论文

涂层毛细管电色谱法评价药物与血小板的相互作用

吕瑞, 杨丰庆, 陈华, 陈际达, 夏之宁*

重庆大学化学化工学院, 重庆 400030

*通讯作者, E-mail: chem_lab_cqu@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-07-10; 接受日期: 2010-11-17

doi: 10.1360/032010-515

摘要 建立了一种新的开管毛细管电色谱法以用于开展药物与血小板相互作用研究. 该方法利用物理吸附将血小板固定于毛细管内壁, 并通过改变血小板进样时间控制涂层长度. 根据涂层长度与药物淌度的关系, 建立了药物与血小板结合常数的计算方程, 得出阿司匹林与血小板的结合常数为 $0.579 \text{ g}^{-1} \text{ L}$, 大于阴性对照品帕珠沙星与血小板的结合常数 $0.249 \text{ g}^{-1} \text{ L}$. 最后, 用亲和萃取法所得结果与本方法对比, 说明了本方法能够用于评价抗凝血药物与血小板的相互作用.

关键词血小板
涂层毛细管电色谱
阿司匹林
帕珠沙星
结合常数

1 引言

血小板是哺乳动物血液的有形成分之一, 是一种与凝血相关的功能生物分子. 受体学说认为, 大多数药物必须先与细胞膜上或细胞内的某些特定受体结合才能发挥效应^[1]. 已有研究表明^[2]血小板膜上的受体是大多数抗凝血药物的主要靶点. 因此, 建立有效的评价抗凝血药物与血小板的相互作用方法, 对于探索药物作用机制和筛选目标药效物质具有重要的指导意义.

研究药物与受体相互作用的方法很多, 如荧光光谱法、生物色谱法、亲和毛细管电泳法等. 荧光光谱法是一种灵敏度高、快速简单的研究方法, 但只能一对一地研究药物与受体的相互作用^[3, 4], 这使得其在应用上受到了一定的限制. 生物色谱法是将受体分子固定于液相色谱柱上进行分析, 可用于研究复杂多组分体系^[5-7], 但此方法需要根据不同的作用机制选择特定的色谱柱, 且色谱柱寿命较短, 成本较高. 而亲和毛细管电泳法以其多模式, 低成本的特点在药物-受体相互作用研究中得到了较广泛的应用^[8-12]. 但目前普遍采用的亲和毛细管电泳研究模式所消耗

的受体量较大, 这也在一定程度上限制了其用于稀有受体的分析.

开管毛细管电色谱(open-tubular capillary electrochromatography, OT-CEC)是毛细管电色谱的一种模式, 它是通过在毛细管内壁涂覆或键和有机改性剂实现物质的固定化. 由于本研究中, 必须维持生物分子的天然构象, 故选择温和而快速的方法对生物分子进行毛细管内表面固定化. 物理吸附法是直接通过非共价作用将生物分子固定于毛细管内壁, 不需要有机溶剂和高温反应过程, 所以能够最大程度地保证生物分子的活性. Martma 等人^[13]将神经细胞膜吸附于毛细管内壁, 制备成了一种新的生物膜开管柱, 在最优的制备条件下, 该柱寿命可达三周. Riekkola 研究组^[14]将低密度脂蛋白(LDL)吸附于毛细管内壁, 通过对吸附条件优化, 制备出了较为稳定的 LDL 开管毛细管电色谱柱, 并用此评价了三种中性类固醇与 LDL 的相互作用强度. 该研究组还在这种 LDL 开管柱中成功地实现了对 LDL 体外氧化反应的评价^[15]. 这些研究均表明 OT-CEC 能够用于生物分子的固定. 2008 年 Riekkola 研究组首次将细菌活细胞涂覆于毛细管内壁制备成了开管毛细管电色谱柱, 并用此评

价了几种抗生素与细菌的亲合力大小, 其结果与生物分析所得结果一致, 证明了开管毛细管电色谱法用于评价药物与活细胞相互作用的可行性^[16].

本研究用物理吸附的方法将血小板部分涂覆于毛细管内壁, 通过药物在不同血小板涂层长度下的淌度变化, 计算出阿司匹林以及阴性对照药物帕珠沙星与血小板的结合常数. 最后, 以亲和萃取法作为对比方法, 证明了本方法可用于评价抗凝血药物与血小板的相互作用.

