

综 述 ·

文章编号:1008-9926(2004)05-0364-03 中图分类号:R927 文献标识码:A

高效液相色谱及其联用技术在药物分析中的应用新进展(一)

王绪明

(中国人民解放军总后勤部卫生部药品仪器检验所 北京 100071)

摘 要:本文对近年来新型高效液相色谱仪及其联用技术在药物毒物分析中的应用新进展进行综述。阐述高效液相色谱仪的一些新型检测器,如二极管阵列紫外检测器、红外检测器、核磁共振检测器、质谱检测器、蒸发光散射检测器、激光小角度散射检测器等的研究,及其在药物毒物分析、中草药制剂分析、临床生物样品分析等生命科学方面的应用。

关键词:高效液相色谱;检测器;联用技术;药物毒物分析

高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)是现代分离测定的重要手段。鉴于其简便快速、灵敏准确,目前,在医药卫生、食品、环保等各个领域已得到了广泛的应用。世界各国已将该法收载于药典^[1~3]。随着色谱技术的发展,结合计算机各种软件的开发,使之 HPLC 与各种检测仪器联用,更加拓宽了 HPLC 的应用范围。

高效液相色谱仪主要由泵、色谱柱、检测器、记录器等组成。它将具有不同极性的单一溶剂或不同比例的混合溶剂、缓冲液等作为流动相。用泵将流动相压入装有填充剂的色谱柱,注入样品溶液,经流动相带入柱内,在填充剂上分离后,各成分先后进入检测器,记录色谱图,进行定性定量分析。近年来,高效液相色谱仪的组成部件都有新的发展,使 HPLC 分析更加灵敏准确、简便快速。特别是联用技术的发展,使之在药物分析生命科学领域的应用更具重要意义,现报道如下:

1 输液泵

输液泵是高效液相色谱仪的主要部件之一,它将贮液器中的流动相按一定流速送入液路系统。早年多用恒压泵,由于其变化较大流量不稳,而今多用恒流泵,如机械往复泵、高压恒流泵等。美国 Perkin Elmer 公司采用往复注射泵,美国 Hewlett Packard 公司采用串联式双柱塞往复泵,设计了可变冲程和多元梯度泵,可完成自动稀释、自动衍生化等^[4]。而 1090 型则采用低压泵和高压泵分开,前者为在柱泵 7ml;后者隔膜泵,压力 0~10kg/cm²。Agilent 新型 1100 泵,装有二元高压梯度泵和低压四元梯度泵,在低流速下也能达到最高精密度^[5]。

2 色谱柱

色谱柱通常为不锈钢柱,内装各种填充剂。常用的填料为硅胶,可用于正相色谱。其中,最常用的是十八烷基键合硅胶,即 ODS 柱,可用于反相色谱或离子对色谱。目前,商品色谱柱有普通型、快速性、氨基酸型、凝胶色谱柱和凝胶滤过

专用柱。为符合 GLP,美国惠普公司开发了色谱柱识别器^[6]。更加保证了色谱柱的可靠性及测定方法的准确性。

近年来,由于柱切换技术的发展,使难以分析的痕量毒物和体内药物,均可直接进行测定。Wang zhao^[7]用柱切换 HPLC 技术测定了人血浆中阿霉素浓度,以 μ -Bondapak C₁₈ 为予处理柱,流动相为 25mmol L⁻¹磷酸二氢胺-0.03mmol L⁻¹磷酸缓冲液,流速 3ml/min。对样品自动净化处理:分析柱固定相为 YWG C₁₈,流动相为甲醇-乙腈-磷酸缓冲液(50:10:40),流速为 1.5ml/min,荧光检测波长 λ_{ex} :495nm, λ_{em} :560nm,血浆测定的线性范围 3~682ng·ml⁻¹,最低检出浓度为 1ng·ml⁻¹。本法直接进样,在线自动净化和浓缩,适于阿霉素的临床药物动力学研究及血液浓度检测。

3 检测器

检测器用于连续检测色谱柱流出的物质,进行定性定量分析。要求其灵敏度高、噪音小、基线稳定、响应值的线性范围宽等。近年来各国都在研究开发新的检测技术,进一步扩大了 HPLC 的应用。

