

·药物分析·

柱切换高效液相技术及其在复杂样品分析中的应用

王 卓 刘荔荔 高 申* 吴玉田

(第二军医大学药学院 上海 200433)

摘要 本文系统地介绍了柱切换高效液相技术的出现及发展、原理和方法,从生物样本、非生物样本两大方面综述了该技术在分析复杂混合样品中的应用进展,并就其与其它技术联合应用探讨了该技术的发展趋势。

关键词 柱切换;高效液相色谱;复杂样品

Column - switching HPLC technique and its application to analysing complex samples

Wang Zhuo, Liu Lili, Gao Shen, Wu Yutian

(College of Pharmacy, Second Military Medical University Shanghai 200433)

ABSTRACT This article systematically introduced the appearance, development, radical principle and methods of column - switching HPLC technique. A review on this technique being applied to analysing complex biological and non - biological samples was presented. Trend of its being combined with other techniques in future was discussed.

KEY WORDS column - switching, HPLC, complex sample

柱切换高效液相(column - switching HPLC, CSHPLC)技术主要是指,利用一个或多个切换阀(switching valve)将两个或两个以上的色谱柱联结,构成一定的色谱网络系统,从而在特定时间内使两种或两种以上流动相以不同流路或走向洗脱不同柱子,以达到多种不同分离目的技术。

早在 1973 年,柱切换技术便随着小死体积(low - dead - volume)切换阀的开发被应用^[1],但直到 80 年代初期,这种技术的应用发表率依然很低。可是在其后的十年里,人

们对复杂混合物分析的逐渐重视使该技术的应用急剧增长。如今,许多新型柱子不断问世,给利用同一流动相完成多种模式的分离带来了很大的方便。另外,计算机化的仪器使对该复杂网络的控制更为简便和准确。因此这种技术的应用数量一直呈上升趋势,其增长不亚于超临界流体色谱及其后的毛细管电泳。

值得注意的是,柱切换这一术语在不同文献中有许多同义语,常见的有:顺序色谱(sequential chromatography),多柱色谱(multiple column chromatography),偶和柱色谱(coupled column chromatography),分流色谱

* 第二军医大学长海医院药学部

(split chromatography)^[2], 多维色谱(multiple dimensional chromatography), 自动高效液相色谱(automated HPLC)等。

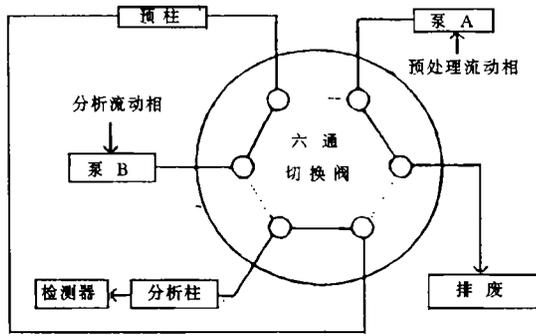


图 1 CSHPLC 的基本流路组成

柱切换高效液相技术应用于浓度低、干扰大、检测难度大的体内药物分析时,集样品净化与浓缩及分离测定为一体,样本不需预处理或预处理大大简化,可直接进样分析;克服了以往样品预处理复杂繁琐、费时费力的缺点,显示出巨大的优越性。另外,它还可实现柱前、柱后化学^[3]、痕量富集(trace enrichment)^[4]及制备色谱(preparative chromatography)^[5]等目的。目前,柱切换 HPLC 技术已广泛应用于环保、农药残留监测、石油化工、食品、生化、体内药物及制剂分析等各个领域。

一、CSHPLC 的原理及方法

CSHPLC 法主要是根据固相萃取的原理,将固相萃取与现代高效液相技术相结合,实现样本的在线自动净化和浓缩。通常,这是利用置于色谱网络中各柱之间的高压、小死体积,具有中心旋转切割功能的切换阀实现的。曾经使用过的有三通^[6]、四通、六通及十通阀^[7]等,但六通阀更为常用。

CSHPLC 系统包括用切换阀将两根或两根以上色谱柱联结起来,并选用适当的阀、在适当的时刻切换,使样品中不同的组分经不同的流路穿过柱网络。这样,只选择含待测

物的那部分样品组分而不是全部样品进行分离,而其它干扰组分则可被清洗排除。恰当的柱网络构型可以实现样品的预浓缩及多级分离而无须改变柱网络构型,只通过切换阀利用旁路,使用或绕开不同的柱以达到一定的目的。在多级分离当中,由于使用的柱及流动相的不同,其分离模式也达到多样化。

柱切换网络构型可根据具体情况来设计,可谓灵活多变、各具特色。但其基本组成不外乎单泵双柱、双泵双柱及多泵多柱三种类型。图 1 显示了生物样品分析常用的单阀双泵双柱切换图。