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

自组装毛细管电泳仪: 可调高压直流电源(0~30 kV), 单波长连续可调紫外-可见吸收检测器(190~900 nm), 光电倍增管(北京卓立汉光有限公司), HW2000 色谱工作站(南京千谱软件公司); 石英毛细管(内径 100 μm , 总长 52.6 cm, 有效长度 44.1 cm, 河北永年锐沣色谱器件有限公司); 医用离心机(0~4000 r/min, 北京医用离心机厂); DELTA 320 型 pH 计(梅特勒-托利多公司); AY120 型电子天平(岛津公司); UV-2450 紫外-可见分光光度计(岛津公司).

磷酸氢二钠(AR, 重庆北碚化学试剂厂); 柠檬酸(AR, 北京化工厂); 柠檬酸三钠(AR, 重庆北碚化学试剂厂); 阿司匹林, 甲磺酸帕珠沙星(纯度均大于 98%, 重庆莱美药业馈赠).

2.2 血小板的制备及其在毛细管内壁的涂覆

采兔动脉血与柠檬酸三钠以 9:1 混合, 置于离心机中以 900 r/min 离心 10 min, 弃去红细胞沉淀, 吸取上层富血小板血浆, 以 3000 r/min 离心 15 min, 将沉淀用 pH 7.3 的运行缓冲液小心吹打成均匀悬液, 离心, 重复两次, 最后将所得血小板沉淀称重, 并用运行缓冲液配制成一定浓度的血小板悬液备用.

将血小板悬液置于进样端以高差进样的方式(高度差为 17 cm)充入毛细管内, 控制进样时间以变化血小板的涂覆长度, 然后用运行缓冲液将毛细管内多余的血小板从进样端冲下, 从而得到带有血小板涂层段的毛细管.

2.3 溶液的配制

运行缓冲液: 准确称取 0.1791 g Na_2HPO_4 , 溶于

100 mL 蒸馏水中, 用柠檬酸调 pH 至 7.3, 得到 5 mmol/L Na_2HPO_4 -柠檬酸盐缓冲液.

阿司匹林样品溶液的配制: 将阿司匹林用无水乙醇配制成 25 mg/mL 母液, 实验前用缓冲液稀释成 2.50 mg/mL 阿司匹林样品溶液待用.

甲磺酸帕珠沙星样品溶液的配制: 将甲磺酸帕珠沙星用缓冲液配制成 0.04 mg/mL 溶液.

2.4 电泳条件

采用 5 mmol/L Na_2HPO_4 -柠檬酸盐(pH 7.3)为运行缓冲液, 高差进样 17 cm $\times$ 5 s, 运行电压为 20 kV, 检测波长为 280 nm.

新毛细管在使用前先用 0.1 mol/L NaOH, H_2O 各冲洗 30 min, 然后用缓冲液冲洗 10 min. 每次电泳前依次用 0.1 mol/L HCl, H_2O , 0.1 mol/L NaOH, H_2O , 缓冲液各冲洗 2 min, 将固定的血小板洗脱, 避免干扰下一次实验.

2.5 涂覆过程中血小板浓度的考察

固定血小板进样时间为 240 s, 分别将浓度为 0.04, 0.08, 0.16, 0.18, 0.20, 0.40, 0.80, 1.60 g/mL 的血小板涂覆于毛细管中, 以丙酮为电渗流标记物, 考察各浓度血小板开管柱中电渗流的变化. 以血小板浓度对电渗流标记物迁移时间作图, 将毛细管内壁涂覆饱和时血小板的浓度作为实验浓度.

2.6 结合常数的计算

在本研究中, 药物的表观迁移时间可以看作药物在有涂层段的迁移时间与在无涂层段的迁移时间之和, 即:

$$\frac{l_{\text{eff}}}{\mu} = \frac{l_p}{\mu^+} + \frac{l_{\text{eff}} - l_p}{\mu^-} \quad (1)$$

其中, μ^+ 表示药物在有血小板涂层段的迁移淌度, μ^- 表示药物在无血小板涂层段的迁移淌度, l_p 为血小板涂层的长度, l_{eff} 为毛细管有效长度.

