SDS)、冰醋酸、无水醋酸钠、四硼酸钠、硼酸均为分析纯(上海化学试剂公司)。实验用水为二次蒸馏水。

1.2 样品处理

取大鼠 2 只,服用药物之前先收集空白尿样 5 mL,然后 4 种药物均按 30 mg/kg 给药。给药后 1 h 收集 5 mL 尿样,加入甲醇 1 mL 沉淀蛋白,涡流混合 2 min,于 4 000 r/min 速率下离心 10 min,过滤,冰箱中保存,备用。

1.3 CZE/MEKC 二维分离装置的构建

在张召香等前期研究^[12]的基础上构建了新的 CZE/MEKC 二维分离平台,如图 1 所示。取一段 2 cm 长的 PTFE 管,在管壁上侧打一孔径为 30 ~ 40 μm 的孔,两端分别连接 15 cm 和 25 cm 长的一维和二维毛细管柱,使两根毛细管柱的接缝位于 PTFE 管的微孔处。取一个 1 mL 的塑料离心管作为接口池,在其两侧打两个与 PTFE 管外径相当的孔,将上述连接好的 PTFE 管穿过离心管两侧的孔并装在离心管内,用环氧树脂将离心管两侧的孔隙密封。高压电源的两根正极线分别插入 CZE 入口池和接口池中作为正极,高压电源的负极线插入检测池作为公用负极。检测池中插入连接压力调节电磁阀和气压计的 N_2 管。压力调节电磁阀和两个电源开关 K_1 、 K_2 用自编 Visual C 语言程序通过计算机控制。整个二维分离检测装置只需一个高压电源、两个电源开关和柱端电化学检测。

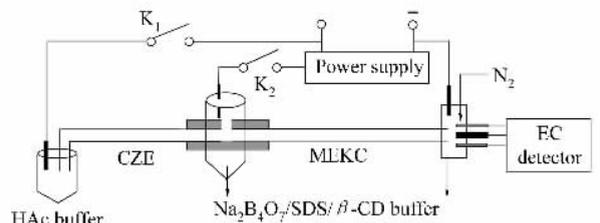


图 1 二维 CZE/MEKC 装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of a 2D CZE/MEKC system

1.4 二维 CZE/MEKC 分离条件

实验开始前,先用注射器将第一维毛细管灌满 CZE 缓冲液(30 mmol/L NaAc/HAc, pH 3.0),然后用硅橡胶堵头将入口端密封,从第二维毛细管末

端充入 MEKC 缓冲液(50 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ /30 mmol/L SDS/10 mmol/L β -CD, pH 9.0)。将第一维毛细管的入口端插入 CZE 缓冲池,第二维毛细管末端放入电化学检测池,使其出口正对工作电极,接口池和检测池中分别加入 MEKC 缓冲液。

首先, K_1 接通, K_2 断开, 在 10 kV 电压下电动进样 10 s。然后进样端换成 CZE 缓冲液, 在 14 kV 电压下进行 CZE 分离, 同时在检测端施加 N_2 30.3 kPa 以抵消电渗流。在 211 s 时, 关闭 N_2 调节阀, 分析物在接口处富集后被电渗流驱动到第二维毛细管中。在 268 s 时, K_1 断开, K_2 接通, 分析物在第二维毛细管中进一步进行 MEKC 和手性分离。

2 结果和讨论

2.1 电极电位的选择

考察了吲哚洛尔、普萘洛尔、尼莫地平、尼群地平在微铂圆盘电极上的电化学反应, 其循环伏安实验表明 4 种分析物分别在 0.85, 0.80, 1.0 和 0.70 V 附近有氧化峰, 说明 4 种分析物均有电化学反应活性。进一步考察了 4 种分析物的流体伏安行为。由图 2 可见, 在电极电位为 0.7 ~ 1.1 V 时, 吲哚洛尔与普萘洛尔的峰电流随着电极电位的增大而增高, 尼莫地平的峰电流在 0.8 V 后形成一个平台, 尼群地平的峰电流在 1.0 V 时达到最大。当电位大于 1.0 V 时, 基线电流开始急剧增大。综合考虑各分析物的响应和信噪比(S/N), 选择 1.0 V 为最佳的工作电位。

