

doi:10.3969/j.issn.2095-0411.2021.02.009

# 毛细管电泳-荧光检测在药物分析中的应用

洪婷婷, 周舒文, 崔鹏飞, 邱琳, 蒋鹏举, 王建浩

(常州大学药学院, 江苏常州 213164)

**摘要:**毛细管电泳微分离技术基于其样品用量少, 分离效率高的特点, 在分离分析领域具有其独特的优势。相较于传统紫外检测, 毛细管电泳-荧光检测可实现高灵敏度的分析。围绕药物分析的应用, 着重介绍了毛细管电泳-荧光检测技术用于手性药物的分离、化学及生物药物的定量分析以及抑制剂的筛选。

**关键词:**毛细管电泳; 荧光检测; 药物分析

中图分类号: R 9

文献标志码: A

文章编号: 2095-0411(2021)02-0068-05

## Application of Capillary Electrophoresis-Fluorescence Detection for Pharmaceutical Analysis

HONG Tingting, ZHOU Shuwen, CUI Pengfei, QIU Lin, JIANG Pengju, WANG Jianhao

(School of Pharmacy, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

**Abstract:** Capillary electrophoresis technique presents tremendous advantages in separation science depending on its high efficiency and low sample consumption. Compared with traditional ultraviolet detection, capillary electrophoresis-fluorescence detection can achieve high sensitivity. This review mainly introduces the application of capillary electrophoresis-fluorescence detection for chiral separation, quantification of chemical and biological drugs and screening inhibitors.

**Key words:** capillary electrophoresis; fluorescence detection; pharmaceutical analysis

随着毛细管电泳技术的发展, 近些年来更多不同类型的分离技术包括毛细管电色谱、非水毛细管电泳、毛细管无胶筛分电泳等不断涌现<sup>[1-7]</sup>。包括毛细管电色谱、非水毛细管电泳、毛细管无胶筛分电泳等。其中, 非水毛细管电泳使用有机溶剂如甲酰胺、乙腈等为介质, 利于较高电压的运行。毛细管无胶筛分电泳中以加入水溶性高分子聚合物的缓冲溶液作为缓冲体系, 其所形成的类似凝胶的孔结构可对不同组分进行分离。由于毛细管电泳进样体积小, 有效检测光程短, 因此毛细管电泳-紫外检测的灵敏

收稿日期: 2020-06-04。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81803495)。

作者简介: 洪婷婷(1989—), 女, 安徽铜陵人, 博士, 讲师。通信联系人: 王建浩(1981—), E-mail: minuswan@cczu.edu.cn

引用本文: 洪婷婷, 周舒文, 崔鹏飞, 等. 毛细管电泳-荧光检测在药物分析中的应用[J]. 常州大学学报(自然科学版), 2021, 33(2): 68-72.

度较低。而毛细管电泳-荧光检测技术可结合毛细管电泳的高效性与荧光检测的高灵敏度,适合于复杂样品中痕量药物的分析。

手性药物分析是毛细管电泳的一项重要应用<sup>[8]</sup>。由于药物对映异构体在人体内具有不同的药理药效活性,手性药物的分离具有重要的现实意义。而毛细管电泳微分离技术基于其独特的优势为手性分析提供了很好的选择<sup>[9]</sup>。此外,毛细管电泳-荧光分析技术在药物的含量测定领域也显现出高灵敏度的优势。本文将侧重于综述毛细管电泳法在化学及生物药物定量分析中的应用,分别介绍毛细管电泳-荧光分析技术对抗肿瘤药物、利尿剂、抗体等药物进行含量测定的相关研究。接着,将进一步总结近些年来毛细管电泳-荧光分析技术用于酶抑制剂筛选和蛋白-蛋白相互作用抑制剂的筛选。

1 手性药物的分离

手性药物分离的常用技术有气相色谱法和高效液相色谱法,但其通常需要昂贵的手性固定相或相对大量的手性衍生试剂。毛细管电泳法对样品及手性选择剂的消耗量均较少,其为手性药物的分离提供了强有力的分析工具。不同种类的手性选择剂例如衍生化的环糊精、万古霉素以及冠醚等均可加入背景缓冲液中(表 1)。传统的紫外检测光谱的灵敏度较低,对被分析物进行衍生化后采用荧光分析可提高检测的灵敏度<sup>[10]</sup>。

