

·综述·

毛细管电泳生物样品预处理技术

范国荣¹ 胡晋红¹ 林梅² 安登魁²

(1)第二军医大学附属长海医院临床药理研究室,上海 200433;中国药科大学药物分析教研室,南京 210009)

摘要 毛细管电泳(CE)已越来越成为分析体内生物样品中药物及其代谢物的常规方法。CE生物体内药物分析中的一个重要步骤是复杂生物样品中微量药物的纯化和浓集预处理过程。本文综述了常用的CE生物样品预处理方法,包括生物样品直接或稀释后进样、蛋白沉淀、液液萃取与固相萃取、微量样品在线浓集、微透析与电透析技术等,并介绍了相关的典型实例。

关键词 毛细管电泳;体内药物分析;生物样品预处理

1 概述

毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)是基于高压电场为驱动力,在细内径毛细管中对阳离子、中性分子、阴离子按其淌度或分配系数不同进行高效、快速分离分析的一种新技术。八十年代初,由于Jorgenson和Lukacs的出色工作,为CE奠定了理论基础,展示了CE高效分离、快速分析、微量检测、操作简便、费用低廉的优异特点,引起国际分析化学界、生物医药界的浓厚兴趣和高度重视^[1,2]。

新兴的CE是以电泳强有力分离机理与色谱成熟的毛细管柱制备技术及自动化的操作优势相结合的产物。与二十多年来一直作为定性定量分离分析首选方法的高效液相色谱(HPLC)技术相比,无论从效率、速度、样品用量及分析成本来说,CE都充分显示了分离模式多、分析速度快、分离效能好、分析费用省的技术优势,成为当今分析化学领域的一项前沿技术^[3]。CE的独特优势促进了CE技术的高速发展和广泛应用。CE已经从发展初期零星、分散和探索性的技术准备阶段,进入了一个全面发展的黄金时期,涉及CE实际应用的论著正以爆炸性的速度增加,研究领域早已跨越技术发展初衷的生物大分子分离分析界限,日益向深

度和广度扩展。随着生命科学和生物医药研究的不断深入,CE在生物大分子分离、手性对映体拆分、无机离子检测、有机药物分析特别是生物体内药物分析方面显示出前所未有的技术优势和应用价值^[2~4]。

2 毛细管电泳体内分析基本方法

由于生物样品复杂的干扰背景和大量蛋白质成份的存在以及待测样品组分本身的浓度限制,使CE分离分析生物样品必须满足灵敏度高、专属性强的特点。因此,如同色谱方法一样,CE生物体内药物分析应该包括一步或多步的样品预处理过程,目的是使最后进样分析的样品相对纯化和浓集,增进分离重现性,提高检测灵敏度。

CE生物样品预处理相对比较简单,因为它无需考虑柱的损害问题;而且几乎所有的现有生物样品预处理方法均已在CE生物样品分析中获得了广泛应用。为了适合微量样品的纯化浓集,CE样品柱上在线浓集技术也得到了迅速的发展和成功的应用,以避免离线样品预处理方法可能引起的待测组分丢失现象,同时也进一步提高了CE的检测灵敏度。

目前,提高CE生物体内药物分析灵敏度主要有两条途径:一是采用样品浓集技术包括柱前离线

浓集和柱上在线浓集,一是发展高灵敏的检测器场放大堆积^[5]是 CE常用的柱上浓集技术,即在进样前先在毛细管进样口引入一段短的稀缓冲液水柱,基于样品离子的电泳速度与电场强度成正比的事实,使样品塞中离子堆积在高浓度的缓冲液界面上,从而大大降低 CE浓度检测限。发展高灵敏度检测器一直是 CE仪器改进的方向,采用高能量光源和改变在线检测池的材料或性状等方法有助于增进光学检测器包括紫外-可见光和荧光检测的检测灵敏度;选择特异性的柱后检测手段如电化学检测和质谱检测更是极大地提高微量待测样品的检测灵敏度。