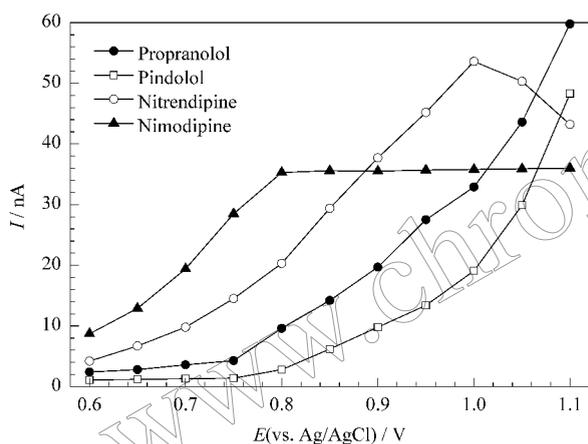


图 2 4 种分析物的流体伏安图

Fig. 2 Hydrodynamic voltammograms for four analytes

Experimental conditions: working electrode, a 300 μm diameter platinum disk electrode; electrokinetic injection, 10 kV \times 10 s; the first dimensional capillary, 15 cm \times 25 μm ; the first dimensional buffer solution, 30 mmol/L NaAc/HAc (pH 3.0); the second dimensional capillary, 25 cm \times 25 μm ; the second dimensional buffer solution, 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ /30 mmol/L SDS/10 mmol/L β -CD (pH 9.0).

2.2 缓冲溶液的选择

吲哚洛尔、普萘洛尔、尼莫地平 and 尼群地平都是弱碱性化合物, 因而考察了不同 pH 条件下的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ 、 NaAc/HAc 、 $\text{NaHC}_2\text{O}_4/\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 等酸性缓冲体系。结果表明, NaAc/HAc 缓冲体系的分离效果最好。在 5 ~ 30 mmol/L 范围内, 增大 NaAc 浓度, 分析物的峰高和分离效率都增大。当 NaAc 浓度为 30 mmol/L 时, 峰高和分离效率都达到最大值。继续增大 NaAc 浓度, 热效应增大, 分离效率下降。进一步考察了 pH 值对分离的影响, 发现 NaAc/HAc 缓冲液的 pH 为 3.0 时吲哚洛尔和普萘洛尔的分离度和分离效率最大, 但尼莫地平 and 尼群地平达不到基线分离(见图 3a); 而且无论如何改变缓冲溶液组成及 pH, 尼莫地平 and 尼群地平都达不到基线分离。这主要是由于尼莫地平 and 尼群地平的结构相似, 电泳淌度相近, 所以在 CZE 的分离条件下无法得到有效分离。但在碱性介质中, 尼莫地平 and 尼群地平都是中性化合物, 可以向介质中加入 SDS, 即在 MEKC 的分离模式下, 根据二者在胶束中的分配系数不同而实现分离。实验发现, 在 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{H}_3\text{BO}_3$ (pH 9.0) 缓冲溶液中加入 30 mmol/L SDS, 尼莫地平 and 尼群地平可达到基线分离, 而吲哚洛尔 and 普萘洛尔由于在 SDS 胶束中的保留因子相近, 所以无法得到有效分离(见图 3b)。

2.3 2D CZE/MEKC 分离

由图 3a 和图 3b 可以看出, 用一维 CZE 或 MEKC 难以将 4 种分析物同时分离, 因此考虑采用 2D CZE/MEKC 同时分离 4 种分析物。吲哚洛尔、普萘洛尔、尼莫地平 and 尼群地平都是手性化合物, 在第二维缓冲溶液中加入 β -CD 可使其对映体分离。考察了 β -CD 的浓度(4 ~ 20 mmol/L) 对对映体分离的影响。在 4 ~ 10 mmol/L 范围内, 随着 β -CD 浓度的增大, 4 种分析物与其对映体的分离度增大, 迁移时间增加。而当 β -CD 的浓度大于 10 mmol/L 时, 分离度不变, 迁移时间延长, 所以最终选择 β -CD 的浓度为 10 mmol/L。