血小板涂层的长度可由血小板的进样时间得到^[17]:

$$l_p = \frac{gr^2\rho}{8\eta l_{\text{tot}}} \cdot h \cdot t_{\text{in}} \quad (2)$$

其中 g 为重力加速度, r 为毛细管内径, ρ 为缓冲溶液的密度, η 为溶液的黏度, l_{tot} 为毛细管总长, h 为进样高度差, t_{in} 为进样时间.

已知在毛细管电色谱中, 溶质的迁移速率表示为^[18]:

$$v = \sum_{i=1}^n v_i \cdot x_i \quad (3)$$

其中: v_i 为溶质在 i 形态下沿柱轴向的输运速率, x_i 为溶质在 i 形态下的摩尔分数. 即: $x_i = \frac{C_i}{\sum_{j=1}^n C_j}$ (其中

$\sum_{j=1}^n C_j$ 表示溶质的总浓度; C_i 表示溶质在 i 形态下的浓度).

在本研究中, 若不计固定相上形态的药物沿柱轴向的输运速率, 则药物在电色谱段的实际迁移速率为:

$$v^+ = \frac{[C]}{[C]+[CS]} \cdot E \cdot \mu^- \quad (4)$$

其中, $[C]$ 为游离态药物的浓度, $[CS]$ 为结合态药物的浓度, E 为运行电压, μ^- 为药物在无涂层毛细管中等同条件下的迁移淌度.

在亲和色谱中, 受体与配体相互作用的结合常数表示为:

$$K_b = \frac{[CS]}{[C] \cdot [S]} \quad (5)$$

其中 $[S]$ 为固定相上与配体结合的受体浓度. 在本研究中表示血小板涂层上与药物结合的血小板浓度.

结合式(4)和(5), 变形得:

$$v^+ = \frac{E}{1+[S] \cdot K_b} \cdot \mu^- \quad (6)$$

由淌度的定义: $\mu = \frac{v}{E}$ 得, 公式(6)可表示为

$$\mu^+ = \frac{1}{1+[S] \cdot K_b} \cdot \mu^- \quad (7)$$

将式(7)代入式(1)化简后得

$$\frac{\mu^-}{\mu} = \frac{l_p \cdot [S]}{l_{eff}} \cdot K_b + 1 \quad (8)$$

以 $\frac{l_p \cdot [S]}{l_{eff}}$ 对 $\frac{\mu^-}{\mu}$ 进行线性回归, 所得线性方程的斜率即为结合常数 K_b .

2.7 血小板与药物的相互作用分析

将血小板以高差进样的方式分别进样 30, 60, 90, 120, 150 s, 并用缓冲液将多余血小板冲下. 在不同血小板涂层长度的毛细管中, 以阿司匹林作为样品进行电泳分析.

为确定阿司匹林与血小板的特异性相互作用, 用阴性对照药物帕珠沙星为样品, 将血小板以高差进样的方式分别进样 30, 60, 120, 180, 240 s, 得到不同长度血小板涂层的毛细管柱, 并进行电泳分析.

2.8 亲和萃取法研究血小板与药物的相互作用

2.8.1 阿司匹林与血小板的相互作用

将血小板分别配成 0.002, 0.004, 0.010, 0.020, 0.040 mg/mL 的溶液, 在 270 nm 波长下用紫外分光光度计分别测定吸光度, 并建立浓度-吸光度的工作曲线用于测定样品中阿司匹林的浓度.

向 5 个塑料离心管中分别加入 50 μ L, 352 mg/mL 的血小板悬液, 然后分别加入 0, 1, 2, 4, 10, 20 μ L, 25 mg/mL 的阿司匹林溶液, 用缓冲液补足 5 mL, 置于 37 $^{\circ}$ C 下温育 10 min. 取出, 用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 以未加药物的滤液作为参比溶液, 用紫外分光光度计测定各阿司匹林滤液的吸光度, 通过工作曲线即可得到游离阿司匹林的浓度.

2.8.2 帕珠沙星与血小板的相互作用

将帕珠沙星分别配成 0.002, 0.004, 0.006, 0.008, 0.012 mg/mL 的溶液, 在 270 nm 下分别测定吸光度, 并建立浓度与吸光度的工作曲线, 用于测定样品中帕珠沙星的浓度.