一切有效的生物样品预处理方法在纯化与浓集微量待测组分、提高检测灵敏度的过程中,不可避免地会造成定量误差;同时电迁移进样由于其固有的歧视效应^[6],在生物样品不稳定电导的情况下更是严重影响 CE分离分析的重现性。因此,要实现 CE生物药物定量检测,必须选择合适的内标物。以内标法处理定量信息 A_i/t_{mi} (迁移时间校正峰面积)和定性信息 t_{mi} ,一定程度上可以消除 CE每次进样分析由于进样电压、进样时间、样品电导堆积水柱、焦耳热效应等因素造成的进样量误差和迁移时间波动,以及峰速度歧视甚至于毛细管内壁吸附引起的电泳峰面积差异和迁移时间变化,有助于 CE体内药物检测满足定性定量分析方法所要求的精密度指标,并基本接近 HPLC定性定量分析的重现性水平,使 CE逐步成为分析体内生物样品中药物及其代谢物的常规方法。

3 生物样品预处理技术及其应用

3.1 直接进样

对于高浓度的生物样品,在一个具有足够检测灵敏度的 CE系统中,采用直接进样或稀释后进样也是完全可能的。尿样、血浆、血清及唾液离心过滤后直接进样 CE分离测定的方法及应用已被研究^[7]。其基本操作步骤是:生物样品或稀释液经 1500 r/min 或高速离心,上清液用 0.2 μ m 或 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,取续滤液进样分析。尿样直接进样明显的好处是避免复杂的样品预处理步骤,一般仅需要简单的稀释或水解过程。如果尿样直接进样,则必须采用高浓度的缓冲液,以实现 CE的高效分离。Li 等对尿液中 80 ng/ml 右美沙芬及其代

谢物右啡烷进行 CE定量分析,经酶水解后直接进样 15 nl,样品区带几乎占整个毛细管柱 10% 的容积,但选择 0.175 mol/L 硼酸缓冲液,其场放大堆积效应使电泳分离效能超过 300000 塔板数^[8]。

血样直接进样的主要困难是高浓度蛋白质的存在,但稀释后的血清直接进样进行 CZE分离还是可行的。如果运行缓冲液浓度较高(0.1 mol/L 硼酸溶液),对于待测组分含量较高的血清样品则可以多倍稀释(如 10 倍),从而保证待测组分的迁移时间和分离效能相对稳定。同时,每次血样直接进样后毛细管柱的有效冲洗也是十分必要的,其中以含有 SDS 的缓冲液冲洗柱子可以很好地除去管壁吸附的蛋白质,并使电泳柱在短时间内达到平衡^[9]。基于表面活性剂 SDS 能够结合并溶解蛋白,阻止蛋白质在毛细管内壁吸附,Nakagwa 等首次将 MECC 成功地应用于血浆样品直接进样分析^[10]。Schm wtz 等还以血浆样品直接进样方法比较了不与血浆蛋白结合的乙琥胺、血浆蛋白结合率约 50% 的戊巴比妥及血浆蛋白结合率大于 99% 的萘普生的 MECC 结果,SDS 胶束的作用可使血浆蛋白变性而释放结合的药物,以至于高蛋白结合率的药物也能被定量检出^[11]。

3.2 蛋白沉淀

生物样品除蛋白步骤是预处理过程的重要部分,其中在血浆或血清中加入合适的蛋白变性试剂使蛋白质沉淀的方法,有助于使变性蛋白释放结合状态的药物,以保证检测生物样品中的药物总量。常用的 HPLC 生物样品预处理蛋白沉淀试剂包括有机溶剂、强酸、强碱和无机盐类,但对于 CE 分离分析而言,一些无机盐包括强酸、强碱由于沉淀蛋白效率相对较差,其大体积添加不仅稀释了样品浓度,而且易引起 CE进样样品上清液电导增大,显著影响体内微量组分的分离度和检测限。而选择有机溶剂特别是乙腈应用于 CE生物样品预处理,它既可以除蛋白、释放蛋白结合药物、提高疏水性待测组分的溶解度,更重要的是在保证用于 CE 分析的样品上清液有足够电导的前提下,使沉淀过程中被稀释的微量药物通过使用相对高电导的运行缓冲液以达到柱上场放大堆积浓集的效果。Shihabi 研究认为,1.5 体积的乙腈处理 1 体积的血浆样品是 CE 生物样品预处理蛋白沉淀的最佳方法^[12]。如果将样品预处理后的上清液吹干浓集,则

