

# 微透析与现代分析技术在线联用的研究进展

聂颖兰, 范斌\*, 闫寒, 彭娟, 郭娜

(中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 微透析技术是一种新型的实时连续活体采样技术。微透析技术与灵敏度高, 选择性好的现代分析技术的在线联用真正实现了内源性物质和体内药物的实时测定, 可有效缩短取样时间, 提高了样品的稳定性, 并能节省时间和节约成本, 提高了时间分辨率以准确观察该快速变化, 是体内药物分析的重大突破。进行微透析在线联用分析时需要综合考虑探针回收率, 灌注速度、待测物相对分子量等对探针回收率的影响, 以及分析需要的样品体积, 待测物的浓度范围, 方法的灵敏度和定量限, 分析速度等相关影响因素, 各因素之间相互联系。文章对目前应用较广的微透析与 HPLC, CE, 微芯片电泳和生物传感器等分析技术在线联用的研究进展进行综述, 重点讨论不同进样接口, 色谱柱及检测器对该联用技术的影响。

**[关键词]** 微透析技术; 在线联用; 高效液相色谱; 高效毛细管电泳

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0252-04

## Progress in the Online Coupling of *in vivo* Microdialysis with Modern Analysis Systems

NIE Ying-lan, FAN Bin\*, YAN Han, PENG Juan, GUO Na

(The Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** Microdialysis (MD) is a sampling technique that can be employed to monitor biological events continuously. When it is coupled to an sensitive and selective analytical system online, microdialysis can provide near realtime information on the time-dependent concentration changes of analytes in the extracellular space. Online systems for the analysis of microdialysis samples enable fast, selective and sensitive analysis while preserving the temporal information. It can improve the stability of the samples and save the time and cost. When developing an online assay based on microdialysis sampling, several parameters must be taken into consideration. These parameters include: the recovery of the probe, volume of sample available for analysis, concentration range of analyte in the sample, sensitivity and limit of detection of the analytical method scheme and the speed of analytical method. Analytical methods employed for online analysis include liquid chromatography (LC), capillary (CE) and microchip electrophoresis and flow-through biosensor devices. Factors that affect the online systems include the interfaces, the column and the detectors was discussed.

**[Key words]** microdialysis; online systems; high performance liquid chromatography; capillary electrophoresis

微透析 (Microdialysis, MD) 技术是从神经化学领域发展

起来的可以对内源性物质及体内药物进行实时取样的新型膜采样技术, 能够获取特定部位、特定时间神经元细胞外液。自 1972 年 Delgado 等<sup>[1]</sup>首次发表了真正意义上的关于“微透析”的文章以来, 近年来随着大量灵敏度高、选择性好的现代分析技术的出现, 微透析在医药研究中的应用呈上升趋势, 实现了活体动物体液中药物和化学递质的实时、连续、在线的检测。21 世纪末到本世纪初, 微透析取样技术实现了与色谱分析的在线联用, 并设计开发了商品化的联用设备 (CMA 及 EICOM 的在线自动联用系统)。微透析取样与色

**[收稿日期]** 2011-11-10

**[基金项目]** 中国中医科学院基本科研业务费自主选题资助项目 (222007005, 222011003)

**[第一作者]** 聂颖兰, 研究实习生, 硕士, 中药药物分析, Tel: 010-64014411-3324, E-mail: nyl100@163.com

**[通讯作者]** \* 范斌, 副研究员, 本科, 中药药物分析, Tel: 010-64014411-3324, E-mail: binf@263.net

谱分析的在线联用技术是体内药物分析方法的重大突破。该联用技术在国外已多见报道,而国内只有王丹等<sup>[2]</sup>进行过相关研究。本文就微透析与现代分析技术的在线联用的研究进展进行综述。

### 1 微透析采样技术

微透析技术已广泛应用于人体和多种实验动物,可同时进行多组织,多位点长时间连续采样,真实反映物质在体内的变化。所得透析液干净,可以直接进行样品分析,省去了繁琐的样品前处理步骤<sup>[3]</sup>。透析液的分析有两种方式:离线分析和在线联用分析。

离线分析为目前较为常见的分析方式。一定体积的透析液收集到管形瓶中,立即处理或冻存后进行测定。透析液需要经过收集、转移、封口或者一定的处理过程才能进入测定仪器中,这些过程增加了样品污染的机会。尤其对本身容易受到光照、温度、湿度等外在物理条件的影响而变质、失活的化合物,想要得到可靠、准确的实验数据难度较大。此类试验中时间分辨率取决于透析速率,待测物的相对回收率及分析方法的灵敏度。该分析方式只能反映特定时间内待测物的平均变化而无法反映其瞬时变化。