3.1 紫外检测器(UVD) 通常多采用固定波长 254nm。为获得 UV-VIS 光谱,早期需要有一种停流扫描装置,但缺点是分离效果不佳、费时。美国光谱物理(SP)公司改进了扫描机构和数据采集方法,提高了扫描速度,推出了光栅自动快速扫描 UVD。美国惠普(HP)公司推出二极管阵列检测器,它由 311~1024 个二极管组成。在 12.5ms 以内即可实时采集全光谱。可进行色谱峰的纯度分析,消除漂移,分离杂质,准确定量。1995 年后,美国 Agilent 公司推出 1100 系列 HPLC 仪,装有高精度二极管阵列检测器(DVD),1024 个二极管的宽度 <1nm,狭缝宽度 2、4、8、16nm 可变量,波长范围 190~950nm,能自行校正波长,操作更加简便快速^[8]。Angelika^[9]应用 HPLC-DVD 分离测定了土壤、水、泥浆和空气中致癌、致突的多环芳烃(PAH),灵敏度达到了 ng 水平,为环保提供了可靠的方法。张明启等^[10]以此鉴定了含人参、鹿茸等 65 批补肾壮阳的中药及保健品胶囊中,有 13 批掺有枸橼酸西地

那非(伟哥)。有效地打击了掺假的不法行为。

在 HPLC 仪中,与 UVD 同时配备的有荧光检测器(FLD)。FLD 的灵敏度比 UVD 高一个数量级,最适于检测体内微量药物。鲁燕侠等^[11]用 RP-HPLC-FLD,以 λ_{ex} :290nm λ_{em} :330nm 同时测定了小鼠脑组织中 5 种神经递质的含量,为临床检测提供了参考。

3.2 示差折光检测器(RID) RID 亦为通用检测器,主要用于糖类分析及凝胶渗透色谱。有人曾用 HPLC-RID 分析了麦芽糖等 7 种糖类及软饮料中果糖、葡萄糖、柠檬酸等成分^[12]。RID 灵敏度较低,受温度影响较大。

3.3 电化学检测器(ECD) ECD 为一种灵敏的检测器。根据电化学原理,色谱柱流出物的响应值随电位的变化而不同,在一定电位条件下,可得到不同保留时间的色谱图,灵敏度可达 pg 水平。HP1049A 新型可变程 ECD 可自动清洗电极,更换低价玻璃碳电极等。在奥运会兴奋剂检测中,使用 HPLC-ECD 灵敏度可达 10^{-12}g ml^{-1} ,检出限为 1ng ml^{-1} 。亦有人用 HPLC-ECD,设定电压 +0.6V,同时测定了吸毒者死体组织中的海洛因、吗啡和羟基吗啡^[13]。杨志凌等^[14]应用 HPLC-ECD 检测法测定了猪组织中动物生长促进剂克伦特罗。实验选用 1.7mmol L^{-1} 氯化锂-甲酸-甲醇(65:1:34)为流动相,工作电压 1.25V,最低检出限为 0.5ng g^{-1} ,可用于测定猪的肌肉、肺、肝、肾及脂肪组织中的克伦特罗。对于控制非法使用克伦特罗,保护人民健康有重要意义。

3.4 红外检测器(IRD) IRD 系从色谱柱分离出的组分,随流动相入红外吸收池进行测定。早期棱镜式光栅红外分光光度计由于扫描速度慢,难以与 HPLC 联用。近代傅立叶红外分光光度计(FTIR)扫描速度快,计算机数据处理,使之 HPLC-IRD 得以应用。其中,溶剂的选择尤为重要。Cheh 等人^[15]选用气溶剂如 D_2O 、 CD_3OD 等,用波长 $5.75\mu\text{m}$ (羰基)和 $6.15\mu\text{m}$ (酰氨基)吸收带测定了磷脂类化合物,结果满意。