存在于人类生命体中的氨基酸大多数为 L-型,测定人脑脊液中非正常 D-型氨基酸水平和氨基酸对映异构体的比例对神经退行性疾病的早期诊断具有一定的指导作用。对于氨基酸对映异构体的分离,可采用不同种类的荧光衍生化试剂进行修饰,例如异硫氰酸荧光素、5-羧基荧光素琥珀酰亚胺酯、4-氟-7-硝基-2,1,3-苯唑等均可用于氨基酸的衍生化<sup>[11-14]</sup>。与其他衍生化试剂相比,氯甲酸-9-芴基甲酯(FMOC)可实现更为快速的反应,其在碱性条件下能与氨基酸的伯胺、仲胺基反应,氨基酸经荧光标记后可进行荧光检测。对于 FMOC 衍生化的手性氨基酸,其需要紫外波谱范围的光作为激发光源。SOMSEN 等<sup>[15]</sup>采用毛细管电泳-荧光检测分离了 FMOC-修饰氨基酸手性药物,选用添加有十二烷基硫酸钠及  $\beta$ -环糊精的硼砂溶液作为背景缓冲液,分别对 16 种蛋白氨基酸实现了手性分离。

表 1 毛细管电泳手性拆分举例  
Table 1 The application of capillary electrophoresis for chiral separation

手性选择剂	被分离手性药物
$\beta$ -环糊精	氨基酸、 $\beta$ -受体阻滞剂、兰索拉唑
硫酸软骨素	奈福泮
万古霉素	吡唑洛芬、布洛芬、氨基酸
青霉素 G 酰基转移酶	酮洛芬、非洛洛芬

2 化学及生物药物的定量分析

毛细管电泳-荧光分析法在抗肿瘤药物的定量分析中具有重要的应用价值。蒽环霉素是一类重要的抗肿瘤药物,特别适用于治疗实体癌。蒽环霉素的定量方法主要有安培检测、紫外-可见光谱以及伏安法等,由于此类药物自身带有荧光,更利于痕量及超痕量分析,可采用胶束电动色谱-激光诱导荧光检测法进行定量<sup>[16]</sup>。研究亚细胞的药物分布对理解药物在亚细胞的运输、效能和其毒性作用具有重要的意义。抗肿瘤药物阿霉素进入细胞后,可主动或被动分布于不同的亚细胞结构中,包括细胞核、线粒体、酸性细胞器和高尔基体。阿霉素主要是在细胞核中发挥抗肿瘤作用,其作用机制为阿霉素可与 DNA 结合形成稳定的阿霉素-DNA-拓扑异构酶三元复合物,干扰 DNA 的复制,引起细胞凋亡。由于亚细胞环境对阿霉素的荧光性质会造成影响,准确测定细胞核中阿霉素的含量有较大难度。因此,建立一种有效的方法减少亚细胞环境对阿霉素荧光测定的影响对于准确评估阿霉素抗肿瘤活性具有重要意义。ARRIAGA 等<sup>[17]</sup>采用胶束电动色谱-荧光检测方法测定单核中阿霉素的浓度,由于电泳缓冲液中加入

了十二烷基磺酸钠,可避免阿霉素的荧光淬灭。该方法也可用于细胞核中其他药物的定量分析。

糖醇是醛糖或酮糖发生氢化反应的产物,其可作为有效的临床治疗药物,例如,山梨醇和甘露醇是肾衰竭病人常用的利尿剂。除此之外,病人尿液和血清中 *D*-型/*L*-型阿拉伯糖醇的比例可作为系统性真菌病的临床诊断监测指标。基于其特殊的结构特征,糖醇类药物的分离和定量具有一定难度。毛细管电泳-激光诱导荧光检测可提供一种高灵敏度的技术手段,然而该方法的应用常需要对被分析物进行衍生化处理。XIAO 等<sup>[18]</sup>提出了新型的非直接激光诱导荧光检测方法,将荧光素钠添加入硼酸盐缓冲液中,被分析物可被检测出倒峰。在电泳运行过程中,硼酸盐缓冲液能促使糖醇-硼砂复合物的形成,用于分离不同的糖醇类药物。该研究分别对缓冲液 pH、缓冲液浓度、荧光素钠浓度、有机添加剂,以及毛细管内径均进行了优化。在最优条件下,可实现对糖醇的定量分析。

