

• 药理学 •

高效毛细管电泳在临床药理中的应用

王建 刘会臣 侯艳宁(白求恩国际和平医院临床药理室 石家庄 050082)

摘要 目的:总结近年来高效毛细管电泳技术在临床药理学中的应用。方法:从高效毛细管电泳的类型、特点、原理及在治疗药物监测及样品分析等方面进行综述。结果:介绍了该项技术在治疗药物监测和样品分析中的优势、前景及诊断治疗方面的价值。结论:该项技术值得在临床药理工作中大力推广。

关键词 高效毛细管电泳; 药物监测; 样品分析

高效毛细管电泳(high performance capillary electrophoresis, HPCE)是近年来发展起来的一种分离、分析技术,它是凝胶电泳技术的发展,是高效液相色谱分析的补充。该技术可分析的成分小至有机离子、大至生物大分子如蛋白质、核酸等。可用于分析多种体液样本如血清或血浆、尿、脑脊液及唾液等,HPCE分析高效、快速、微量^[1]。根据其分离样本的原理设计不同主要分为以下几种类型:①毛细管区带电泳(capillary zone electrophoresis, CZE);②毛细管等速电泳(capillary chromatography, CITP);③毛细管胶速电动色谱(micellar electrokinetic capillary chromatography, MECC);④毛细管凝胶电泳(capillary gel electrophoresis, CGE);⑤毛细管等电聚焦(capillary isoelectric focusing, CIEF)。目前CZE和MECC用得较多,本文以这两种方法为例来说明HPCE的原理。

1 HPCE的特点及原理

1.1 HPCE的仪器组成

1.2 CZE的基本原理

HPCE选用的毛细管一般内径约为50 μm (20~200 μm),外径为375 μm ,有效长度为50cm(7~100cm)。毛细管两端分别浸入两分开的缓冲液中,同时两缓冲液中分别插入连有高压电源的电极,该电压使得分析样品沿毛细管迁移,当分离样品通过检测器时,可对样品进行分析处理。HPCE进样一般采用电动力学进样(低电压)或流体动力学进样(压力或抽吸)两种方式。

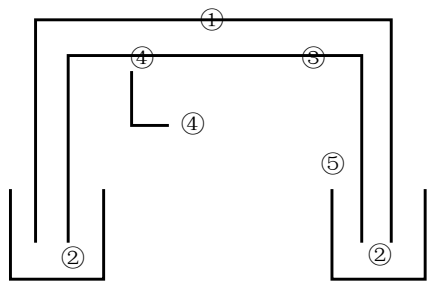


图1 HPCE的5个主体构件示意图
①高压电源 ②电极槽和电极 ③毛细管柱
④检测器和信息处理装置 ⑤进样端

在毛细管电泳系统中,带电溶质在电场作用下发生定向迁移,其表观迁移速度是溶质迁移速度与溶液电渗流速度的矢量和。所谓电渗是指在高电压作用下,双电层中的水合阴离子引起流体整体地朝负极方向移动的现象;电泳是指在电解质溶液中,带电粒子在电场作用下,以不同的速度向其所带电荷相反方向迁移的现象。溶质的迁移速度由其所带电荷数和分子量大小决定,另外还受缓冲液的组成、性质、pH值等多种因素影响。带正电荷的组份沿毛细管壁形成有机双层向负极移动,带负电荷的组份被分配至毛细管近中区域,在电场作用下向正极移动。与此同时,缓冲液的电渗流向负极移动,其作用超过电泳,最终导致带正电荷、中性电荷、负电荷的组份依次通过检测器。

1.3 MECC的基本原理

MECC是在CZE基础上使用表面活性剂来充当胶束相,以胶束增溶作为分配原理,溶质

在水相、胶束相中的分配系数不同,在电场作用下,毛细管中溶液的电渗流和胶束的电泳,使胶束和水相有不同的迁移速度,同时待分离物质在水相和胶束相中被多次分配,在电渗流和这种分配过程的双重作用下得以分离。MECC是电泳技术与色谱法的结合,适合同时分离分析中性和带电的样品分子^[2]。