向 5 个塑料离心管中分别加入 10 μ L, 352 mg/mL 的血小板悬液, 然后分别加入 0, 20, 30, 40, 50, 60 μ L, 1 mg/mL 的帕珠沙星溶液, 用缓冲液补足 5 mL, 置于 37 $^{\circ}$ C 下温育 10 min. 取出, 用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 以未加药物的滤液作为参比溶液, 用相同的方法测定游离帕珠沙星浓度.

3 结果与讨论

3.1 涂覆过程中血小板浓度的考察

为使药物与血小板充分接触, 需要保证血小板

在毛细管中的涂覆达到饱和. 以研究中所需的血小板最长涂覆长度进行实验, 即固定血小板进样时间为 240 s. 由图 1 可知, 血小板浓度在 0.20 g/mL 时, 电渗流变化较小, 说明涂覆在毛细管内壁的血小板已达到饱和. 而当血小板浓度为 1.60 g/mL 时, 由于血小板悬液的黏度变大, 使得进样的区段减小, 导致电渗流标记物迁移时间略有下降. 因此, 选择涂覆达到饱和后血小板的最低浓度 0.20 g/mL 作为本研究的血小板涂覆浓度.

3.2 阿司匹林与血小板的相互作用分析

阿司匹林是目前常用的抗血小板药物, 作用机制是使得血小板膜上环氧酶 1(COX-1)丝氨酸位点乙酰化后失活, 从而抑制血栓烷 $A_2(TXA_2)$ 的生成, 进而阻止血小板的凝集和释放反应^[19]. 由图 2 可知, 阿司匹林的电泳淌度随着血小板涂层长度的增加而减小, 且电泳峰形逐渐展宽. 因为在电泳过程中, 阿司匹林与血小板发生了相互作用, 随着血小板涂层长度的增加, 阿司匹林在涂层上的保留时间变长, 在电泳图谱中反映为阿司匹林的迁移时间也变长. 而峰的展宽是因为阿司匹林在血小板涂层中的分配是一个动态平衡过程, 即同时存在着与血小板的结合和解离过程, 而阿司匹林与血小板的特异性结合作用, 导致结合过程的速率远大于解离过程的速率, 这种慢解离过程使得解离出的阿司匹林的迁移速率较游离的阿司匹林慢, 因而所检测到的阿司匹林的峰

图 1 血小板浓度对毛细管内壁饱和性的影响. 电泳条件: 缓冲液, 5 mmol/L Na_2HPO_4 -柠檬酸盐; pH 7.3; 血小板进样时间, 240 s; 运行电压, 20 kV; 检测波长, 280 nm; 血小板浓度 0.04, 0.08, 0.16, 0.18, 0.20, 0.40, 0.80, 1.60 g/mL; 样品, 丙酮

图 2 阿司匹林与不同长度血小板涂层的相互作用电色谱图. 电色谱条件: 缓冲液, 5 mmol/L Na_2HPO_4 -柠檬酸盐; pH 7.3; 进样时间, 5 s; 运行电压, 20 kV; 检测波长, 280 nm; 血小板涂层长度 A: 0 cm; B: 0.05 cm; C: 0.11 cm; D: 0.16 cm; E: 0.22 cm; F: 0.27 cm; 1, 丙酮; 2, 阿司匹林

展宽. 随着血小板涂层长度的增加, 阿司匹林在血小板中的分配时间变长, 而慢的解离过程导致阿司匹林的峰展宽加剧. 但随着血小板涂层长度的增加, 电渗流标记物的迁移时间并无太大变化, 这是因为在本研究中, 电渗流主要由未涂层段的硅羟基解离产生, 虽然血小板的涂覆在一定程度上会抑制电渗流, 但实验中血小板涂层长度较短且变化范围不大, 故实验中血小板涂层长度的变化对电渗流的影响较小.

为考察涂层在电泳过程中的稳定性, 每次实验后按照 2.4 所述的方法将血小板涂层完全洗脱, 在同一涂层长度下平行实验三次. 由表 1 中淌度的 SD 值可知, 平行实验中阿司匹林表观淌度的 RSD 均小于 3.4%, 说明血小板涂层的稳定性能够满足实验的要求, 且重现性良好.

由于在涂覆过程中所用的血小板浓度较低, 故假设加入血小板前后溶液的黏度不变, 即 $\eta = 1.0 \times 10^{-3}$ Pa s. 由此得到血小板涂覆长度及所对应淌度数据见表 1. 将所得 x, y 代入方程(8)进行线性回归, 得到线性方程为 $y = 0.5785x + 0.8698$ ($R^2 = 0.9844$). 由斜率得到阿司匹林与血小板相互作用的结合常数为 $0.579 \text{ g}^{-1} \text{ L}$.

