

• 综述 •

毛细管电泳技术在药物分析中的应用研究进展

吴娟芳, 陈令新, 罗国安*, 王义明

(清华大学 化学系 北京 100084)

关键词: 毛细管电泳; 药物分析; 手性分离; 相互作用; 药物代谢; 金属抗癌药物

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2006)05 - 0385 - 05

Recent advances in the application of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis

WU Juan-fang, CHEN Ling-xin, LUO Guo-an*, WANG Yi-ming

(Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Key words: capillary electrophoresis; pharmaceutical analysis; chiral separation; interaction study; drug metabolism; anti-cancer metallodrug

如果以毛细管区带电泳的出现为起点,毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE) 技术的起源可以追溯到 20 世纪 60 年代中期,瑞典科学家 Hjerten^[1] 首先提出毛细管区带电泳的概念。此后,毛细管电泳技术得到飞速发展,在常规药物分析和其他药物研究中发挥着独特的作用,如以治疗为目的的某一类药物的代谢物组学、药代动力学研究、药品质量控制、生物制品、毒物及滥用药物的定性定量分析等。CE 具有高效、快速、微量、多模式、经济、自动化及洁净等优点^[2]。随着与之相关的一系列分析方法和检测联用技术的不断改进,CE 在化学、生命科学、临床医学、药学等领域得到了广泛的应用。本文就近年来该技术在国内外的发展进行综述。

1 生物样品的处理和待测成分富集

当前,分析科学的研究对象涉及到生物体液和细胞组织,如血清、尿液等样品,而不仅仅局限于模拟生理条件下的样品。直接来自生命体的样品在成

分上比较复杂,往往需要进行蛋白沉降等预处理操作。作为一种主要的分析技术,CE 的分析对象也开始从以往相对简单的分析体系逐步扩展到生物样品^[3]。样品前处理的效率直接影响到整体分析水平,一般来说,CE 技术较多配合固相萃取技术 (solid-phase extraction, SPE),简单、耗样量少^[4]。

待测成分的富集是 CE 样品前处理技术中另一个关键。纳升级进样量作为一个显著优势的同时,需要相应高灵敏度检测技术与之配套。此外,尽管 CE-MS 联用具有广阔的发展前景,但浓度灵敏度较低。最新发展了一系列的预富集方法,如柱上等速电泳富集法、样品堆积技术以及膜富集或固相富集等技术,以增强浓度灵敏度。例如 Chiang 等^[5]对比了两种毛细管电泳富集技术,采用以磷酸、SDS、二乙胺和乙腈溶液进行冲扫 (sweeping method) 的方法可检测到浓度低至 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的水平,而同时采用阳离子选择性耗尽 (cation-selective exhaustive) 进样技术和胶束电动色谱冲扫 (CSEI-sweep-MEK) 技术可以使检测限达到 $1 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2 毛细管电泳技术理论及传统电泳分离模式发展

2.1 毛细管电泳技术理论的发展 除了在分析对象和应用广度上的拓展,也有研究侧重于分离理论、

收稿日期: 2005-08-24.

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2003BA310A03); 国家自然科学基金资助项目 (20475031)。

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 10 - 62781688, E-mail: luoga@mail. tsinghua. edu. cn

人工智能优化分离参数,毛细管电泳结合动力学和热力学等理论研究。如 Trapp^[6]利用动力学色谱和毛细管电泳技术测定了速率常数,进而直接计算得到甲硫丙脯酸异构化的势垒; Muzikar等^[7]采用实验设计和人工神经网络 (artificial neural network, ANN)相结合的方法,优化了三乙醇胺铬酸盐的缓冲液,对高浓度氯离子的溶液中含有的硫酸盐进行了测定。

2.2 传统电泳分离模式发展 相对改进分离技术,发展一种全新的 CE分离模式则比较困难。当前 CE的研究热点主要集中在方法的应用,改进和不同分离模式适用性的研究。

