

文章编号:1008-9926(2004)06-0457-03 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(二)

王绪明, 白林

(中国人民解放军总后勤部卫生部药品仪器检验所 北京 100071; 中国人民解放军总医院, 药材处 北京 100853)

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。有关高效液相色谱仪的一些新型检测器及其应用已有报道,本文着重对高效液相色谱及其联用技术在中药制剂分析、中药指纹图谱分析、临床生物样品分析及药代动力学研究、毒物分析和军用化学毒剂分析等方面的应用进行介绍。

关键词:高效液相色谱;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。

1 药物及其制剂分析

鉴于药物及其分解产物在HPLC分离检测中的保留时间不同,用HPLC对药物鉴别和杂质检查,具有较强的专属性,而色谱图面积与浓度呈线性关系又可定量测定。因此,在药品质量控制及新药市场中被作为重要分析手段。王维剑等^[4]以ODS柱,甲醇-0.5%乙酸(1:9)为流动相,DVD检测器,波长329nm测定了一种新型抗肿瘤药替莫唑胺(temozolomide),为申报新药提供了数据。李小青等^[5]用RP-HPLC测定了新剂型多维软咀嚼片维生素C的含量,并研究了其稳定性。样品经冷冻干燥技术处理后,采用C₁₈柱,0.005mol L⁻¹ KH₂PO₄(pH3.6)为流动相,波长246nm,流速1ml/min。结果本法灵敏、准确,回收率100.3%,最低检测限为20ng,维生素C主峰与杂质完全分离,可用于其稳定性的监控,进而控制其质量。赵雪梅等^[6]用RP-HPLC法测定了复方利血平中维生素B₁、维生素B₆、氯氮草、利血平、氢氯噻嗪和硫酸双氯曲嗪6种组分的含量。为今后修订质量标准提供了参改。卞俊等^[7]用HPLC法测定了安脑胶囊中褐黑素含量,由于该制剂具有抗氧化、增强免疫功能,适于抗衰老,已列为海军基金项目。实验采用ODSC₁₈柱,乙腈-0.05mol L⁻¹醋酸铵缓冲液(1:3,pH4.6),检测波长278nm,结果线性范围在0.028~0.141μg μl⁻¹,回收率98.5%,方法准确、简便。许波等^[8]用HPLC法同时测定了增效黄连素胶囊中盐酸小檗碱和甲氧苄啶的含量,一次分析只需15min。翁水旺^[9]用反相离子对高效液相色谱法测定了复方降压胶囊中磷酸氯喹的含量。该制剂中含有12种成分,用化学分析比较困难,而用本法较为理想。晏秋鸿等^[10]应用HPLC测定了发酵液中梅岭霉素的含量。因为该药是我国自主研发的新型十六元大环内酯抗生素,主要用于兽用驱药,现已申报专利^[11]。本法不仅

可控制该药的产品质量,亦为后续发酵工艺优化、产业化、新药申报奠定了基础。刘刚等^[12]用HPLC一梯度洗脱法同时测定了鼻腔洗剂中甲硝唑、氯霉素和氯化可的松三种有效成分的含量。赵维娟等^[13]用HPLC法测定了乳膏中抗甲状腺机能亢进药甲氧咪唑含量。乳膏基质不干扰,可用于该制剂的质量控制。