在优化条件下, 采用 2D CZE/MEKC 同时分离 4 种分析物及其对映体, 第一维分离的缓冲液为 30 mmol/L NaAc/HAc (pH 3.0), 分析物在第一维毛细管中根据淌度不同进行 CZE 分离。第二维分离的缓冲液为 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ /30 mmol/L SDS/10 mmol/L β -CD, 第一维流出组分在第二维毛细管中根据分配系数不同进一步进行 MEKC 和手性分离。4 种分析物及其对映体都能达到基线分离(见图 3c)。

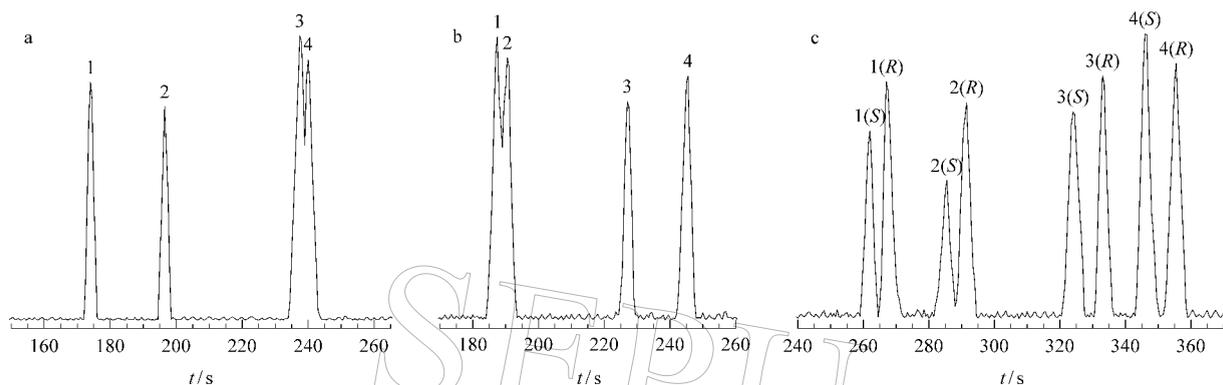


图 3 4 种分析物及其对映体的电泳谱图

Fig. 3 Electropherograms of four analytes and their enantiomers

a. CZE separation of four analytes : buffer solution , 30 mmol/L NaAc/HAc , pH 3.0 ; sample concentration , 20 mg/L. b. MEKC separation of four analytes : buffer solution , 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ /30 mmol/L SDS , pH 9.0 ; sample concentration , 40 mg/L. c. 2D CZE/MEKC separation of four analytes and their enantiomers : the first dimensional buffer solution , 30 mmol/L NaAc/HAc , pH 3.0 ; the second dimensional buffer solution , 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ /30 mmol/L SDS/10 mmol/L β -CD , pH 9.0 ; sample concentration , 5 mg/L. Other conditions are the same as in Fig. 2.

Peaks : 1. pindolol ; 2. propranolol ; 3. nitrendipine ; 4. nimodipine.