2 HPCE 在治疗药物监测中的应用

临床药物测定,样品多为血清、血浆、尿液或唾液,因而需要进行样品预处理,其处理方式分两类:一类为直接进样即用乙腈除去蛋白质干扰,或将样品离心用微孔滤膜过滤,取滤液直接进样。另一类为萃取法,一般沿用色谱分析中的液相萃取和固相萃取。

2.1 抗肿瘤药的 HPCE 监测

目前已对多种药物进行了 HPCE 监测^[3],如抗肿瘤药氨甲喋呤先经固相萃取,HPCE 分离后用激光激发荧光检测器(LIF)测定,其检测限可达 0.1~1nmol/L;用 CZE 分析血浆中表阿霉素、阿霉素及其异构体,可以直接进样,分析时间短(5~10min),检测限可达 125~250ng/L;测定血浆中的阿糖腺苷,需经萃取后进样,对浓度为 8 μ mol/L 的阿糖腺苷测定发现,其批内和批间变异系数分别为 9.1% 和 12.3%。

2.2 催眠镇静药的 HPCE 监测

催眠镇静类药物临床应用范围广,品种多,易发生药物依赖性,且中毒剂量与治疗剂量接近,因此常需要监测血药浓度。HPCE 分离效率高,最低检测限可达几个 ng/L。采用的技术主要是 MECC 和 CZE,分析的该类药物主要有巴比妥类、苯并二氮 类、抗癫痫药、三环类抗抑郁药及其多种代谢产物,进行该类药物分析时常用的阴离子表面活性剂为十二烷基硫酸钠(SDS),一般选择的浓度在 50~75mmol/L 范围;常用的阳离子表面活性剂为十二烷基三甲基溴化铵(DTAB)。有报道称一次能分离多达 32 种不同类型的药物(阿片类、巴比妥类、苯并二氮 类等),一般说来,一次可分析同类型 6~7 种药物。

2.3 其它常用药物的 HPCE 监测

HPCE 适应于多种临床常用用药的检测,如抗生素类药物阿扑西林可以不需进行样品的前处理,直接以血浆样品进样,但缓冲液中加入 SDS 可减少蛋白的管壁吸附。头孢类抗生素先锋霉素经服可被胃肠菌分解为 5 种代谢物,所以可用 HPCE 监测先锋霉素及其代谢产物;盐酸黄酮哌酯,又称泌尿灵,是抗平滑肌痉挛药物,能缓解泌尿结石病人的疼痛,取病人尿液作 MECC 测定,样品前处理简单,检测限可达 200 μ g/L;氨茶碱为治疗哮喘、早产儿窒息等疾病的常用药,监测该类药常用 MECC 法,取血清、唾液或尿液样品,以直接方式进样多波长测定,药物测定的线性范围为 10~200 μ mol/L,药物浓度在 25~110 μ mol/L 范围时有较好的精确度^[4];环孢菌素 A(CsA)为一种作用于 T 淋巴细胞的强力免疫抑制剂,采用 MECC 分离模式,以酮康唑为内标,建立了适合 CsA 临床治疗监测的定量分析方法^[5],评价结果表明:CsA 的平均萃取回收率为 78.79%,平均方法回收率为 97.96%,浓度检测限为 0.5ng/ml,质量检测限为 1.819fg,3 例器官移植病人 CsA 血药浓度,经 HPCE 分析,其结果与临床常规检测 TDx 方法比较,实验数据相关性良好。

2.4 违禁药物的 HPCE 监测

HPCE 可对违禁药物、毒品进行测定,如鸦片、海洛因、可卡因等并且还能检测出人体头发中的微量可卡因和吗啡。镇痛类药物如美沙酮可用 CZE 测病人尿液中该药及其代谢物的含量,直接用尿样进样分析时间少于 6min,且不受其他代谢物的干扰^[6]。

2.5 部分中枢神经系统药物中毒的快速筛选

吴惠芳等^[7]建立了高效毛细管电泳系统分析法,分析体液样品中 29 种 CNS 药物,作为 CNS 药物中毒的快速筛选方法。血、尿样品中用有机溶剂萃取,胃液直接进样。用酸、弱碱和中性 3 组缓冲液体系进行电泳分离。以组分与电渗流迁移时间之比的相对迁移时间和紫外吸收光谱为定性指标。最低检测浓度 0.5~5 μ g/ml。在此法基础上可增加分析品种。该方法用于实际中毒样品分析,证实所建方法操