2 中药及其制剂分析

2.1 中药指纹图谱分析 中医药在防治疾病方面,发挥极其重要的作用至今已有几千年的历史,而且,在国外享有很高的声誉。但是,如何控制中药材的内在质量,使之现代化,更好的走向世界,是需要研究的重要课题。目前,指纹图谱分析是综合宏观分析的重要手段之一。国家颁布了《中药注射剂指纹研究的技术要求(暂行)》^[14]和《中药注射剂色谱实验研究技术指南(试行)》^[15]后,各有关单位正在加紧研究。刘艳娥等^[16]建立了金银花药材高效液相色谱指纹图谱分析方法,可用于控制该药材的内在质量,实验以水煎法对金银花处理后,选C₁₈柱,流动相为(A)甲醇-0.05%磷酸溶液(10:90),(B)甲醇-0.05%磷酸溶液(60:40)梯度洗脱,流速1ml/min,运行时间60min,检测波长238nm,以此对方法学进行了考察,结果符合图谱技术要求。检测了10批不同厂家金银花药材的指纹图谱,出现有11个色谱峰为共有的指纹峰,并以黄芪苷为参照物计算了11个峰的相对保留时间,方法可靠,为提高金银花药材质量控制提供了参改。张雯洁等^[17]研究了三七中皂苷类成分的液相指纹图谱,结果在35个不同地区的样品中,确定了15个共有峰,并以人参皂苷R_{G1}峰为参照,计算了其相对保留时间和相对峰面积。发现三七的根种主要皂苷为人参R_{G1}和R_{B1},而三七皂苷R₁则是三七中特有成分。因此,为三七质量控制新模式的建立提供了依据。马欣等^[18]应用HPLC-DVD-MS²法建立了银杏叶提取物的多维指纹图谱,同时建立了质谱总离子流(TIC)指纹图谱,检测了银杏叶中四种有效成分(黄酮和内酯类化合物)。样品经前处理后,应用Agilent HPLC色谱条件和APFES-MS条件分析了法国、香港、山东等10个厂家样品。结果提取物的HPLC有33个峰,MS总离子流有51个峰。并以芦丁为参照

作者简介:王绪明(1933-),男,山东青岛人,主任药师。中国药学会高级会员,中国分析仪器学会光分析专业委员会常委,中国光学仪器学会物理光子专业委员会常委《光学仪器与分析》副主编。研究方向:药物分析。Tel:(010)66949020,66941847;E-mail:jfjn2004@163.com

物,计算了样品的相似度。多维指纹图谱专属性强,因为对中药中某成分有保留时间、UV 图谱、相对分子量和特征碎片 4 种信息,为中药研究中缺乏对照品提高了可能性。

2.2 中药制剂分析 (1) 李仙义等^[19]用 Agilent1100 HPLC-DVD 法测定了复方茵陈薄膜衣片中二甲氧基香豆素的含量(国家基金项目)。该制剂主要用于治疗湿热黄疸性肝炎,它是由茵陈蒿汤经工艺改进并运用现代技术提取有效部位制成。实验将样品过中性氧化铝柱纯化后,采用 C_{18} 柱,甲醇-水(45:55)为流动相,检测波长 280nm,结果线性范围在 0.108~1.080 μ g,回收率为 92.3%。方法简便准确,可作为药品的质量控制方法。吕东^[20]Agilent HPLC 测定了国家中药三类新药复方锁阳补肾胶囊中淫羊藿苷的含量(已收入青海省藏药标准)。实验选用乙醇超声处理,以 C_{18} 柱,用乙腈-水(27:75)流动相,270nm 检测,结果以测得的峰面积对浓度作用,得回归方程

$$Y=956.0X-10.57, r=0.9998。$$

线性范围在 0.280~1.438 μ g,本法可用于控制原料药及成药的产品质量。(3) 姜舜尧等^[21]采用反相高效液相色谱和离子交换液相色谱,分析了中成药半夏露糖浆中麻黄碱和伪麻黄碱成分。采用 SCX 柱,以离子交换色谱法分离,供试品种酸性和中性成分不被保留,生物碱等碱性成分可获得较好的分离,故可直观地得到麻黄中含生物碱在内的碱性成分的指纹信息。王晓先等^[22]用 HPLC-DVD 检测了赤丹退黄颗粒中丹参酮 A 的含量。因为该制剂等由赤芍、丹参、葛根等组成的中药复方,用于治疗急慢性病毒性胆型肝炎,用本法控制该制剂的质量有重要意义。