对于非法滥用药物的定量分析,相较于血液和尿液样品,选用口腔液样品进行检测具有其独特的优势。对于口腔样品中药物的分析主要采用的方法为免疫分析或色谱-质谱联用。免疫分析法的局限在于易出现假阳性或假阴性结果,色谱法的应用常需要对样品进行前处理,耗时较长,而毛细管电泳法可实现快速高效的分离。因此,有研究采用便携式的毛细管电泳仪与深紫外荧光检测器连接,用于定量口腔样品中非法滥用药物可卡因、可卡乙碱、苯丙胺、3, 4-亚甲基二氧甲基苯丙胺、大麻二酚等。以 3, 4-亚甲基二氧甲基苯丙胺作为模板药物,其检测限为  $0.5 \mu\text{g/L}$ <sup>[19]</sup>。

基于重组抗体在人体内的高靶向特异性,其为靶向治疗常用的生物药物之一,建立重组抗体的结构非均质性与其功能之间的联系对于生物制药行业具有的重要意义。在药物研发和生产过程中,突变和体外的修饰会引起蛋白结构的改变,影响药效。因此,很有必要建立有效的方法用于检测和评估药物研发过程中的变异性。CHEN 等<sup>[20]</sup>采用毛细管电泳-质谱法表征完整的单克隆抗体并同时定量不同的突变体,并进一步运用毛细管电泳-荧光光谱分析了胺聚糖。经酶水解后抗体释放胺聚糖,进行标记后可分别测定每个胺聚糖峰的相对丰度。

类风湿性关节炎是一种常见的系统性自身免疫病,其影响了世界各地  $0.5\% \sim 1\%$  成年人的生活。研究表明,能特异性识别抗-核周因子和角蛋白的抗体是类风湿性关节炎的特征标志物。抗环瓜氨酸肽的抗体可用于类风湿性关节炎早期阶段的诊断,其在临床常用的检测方法为酶联免疫分析。除此之外,毛细管电泳-荧光分析为抗体浓度的测定提供了另一有效的分析手段<sup>[21]</sup>。首先,对抗原进行荧光素的标记,由于抗环瓜氨酸肽的分子质量较低,其与抗体结合形成复合物后,基于流速的差异可实现分离。该方法的建立为其他不同种类抗体的测定奠定了技术基础。

神经毒素是一类有效的镇痛药物,然而高剂量的神经毒素会引发呼吸抑制等副作用。因此,有必要建立灵敏高效的分析方法用于定量神经毒素、减小药物的累积毒性。已有科研工作者采用酶联免疫分析以及液相-质谱联用技术测定神经毒素的含量。基于毛细管电泳特殊的性质,毛细管电泳-荧光分析法适用于分析蛋白和肽段的分析。LI 等<sup>[22]</sup>对神经毒素 N-末端  $\alpha$ -氨基进行异硫氰酸荧光素的衍生化,接着采用毛细管电泳-荧光分析进行了含量测定。结果表明,所建立的方法准确度高、重现性好,并且可用于其他肽段的分析。

### 3 抑制剂的筛选

酶分析对生物催化、药物筛选以及新药发现均具有重要的研究意义。为了提高药物筛选的效能,开发快速灵敏的酶分析平台用于高通量筛选受到了科研工作者的广泛关注。例如, HUABG 等<sup>[23]</sup>制备了绿色荧光蛋白(GFP)-功能化的整体毛细管柱用于构建微酶分析平台。与颗粒填充柱相比较,整体柱可被看作是单一的多孔颗粒,其可克服填充柱中死体积大的缺点。提高填充柱传质效率的一种方式减小颗粒尺寸,然而随着颗粒间间隙空间的减小,柱渗透性变差,而整体柱结构中,流通孔道的尺寸和孔的

深度可独立控制,因此可调节该色谱柱同时获得较好的渗透性和传质。GFP 探针包含组氨酸标签和凝血酶的底物序列,其通过金属亲和力固定于整体柱中,经凝血酶的水解后可解离释放。该平台进一步应用于凝血酶抑制剂水蛭素的分析。水蛭素与凝血酶的活性位点结合后能够形成非共价复合物,以抑制凝血酶的活性。通过测定加入水蛭素后水解脱落的 GFP 荧光强度的变化可分析水蛭素的抑制能力。研究发现,随着水蛭素浓度的增高,抑制效果增强。该平台为其他多种抑制剂的筛选提供了有效的技术手段。毛细管电泳-荧光分析也可用于核酸代谢酶抑制剂的筛选<sup>[24]</sup>。