可以进一步提高 CE体内分析的检测灵敏度^[13]。

3.3 液液萃取与固相萃取

延用色谱技术中样品预处理的液液萃取与固相萃取,是目前 CE常用的生物样品离线纯化浓集技术

液液萃取和固相萃取方法从生物样品中分离提取待测组份具有一定的选择性,这种选择性可以通过改变萃取溶剂的极性及固定相特征和洗脱剂性能来获得,其中,分步固相萃取操作还可以将几组性质不同的药物依次分离萃取^[14]。液液萃取和固相萃取的共同特点是使生物样品中高浓度的无机盐在萃取过程中除去,且最终得到的待测组份浓度通常为初始样品的 10~100倍,弥补了 CE常用紫外检测器灵敏度低的缺陷,对于许多药物,甚至采用紫外检测器也可使最低检测限达到 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ ^[15]。但液液萃取和固相萃取方法操作时间较长,又不适合处理微体积样品

最近, van der Vlis 等将电场施加在液液萃取系统的两相界面,进行液液电萃取 (liquid-liquid electroextraction) 操作,不仅极大地提高离子组份的萃取效率,而且可以实现以小体积缓冲液来迅速萃取浓集大体积有机溶剂中待测组份的目的^[16]。Soini 等结合传统固相萃取和电驱动洗脱,提出了一种电色谱固相萃取 (electrochromatographic solid-phase extraction) 方法^[17]。在 C₈固相小柱两端施加 150 kV 电压,0.5 ml 西米替丁血清样品可用 50 μl 洗脱液来收集,萃取回收率可达 93%,待测组份浓集 10~15倍。

3.4 微量样品在线浓集技术

3.4.1 固相萃取在线浓集 由于离线样品预处理方法都可能丢失待测组份,而且生物样品量越小,样品预处理越困难。因此, Guzman 等首次将固相萃取技术应用于 CE的在线样品富集,用填充结合抗体的玻璃球浓集器置于分离毛细管前端,成功地实现了尿液中脱氧麻黄碱的在线浓集和 CE分离分析^[18]。最近 Strausbauch 研究小组^[19]报道了制作简便固相萃取-CE在线浓集装置的方法。他们用直径相匹配的聚乙烯或 Teflon 小管接合分离毛细管,其中填充 50~100 nl 的反相色谱 C₈或 C₈填料,并以少量玻璃纤维封口。浓集样品采用压力进样 (0.5 psi \times 1.0 min), 40~100 nl 的乙腈-稀盐酸混合液洗脱,灵敏度的增强可以简单地通过浓集样品量 (1~100 nl) 和洗脱溶剂量的比值来确定。

参考 HPLC 柱切换方法, Debets 等还设计了一个带有微量固相预柱的旋转进样切换阀,以液相色谱泵驱动大体积样品液柱前浓集,切换阀旋转后电渗流解吸进行正常 CE 分离分析,检测罂粟碱灵敏度可提高 2~3 个数量级^[20]。