3.3 阴性对照品与血小板的相互作用分析

为验证阿司匹林与血小板之间存在特异性相互作用, 将帕珠沙星作为阴性对照进行分析(图 3), 数

表1 阿司匹林在不同血小板涂层长度下电泳的数据处理结果

[S] (10^3 g/L)	l_{eff} (cm)	t_{in} (s)	l_p (cm)	μ ($10^{-3}\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{min}^{-1}$)	x_1	y_1
—	44.1	—	0	18.099(± 0.366)	—	—
0.20	44.1	30	0.05	17.505(± 0.211)	0.245	1.034
0.20	44.1	60	0.11	15.687(± 0.373)	0.490	1.154
0.20	44.1	90	0.16	14.387(± 0.247)	0.735	1.258
0.20	44.1	120	0.22	12.757(± 0.430)	0.980	1.419
0.20	44.1	150	0.27	11.242(± 0.267)	1.225	1.610

注: x_1, y_1 分别表示方程(8)中阿司匹林的横、纵坐标

图3 帕珠沙星与不同长度血小板涂层的相互作用电色谱图. 电色谱条件: 缓冲液, 5 mmol/L Na_2HPO_4 -柠檬酸盐; pH 7.3; 进样时间, 5 s; 运行电压, 20 kV; 检测波长, 280 nm; 血小板涂层长度: A: 0 cm; B: 0.05 cm; C: 0.11 cm; D: 0.22 cm; E: 0.32 cm; F: 0.43 cm; 1, 丙酮; 2, 帕珠沙星

据处理结果见表2. 将 x, y 分别代入方程(8)进行线性回归, 得帕珠沙星的线性方程为 $y = 0.2485x + 0.9486$ ($R^2 = 0.9925$), 由斜率得帕珠沙星与血小板的结合常数为 $0.249 \text{ g}^{-1} \text{L}$.

由结合常数值可知, 帕珠沙星与血小板也存在一定的相互作用, 但其强度不及阿司匹林, 这是因为帕珠沙星是一种抗菌药, 作用靶点主要是细菌 DNA 促旋酶和拓扑异构酶 IV, 而未见其与血小板膜上受

体有相互作用的报道. 但帕珠沙星具有一定的脂溶性, 其与血小板的作用应主要表现为与膜的疏水作用.

3.4 亲和萃取法计算血小板与药物的结合常数

亲和萃取法是根据分子体积的不同而将药物和受体分离的方法, 鉴于血小板分子体积约在 1 微米到十几微米之间, 故采用孔径为 $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜对受体和游离态的药物进行分离, 通过测定游离态药物的浓度, 药物的总浓度, 得到结合态药物的浓度, 根据公式 $\frac{1}{a_c} = \frac{1}{a_{\text{max}}} + \frac{1}{a_{\text{max}} \cdot K \cdot c}$ (其中 a_c 为与受体

结合的药物浓度, c 为药物的本体浓度, a_{max} 为与受体结合的药物最大量)即可得到药物与血小板的结合常数.

3.4.1 阿司匹林与血小板的结合常数计算

在 270 nm 波长下用紫外分光光度计分别测定吸光度, 得到阿司匹林浓度-吸光度的工作曲线方程为: $y = 5.4078x + 0.0004$ ($R^2 = 0.9975$). 阿司匹林与血小板结合前后的浓度变化见表3.

根据表2中数据, 结合公式, 得到阿司匹林与血小板的结合常数为 $27.331 \text{ g}^{-1} \text{L}$, 大于本方法计算出的 $0.579 \text{ g}^{-1} \text{L}$.