3.5 核磁共振检测器(NMRD) 自超导 NMR 推出后,才使 HPLC 与 NMR 有可能联用,但灵敏度仍不理想,样品用量亦较大。1995 年,Varian 公司推出了新的 NMR 检测器^[16],并已用于肽的混合物分析。HPLC 色谱柱的流出物一方面用 UV-VIS 控制,同时,由收集器收集样品,最后流入磁场的探头处进行 NMR 测定。HPLC-NMR 联用的关键是 NMR 流动探头。新的 HPLC-NMR 微量流动探头位于磁场中心处,为体积 $6\mu\text{l}$, $\phi 3\text{mm}$ 的外绕 NMR 线圈流动池,探头的下部为联接 HPLC 流动相入口和出口的标准探头;另有一个较前大二倍的流动池,用于以样品收集器进行停流测量。500MHz HPLC-NMR,在 ^1H NMR 流动池检测相对分子量 400 时,检出限为 200ng。最近,Varian 公司研究开发的低温探头(-250℃),其灵敏度比同类室温探头高 4 倍以上,对于蛋白质研究和新药开发领域提供一个全新的视野。而可更换式流动池(FIC)对于天然产品和代谢产物的研究更是有力的工具,FIC 的切换只需 10min,操作简便快速^[17]。

3.6 质谱检测器(MSD) 质谱是研究化学结构、鉴别药物毒物的重要工具,特别是与气相色谱联用(GC-MS)更是简便快

速。王绪明^[18]曾用气相色谱-质谱联用多次鉴定了中毒患者服用的毒物巴比妥药物,为医院抢救提供了可靠依据。但对于挥发性低,耐热稳定性差以及高分子、离子型化合物的分析则受到限制。而用 HPLC-MS 联用则可和 GC-MS 相互补充,使分离手段更加完善。HPLC 和 GC-MS 联用的关键是通过接口(interface)相联。由于 HPLC 流动相的组成比 GC 载气复杂,因此,对 HPLC-MS 的接口技术则要求更高。目前,较为完善的接口有以下几种:

(1)热喷雾接口(Thermospray, TS)^[19] 由 HPLC 流出的极性溶液,以 $1\sim 2\text{ml/min}$ 流速进入不锈钢毛细管($\text{ID}=0.13\text{mm}$),经加热蒸发呈带正负电荷的雾滴/气溶胶,在一定的能量下,溶剂则被油泵抽走,正离子进入离子源。Games 等^[20]曾用 HPLC-TS-MS,同时分离和测定了前列腺素 D_2 、Beclomethasone dipropionate, Ranitidine-N-oxide 三个药物的分子量。

(2)离子束接口(Partial Beam, PB) BP 接口为 90 年代发展的 HPLC-MS 接口新技术。由正相或反相 HPLC 所用的流动相,以 $0.1\sim 1.0\text{ml/min}$ 流入喷雾器,经氦气喷入脱溶剂腔使呈离子束,再在真空条件下,使瞬间分离至二级分液器,经传送杆进入离子源。王绪明^[21]曾报道了 Timothy^[22]采用 HPLC-PB-MS, EI/CI 离子源, $\mu\text{-Bondapak}$ 色谱柱,流动相为水-乙腈(70:30),流速 0.27ml/min ,成功地分离鉴定了乙烯丙巴比妥等 12 种巴比妥药物,并给出了其色谱图,为巴比妥类药物中毒的鉴定提供了参考。

(3)电喷雾接口(Electrospray, ES) ES 是近几年继 PB 接口之后推出的 HPLC-MS 新技术。HPLC 流出物由电喷雾的雾化进入高压筒状电极,使形成一种微滴的细雾,通过热氮气逆流脱溶剂,使离子化进入毛细管,在二级抽真空后出毛细管进入碰撞感应解离区(CID),经分离室聚集成离子束进入离子源。HPLC-ES-MS 特别适于蛋白质、多肽和酶的分析,灵敏度可达 $\text{pmol }\mu\text{l}^{-1}$ 水平,如测肌红蛋白($\text{MW}=16\,951$),灵敏度为 $20\text{fmol }\mu\text{l}^{-1}$ ^[23]。Oberacher 等^[24]应用 HPLC-ES-MS 对人类基因组 TH01 短串联重复序列系统进行了分析,结果与毛细管电泳法完全相符。Sannes-Lowery 等^[25]应用 HPLC-ES-MS 研究了人体免疫缺陷病毒(HIV) Tat 肽与病毒转移复制 RNA 应答元件相互作用,对艾滋病的机理与防治有意义。郭继芬等^[26]应用 HPLC-ES-MS 分析了人参皂苷 8 种成分。对于深入阐明人参功效,开发人参应用价值,寻找新的先导化合物都有重要价值。