在方法的应用、改进方面, Razak等^[8]采用缓冲液中添加环糊精的胶束毛细管电动色谱 (MEKC)来研究一种在临床上仍处于测试水平的新药 Este rom,并对药物中的主要成分进行分离; Sterbova等^[9]用优化的 MEKC分析了五味子 (*Schisandra chinensis*)植物样品中木脂素,得到了较好的分离效率; Lin等^[10]发现 OAC (ofloxacin acyl chloride)是一种潜在的含发色团的试剂,可以方便的用其标记不含发色团的含氨基药物,进而用于毛细管区带电泳紫外检测。

在不同模式适用性的研究中, Leonard等^[11]比较了毛细管区带电泳 (CZE),非水毛细管电泳 (NACE), MEKC, MEEKC等电泳模式,指出只有 MEEKC模式在优化的电泳条件下能完成 16种 HIV蛋白酶抑制剂 (共有 8对光学异构体)的分析; Lim等^[12]比较了 CZE, MEKC和毛细管电色谱 (CEC)在分离 6种结构相似的鸦片剂麻醉药物的情况,结果表明 CEC具有最大分离效率。

3 CE-MS联用检测技术

当前, CE的检测通常由紫外、二极管阵列或激光诱导荧光等检测器来完成。近年来,由于质谱 (MS)能提供更为丰富的有关相对分子质量和分子结构的信息,已经成为 CE的最重要的检测技术之一, CE-MS联用技术得到很大的发展。CE-MS联用中,主要离子化手段有快原子轰击 (FAB)和电喷雾电离 (ESI)离子化;而毛细管电泳的分离模式则主要集中在 CZE, MEKC,毛细管凝胶电泳 (CGE)和毛细管等速电泳 (CITP)等。

3.1 CE-MS接口技术 CE-MS联用的关键问题是 CE和 MS的接口技术。当前主要采用无鞘接口、液体接界和鞘式液体接界等接口技术^[13]。此外还发展了其他一些接口技术,如 CF-FAB(连续流快原子

轰击)接口技术^[14]。

3.2 CE-MS联用在核酸成分分析中的应用 CE能完成高效的分离任务,而 MS则能以高选择性和高灵敏度提供样品的相对分子质量和分子结构特征信息,因此, CE-MS联用在分析核酸时显示了极大优势。Cai等^[15]用 CE-MS结合时间分段程序 (time-segment program)同时分析了药物 Ziagen(含核苷)及其磷酸化的代谢产物。此外,还有用 CE-MS联用技术对 DNA加合物、寡核苷酸等进行分析。

3.3 CE-MS在其他药物分析中的应用 CE-MS联用技术也在传统药物研究中得到了广泛的应用^[16]。Visky等^[17]采用 CE-MS对加兰他敏氢溴酸盐胶囊中所含杂质进行分析。Liu等^[18]用 CE-ESI-MS/MS对粉防己生物碱进行分离鉴定。

CE-MS虽然发展很快,但是现阶段,该技术的应用广度离常规定量检测还有很大距离。主要问题是:较低的样品利用率以及由此产生的较弱的浓度灵敏度;与 LC-MS相比有更大的检测波动性;分离灵敏度过于依赖样品基底离子强度等^[19]。解决这些问题必将是 CE-MS联用技术发展的重点,也将是将 CE-MS推向常规检测的关键。

4 CE应用热点

在药物分析领域,毛细管电泳的分析任务纷繁复杂,分离对象各不相同。近两年来,研究热点主要可以概括为 4个方面:手性分离、相互作用、药物代谢和抗癌金属药物研究。下面将对这 4方面的问题做一简要概述。

4.1 手性分离 手性药物分离和纯度检验是药物研究和制药工业的关键任务,也是毛细管电泳在药物分析领域发展的重点。

早期就已报道了不少有关手性药物分离的实例^[20,21],近期, Szoko等^[22]用羟丙基甲基-β-环糊精作为手性选择剂,用 CE分析了药物对映异构体,并进行了药物的体外代谢研究; Foulon等^[23]对芳香化酶抑制剂——N-咪唑衍生物进行手性分离,并考察了包括手性选择剂的性质等分离参数对分离的影响; Perez-Maseda等^[24]采用单/双环糊精为缓冲体系,分析一种新型抗炎药物 COX-2的对映体异构体纯度等。上述例子表明,如何选择适当的手性选择试剂以完成手性拆分是这类问题的关键。