表2 帕珠沙星在不同血小板涂层长度下电泳的数据处理结果

[S] (10^3 g/L)	l_{eff} (cm)	t_{in} (s)	l_p (cm)	μ ($10^{-3}\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{min}^{-1}$)	x_2	y_2
—	44.1	—	0	42.934	—	—
0.20	44.1	30	0.05	41.918	0.245	1.024
0.20	44.1	60	0.11	40.142	0.490	1.070
0.20	44.1	120	0.22	36.730	0.980	1.169
0.20	44.1	180	0.32	32.770	1.469	1.310
0.20	44.1	240	0.43	29.654	1.959	1.448

注: x_2, y_2 分别代表方程(8)中帕珠沙星的横、纵坐标

表 3 阿司匹林与血小板结合前后的浓度值

结合前阿司匹林浓度(mg/mL)	游离阿司匹林浓度(mg/mL)	结合态阿司匹林浓度(mg/mL)
0.0050	0.0022	0.0028
0.0100	0.0049	0.0051
0.0200	0.0125	0.0075
0.0500	0.0388	0.0112
0.1000	0.0760	0.0240

3.4.2 帕珠沙星与血小板的结合常数计算

将帕珠沙星分别配成 0.002, 0.004, 0.006, 0.008, 0.012 mg/mL 的溶液, 在 270 nm 下分别测定吸光度, 得到帕珠沙星浓度-吸光度工作曲线方程为 $y = 10.9036x + 0.0364$ ($R^2 = 0.9952$). 帕珠沙星与血小板结合前后的浓度值见表 4.

由表 4 中的数据, 结合公式得帕珠沙星与血小板的结合常数值为 $0.517 \text{ g}^{-1} \text{ L}$, 大于本方法计算得到的

表 4 帕珠沙星与血小板结合前后浓度值

结合前帕珠沙星浓度(mg/mL)	游离帕珠沙星浓度(mg/mL)	结合态帕珠沙星浓度(mg/mL)
0.0400	0.0022	0.0378
0.0600	0.0043	0.0557
0.0800	0.0062	0.0738
0.1000	0.0084	0.0916
0.1200	0.0102	0.1098

结合常数值 $0.249 \text{ g}^{-1} \text{ L}$.

亲和萃取实验所得结合常数值均大于本方法所得值, 可能是因为在亲和萃取实验中, 药物与血小板悬液的混合物通过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜时, 血小板悬液中混有的部分小分子蛋白与游离药物也一同被滤过, 这些小分子蛋白的混入影响了对游离药物吸光度的测定, 导致所得的结合常数值偏大, 而确切的原因还有待进一步的研究. 此结论证明本方法能够用于评价抗凝血药物与血小板的相互作用.

4 结论

本研究建立了一种新的毛细管电色谱研究药物-受体相互作用的方法, 以阿司匹林和阴性对照品帕珠沙星作为研究对象, 考察了各药物在不同血小板涂层长度的毛细管中的淌度变化, 根据所建立的方程得到了阿司匹林、帕珠沙星与血小板相互作用的结合常数, 并与亲和萃取法所得结论进行对比, 从结果可以看出, 抗凝血药物阿司匹林与血小板具有更强的结合作用. 本方法操作简单, 受体用量少, 且避免了受体的加入对检测的干扰, 更加适用于稀有受体的分析. 根据所建立的结合常数计算方程, 可定量地评价药物与受体的结合强度, 为复杂体系中抗凝血药物的筛选奠定了基础.

致谢 本工作得到了国家自然科学基金(20775096)和科技部国际合作项目(2010DFA32680)的资助, 特此一并致谢.

参考文献

- 1 吕宝璋, 卢建, 安明榜. 受体学. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2000. 6-7
- 2 Michelson AD. *Platelet*. 2nd ed. MA: Academic Press, 2006. 117-134
- 3 Wang F, Huang W, Su L, Dong ZJ, Zhang S. Spectrofluorimetric study of the binding of codeine to nucleic acids. *J Mol Struct*, 2009, 927(1-3): 1-6
- 4 Wu FY, Zhang LN, Ji ZJ, Wan XF. Spectroscopic investigation of the interaction between thiourea-zinc complex and serum albumin. *J Lumin*, 2010, 130(7): 1280-1284
- 5 Wang HL, Zou HF, Ni JY, Kong L, Gao S, Guo BC. Fractionation and analysis of *Artemisia capillaries* Thunb. by affinity chromatography with human serum albumin as stationary phases. *J Chromatogr A*, 2000, 870(1-2): 501-510
- 6 孔亮, 邹汉法, 汪海林, 倪坚毅, 张玉奎. 以人血清白蛋白为固定相的分子生物色谱分析几种中药活性成分的研究. 高等学校化学学报, 2000, 21(1): 36-40
- 7 Mao XQ, Kong L, Luo QZ, Li X, Zou HF. Screening and analysis of permeable compounds in *Radix Angelica Sinensis* with immobilized liposome chromatography. *J Chromatogr B*, 2002, 779(2): 331-339
- 8 Caldwell GW, McDonnell PA, Masucci JA, Johnson DL, Jolliffe LK. Using affinity capillary electrophoresis to study the interaction of the extracellular binding domain of erythropoietin receptor with peptides. *J Biochem Biophys Methods*, 1999, 40(1-2): 17-25
- 9 夏之宁, 李丽仙, 杨靖, 熊彩桥. 药物与细胞膜相互作用的毛细管电泳方法研究. 中国科学 B 辑: 化学, 2009, 39(7): 634-639