3.4.2 等速电泳在线浓集 等速电泳与其它 CE 分离模式不同,它具有独特的电解质系统,即前导电解质和尾随电解质。在等速电泳中,低浓度样品组份将遵循 Kohlrausch 调整函数,使其浓度适合前导离子浓度水平,从而使样品区带产生强浓缩作用,是目前 CE 分离分析一种理想的微量样品在线浓集技术。采用等速电泳与 CE 两级在线连接进行浓集与分离,可分为对接式耦合和套接式耦合两种方式,其浓缩因子可达 100~1000 倍^[21]。但是,二者共同存在着装置复杂、操作繁琐的问题,而且 CE 分离过程易受等速电泳系统的影响,造成电泳分离分析重现性差。为此, Foret 等提出了 CE 单柱短暂等速电泳浓集方法,通过大体积进样和等速电泳浓集降低了 CE 的浓度检测限,使其分析灵敏度增加两个或更高的数量级^[22]。但是, CE 单柱等速电泳浓集也有不足之处,过长的进样塞占用了分析毛细管的有效长度,使 CE 分离度受到影响。因此,为了保证大体积进样的等速电泳浓集与 CE 分离的正常进行,使 CE 真正实现高效分离、灵敏检测,在等速电泳过程中,采用反向平衡推力以保证堆积区带位于分离毛细管进样口,是十分有效的措施^[23]。

3.5 微透析与电透析技术

微透析技术起源于二十世纪七十年代,是一种利用膜透析原理,微量地对生物体液进行流动性连续采样的新技术,具有样品纯净、取样量少、可实现在线进样分析等特点,目前已发展成为药理学、临床医学、药代动力学和生物药剂学等方面研究的重要工具^[24]。微透析取样装置主要由注射泵、微透析探针、连接管和收集器组成。微量注射泵流速一般只有 0.5~5 $\mu\text{l}/\text{min}$,探针常用长度仅为 0.5~10 mm,决定了微透析取样量少、回收率低,同时也对定量检测方法提出了更高的要求。具有高效分离、快速分析、微量进样和灵敏检测优势的 CE 目前已成为微透析取样较为合适的分析手段,其中在线联用的微透析-CE 装置已成功地实现了活体动物血浆、全血、脑组织以及皮下组织中微量药物的定量检测^[25-27]。

生物体液中微透析取样仅仅是一种按浓度梯度逆向扩散而无选择性的动态过程,没有外力作

用,低的回收率一般仅为20%~30%,因而不可能具有样品浓集效应。Buscher等将一高电场加在透析膜两侧,使待测组份不仅沿浓度梯度扩散,而且还选择性地电迁移通过透析膜,建立了电透析(electrodialysis)方法,并与CE易于实现在线联用^[28]。电透析装置由唐南(donor)室和接收室组成,按静态或动态二种方式操作,同时透析膜两侧电导差异有助于增进待测组份的浓集。电透析-CE已成功地应用于血浆中三磷酸腺苷和植酸酶水解培养液中肌醇的分离分析。