在线联用分析较离线测定有较大优势<sup>[4]</sup>。自动化的连续操作,可以有效地避免样品因在室温取样而酶解,提高了样品的稳定性,省去复杂的样品前处理及由此产生的样品损失和误差。并能节省时间和节约成本(不用处理样品,不用购买管形瓶)。许多神经递质释放的变化往往在几秒钟内完成,而较低的时间分辨率可能导致该变化由于稀释而减弱或消失。在线联用系统需要样品量较少,可有效缩短取样时间,提高了时间分辨率以准确观察该快速变化,真正实现了样品的实时测定。

### 2 影响在线联用的因素<sup>[6]</sup>

进行微透析在线联用分析时需要综合考虑探针回收率,灌注速度、待测物相对分子量等对探针回收率的影响,以及分析需要的样品体积,待测物的浓度范围、方法的灵敏度和定量限、分析速度等相关影响因素,各因素之间相互联系。

探针绝对回收率反映了探针对于采样部位的生物动力学的干扰程度。绝对回收率越高,单位时间内回收的物质越多,对组织的干扰越大。相反,在低速条件下,组织中回收的物质少,更真实反应了组织内细胞外液的浓度情况,增加了实验的可信度<sup>[5]</sup>。因此,为了减小实验过程中对组织的干扰,选择一个适当的灌注速度是很重要的。当灌注速度很小时,探针内外的溶液有相对更多的时间达到一个平衡,其相对回收率就高。传统的微透析灌注速度在 $0.5 \sim 2.0 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ,小分子物质的相对回收率一般在 $10\% \sim 40\%$ ,而灌注流速为 $100 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时相对回收率可接近 $100\%$ 。

所需透析液体积与所选择仪器方法的检测灵敏度有关。例如流速灌注为 $1 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ,样品浓度为 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 级,如果分辨时间为 $1 \text{ min}$ ,则要求仪器检测限为 $1 \text{ pmol}$ 。如果检测限为 $10 \text{ pmol}$ 或更高浓度,则需要增加样品量( $10 \mu\text{L}$ ),分辨时间将增加至 $10 \text{ min}$ 。

在大多数在线联用的情况下,时间分辨率与分析时间有关,在尽可能获得完整色谱峰的同时,也要考虑最大限度的提高微透析的时间分辨率。如果分析时间较变化持续时间长,变化将在下次进样时体现。如果分析时间较变化持续时间短,则可实时进行监测。

### 3 微透析与现代分析技术的在线联用

**3.1 微透析-HPLC 在线联用** HPLC 是与微透析系统结合的首选分析方法。联用系统包括 HPLC 泵,在线进样器,色谱柱,检测器,及数据处理系统。在线进样器为实现 MD-HPLC 联用的核心部件。传统的六通阀进样需要对样品进行分流,损失部分样品信息。Steele 等<sup>[7]</sup>比较双六通阀和八通阀进样装置,两者均不需对样品进行分流,无样品信息损失,适用于药动学研究,八通阀的进样重现性较双六通阀高。王丹等<sup>[2,8]</sup>构建了微透析与高效液相色谱联用技术平台并成功地将其应用到中药经皮给药的体内药动学与代谢研究中。采用十孔自动进样阀,首先将透析液储存于定量环中,然后借助电力将其注入到色谱柱中。该平台能够依次连续地装载样品,并按照预先设计好的时间间隔注入到高效液相色谱分析系统中。能同时对 2 只以上实验动物进行考察;能同时联接两台 HPLC 进行工作。该装置精密度、重现性、稳定性均优于离线装置。这是国内第一台自行构建并投入实用的在线联用装置,为推动这一新技术在我国的广泛应用奠定了基础。

色谱柱通常选用毛细管柱和微孔柱,流速低,死体积小,减少流通池体积避免混合和色散,减少峰展宽。微孔柱优点为进样量少,可进行低流速灌注,减少待测物的稀释,相对提高了检测限。McLaughlin 等<sup>[9]</sup>比较了微孔柱和常规柱分析 Tirazepam,微孔柱分析时间仅为 $14 \text{ min}$ ,常规柱则需 $23 \text{ min}$ ,分析时间大大缩短。Mathy 等<sup>[10]</sup>采用微孔柱测定血中和皮肤中氟康唑,分析时间由 $40 \text{ min}$ 缩短至 $24 \text{ min}$ 。毛细管柱通常应用于质谱检测,样品需求量少,有助于离子化,提高质谱检测限。Liu Y 等<sup>[11]</sup>采用 UPLC, $2 \mu\text{m}$ 毛细管柱对透析液中 5-HT 进行测定,样品在 $1 \text{ min}$ 内出峰,且所需样品量仅为 $500 \text{ nL}$ 。