3 临床生物样品分析及药代动力学研究

Liu Zhi Min 等^[23]以 HPLC 法,采用 TSKG3000SW 分子筛色谱柱(分子量范围 1 000~300 000),流动相为 2mol L^{-1} 尿素,流速 1ml/min,检测波长 216nm,对男性精液生殖细胞精蛋白进行了分离研究,结果首次证实了精蛋白(相对分子量 4 800~25 000)异常或含量不足是男性不育的重要原因。刘建芳等^[24]采用 Agilent1100LC/ESFMSD 联用系统,内标桂利嗪,流动相:甲醇-水(70:30)含 1% 甲酸,流速 0.4ml/min,检测离子为 405.2M/Z 和 369.2SIM 等条件,建立了测定人血浆中的氟桂利嗪。样品用乙醚-环己烷(2:1)提取,可去除血浆中内源性物质的干扰。方法灵敏专一,最低检测限为 0.2ng \cdot ml $^{-1}$,适于生物样品分析。经 20 名健康受试者交叉口服单剂量二种盐酸氟桂利嗪胶囊 20mg,测得血药浓度-时间曲线及动力学参数,结果满意,为临床治疗脑血管外周血管疾病患者用药提供了检测手段。郭瑞臣等^[25]应用 HPLC-ESFMSD 测定了尼索地平人体中的血浆浓度及药代动力学。由于该药治疗高血压心脏病的作用 H 硝苯地平强 4~10 倍。但给药剂量小,遇光不稳定,因此,用常规 UV 检测达不到要求。而本法灵敏度高,最低检出限为 0.15ng \cdot ml $^{-1}$,不仅满足了低浓度检测,亦可用于生物利用度的研究。温预关等^[26]用岛津 LC-3AHPLC-HLD 法, λ_{ex} :345nm, λ_{em} :460nm,测定了抗焦

虑、抗惊厥新药扎来普隆(zaleplon)^[27]胶囊的含量,研究了人体药代动力学。实验选用乙腈-水(50:50)为流动相,分离效果较好,结果线性范围在 1~100ng \cdot ml $^{-1}$,方法简便灵敏。经测定 20 名男性受试者,未见不良反应,所得之动力学参数为临床用药提供了参考。

4 毒物分析

4.1 冰毒的检测 冰毒(甲基苯丙胺,MA)的主要活性代谢物苯丙胺(PA)与 MA 具有相似的药理作用。成人一次服用 PA30mg 即出现中毒反应,最小致死量为 200mg^[28]。二者均为滥用药物“摇头丸”常见成分。杨小红等^[29]用 HPLC-DVD 法同时测定了临床中毒患者血浆中的 MA 和 PA 含量。实验最佳条件为固相萃取时,血样必须经碱化后上柱,而后的洗脱以 3% 盐酸溶液 0.5ml 为宜。色谱柱为岛津 CLC C_{18} 柱,流动相为乙腈-甲醇-25mmol L^{-1} 磷酸二氢钾缓冲液,检测波长为 210nm,单个样品可在 60min 内完成。为临床快速诊断和抢救提供了依据。鉴于近年来在我国沿海地区,私制冰毒事件时有发生,因此,该法也为打击走私冰毒提供了有力的手段。

4.2 生物毒素分析 Wilkes^[30]用 HPLC-ELSD 法测定了串珠毒素 FB₁~FB₄。因此,在许多谷物食品中,曾发现这种毒素不仅能引起动物患病如马脑白质软化,猪肺水肿及兔肝癌,而且,FB₁ 还可能与南非和中国人群众食道癌发病率有关。因此,引起人们的高度重视。实验采用 YMC C_{18} 柱,以乙腈-水-三氟醋酸(pH2.7)为二元系统流动相,其中溶液 A 为 5:95:0.25,溶液 B 为 90:10:0.25,流速为 1ml/min,梯度洗脱,结果成功地分离了 4 种串珠毒素 FB₁、FB₂、FB₃ 和 FB₄,检出灵敏度为 60ng。我国食道癌高发区及青海大骨节病区的粮食中,都曾发现致突、致癌的毒物互隔交链孢霉醇(AOH)、互隔交链孢霉醇单甲醚(AME)和玉米赤霉烯酮(ZWA)。罗毅等^[31]采用 SPHPLC-DVD 和 VGMS 及 HPLC-MS LINC 离子束接口,对 143 个大骨节病区及非病区采集的玉米、小麦样品进行了毒物检测。结果从病区粮食中分离得到的互隔交链孢霉菌培养物中,不同程度地检出了 AOH 和 AME 二个毒素,并用 HPLC-MS 进行了鉴定。