参考文献

- Jorgenson JW, Lukacs KD. Zone electrophoresis in open tubular glass capillaries. *Anal Chem*, 1981, **53**: 1298
- Landers JP. *Handbook of Capillary Electrophoresis* (2nd ed). CRC Press, 1997
- 范国荣,林梅,张正行等.三氟乙酰伯氨喹合成产品高效毛细管电泳分析与高效液相色谱分析的比较研究.中国药科大学学报,1996,27(3): 175
- Landers JP. Clinical capillary electrophoresis. *Clin Chem*, 1995, **41**(4): 495
- Song JZ, Chen HF, Tian SJ, et al. Determination of metformin in plasma by capillary electrophoresis using field-amplified sample stacking technique. *J Chromatogr*, 1998, **708**: 277
- Huang XH, Gordon MJ, Zare RN. Bias in quantitative capillary zone electrophoresis caused by electrokinetic sample injection. *Anal Chem*, 1988, **60**: 377
- Thormann W, Lienhard S, Wernly P. Strategies for the monitoring of drugs in body fluids by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J Chromatogr*, 1993, **636**(1): 137
- Li S, Fried K, Wainer IW, et al. Determination of dextromethorphan and dextrophan in urine by capillary zone electrophoresis application to the determination of debrisoquin-oxidation metabolic phenotype. *Chromatographia*, 1993, **35**: 216
- Lloyd DK, Watzig H. Sodium dodecyl sulfate solution is an effective between-run rinse for capillary electrophoresis of samples in biological matrices. *J Chromatogr*, 1995, **663**: 400
- Nakagawa T, Oda Y, Shibukawa A, et al. Electrokinetic chromatography for drug analysis: Separation and determination of cefpiramide in human plasma. *Chem Pharm Bull*, 1989, **37**: 707
- Schmutz A, Thormann W. Assessment of impact of physico-chemical drug properties on monitoring drug levels serum by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct sample injection. *Electrophoresis*, 1994, **15**: 1295
- Shihabi ZK. Sample matrix effects in capillary electrophoresis. II. Acetonitrile deproteinization. *J Chromatogr*, 1993, **652**: 471
- Brunner LJ, Dipiro JT, Feldman S. Serum antipyrene concentrations determined by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J Chromatogr*, 1993, **622**: 98
- Wernly P, Thormann W. Drug of abuse confirmation in human urine using stepwise solid-phase extraction and micellar electrokinetic capillary chromatography. *Anal Chem*, 1992, **64**: 2155
- Luksa J, Josic DJ. Determination of cimetidine in human plasma by free capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr*, 1995, **667**: 321
- van der Vlis E, Mazereeuw M, Tjaden UR, et al. Combined liquid-liquid electroextraction and isotachophoresis as a fast on-line focusing step in capillary electrophoresis. *J Chromatogr*, 1994, **687**: 333
- Soini H, Tsuda T, Novotny MV. Electrochromatographic solid-phase extraction for determination of cimetidine in serum by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J Chromatogr*, 1991, **559**: 547
- Guzman NA, Trebilcock MA, Advis JP. The use of a concentration step to collect urinary components separated by capillary electrophoresis and further characterization of collected analytes by mass spectrometry. *J Liq Chromatogr*, 1991, **14**(5): 997
- Strausbauch MA, Madden BJ, Wettstein PJ, et al. Sensitivity enhancement and second dimensional information from the SPE-CE analysis of entire HPLC fractions. *Electrophoresis*, 1995, **16**: 541
- Debets AJJ, Mazereeuw M, Voogt WH, et al. Switching valve with internal micro precolumn for on-line sample enrichment in capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr*, 1992, **608**: 151
- Stegehus DS, Tjaden UR, van der Greef J. Analyte focusing in capillary electrophoresis using on-line isotachophoresis. *J Chromatogr*, 1992, **591**: 341
- Foret F, Szko E, Karger BL. Trace analysis of proteins by capillary zone electrophoresis with on-column transient isotachophoretic preconcentration. *Electrophoresis*, 1993, **14**: 417
- Reinhoud NJ, Tjaden UR, van der Greef J. Automated isotachophoretic analysis focusing for capillary zone electrophoresis in a single capillary using hydrodynamic back pressure programming. *J Chromatogr*, 1993, **641**: 155
- Lunte CE, Scott DO, Kissinger PT. Sampling living systems using microdialysis probes. *Anal Chem*, 1991, **63**: 773A
- Tellez S, Forges N, Roussin A, et al. Coupling of microdialysis with capillary electrophoresis: a new approach to the study of drug transfer between two compartments of the body in freely moving rats. *J Chromatogr*, 1992, **581**: 257
- Hogan BL, Lunte SM. On-line coupling of in vivo microdialysis sampling with capillary electrophoresis. *Anal Chem*, 1994, **66**: 596
- Zhou JX, Heckert DM, Zuo H, et al. On-line coupling of in vivo microdialysis with capillary electrophoresis/electrochemistry. *Anal Chim Acta*, 1999, **379**: 307
- Buscher BAP, Tjaden UR, van der Greef J. On-line electrodialysis-capillary zone electrophoresis of adenosine triphosphate and inositol phosphates. *J Chromatogr*, 1997, **764**: 135