4.2 药物代谢研究 药物代谢有很多研究方向,如药物的体内、体外代谢物组学研究、药物在细胞、组织、体内整体传输及药代动力学研究等^[25-27]。

进行药代动力学的研究,要求相应的检测技术

能在生物基底的干扰下仍对被分析物有较好的定性定量分析能力。CE在药代动力学研究中有独特优势:如与色谱手性分离柱相比,CE技术对生物样品中手性药品的分离显得更为经济、方便;但另一方面也存在一些问题,如需要发展一系列更为有效、简便及耗样量少的方法对生物样品进行前处理,解决基底干扰问题^[41]。

4.3 金属抗癌药物研究 CE-MS联用技术在金属抗癌药物研究中发挥着重要作用。主要研究对象涉及铂类、钌类等抗癌药物及其代谢产物,研究任务涉及分离分析、生物药物稳定性评价、潜在抗癌金属药物和生物分子(核苷酸、DNA片断、DNA、氨基酸等)相互作用研究等。如Wamke等^[28]用CZE-MS分离并鉴定了顺铂和DNA的复合物;Zenker等^[29]在模拟生理条件下用CZE研究了5'-GMP与顺铂相互作用的动力学特征;Timeraev等^[30]用CE-ICP/MS技术研究了铂类药物与人血清白蛋白的相互作用。

20世纪90年代以后,这个方向的研究得到了很大进展,但是还存在着一些值得关注的问题。如研究多局限在模拟生理条件下,而直接涉及生物体内金属药物的代谢、生理转化过程和结合性质的研究还很少;另外,由于分析技术发展水平本身的制约,对生物基质(体液、癌细胞基质、组织提取液等)的研究也相对缺乏。将来的研究方向很可能会从抗癌药物和DNA的相互作用研究扩展到药物和血液成分,如血清蛋白、白蛋白、脱铁转铁蛋白等大分子的相互作用^[31]。

4.4 分子相互作用研究 分子间相互作用的研究可以从如下5种毛细管电泳法中选择:区带毛细管电泳(CZE)、亲和毛细管电泳(ACE)、前沿分析法(FA)、Hummel-Dreyer分析法(HD)和空峰法(VP)。研究的相互作用体系则涉及到蛋白-蛋白相互作用体系,蛋白-DNA/RNA作用体系,蛋白-碳水化合物作用体系,蛋白-小分子作用体系,DNA-小分子作用体系,小分子-小分子作用体系。用于计算结合常数的模型,主要有适于非协同作用中等至强相互作用体系的Scatchard模型以及由它进一步推导得到的Klotz模型,存在协同作用的McGhee-von Hippel模型,此外还有同时适于弱、中等和高强度作用体系的Kendler模型等。毛细管电泳对相互作用体系分析可得到各类热力学和动力学常数^[32]。涉及相互作用研究的例子相对比较多,发展也比较早^[33-35]。近来也有很多这方面研究的报道,如Xia等^[36]研究了鱼腥草素钠与 β 环糊精的包络常数等。

前沿分析法(FA)在相互作用研究中占有很大比例。FA主要应用于药物和生物分子间相互作用的研究,如用FA测定药物(华法林、维拉帕米、普萘洛尔)和血浆蛋白(人血清白蛋白、 α_1 酸糖蛋白和脂蛋白)等相互作用^[37]。

5 毛细管电泳新技术

5.1 毛细管电色谱技术 毛细管电色谱(capillary electrochromatography, CEC)是融合CE和HPLC的又一类分析技术。按分离原理,可以把CEC列为CE的一种具体应用模式。

CEC技术的发展,借鉴了HPLC的梯度洗脱等技术,分析对象扩展至蛋白、多肽类药物、中药复杂成分。其中柱(包括填充毛细管柱和柱塞)制备技术是CEC研究的一个重要领域,可以说该技术直接决定了CEC应用的广度。主要有如下几类柱制备技术:开管柱、填充柱、整体铸型(包括基于氧化硅的整体铸型、基于聚合物整体铸型、基于粒子固定化的整体铸型)技术^[38]。