LC 检测器的选择与待测物的性质有关,紫外(UV)检测器主要用于药动学研究,电化学检测器主要用于儿茶酚胺类及某些具有氧化还原特性的生物样品分析,而荧光检测器(FLD)多需要对样品进行衍生化。Tsai TH 等<sup>[12-14]</sup>利用在线 MD-微孔柱 HPLC 与多种检测器联用系统进行了大量药物体内药代动力学研究。C. S. Chaurasia 等<sup>[15]</sup>采用 MD-HPLC-ECD 同时监测了清醒自由活动大鼠体内单胺类神经递质及其代谢产物的含量变化。Yoshitake 等<sup>[16]</sup>采用 MD-微孔柱 HPLC-FL 系统,柱后衍生化法在线测定鼠脑中五羟色胺含量。

最敏感的检测方法为 HPLC-MS。MS 较其他 HPLC 检测器的优点是<sup>[17]</sup>:①保留时间和相对分子质量可同时检测;②检测来源于母离子的子离子,提供了灵敏高效的分析;③基线的漂移最低,系统可迅速平衡(HPLC-ECD 的平衡至少要 $24 \text{ h}$ ,并且稍有改变,波动很大,需重新平衡)。④大大缩短了检测时间。Shackman 等<sup>[18]</sup>采用 LC-MS 检测乙酰胆碱,检

测限为 8 amol。

**3.2 微透析-CE 在线联用 高效毛细管电泳法 (HPCE)** 具有微量、高效及高分辨等特点, HPCE 的进样体积只需要 1 ~ 10 nL, 且对样品的预处理要求低, 可用于极少量样品的分离并可获得较高的分离效率 ( $> 1\ 000\ 000/m$ )<sup>[19]</sup>, 在采用 HPLC 样品分离度较差, 尤其是针对手性样品时, CE 往往能够得到较满意的分离度。CE 的发展及其在微透析中的应用已有多篇相关综述<sup>[20-21]</sup>。CE 的定量检测能力可用预浓缩样品 (浓缩或传统萃取) 或者采用高灵敏度的检测方法如激光介导荧光法 (LIF), MS/ESI, MALDI-TOF, ECD 等联用来加强。

MD-CE 在线联用的重要因素是进样接口。最早有关该系统在线联用的报道是 Hogan 等<sup>[22]</sup> 使用纳升进样阀作为接口, 透析液首先在进样环处收集, 使用一种特殊的 transfer line 将样品从进样阀转移至分离毛细管的入口处, 该系统成功用于血液中抗肿瘤制剂的研究。相似的系统<sup>[23]</sup> 进行在线 NDA/CN 衍生来监测脑内天冬氨酸和谷氨酸的释放的研究。J. Zhou 等<sup>[24]</sup> 建立 MD-CE-ECD 系统用来进行烟碱的经皮给药监测, 采用碳纤维工作电极和毛细管柱前醋酸纤维素减波装置来避免高压对动物的影响, 持续监测尼古丁透皮吸收贴片经皮给药 24 h 内皮内烟碱的浓度, 该研究时间分辨率为 10 min。

Lada 等<sup>[25]</sup> 使用流速控制接口代替进样阀来实现进样过程, 该接口降低灌流速度, 时间分辨率为 65 ~ 85 s, 成功地进行脑内多种神经递质的分离和定量。Bowser 和 Kennedy<sup>[26]</sup> 设计了鞘流池系统通过降低荧光背景和激光散射来提高灵敏度 (15 倍), 成功地实现了氨基酸的分离。Li Z 等<sup>[27]</sup> 采用微透析采样, CE-LIF 方法测定透析液中多种氨基酸水平变化, 时间分辨率为 15 s, 实现了真正意义上的实时监测。Shou M<sup>[28]</sup> 建立了微透析-胶束电色谱-LIF 在线联用测定鼠脑中多巴胺浓度变化, 检测限为  $2\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 纹状体多巴胺基线浓度为  $(18 \pm 3)\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $n = 12$ )。该方法可准确测定纹状体内多巴胺浓度, 有效地将给药可卡因后纹状体内多巴胺水平与行为学变化相联系。且电泳图中可检测 60 多种峰, 暗示该方法可同时测定其他多种物质体内变。