3.7 蒸发光散射检测器(ELSD) ELSD 对所有不挥发溶质都有响应,使一种较理想的通用检测器。其特点是灵敏度高,检出限为 10ng,不受溶剂成分及温度波动的影响,亦可用于梯度洗脱,目前已得到广泛的应用。Rongiovanni^[27]应用 HPLC-ELSD 定量分析了未衍生化的氨基酸,已被用于细胞培养液氨基酸的测定。同时,为实现快速、不经柱前或柱后衍生化的肽低浓度 ng 水平检测提供了可能。曾令杰等^[28]应用 HPLC-ELSD 分析了新疆伊犁贝母中主要活性生物碱苷以及其苷元的含量。平均回收率为 95%~105%。Lisong lin 等^[29]曾用 HPLC-ELSD, C_{18} 柱,以乙腈-甲醇-水(66.5:3.5:50)内

含 0.006 的三乙胺为流动相,分析了 5 种贝母中八种生物碱的含量。结果表明,不同产地,不同季节的贝母,生物碱的含量有所不同,为贝母质量的控制提供了可行的方法。

3.8 小角度激光散射检测器 (LALLSPD) LALLSPD 是近代 HPLC 领域中出现的一种新型检测技术。HPLC-LALLSPD 可以快速检测多糖、蛋白质类高聚物的分子量及分子量分布参数,可不需要标准品或外标要求^[30]。本法的基本原理,是从 HPLC 流出的高分子溶液如右旋糖酐或胸腺肽因子溶液等,在一束光线通过时,除产生投射和反射外,还有因分子的热运动使分子内部形成局部密度变化,而向各个角度发射散射光,称瑞利(Rayleigh)散射或分子散射。根据光散射公式和仪器的测定参数而求蛋白质的相对分子量。目前,该技术在蛋白质药物研究中,如核糖核酸酶 A、溶菌酶、垂体分泌及 DNA 重组的人生长激素、DNA 重组的 HBsAg 等分析均得到广泛的应用^[31]。

此外,自动恒温器、自动进样器与计算机技术联用,有效保证分离检测温度的恒定,减少了人工进样系统误差。更能用事先编好的程序,指挥仪器自动无人操作,大大提高了检测准确度和自动化程度,节省人力和时间。故障仪器自动报警,指示软件,可及时停机用图像指示仪器故障原因和部位,给人工维修提供了极大方便。

综上所述,HPLC 仪及其联用技术新的研究与发展,对药物毒物快速分析以及促进生命科学的发展都有重要意义。

参考文献:

- [1] The United States pharmacopeial convention, Inc, The United States pharmacopeia [S]. Appendix, 1998. 1774 ~ 1777
- [2] British pharmacopoeia commission, British pharmacopoeia [S]. Appendix, 2002. 140 ~ 144
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部) [S]. 北京:化学工业出版社, 2000. 附录 32 ~ 34
- [4] Hewlett Packard. High performance liquid chromatograph system [R]. Hewlett Packard USA, 1994, 12F4 - 0202
- [5] Agilent T. 1100 series HPLC system [J]. PEAK, 1995, 3:10
- [6] Hewlett Packard. New column identification memory [J]. PEAK, 1996, 1:17
- [7] Wang Zhou. Column switching HPLC method for determination of Adriamycin in plasmas [J]. Chinese J pharm analysis, 1994, 14(1): 17
- [8] 刘燕萍. 全新 1100 液相以谱系统 [J]. 惠普分析导报, 1995, 3:7
- [9] Angelika GH. Stabilization of retention time and analysis for PNA [J]. PEAK, 1995, 3:6
- [10] 张启明, 尹华, 黄海伟, 等. 检查中药非法掺入枸橼酸西地那非的方法研究 [J]. 药物分析杂志, 2002, 22(4): 315
- [11] 鲁燕侠, 崔佳, 蔺兴遥, 等. RP-HPLC 荧光检测法测定小鼠脑组织中 5 种神经递质的含量 [J]. 解放军药学报, 2003, 19(4): 262
- [12] Hewlett Packard. Saccharide analysis [J]. Analytical Newsletter, 1991, 1
- [13] 张惠. 历届奥运会兴奋剂检测及其某些违禁药物分析方法的进展 [J]. 国外分析仪器—技术与应用, 1994, 1:49
- [14] 杨志凌, 陈杖榴, 方炳虎, 等. HPLC-电化学检测法测定猪组织中的克伦特罗对人体有害的动物生长促进剂 [J]. 色谱, 2003, 21(3): 245
- [15] Chehss. High performance liquid chromatography of phospholipids using deuterated solvents for infrared detection [J]. J chromatogr (Biomed Appl), 1984, 307(2): 261
- [16] Varian. LC-NMR Application [R]. LC-NMR 814012 (USA). 1995, 1
- [17] Varian. 600MHz NMR-Gold probes [J]. Instrument News, 2003, 3:1
- [18] 王绪明. GC-MS 联用对中毒患者毒物快速分析的研究 [J]. 解放军药学报, 2003, 19(4): 250
- [19] Finnigan MAT. Thermo spray. A new LC/MS interface [J]. Application Data sheet, 1985, 6:1
- [20] Games DE, Ramsey ER. Application of Thermo spray [J]. Finian Data sheet, 1985, 10:1
- [21] 王绪明. 高产液相色谱-粒子束 EI/CI 质谱联用鉴定巴比妥类药物 [J]. 国上分析仪器—技术与应用, 1995, 3:78
- [22] Timothy WR. Identification of Barbiturates using High Performance Liquid chromatography Partical beam EI/CI Mass spectroscopy [J]. J Liquid Chromatogr, 1994, 17(4): 867
- [23] Hewlett Packard. How the HP Electrospray interface works [J]. HP ELECTROSPRAY ms (USA), 1992, 6
- [24] Oberacher H, Parson W, Muhlmann R, et al. Analysis of polymerase chain reaction products by on-line Liquid chromatography-mass spectrometry for Genotyping of polymorphic short Tandem Loci [J]. Anal chem, 2001, 73(2): 5109
- [25] Sannes - Lowery KA, Hu P, Mark DP, et al. HIV - 1 Tat peptide binding to TAR RNA by Electrospray ionization mass spectrometry [J]. Anal chem, 1997, 69(24): 5130
- [26] 郭继芬, 钟大放, 乔善义, 等. 高产液相电喷雾质谱联用技术分析人参皂苷 [J]. 质谱学报, 2003, 24(4): 487
- [27] Rongiovanni R. Separation and analysis of peptides by HPLC using the Evaporative Light - scattering detector [J]. J chinese pharm Andysis, 1994, 14(5): 62; 14(6): 51
- [28] 曾会杰. 伊贝母中活性生物碱的 HPLC-ELSD 分析 [J]. 药物分析杂志, 2003, 23(4): 274
- [29] Lisong Lin, Lin GE, Chan shanwan, et al. Determination of isosteroidal alkaloids in bulbus of Fritillari by High performance Liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector [J]. J Chromatogr A, 2001, 909: 207
- [30] Zhou Ruzhen. Determination of molecular weight and its distribution of Low molecular weight heparins [J]. Spec. J pharm people's Mil surg, 1997, 13(1): 11
- [31] 张修建, 周如真, 马剑文. 小激光散射仪及其在药物研究中的应用. 见周如真. 胸腺激素的研究与质量检验技术 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994. 38

(收稿日期: 2004 - 04 - 12; 修回日期: 2004 - 06 - 10)

(本文编辑 刘贺之)