2.4 2D CZE/MEKC 分离体系的优化

2.4.1 微孔直径的优化

二维毛细管的接口是二维分离的核心部分,本文采用带微孔的 PTFE 管连接两毛细管。第二维分离过程中,为从接口池中引入 MEKC 缓冲溶液,对微孔直径进行了研究。当微孔直径小于 $20\ \mu\text{m}$ 时,MEKC 缓冲液不能从接口池流入第二维毛细管,大量 CZE 缓冲液在电渗流驱动下从第一维毛细管流入第二维毛细管,影响第二维分离。当微孔直径大于 $20\ \mu\text{m}$ 时,样品在第二维的分离度和分离效率增大,但当微孔直径大于 $40\ \mu\text{m}$ 时,死体积增大,分离效率变差。只有当微孔直径($30\sim 40\ \mu\text{m}$)略大于毛细管内径($25\ \mu\text{m}$)时,接口池中的 MEKC 缓冲液才能取代 CZE 缓冲液进入第二维毛细管,分离度和分离效率达到最大。借助于显微镜,调节两根毛细管间的距离等于微孔直径。通过微孔,接口池中的缓冲溶液进入第二维毛细管,实现导电。由于仅在 PTFE 管上侧打一直径为 $30\sim 40\ \mu\text{m}$ 的微孔,样品在电场和电渗流作用下从第一维经接口转移至第二维时没有组分丢失现象。

2.4.2 N_2 压力条件的优化

在第一维分离过程中于检测端施加压力以抵消电渗流,防止 CZE 缓冲液进入第二维毛细管。当 N_2 压力小于 $30.3\ \text{kPa}$ 时,压力流小于电渗流,部分 CZE 缓冲液在电渗流驱动下进入第二维毛细管中。但当 N_2 压力大于 $32.0\ \text{kPa}$ 时,压力流大于电渗流,MEKC 管内部分缓冲溶液从 PTFE 套管的微孔处压

出。只有当 N_2 压力为 $30.3\ \text{kPa}$ 时,压力流等于电渗流,CZE 缓冲液在第一维毛细管中静止不动,阳离子分析物在第一维毛细管中根据淌度不同从阳极端向阴极端迁移。所以需在第一维分离过程中向检测端施加压力为 $30.3\ \text{kPa}$ 的 N_2 。

为确定第一维分离区带到达接口的时间,将第一维和第二维毛细管同时充满 CZE 缓冲溶液,并在检测端施加 $30.3\ \text{kPa}$ N_2 压力,根据毛细管总长($15\ \text{cm} + 25\ \text{cm}$)和峰的迁移时间(第 1 个峰和第 3 个峰的迁移时间分别为 563 和 $715\ \text{s}$)计算出第 1 个和最后 1 个区带到达接口的时间分别为 211 和 $268\ \text{s}$,从而确定开关阀门的时间。在 $211\ \text{s}$ 时关闭 N_2 调节阀,第一维分离区带在电渗流的驱动下依次进入第二维毛细管中。在这段时间内主要是接口池中的 MEKC 溶液进入第二维毛细管,由于 CZE 缓冲液的离子强度远远小于 MEKC 缓冲液,即使有少量的 CZE 缓冲液进入第二维毛细管,对后续的分没有影响。在 $268\ \text{s}$ 时,最后一个区带已进入第二维毛细管中,此时断开 K_1 接通 K_2 进行 MEKC 分离。

采用动态 pH 连接-胶束扫集法避免第一维分离的样品区带在接口处扩散。分析物在第一维毛细管中带正电荷,一旦到达接口,在 CZE 缓冲液($\text{pH}\ 3.0$)和 MEKC 缓冲液($\text{pH}\ 9.0$)的界面失去质子而堆积在两种缓冲液的界面处,中性分析物立即与 SDS 胶束和 β -CD 作用而被进一步富集。因此,尽管接口内径大于分离毛细管内径,第一维流出的样品区带经接口会部分扩散,但由于动态 pH 连接-胶束扫集双重富集技术的堆积浓缩过程起到了区带锐

化的作用,有效抵消了第一维分离区带在接口处的扩散,因而并不会使得整体二维系统的柱效受到明显的影响。如图3c所示,经二维分离得到的峰形良好,各组分分离的理论塔板数为 $(2.8 \sim 4.3) \times 10^4/m$,这表明区带由第一维进入第二维在接口处柱效和分辨率没有受到明显的影响。根据峰高浓度比,在线双重富集2D CZE/MEKC的检测灵敏度比一维CZE(见图3a)和MEKC(见图3b)提高3~6倍,检出限为0.015~0.052 mg/L,峰面积和迁移时间的相对标准偏差(RSD, $n=7$)分别为1.3%~3.6%和0.8%~1.4%。