手性分离技术是CEC在近来发展中的一个重点。在过去的几年里,发展用作对固定相修饰的手性选择剂成为该研究领域的焦点。如采用环糊精及其衍生物、手性蛋白质等固定相修饰技术。另外,分子印迹技术的发展给制备手性分离柱提供了全新的思路。

基于亲和作用的固定相技术和其他新型技术也得到了发展。Fu等^[39]采用亲水相互作用CEC法测定了人血清中8种碱性药物,并对分离条件进行了优化;Yu等^[40]巧妙的将内皮素受体过量表达的整体细胞(CHO,中国大鼠卵巢细胞)固定到毛细管内作为固定相,对内皮素的配体进行分离分析,得到了较好的结果,为亲和CEC研究提供了新的思路。

5.2 微芯片毛细管电泳(microchip electrophoresis)技术 微芯片毛细管电泳技术以其微型化、高效的特点为分析工作者所钟爱,并显示了巨大的发展潜力,其制作技术(包括一系列的接口技术)也不断成熟^[41-43]。关键问题仍集中于微型化、集成化、高通量和接口设计等几个方面^[44,45]。已经有很多该技术的应用实例报道。如Rodriguez等^[46]在微芯片上采用MEKC模式高效分离了FITC标记的氨基酸对映异构体等。

6 展望

在今后一段时期内,毛细管电泳在药物分析方面的发展趋势还会集中在上述的4个方面;分析对象则会由简单模拟生命体系逐步扩展到包括体液、

细胞 组织等在内的复杂生物样品体系。生物样品分析必然要求进一步发展复杂样品前处理和富集技术,更灵敏的检测技术及与质谱联用出现的一系列问题,如接口技术、样品利用率、浓度灵敏度、检测波动性。此外,CEC和微芯片毛细管电泳以其经济、微型、高效的优势将在今后的发展中逐步占据更大的比例,成为推动毛细管电泳技术迈向常规检测技术的重要力量。