**3.3 微透析与其他分析技术在线联用** 微芯片电泳是近年来发展起来的一项联用仪器。可在芯片上完成样品衍生化, 样品量仅需 nL ~ pL, 分析迅速, 检测器可整合入芯片, 便于实现系统小型化。联用的主要挑战是收集透析液的管路与分析芯片的连接及在线自动快速有效的衍生化方法。最早由 Huyhn 等<sup>[29]</sup> 建立联用方法。由碱石灰玻璃焊接的双 T 通道设计, 采用 Microtight 连接微透析和芯片系统, 通过控制门极电压进样, 微透析样品分段进入电泳分离通道进行分析, 成功用于  $\beta$ -L 乳糖苷酶活性的监测。Sandlin ZD 等<sup>[30]</sup> 采用柱前 OPA 衍生, LIF 测定麻醉大鼠体内氨基酸含量, 由 Upchruch fitting 连接毛细管 (用于连接探针出口) 和芯片, 门控进样程序持续监测, 时间分辨率为 2 ~ 4 min。

生物传感器与微透析系统联用 (on-line biosensors) 的主要部分是酶电极, 可以特异地与透析液中的待物反应, 并被检测器检测, 可实现适时分析测定。传统的传感器由于基于

非分离原理, 通常只能对一种物质进行检测。Toshio Yao 等<sup>[31]</sup> 建立六通自动切换进样阀流动进样传感器系统, 包含三种酶电极检测器, 在线实时连续测定鼠脑中多种神经递质。

#### 4 结语

微透析与现代分析技术联用在体内各种内源性物质及外源性药物实时检测方面相比其他取样检测技术具有明显的优势。能够明显减少取样操作对实验动物正常状态的影响, 使得测得的结果最接近所测物质在体内的真实状态; 能够实现连续实时取样和实时检测, 更能明确所测物质在同一个体内的变化过程; 免除了样本前处理过程, 减少了外界操作对样本的影响, 并避免了样本的浪费; 现代分析技术的高灵敏度保证了检测结果的可信。

目前, 国内针对微透析技术的应用主要还局限于与现代分析技术的离线联用分析应用, 多用于实验动物体内神经递质的测定<sup>[32]</sup>, 而在药物的分布和代谢动力学方面及作为给药或治疗手段的应用的应用鲜有少见报道。由于探针透析膜的限制, 该技术在在大分子物质、脂溶性物质应用方面还存在一定局限性<sup>[4]</sup>。商品化的在线联用仪器由于应用成本较高是限制了该技术在国内外广泛的应用的一个重要因素。另外, 为微透析技术本身操作的要求较高、商品探针成本高也是制约该技术在各领域应用的因素。

#### [参考文献]

- [1] Delgado J M, Defeudis F V, Roth R H, et al. Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys [J]. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1972, 198(1): 9.
- [2] 王丹, 石力夫, 胡晋红, 等. 微透析联用反相高效液相色谱对大鼠皮肤葛根素的药代动力学研究 [J]. 分析化学研究简报, 2008, 36(10): 1391.
- [3] 张英丰, 吴阳, 汪小根, 等. 关于微透析法与血药浓度法的异同及其药动学数据特殊处理的探索与思考 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 276.
- [4] 张英丰, 汪小根, 吴阳, 等. 微透析技术进行药动学研究的发展趋势及局限性探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 270.
- [5] Pradyot Nandi, Susan M Lunte. Recent trends in microdialysis sampling integrated with conventional and microanalytical systems for monitoring biological events: A review [J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 651(1): 1.
- [6] 罗汀, 郭义, 王秀云. 微透析校正的相关问题和方法 [J]. 生物技术通讯, 2004, 15(2): 182.
- [7] Steele K M, Lunte C E. Microdialysis sampling coupled to on-line microbore liquid chromatography for pharmacokinetic studies [J]. J Pharm Biomed Anal, 1995, 13(2): 149.
- [8] 王丹. 微透析液相色谱联用的构建及在经皮药动学研究的应用 [D]. 上海: 第二军医大学, 2009: 5.
- [9] McLaughlin K J, Faibushevich A A, Lunte C E. Microdialysis sampling with online microbore HPLC for

