

[研究简报]

化合物疏水参数测定的脂质体毛细管电泳方法

董志强¹, 夏之宁^{1,2}, 蒋雪梅²

(1. 重庆大学化学化工学院药理学系, 2. 生物工程学院, 重庆 400030)

关键词 脂质体; 毛细管电泳; 疏水参数; 迭代拟合

中图分类号 O657 文献标识码 A 文章编号 0251-0790(2007)07-1273-03

脂质体是类脂分子的自组装体, 是一种由一个或多个脂双层中间包覆微水相的结构, 是生物膜的良好模型. 1995年, Zhang等^[1]首先将脂质体用于毛细管电泳(CE)并考察了不同药物与脂质体间的相互作用, 创立了新的脂质体毛细管电泳(Liposome capillary electrophoresis, LCE). 目前, LCE主要用于化合物的分离分析, 而用于测定化合物疏水参数的报道则不多见^[2,3]. 另外, 在测定疏水参数时需用疏水性极强的某种化合物作为脂质体相的标记物^[2], 以获得脂质体相的迁移时间 t_1 . 如果采用的标记物不是完全溶于脂质体相, 那么测得的疏水参数值会有偏差. 由于脂质体相标记物的疏水性强使获得 t_1 值费时. 针对这些问题, 本文采用脂质体模拟生物膜作为CE的运行介质, 探讨了一种可简单、快速获得 t_1 值的新技术, 即根据系列标准化合物在LCE中的迁移时间与其疏水参数的关系进行非线性拟合得到 t_1 值. 将该方法用于6种苯类化合物的疏水参数测定, 并对测定结果的准确性进行了比较.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂 自组装毛细管电泳仪(重庆大学化学化工学院, 0~30 kV高压输出, 紫外-可见光谱单色系统, 光电倍增探测器); 数据采集和处理: HW-2000色谱工作站(南京千谱软件有限公司); 未涂层熔融石英毛细管(内径75 μm , 总长63 cm, 有效长度50 cm, 河北永年锐洋色谱器件有限公司); AS 3120A超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); TGL-16B型台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂). 卵磷脂购于北京华清美恒天然产物技术开发有限公司; 其余试剂均为分析纯; 实验室用水为普通蒸馏水. 微孔滤膜购于上海新亚净化器件厂, 孔径分别为0.45和0.22 μm .

1.2 实验方法 脂质体溶液的配制^[4]: 取相应质量的卵磷脂于烧杯中, 用适量的氯仿溶解; 在旋转蒸发仪上减压蒸发氯仿, 卵磷脂在圆底烧瓶内形成一层磷脂膜后, 加入相应的缓冲液, 超声使得磷脂膜分散在缓冲液中. 将得到的溶液分别挤压通过孔径为0.45和0.22 μm 的滤膜各3次, 最终得到脂质体溶液. 样品的配制: 将各样品分别溶解于脂质体溶液中, 备用. 电泳前分别用0.1 mol/L NaOH、蒸馏水及电泳运行缓冲液冲洗毛细管10 min. 2次电泳间分别用蒸馏水和电泳运行缓冲液冲洗5~10 min.

1.3 LCE测定化合物疏水参数的原理 LCE是依据化合物在水相和脂质体相中分配的差异进行 $\lg P$ 值的测定, 因此与MEKC类似, LCE通过以下两式测定化合物的 $\lg P$ 值:

$$k = (t_m - t_0) / [t_0(1 - t_m/t_1)]; \quad \lg P = a \lg k + b$$

式中, k 为LCE中的容量因子, t_m 为电中性化合物的迁移时间, t_0 为电渗流标记物的迁移时间, t_1 为脂质体相的迁移时间; a 和 b 分别为 $\lg P$ 与 $\lg k$ 之间标准曲线的斜率和截距.

2 结果与讨论

2.1 脂质体的稳定性 将制备的脂质体在10000g下离心10 min, 没有发现分层现象, 说明所制备的脂质体溶液性质稳定. 由于脂质体是一种分散体系, 电场可能会对脂质体的形状及性质产生影响, 导

收稿日期: 2006-11-09.

基金资助: 国家自然科学基金(批准号: 20375051)和教育部高校青年教师奖(批准号: 教人司[2002]123)资助.

联系人简介: 夏之宁(1961年出生), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事分析化学和药物化学研究.

E-mail: chem_lab_cqu@yahoo.com.cn

致被分析物在脂质体中的分配和有效淌度发生变化, 因此对脂质体在电场下的稳定性进行了考察. 以苯酚为对象, 分别考察了 20, 18, 16, 14 和 12 kV 下苯酚有效淌度的变化. 实验结果表明, 在各电压下分别连续 5 次进样, 苯酚有效淌度的变化不大, 其 RSD 值均小于 5% ($n=5$). 因此可认为所制备的脂质体性质稳定, 可进行 LCE 的相关分析.