- 10 Østergaard J, Jorgensen L, Thomsen AE, Larsen SW, Larsen C, Jensen H. Drug-liposome distribution phenomena studied by capillary electrophoresis-frontal analysis. *Electrophoresis*, 2008, 29(16): 3320–3324
- 11 Pedersen JT, Østergaard J, Houen G, Heegaard NHH. Affinity capillary electrophoresis for identification and investigation of human Gc-globulin(vitamin D-binding protein) and its isoforms interacting with G-actin. *Electrophoresis*, 2008, 29(8): 1723–1733
- 12 El-Hady D, Kühne S, El-Maali N, Wätzig H. Precision in affinity capillary electrophoresis for drug-protein binding studies. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 52(2): 232–241
- 13 Martma K, Fernaeus SZ, Land T, Shimmo R. New capillary coatings in open tubular CEC as models for biological membranes. *Electrophoresis*, 2010, 31(9): 1586–1589
- 14 Kuldvee R, Wiedmer SK, Öörin K, Riekkola ML. Human low-density lipoprotein-coated capillaries in electrochromatography. *Anal Chem*, 2005, 77(10): 3401–3405
- 15 Kuldvee R, D’ulivo L, Yohannes G, Lindenburg PW, Laine M, Öörni K, Kovanen P, Riekkola ML. Open tubular capillary electrochromatography: Technique for oxidation and interaction studies on human low-density lipoproteins. *Anal Chem*, 2006, 78(8): 2665–2671
- 16 Chen J, Fallarero A, Määttänen A, Sandberg M, Peltonen J, Vuorela PM, Riekkola ML. Living cells of *Staphylococcus aureus* immobilized onto the capillary surface in electrochromatography: A tool for screening of biofilms. *Anal Chem*, 2008, 80(13): 5103–5109
- 17 熊彩侨, 夏之宁, 黄锐, 陈华, 徐盼. 区段-区段动力学毛细管电泳测定动力学参数的新方法及其应用. *中国科学 B 辑: 化学*, 2008, 38(8): 705–709
- 18 张维冰. 毛细管电色谱理论基础. 北京: 科学出版社, 2006. 94–97
- 19 Michelson AD. *Platelet*. 2nd ed. MA: Academic Press, 2007. 1099–1101

Evaluation of affinity interaction between drugs and platelet by open tubular capillary electrochromatography

LV Rui, YANG FengQing, CHEN Hua, CHEN JiDa & XIA ZhiNing

College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China

Abstract: An open tubular capillary electrochromatography (CEC) method was developed for the evaluation of affinity interaction between drugs and platelet. The platelet was attached onto the inner surface of the capillary by physical adsorption, while the coated length was controlled by varying the injection time of platelet suspension. According to the magnitude of the apparent mobility of the analytes and the coated length of platelet, as well as the chromatographic distribution theory of CEC, the equation for calculating of binding constant was deduced. By using the developed method, the binding constants of the anti-platelet aggregation drug aspirin and the negative control pazufloxacin were determined. The results indicated the strong interaction between aspirin and platelet with the binding constant of $0.579 \text{ g}^{-1} \text{ L}$, while the pazufloxacin and platelet showed weak interaction with the binding constant of $0.249 \text{ g}^{-1} \text{ L}$. In the end, affinity extraction has been used for contrast. It can be concluded that the developed method can be used for the determination of affinity interaction of drug with platelet as well as other living cell that can be coated onto the inner surface of capillary.

Keywords: platelet, open tubular capillary electrochromatography, aspirin, pazufloxacin, binding constant