蛋白-蛋白相互作用在生物代谢、信号传导、免疫识别等多种生物过程中均扮演着重要角色,而对于蛋白-蛋白相互作用抑制剂的筛选具有重要的意义。与常用的筛选方法相比,毛细管电泳法具有其独特的优势。KANG 等<sup>[25]</sup>采用毛细管电泳-前沿分析法在天然产物中筛选蛋白-蛋白相互作用抑制剂。首先选择了抗凋亡蛋白 Bcl-X<sub>L</sub>, 5-羧基荧光素标记肽 F-Bid(配体),以及 Bcl-X<sub>L</sub>-Bid 相互作用抑制剂 ABT-263 进行预试验。在运行过程中,配体可与蛋白、蛋白-配体复合物分离,进一步可测定蛋白-配体复合物的解离常数。在加入抑制剂后,蛋白-配体复合物的形成受到抑制,电泳图谱中配体的峰高增大。本研究采用类似的方法,对一系列合成化合物及天然提取物进行了筛选。结果发现,雷酚内酯和南蛇藤醇为 Bcl-X<sub>L</sub>-Bid 相互作用有效的抑制剂。KENNEDY 等<sup>[26]</sup>利用毛细管电泳法对热休克蛋白 Hsp70 和 Bcl2-相关蛋白 Bag3 相互作用的抑制剂进行了筛选。

## 4 结 论

毛细管电泳-荧光检测为药物分析提供了有效的技术平台。对于手性药物的分离,采用不同的衍生化方法可提高检测的灵敏度。针对化学及生物药物的含量测定,本文总结了多种分析模式,包括胶束电动色谱-激光诱导荧光检测、毛细管电泳-激光诱导荧光检测、毛细管电泳-深紫外荧光检测及非直接激光诱导荧光检测。虽然已有大量文献报道毛细管电泳-荧光分析法在药物分析中的应用,其对于临床用药的指导作用仍需进一步探索。此外,毛细管电泳-荧光检测在酶抑制剂和蛋白相互作用抑制剂的高通量筛选领域也具有广阔的应用前景。

## 参考文献:

- [1]QUE A H, KONSE T, BAKER A G, et al. Analysis of bile acids and their conjugates by capillary electrochromatography/electrospray ion trap mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2000, 72(13): 2703-2710.
- [2]LAMMERHOFER M, SVEC F, FRECHET J M J, et al. Capillary electrochromatography in anion-exchange and normal-phase mode using monolithic stationary phases[J]. *J Chromatogr A*, 2001, 925(1): 265-277.
- [3]HARA T, MAKINO S, WATANABE Y, et al. The performance of hybrid monolithic silica capillary columns prepared by changing feed ratios of tetramethoxysilane and methyltrimethoxysilane[J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(1): 89-98.
- [4]ZHANG Z B, WANG F J, XU B, et al. Preparation of capillary hybrid monolithic column with sulfonate strong cation exchanger for proteome analysis[J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1256: 136-143.
- [5]WIEDER W, LUBBAD S H, TROJER L, et al. Novel monolithic poly(p-methylstyrene-co-bis(p-vinylbenzyl)dimethylsilane) capillary columns for biopolymer separation[J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1191(1): 253-262.
- [6]LIU C, DENG Q, FANG G, et al. Ionic liquids monolithic columns for protein separation in capillary electrochromatography[J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 804: 313-320.
- [7]WANG T, CHEN Y, MA J, et al. Ionic liquid-based zwitterionic organic polymer monolithic column for capillary hydrophilic interaction chromatography[J]. *Analyst*, 2015, 140(16): 5585-5592.
- [8]ZHANG Z B, WU M H, ZOU H F, et al. Recent progress of chiral monolithic stationary phases in CEC and capillary