2.2 标准化合物与待测化合物的荷电情况 采用与脂质体溶液背景电解质相同的毛细管区带电泳 (CZE) 考察 5 种标准化化合物的有效淌度. 结果表明, 所有化合物皆与电渗流标记物二甲亚砜 (DMSO) 同时出峰, 说明这几种化合物的表观淌度与 DMSO 的淌度相同, 即有效淌度为零. 因此认为所选择的研究对象在所选定条件下呈电中性, 其它 6 种苯类待测化合物呈电中性的确认也用相同方法.

2.3 t_1 的求解以及相关性标准曲线的建立 为了简便快捷地获得 t_1 值, 本文采用数学方法, 通过利用 5 种标准化化合物的 t_m 值及其 $\lg P$ 值进行非线性拟合得到 t_1 值. 5 种标准化化合物的 LCE 谱见图 1, 通过表 1 的数据并结合 $\lg P$ 的计算公式, 运用 SPSS 13.0 统计软件拟合得到 t_1 值为 11.49 min, 标准方程为 $\lg P = 0.865 \lg k + 2.128$, $R^2 = 0.996$ (图 2). 从拟合的相关系数可以看出, $\lg k$ 与 $\lg P$ 之间存在着良好的线性相关性.

为了验证拟合得到的 t_1 值的准确性, 实验以非标记的脂质体溶液作为样品进样, 在与脂质体溶液

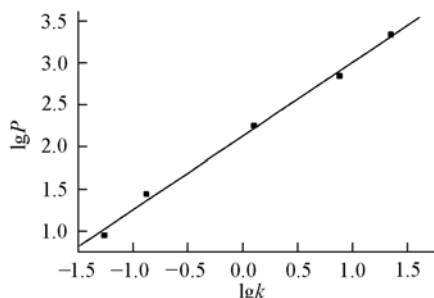


Fig. 2 Standard curve of five standard compounds by LCE

Table 1 $\lg P$, $\lg k$, measuring error range of $\lg k$ and RSD of the standard compounds*

Standard compounds	$\lg P^{[5]}$	$\lg k$ (by LCE)	The measuring error range of $\lg k$ by LCE	RSD(%, $n=5$)
Aniline	0.95	-1.32	-1.5—-1.24	0.95
Phenol	1.44	-0.95	-0.96—-0.92	0.75
α -Naphthylamine	2.25	-0.03	-0.06—-0.01	0.92
β -Naphthol	2.84	0.52	0.51—0.53	2.63
Naphthalene	3.33	0.70	0.65—0.72	2.97

* Determination system was octanol/water.

2.4 6 种苯类化合物疏水参数的测定 采用拟合得到的标准曲线对 6 种苯类化合物的疏水参数进行了测定. 为了验证拟合方法测定 $\lg P$ 值的准确性, 本文将 6 种苯类化合物通过拟合得到的 $\lg P$ 值与 LCE 测定的 $\lg P$ 值及微乳液毛细管电动色谱 (MEEKC, SDS-正庚烷-正丁醇-水微乳体系) 测定的 $\lg P$ 值以及文献值进行了比较 (表 2). 从表 2 可见, 由 LCE 拟合测得的 $\lg P$ 值与文献值和 MEEKC 测定值之差的平均值分别为 0.35 和 0.38 个对数单位, 这可能是由于测定体系的不同所造成. 而由拟合测得的 $\lg P$ 值与实验测定值之差的平均值仅有 0.07 个对数单位, 可看出迭代拟合方法是准确可行的. 从表 2 中还可以看出, 随着待测化合物的 $\lg P$ 值的减小, 拟合测得值和实验测得值与文献值的差距逐渐增大.

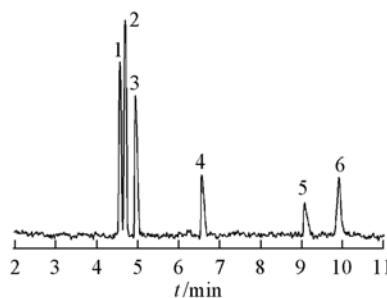


Fig. 1 LCE electropherogram of the mixture of the five standard compounds and DMSO

Operating conditions: 20 mmol/L disodium tetraborate decahydrate, 10 mmol/L sodium dihydrogen phosphate and 5 mmol/L phosphatidylcholine buffer, pH = 7; detection: 220 nm; injection: 5 s \times 18 kV; applied voltage: 18 kV. Peaks: 1. DMSO; 2. aniline; 3. phenol; 4. α -naphthylamine; 5. β -naphthol; 6. naphthalene.

背景电解质相同的 CZE 中, 测得 t_1 为 14.44 min. 通过直接测得的 t_1 值以及 5 种标准化化合物的 t_m 值 (如表 1), 得标准方程: $\lg P = 1.088 \lg k + 2.397$, $R^2 = 0.9834$. 由结果可知, 迭代得到的 t_1 值比直接测得的 t_1 值小 3 min, 这可能是由于脂质体在毛细管壁吸附的结果. 但是由迭代得到的 t_1 值所建立的标准方程的 R^2 比直接测定 t_1 值得到的 R^2 大, 这也说明了迭代拟合方法的合理性, 并且这种方法简单、快速, 缩短了分析时间.