5 军用化学毒剂分析

杨凤仙等^[32]应用 HPLC-ESFMS 法,分析了水和土壤中有有机磷酸化合物异丙基磷酸和异丙基磷酸丙酯。采用了 SIM 技术,排出了基质干扰,回收率分别为 100% 和 90%,灵敏度 1ng μ l $^{-1}$ 。鉴于这些化合物属神经性毒剂如沙林等的水解产物,因此,本法可用于测定化学毒剂。由于本法灵敏准确,故满足了禁止化学武器公约组织(OPCW)组织的第七轮国际联试配样测试工作的需要。王绪明^[33]报道了 Raghuvveeran 等^[34]用 RP-HPLC 法测定了水中的硫芥(HD),硫芥即芥子气,是一种糜烂化学毒剂,为核查化学裁军协定的实际情况,需要监测被认为是生产 HD 一些生产单位的流出物。实验采用岛津 LC-6A HPLC 仪,色谱柱为 Ppolyosil C_{18} 不锈钢柱,流动相

为甲醇-水(63:37);RCS-C₁₈预柱;流动相为甲醇-水(75:25),二者皆为1.5ml/min,UVD检测,波长200nm。且检出灵敏度为5ng,在10~40μg范围内呈线性关系,而在4.0~20.0μg·ml⁻¹范围内恒定。本法简便快速准确,HD的水解产物及杂质对测定不干扰,可用于监测合成装置流出物水样中的芥子气,亦可用于测定生物样品的HD。

6 结语

本文对近年高效液相色谱及其联用技术在药物毒物分析中应用的最新进展进行了综述。论述了高效液相色谱及其联用技术在药物及其制剂、临床生物样品及药代动力学和军用化学毒剂分析等方面的新进展。可对药物毒物分析工作者有所参考。随着HPLC联用技术的应用更加广泛,无疑将进一步促进我国仪器的发展,对我国生命科学的研究和环境监测都有重要意义。

参考文献:

- [1] The United states pharmacopeial convention, Inc, The United states pharmacopeia [S]. Appendix. 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] 王维剑, 张军仁, 庞华. 替莫唑胺含量测定方法的研究[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(5): 344
- [5] 李小青, 闫平, 谢剑炜, 等. 反相高效液相色谱法测定多维软咀嚼片中维生素C的含量[J]. 解放军药学报, 2003, 19(5): 392
- [6] 赵雪梅. 反相高效液相色谱法测定复方利血平片中6个组分的含量[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(5): 335
- [7] 卞俊, 原永芳, 宣伟东, 等. 高效液相色谱法测定安脑胶囊中褐黑素含量[J]. 药物分析杂志, 2002, 22(4): 270
- [8] 许波, 高良美. 高效液相色谱法测定增产黄连素胶囊中盐酸小檗碱和甲氧苄啶的含量[J]. 药物分析杂志, 2001, 21(1): 21
- [9] 翁水旺. 反相离子对液相色谱法测定复方降压胶囊中磷酸氯喹的含量的研究[J]. 解放军药学报, 2004, 20(1): 69
- [10] 晏秋鸿, 陈斌, 郭美锦. 反相高效液相色谱法测定发酵液中梅岭霉素[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(4): 245
- [11] OU YANG Ling, TU Gaoqun, GAO Yongsheng, et al. The fermentation method for Meiling mycin from streptomyces nanchangenses [P]. Chinese patent 1070228, 1996-03-09
- [12] 刘刚, 张启明, 吴璋, 等. 高效液相色谱法同时测定鼻腔洗剂中甲硝唑、氯霉素、氢化可的松三种成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(4): 317
- [13] 赵维娟, 张梅, 许景峰, 等. 高效液相色谱法测定甲硫咪唑乳膏的含量[J]. 解放军药学报, 2002, 18(3): 181
- [14] 国家药典委员会. 中药注射剂指纹研究的技术要求(暂行) [S]. 2002
- [15] 国家药品监督管理局. 中药注射剂色谱实验研究技术指南(试行) [S]. 国药管注[2000]348号
- [16] 刘艳娥, 吴玖涵, 吴玉田, 等. 金银花药材高效液相指纹图谱研究[J]. 解放军药学报, 2003, 19(3): 161
- [17] 张雯洁, 张华, 李忠琼, 等. 三七皂苷类成分的液相图谱研究[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(4): 328
- [18] 马欣, 孙毓庆. 银杏叶提取物的多维指纹图谱的研究[J]. 色谱, 2003, 21(6): 562
- [19] 李仙义, 袁海龙, 梁爱君, 等. HPLC测定复方茵陈薄膜衣片中6,7-二甲氧基香豆素含量[J]. 解放军药学报, 2003, 19(3): 176
- [20] 吕东. 高效液相色谱法测定复方锁阳补肾胶囊中淫羊藿苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2002, 23(4): 339
- [21] 姜舜尧, 田颂九, 刘琼, 等. 用二种高效液相色谱分离模式分析测定半夏露糖浆中安黄碱和伪麻黄碱成分[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(5): 341
- [22] 王晓先, 刘峰群, 赵庆国. 高效液相色谱法测定赤丹退黄颗粒中丹参酮A的含量[J]. 解放军药学报, 2003, 19(2): 149
- [23] Liu ZM. Study on separation of protamines in human sperm cells by High performance liquid chromatography [J]. Chinese J chromatogr, 1994, 12(6): 449
- [24] 刘建芳, 杨汉煜, 邓鸣, 等. 液相色谱-质谱联用法测定人血浆中氟桂利嗪[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(6): 468
- [25] 郭瑞臣, 魏春敏, 王本杰, 等. 高效液相色谱-质谱联用测定人体尼索地平血浆浓度及其药动力学研究[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(6): 464
- [26] 温预关, 马崔, 邱畅, 等. 扎来普隆胶囊的人体药代动力学研究[J]. 解放军药学报, 2004, 20(1): 24
- [27] Elie R, Pher E, Farr I, et al. A novel nonbenzodiazepine hypnotic [J]. J clin psychiatry, 1999, 60(10): 536
- [28] 李焕德, 许树梧. 急性中毒毒物监测与诊疗 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1999. 603
- [29] 杨小红, 田开珍, 王峰, 等. 高效反相二极管阵列检测法同时测定临床中毒患者血浆中的甲基苯丙胺和苯丙胺[J]. 色谱, 2003, 21(5): 497
- [30] Wilkes JG. Determination of Fumonisin B₁, B₂, B₃ and B₄ by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection [J]. J chromatogr A, 1995, 695: 319
- [31] 罗毅, 刘峰, 冯建林. 高效液相-质谱法测定粮食中互隔产链孢霉醇互隔交链孢霉醇单甲醚及玉米赤霉烯酮[J]. 色谱, 1994, 12(5): 342
- [32] 杨凤仙, 于惠兰, 车月有, 等. HPLC-ESI-MS分析有机磷化合物的方法研究[J]. 质谱学报, 2000, 21(3,4): 127
- [33] 王绪明. 反相高效液相色谱法测定水中实验[J]. 国外分析仪器-技术与应用, 1995, 1: 79
- [34] Raghuvveran CD. Reversed phase high performance liquid chromatography of sulphar mustard in water [J]. liquid chromatogr, 1993, 16(7): 1615

(收稿日期: 2004-04-12; 修回日期: 2004-06-10)

(本文编辑 刘贺之)