- LC[J]. Electrophoresis, 2010, 31(9): 1457-1466.
- [9] WENG X L, BAOZ B, XING H B, et al. Synthesis and characterization of cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate silica hybrid spheres for enantioseparation of chiral-blockers[J]. J Chromatogr A, 2013, 1321: 38-47.
- [10] HAMIDI S, JOUYBAN A. Pre-concentration approaches combined with capillary electrophoresis in bioanalysis of chiral cardiovascular drugs[J]. Pharmaceutical Sciences, 2015, 21(4): 229-243.
- [11] HERRERO M, IBANEZ E, MARTIN-ALVAREZ P J, et al. Analysis of chiral amino acids in conventional and transgenic maize[J]. Anal Chem, 2007, 79(13): 5071-5077.
- [12] LIN K C, HSIEH M M, CHANG C W, et al. Stacking and separation of aspartic acid enantiomers under discontinuous system by capillary electrophoresis with light-emitting diode-induced fluorescence detection[J]. Talanta, 2010, 82(5): 1912-1918.
- [13] WAGNER Z, TABI T, JAKO T, et al. Chiral separation and determination of excitatory amino acids in brain samples by CE-LIF using dual cyclodextrin system[J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 404(8): 2363-2368.
- [14] CREAMER J S, MORAM F, WILLIS P A. Enhanced resolution of chiral amino acids with capillary electrophoresis for biosignature detection in extraterrestrial samples[J]. Anal Chem, 2017, 89(2): 1329-1337.
- [15] PRIOR A, COLIVA G, SOMSEN G, et al. Chiral capillary electrophoresis with UV-excited fluorescence detection for the enantioselective analysis of 9-fluorenylmethoxycarbonyl-derivatized amino acids[J]. Anal Bioanal Chem, 2018, 410(20): 4979-4990.
- [16] MBUNA J, KANETA T. Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for application in intracellular investigation of anthracyclines and multidrug resistance proteins[J]. Analytical Sciences, 2015, 31(11): 1121-1128.
- [17] XIONG G, CHEN Y, ARRIAGA E A. Measuring the doxorubicin content of single nuclei by micellar electrokinetic capillary chromatography with laser-induced fluorescence detection[J]. Anal Chem, 2005, 77(11): 3488-3493.
- [18] XIAO Y, LI Y, YING J, et al. Determination of alditols by capillary electrophoresis with indirect laser-induced fluorescence detection[J]. Food Chemistry, 2015, 174: 233-239.
- [19] SAAR-REISMAA P, ERME E, VAHER M, et al. In situ determination of illegal drugs in oral fluid by portable capillary electrophoresis with deep UV excited fluorescence detection[J]. Anal Chem, 2018, 90(10): 6253-6258.
- [20] CHEN C H, FENG H, GUO R, et al. Intact NIST monoclonal antibody characterization-proteoforms, glycoforms-using CE-MS and CE-LIF[J]. Cogent Chemistry, 2018, 4(1): 1-13.
- [21] NGUYEN B T, PARK M, KANG M J. Capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence (CE-LIF)-based immunoassay for quantifying antibodies against cyclic citrullinated peptides[J]. Analyst, 2018, 143(13): 3141-3147.
- [22] CHEN C, HU Y, LI F, et al. A single-label fluorescent derivatization method for quantitative determination of neurotoxin in vivo by capillary electrophoresis coupled with laser-induced fluorescence detection[J]. Analyst, 2016, 141(14): 4495-4501.
- [23] LIN L, LIU S, HUANG Y, et al. Automatic and integrated micro-enzyme assay ( $AI_{\mu}EA$ ) platform for highly sensitive thrombin analysis via an engineered fluorescence protein-functionalized monolithic capillary column[J]. Anal Chem, 2015, 87(8): 4552-4559.
- [24] GREENOUGH L, SCHERMERHORN K M, GARDNER A F. Adapting capillary gel electrophoresis as a sensitive, high-throughput method to accelerate characterization of nucleic acid metabolic enzymes[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(2): 1-11.
- [25] XU M, LIU C, KANG J. Screening of small-molecule inhibitors of protein-protein interaction with capillary electrophoresis frontal analysis[J]. Anal Chem, 2016, 88(16): 8050-8057.
- [26] JENNIFER N, GESTWICKI J E, KENNEDY R T, et al. Development of a capillary electrophoresis platform for identifying inhibitors of protein-protein interactions[J]. Anal Chem, 2013, 85(20): 9824-9831.