2.5 样品测定

按照1.2节方法对尿样进行处理后,在最佳的实验条件下对空白尿样和服药后的尿样分别进行分离检测,得到的电泳谱图如图4所示。经加标确认待测组分峰,空白尿样中的成分对待测组分的分离无明显干扰。对服药后的尿样重复进样分析,考察

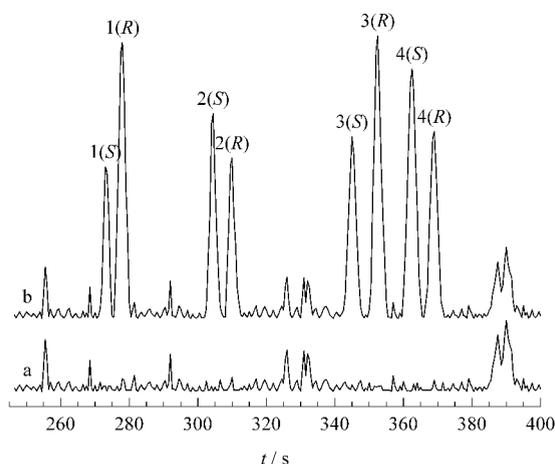


图4 (a)空白尿样和(b)服药后收集的尿样的电泳谱图

Fig. 4 Electropherograms of (a) blank urine and (b) postdosing mouse urine samples

Experimental conditions and peak identifications are the same as in Fig. 3c.

方法的重现性,测得峰面积和迁移时间的RSD($n=7$)分别为1.7%~3.8%和1.3%~4.6%,重现性良好。结果表明,该法可用于复杂样品中多组分的同时分离,分离度和峰容量远远大于一维分离。

3 结语

本文建立了一种有效的2D CZE/MEKC分离平台用于分离低相对分子质量的化合物。利用微孔接口连接两根毛细管,避免了分析物在接口处的损失,动态pH连接-胶束扫集法有效压缩了样品区带,避免了第一维分离区带在接口处扩散;采用电化学检测与二维毛细管电泳分离联用,实现了尿样中多种药物组分及其对映体的同时分离。

参考文献:

- [1] Kraly J R, Jones M R, Gomez D G, et al. *Anal Chem*, 2006, 78: 5977
- [2] Zhu C R, He X Y, Kraly J R, et al. *Anal Chem*, 2007, 79: 765
- [3] Schoenherr R M, Ye M, Vannatta M, et al. *Anal Chem*, 2007, 79: 2230
- [4] Mohan D, Paša-Toleó L, Masselon C D. *Anal Chem*, 2003, 75: 4432
- [5] Zhang M, El Rassi Z. *J Proteome Res*, 2006, 5: 2001
- [6] Yang C, Liu H, Ying Q, et al. *Anal Chem*, 2003, 75: 215
- [7] Liu H C, Tian Y, Yang C, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (刘和春, 田艳, 杨春, 等. 色谱), 2003, 21(5): 446
- [8] Liu H, Zhang L, Zhu G, et al. *Anal Chem*, 2004, 76: 6506
- [9] Liu H C, Zhang L H, Zhang W B, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (刘和春, 张丽华, 张维冰, 等. 色谱), 2005, 23(1): 52
- [10] Anouti S, Vandenabeele-Trambouze O, Koval D, et al. *Anal Chem*, 2008, 80: 1730
- [11] Anouti S, Vandenabeele-Trambouze O, Koval D, et al. *Electrophoresis*, 2009, 30: 2
- [12] Zhang Z X, Zhang M Z, Zhang S S. *Electrophoresis*, 2009, 30: 1958