这可能是由于待测化合物的测定误差($\Delta \lg P$)受化合物迁移时间的测定误差(Δt_m)的影响程度不同所造成^[6]. 另一方面, 对于一些疏水性强的化合物, 其几乎全部分配在脂双层内, 因此 LCE 对疏水性强的化合物的测定值与文献值相差较小. 而对于一些疏水性弱的化合物, 它们在脂质体中的分配上可能存在两种分配平衡, 这就使其在脂水两相中的分配系数与迁移行为的关系上与其它测定方法存在一定的差异, 从而造成测定差值的增大.

Table 2 $\lg P$ values measured by LCE vs. literature values and measured by MEEKC for benzenes

Compound	t_m/min	$\lg P$ (Iteration) ^a	$\lg P$ (Detection) ^a	$\lg P$ (Literature) ^a	$\lg P$ (MEEKC)	$\Delta 1^c$	$\Delta 2^c$	$\Delta 3^c$	$\Delta 4^c$	$\Delta 5^c$
Resorcin	5.10	1.23	1.20	0.80	0.76 ^{[7]b}	0.43	0.40	0.47	0.44	0.03
Benzylalcohol	5.28	1.45	1.47	1.10	1.18 ^{[7]b}	0.34	0.36	0.27	0.29	0.02
Benzene	5.69	1.73	1.80	2.17	2.21 ^{[8]b}	0.44	0.37	0.48	0.41	0.07
Toluene	7.43	2.28	2.44	2.69	2.82 ^{[8]b}	0.41	0.25	0.54	0.38	0.16
<i>o</i> -Xylene	9.85	2.87	2.95	3.16	—	0.29	0.21	—	—	0.08
Ethyl benzene	10.17	2.98	3.02	3.20	3.16 ^{[8]b}	0.22	0.18	0.18	0.14	0.04

a. $\lg P$ (Iteration): determined by iteration; $\lg P$ (Detection): determined by experiment; $\lg P$ literature was taken from ref. [5], determination system was *n*-octanol/water system. *b.* The determination system of refs. [7] and [8] was microemulsion system(SDS-heptane-butanol-water). *c.* $\Delta 1 = |\lg P(\text{Literature}) - \lg P(\text{Iteration})|$; $\Delta 2 = |\lg P(\text{Literature}) - \lg P(\text{Detection})|$; $\Delta 3 = |\lg P(\text{MEEKC}) - \lg P(\text{Iteration})|$; $\Delta 4 = |\lg P(\text{MEEKC}) - \lg P(\text{Detection})|$; $\Delta 5 = |\lg P(\text{Detection}) - \lg P(\text{Iteration})|$.

参 考 文 献

- [1] Zhang Y. X., Zhang R., Hjertén S., *et al.*. Electrophoresis[J], 1995, **16**(1): 1519—1523
- [2] Burns S. T., Khaledi M. G.. Journal of Pharmaceutical Sciences[J], 2002, **91**(7): 1601—1612
- [3] Bui H. H., Khaledi M. G.. Journal of Colloid and Interface Science[J], 2002, **253**(2): 397—401
- [4] SUN Chun-Yan(孙春燕), LI Di(李迪), WANG Mei-Jia(王美佳), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(3): 515—518
- [5] Schwarzenbach R. P., Gschwend P. M., Imboden D. M.; Translated by WANG Lian-Sheng(王连生), WANG Xiao-Dong(王晓东), WANG Bin(王斌). Environmental Organic Chemistry(环境有机化学)[M], Beijing: Chemical Industrial Press, 2004: 801—809
- [6] JIANG Xue-Mei(蒋雪梅), WEI Wei-Li(魏为力), XIA Zhi-Ning(夏之宁), *et al.*. Acta Pharmaceutica Sinica(药学报)[J], 2006, **41**(10): 1020—1024
- [7] Ishihama Y., Oda Y., Uchikawa K., *et al.*. Analytical Chemistry[J], 1995, **67**(9): 1588—1595
- [8] JIANG Xue-Mei(蒋雪梅), WEI Wei-Li(魏为力), JIANG Jun-Po(姜军坡), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(8): 1424—1429

Method Measuring of Hydrophobic Parameter of Organic Compounds via a Novel Liposome Capillary Electrophoresis

DONG Zhi-Qiang¹, XIA Zhi-Ning^{1,2*}, JIANG Xue-Mei²

(1. Department of Pharmaceutics, Institute of Chemistry and Chemical Engineering,

2. College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract Liposome capillary electrophoresis(LCE) provides a novel and facile approach for determining hydrophobic parameters($\lg P$) of organic compounds. In order to avoid the error of the migration time of liposome phase(t_1) on determination, a novel technique was developed in this paper, in which the t_1 was obtained *via* non-linearity fitting with $\lg P$ values from literatures and migration time(t_m) of a series of standard compounds. $\lg P$ values of the six benzene derivatives determined by this LCE method were compared with literature values and the ones obtained by directly determined t_1 and MEEKC. The average error between $\lg P$ values determined by two LCE methods was 0.07 logarithm units. The LCE method was simple and rapid, which can provide a new way to determine $\lg P$ of organic compounds.

Keywords Liposome; Capillary electrophoresis; Hydrophobic parameter; Iteration (Ed.: A, G)