References

- [1] Hjerten S. Free zone electrophoresis [J]. Chromatogr Rev, 1967, 9: 122 - 219.
- [2] Chen Y. Capillary Electrophoresis Techniques and Application (毛细管电泳技术及其应用) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000: 5 - 7.
- [3] Wen J, Lu F, Yin XP. Application of capillary electrophoresis in analysis of cell and its components [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2004, 39: 566 - 570.
- [4] Lin CC, Li YT, Chen SH. Recent progress in pharmacokinetic applications of capillary electrophoresis [J]. Electrophoresis, 2003, 24: 4106 - 4115.
- [5] Chiang HY, Sheu SJ. Analysis of ephedra-alkaloids using sweeping and cation-selective exhaustive injection and sweeping micellar electrokinetic chromatography methods [J]. Electrophoresis, 2004, 25: 670 - 676.
- [6] Trapp O. Direct calculation of interconversion barriers in dynamic chromatography and electrophoresis: isomerization of captopril [J]. Electrophoresis, 2005, 26: 487 - 493.
- [7] Muzikar M, Havel J, Macka M. Capillary electrophoresis determinations of trace concentrations of inorganic ions in large excess of chloride: soft modeling using artificial neural networks for optimization of electrolyte composition [J]. Electrophoresis, 2003, 24: 2252 - 2258.
- [8] Razak JL, Doyen HJ, Lunte CE. Cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography for the analysis of Esterom, a topical product consisting of hydrolyzed benzoylcegonine in propylene glycol [J]. Electrophoresis, 2003, 24: 1764 - 1769.
- [9] Sterbova H, Sevcikova P, Kvasnickova L, et al. Determination of ligands in *Schisandra chinensis* using micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. Electrophoresis, 2002, 23: 253 - 258.
- [10] Lin FM, Kou HS, Wu SM, et al. An ionizable chromophoric reagent for the analysis of primary amine-containing drugs by capillary electrophoresis [J]. Electrophoresis, 2005, 26: 621 - 626.
- [11] Leonard S, Van Schepdael A, Ivanyi T, et al. Development of a capillary electrophoretic method for the separation of diastereoisomers of a new human immunodeficiency virus protease inhibitor [J]. Electrophoresis, 2005, 26: 627 - 632.
- [12] Lim JT, Zare RN, Bailey CG, et al. Separation of related opiate compounds using capillary electrochromatography [J]. Electrophoresis, 2000, 21: 737 - 742.
- [13] Banks JF. Recent advances in capillary electrophoresis/electrospray/mass spectrometry [J]. Electrophoresis, 1997, 18: 2255 - 2266.
- [14] Caprioli RM. Continuous-Flow Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry [M]. Chichester: John Wiley & Sons, 1990: 1 - 27, 121 - 136.
- [15] Cai ZW, Fung EN, Sinhababu AK. Capillary electrophoresis-ion trap mass spectrometry analysis of Ziagen and its phosphorylated metabolites [J]. Electrophoresis, 2003, 24: 3160 - 3164.
- [16] Smyth WF. Recent applications of capillary electrophoresis electrospray ionisation-mass spectrometry in drug analysis [J]. Electrophoresis, 2005, 26: 1334 - 1357.
- [17] Visky D, Jimidar I, Van Ael W, et al. Capillary electrophoresis-mass spectrometry in impurity profiling of pharmaceutical product [J]. Electrophoresis, 2005, 26: 1541 - 1549.
- [18] Liu RM, He FY, Sun AL. Separation and identification of alkaloids in *Stephania tetrandra* by capillary electrophoresis electrospray-MS/MS [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2004, 39: 363 - 366.
- [19] Willems AV, Deforce DL, Van Peteghem CH, et al. Analysis of nucleic acid constituents by on-line capillary electrophoresis-mass spectrometry [J]. Electrophoresis, 2005, 26: 1221 - 1253.
- [20] Yu J, Wang YM, Luo GA. Chiral separation of ofloxacin enantiomers by capillary electrophoresis [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1997, 32: 203 - 206.
- [21] Rui JZ, Zhou XD, Lin SS, et al. Simultaneous determination of the enantiomers of verapamil and norverapamil in plasma by high performance capillary electrophoresis [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1998, 33: 517 - 522.
- [22] Szoko E, Tabi T, Borbas T, et al. Assessment of the *N*-oxidation of deprenyl, methamphetamine, and amphetamine enantiomers by chiral capillary electrophoresis: an *in vitro* metabolism study [J]. Electrophoresis, 2004, 25: 2866 - 2875.
- [23] Foulon C, Danel C, Vaccher MP, et al. Chiral separation of *N*-imidazole derivatives, aromatase inhibitors, by cyclodextrin-capillary zone electrophoresis. Mechanism of enantioselective recognition [J]. Electrophoresis, 2004, 25: 2735 - 2744.
- [24] Perez-Maseda C, Calvet C, Cuberes R, et al. Determination of enantiomeric purity of a novel COX-2 anti-inflammatory drug by capillary electrophoresis using single and dual cyclodextrin systems [J]. Electrophoresis, 2003, 24: 1416 - 1421.
- [25] Prost F, Thomann W. Capillary electrophoresis to assess drug metabolism induced *in vitro* using single CYP450