作简便、分析时间短、杂质干扰小。

3 HPCE 在药物分析中的应用

近来 HPCE 在药物分析中有着广泛的应用, 由于该法的分析时间比 HPLC 短、成本低, 进样方式简单等优点, 所以越来越受到人们的关注。其中 MECC 可同时分析带电和中性的药物混合样品, 若在缓冲液中加入适当浓度的改性剂(如甲醇、乙醇、丙酮等)可增加样品组分的溶解力, 扩大 MECC 的应用范围, 改善分离效果, 缺点是延长迁移时间。在药物分析中最常用的技术是 MECC 和 CZE 技术, MECC 和 CZE 技术是以自由溶液为载体, 配制方便, 按照样品分析的要求, 只要改变载体的组成等就可以适用于多种样品的分析, 如原料药、多种混合物、药物纯度控制、药物复方制剂、多肽或蛋白质药物、生物样品、代谢物分离。如电解质载体中选用环糊精可用于手性化合物分离; 选用 SDS 可适用于大多数水溶性药物; 选用胆汁盐可用于脂溶性药物的分离; 由于自由溶液中水及大多数电解质在紫外区无吸收, 可选用 210nm 的波长, 因此可适用于绝大多数药物的分离及定量分析; 由于进样量少, 分离效能高, 灵敏度高, 可用单细胞胞浆的直接分析。

展望: HPCE 技术自 80 年代以来得到迅速发展, 在分析化学和生物医药学中已有广泛应用, 应用最多的是药物分析, 特别在混合组份中

药分析分离中表现出其独特的优势, 使在临床体液标本的测定方面一直处在研究和探索阶段, 主要表现在测定标本的范围不断扩大, 测定分析条件的不断完善。预计随 HPCE 自动分析仪的推广和应用, HPCE 分析技术会逐渐为包括临床药理在内的临床实验室的常规测试所接受, 以改善现有的测定技术。

参考文献

- 1 罗国安, 王义明. 毛细管电泳的原理及应用. 色谱, 1995, 13(4): 254
- 2 D Hulst A, Verbeke N. Quantitation in chiral capillary electrophoresis theoretical and practical considerations. Electrophoresis, 1994, 15(6): 854
- 3 Tomlinson AJ, Benson LM, Johnson KL, Naylor S. Investigation of drug metabolism using capillary electrophoresis with photodiode array detection and online mass spectrometry equipped with an array detector. Electrophoresis, 1994, 15(1): 62
- 4 Johansson IM, Gron Rydberg MB, Schmekel B. Determination of theophylline in plasma using different capillary electrophoretic systems. J Chromatogr, 1993, 652(2): 487
- 5 胡晋红, 范国荣, 张诗龙. HPCE 在环孢菌素 A 临床治疗监测中的应用. 中国临床药理学杂志, 1997, 6(1): 13
- 6 Molieni S, Caslavka J, Allemann D et al. W. Determination of methadone and its primary metabolite in human urine by capillary electrophoretic techniques. J Chromatogr B Biomed Appl, 1994, 658(2): 355
- 7 吴惠芳, 关福玉, 罗毅. 体液中 29 种中枢神经系统药物的高效毛细管电泳系统分析方法. 药理学报, 1997, 32(5): 377

(收稿: 1998-09-07)

一氧化氮对动脉压力感受性反射的作用

刘卫华南(解放军第 88 医院 山东泰安 271000)

关键词 一氧化氮; 血压调节; 扩血管作用

自从阐明硝酸酯类药物通过释放作为血管内皮细胞松弛因子的一氧化氮(NO)产生其扩血管作用以来, NO 的研究深入到心血管、中枢神经、呼吸、消化、免疫系统各个方面。NO 对动脉压力感受性反射(ABR)虽然只是其心血管系统作用中一个小的方面, 但由于 ABR 在血压调节中起重要作用, 所以这一方面的研究也颇

受重视。本文旨在综述这方面研究进展, 为进一步探讨提供参考。

1 NO 的合成与释放

L-精氨酸(L-Arg)是体内合成 NO 的底物, 在 NO 合酶(NOS)的作用下, L-Arg 被氧化为 NO 和 L-瓜氨酸。NOS 分为结构型和诱导型。由结构型 NOS 催化产生的 NO 与其生