- the determination of tirapazamine and its reduced metabolites in rats[J]. *Analyst*,2000,125 (1):105.
- [10] Mathy F X, Vroman B, Ntivunwa D, et al. Online determination of fluconazole in blood and dermal rat microdialysates by microbore high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B; Anal Technol Biomed Life Sci*, 2003,787 (2):323.
- [11] Liu Y, Zhang J, Xu X, et al. Capillary ultrahigh performance liquid chromatography with elevated temperature for sub-one minute separations of basal serotonin in submicroliter brain microdialysate samples [J]. *Anal Chem*,2010,82(23):9611.
- [12] Chang Y L, Chou M H, Lin M F, et al. Determination and pharmacokinetic study of meropenem in rat bile using on-line microdialysis and liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*,2002,961 (1):119.
- [13] Liu S C, Tsai T H. Determination of diclofenac in rat bile and its interaction with cyclosporin a using on-line microdialysis coupled to liquid chromatography [J]. *J. Chromatogr B; Biomed Appl*, 2002,769 (2):351.
- [14] Tsai T H, Kao H Y, Chen C F. Measurement and pharmacokinetic analysis of unbound cephaloridine in rat blood by on-line microdialysis and microbore liquid chromatography [J]. *Biomed Chromatogr*, 2001, 15 (2):79.
- [15] Chaurasia C S, Chen C E, Ashby C R. *In vivo* on-line HPLC-microdialysis; simultaneous detection of monoamines and their metabolites in awake freely moving rats [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1999,19 (3/4):413.
- [16] Yoshitake T, Iizuka R, Kehr J, et al. Determination of serotonin in microdialysis samples from rat brain by microbore column liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection [J]. *J Neurosci Methods*, 2001,109 (2):91.
- [17] 王俏. 脑乙酰胆碱分析技术研究进展 [J]. *西北药学杂志*,2007,22(1):43.
- [18] Shackman H M, Shou M, Cellar N A, et al. Microdialysis coupled on-line to capillary liquid chromatography with tandem mass spectrometry for monitoring acetylcholine *in vivo* [J]. *J Neurosci Methods*, 2007,159 (1):86.
- [19] Guihen E, Hogan A M, Glennon J D. High-speed microchip electrophoresis method for the separation of (R,S)-naproxen [J]. *Chirality*, 2009,21(2):292.
- [20] 高现朝,马宏伟. HPCE 法分析百合多糖的单糖组成 [J]. *中国实验方剂学杂志*,2009,15(8):27.
- [21] Lapainis T, Sweedler J V. Contributions of capillary electrophoresis to neuroscience [J]. *J Chromatogr A*, 2008,1184(1/2):144.
- [22] Hogan B L, Lunte S M, Stobaugh J F, et al. Online coupling of *in vivo* microdialysis sampling with capillary electrophoresis [J]. *Anal Chem* 1994,66 (5):596.
- [23] Zhou S Y, Zuo H, Stobaugh J F, et al. Continuous *in vivo* monitoring of amino acid neurotransmitters by microdialysis sampling with online derivatization and capillary electrophoresis separation [J]. *Anal Chem*, 1995,67 (3):594.
- [24] Zhou J, Heckert D M, Zuo H, et al. Online coupling of *in vivo* microdialysis with capillary electrophoresis/electrochemistry [J]. *Anal Chim Acta*, 1999, 379 (3):307.
- [25] Lada M W, Vickroy T W, Kennedy R T. High temporal resolution monitoring of glutamate and aspartate *in vivo* using microdialysis online with capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection [J]. *Anal Chem*,1997,69 (22):4560.
- [26] Bowser M T, Kennedy R T. *In vivo* monitoring of amine neurotransmitters using microdialysis with on-line capillary electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 2001, 22 (17):3668.
- [27] Li Z, Zharikova A, Bastian J, et al. High temporal resolution of amino acid levels in rat nucleus accumbens during operant ethanol self-administration: involvement of elevated glycine in anticipation [J]. *J Neurochem*, 2008,106(1):170.
- [28] Shou M, Ferrario C R, Schultz K N, et al. Monitoring dopamine *in vivo* by microdialysis sampling and on-line CE-laser-induced fluorescence [J]. *Anal Chem*, 2006, 78(19):6717.
- [29] Huynh B H, Fogarty B A, Martin R S, et al. On-line coupling of microdialysis sampling with microchip-based capillary electrophoresis [J]. *Anal Chem*, 2004, 76 (21):6440.
- [30] Sandlin Z D, Shou M, Shackman J G, et al. Microfluidic electrophoresis chip coupled to microdialysis for *in vivo* monitoring of amino acid neurotransmitters [J]. *Anal. Chem*, 2005, 77 (23):7702.
- [31] Yao T, Okano G. Simultaneous determination of L-glutamate, acetylcholine and dopamine in rat brain by a flow-injection biosensor system with microdialysis sampling [J]. *Anal Sci*, 2008,24(11):1469.
- [32] 孙晓芳,王丹巧,吴兆恩,等. 首乌方对帕金森病模型大鼠血液和纹状体细胞外液左旋多巴药代动力学影响的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*,2011,17(11):111.

[责任编辑 蔡仲德]