- enzymes (SupersomesTM): application to the chiral metabolism of mephenytoin and methadone [J]. Electrophoresis, 2003, 24: 2577 - 2587.
- [26] Breadmore MC, Thomann W. Capillary electrophoresis evidence for the stereoselective metabolism of itraconazole in man [J]. Electrophoresis, 2003, 24: 2588 - 2597.
- [27] Malek AH, Khaledi MG. Monitoring liposome-mediated delivery and fate of an antisense, drug in cell extracts and in single cells by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence [J]. Electrophoresis, 2003, 24: 1054 - 1062.
- [28] Wamke U, Gysler J, Hofte B, et al. Separation and identification of platinum adducts with DNA nucleotides by capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis coupled to mass spectrometry [J]. Electrophoresis, 2001, 22: 97 - 103.
- [29] Zenker A, Galanski M, Berüter TL, et al. Kinetics of binding properties of 5'-GMP with cisplatin under simulated physiological conditions by capillary electrophoresis [J]. J Chromatogr B, 2000, 745: 211 - 219.
- [30] Timerbaev AR, Aleksenko KS, Polec-Pawlak K, et al. Platinum metalloid-drug-protein binding studies by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: characterization of interactions between Pt(II) complexes and human serum albumin [J]. Electrophoresis, 2004, 25: 1988 - 1995.
- [31] Hartinger CG, Timerbaev AR, Keppler BK. Capillary electrophoresis in anti-cancer metalloid drug research: advances and future challenges [J]. Electrophoresis, 2003, 24: 2023 - 2037.
- [32] He XY, Ding YS, Li DZ, et al. Recent advances in the study of biomolecular interactions by capillary electrophoresis [J]. Electrophoresis, 2004, 25: 697 - 711.
- [33] Wang QG, Wang YM, Luo GA. Capillary electrophoresis immunoassay [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1998, 33: 396 - 400.
- [34] Wang QG, Wang YM, Luo GA, et al. Determination of the binding constant between progesterone and its monoclonal antibody using affinity capillary electrophoresis [J]. Chin J Anal Chem (分析化学), 2000, 28: 731 - 734.
- [35] Wang QG, Luo GA, Yeung WSB. Determination of the binding constant between bovine serum albumin and its monoclonal antibody by affinity capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection [J]. Chem J Chin Univ (高等学校化学学报), 1999, 20: 1551 - 1553.
- [36] Xia ZN, Xiang SF, Li ZY, et al. Inclusion constant of sodium houthuyfonate and β -cyclodextrin measured by capillary electrophoresis [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2003, 38: 42 - 45.
- [37] Ostergaard J, Heegaard NHH. Capillary electrophoresis frontal analysis: principles and applications for the study of drug-plasma protein binding [J]. Electrophoresis, 2003, 24: 2903 - 2913.
- [38] Gubitz G, Schmid MG. Recent advances in chiral separation principles in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography [J]. Electrophoresis, 2004, 25: 3981 - 3996.
- [39] Fu HJ, Jin WH, Xiao H, et al. Determination of basic pharmaceuticals in human serum by hydrophilic interaction capillary electrochromatography [J]. Electrophoresis, 2004, 25: 600 - 606.
- [40] Yu HM, Tseng MJ, Fang JM, et al. Capillary electrophoresis using immobilized whole cells with overexpressed endothelin receptor for specific ligand screening [J]. Electrophoresis, 2004, 25 (7-8): 1034 - 1041.
- [41] Jin Y, Luo GA, Tang YH, et al. Microfabrication of integrated capillary electrophoresis chips and on-chip sample injection and separation [J]. J Anal Sci (分析科学学报), 2001, 17: 148 - 152.
- [42] Jin Y, Luo GA. Fabrication and application of an interface to couple microfluidic chips with electrospray ionization mass spectrometer [J]. Anal Instrum (分析仪器), 2003, 2: 4 - 10.
- [43] Jin Y, Luo GA. Fabrication of the microfluidic chips with integrated ultra-micro electrodes and its application in on-chip electrochemical detection [J]. Chem J Chin Univ (高等化学学报), 2003, 24: 1180 - 1184.
- [44] Jin Y, Wen T, Wang YM, et al. Development and application of the detection technologies of integrated capillary electrophoresis chips [J]. Mod Sci Instr (现代科学仪器), 2001, 4: 15 - 17.
- [45] Jin Y, Luo GA, Wang RJ. Development of integrated capillary electrophoresis chips [J]. Chin J Chromatogr (色谱), 2000, 18: 313 - 317.
- [46] Rodriguez I, Jin LJ, Li SFY. High-speed chiral separations on microchip electrophoresis devices [J]. Electrophoresis, 2000, 21: 211 - 219.