二、CSHPLC 分析复杂混合物的应用

(一)生物样本

1. 生物体液中的一般药物

血清、血浆及尿样是常见生物体样品,特别是血浆样品常用于治疗药物浓度监测(TDM)。生物体液样品往往含药物量低、内源性杂质多,利用柱切换技术可将净化和浓集合为一体,使分析时间大为缩短,预处理大大简化。这对于不够稳定的药物极为重要,可避免某些不稳定成分因暴露时间长引起的分解和共沉淀,并消除了液液萃取可能造成的样品损失,使回收率大大增加。另外,由于

可以较大量样品直接进样,从而使某些微量成分得以富集,达到很好的检测限。

(1) 样本直接进样

一些在生物样本中浓度较高的药物,进样量不大,对预柱污染较轻,可直接吸取试样进样分析。如茶碱、苯妥英等抗癫痫药及一些抗生素。高申等^[8]采用单泵双柱系统,建

立了同时测定苯妥英和卡马西平血浓度的方法。取血浆 20 μ l 直接进样,预处理流动相(PMP)为纯水,分析流动相(AMP)为甲醇水溶液,方法操作简单,结果准确精密。使一些只有单泵 HPLC 仪的单位也可在一定范围内应用 CSHPLC 技术。

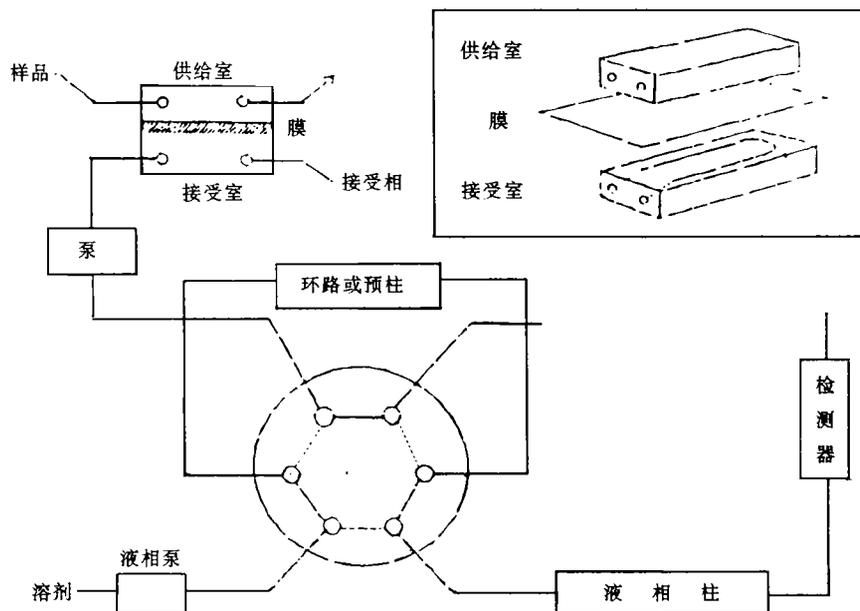


图 2 在线透析与柱切换联用装置基本构型
(右上角为透析部件局部详图)

(2) 样品稀释后进样

有些样本中药物含量较低,需要相应增加进样量,但多次进样后易引起预柱(PC)的污染堵塞,缩短其寿命。若先将样品稀释再进样分析,稀释后的样品中蛋白成分易于被洗脱,很少于柱上析出,特别当选用一些对蛋白质有一定溶解能力的溶液(如一定浓度的乙酸作稀释剂时,则更能防止颗粒的污染。

文献^[9]报告了利用双柱双泵系统研究抗癌药阿霉素的血浆药物浓度测定方法。将 300 μ l 血样以缓冲液稀释至 700 μ l 直接进样 500 μ l, 样本随预处理流动相进入预柱

(μ Bondapak, C₁₈37 - 50 μ m)将蛋白等大量内源性杂质洗脱,2min 后以反冲方式将富集于预柱柱头的待测组分洗入分析柱分离测定,方法精密灵敏,预柱进样数百次仍无需更换。

(3) 样本略加处理后进样

有的药物含量低,进样量大,且稀释后仍会造成 PC 污染,则可先用沉淀剂去除蛋白等内源性杂质,再取上清液直接进样,也可取得满意的结果。

另外,若药物与蛋白结合牢固时,也不可直接进样,必须进行蛋白沉淀及必要的前处理。应当注意,若在进样前的处理中加入了

甲醇、乙腈等有机溶剂来沉淀蛋白,则进样的上清液须以适当体积的水稀释,以降低一级流动相中有机溶剂的浓度(即降低其对弱极性待测组分的洗脱能力),从而防止被测组分在净化过程中从一级柱上被洗脱。

2. 生物体液中的对映体药物

手性药物中对映体的分析日益重要, L. - E. Edholm 等^[10-12]致力于生物体液中对待映体药物通过柱切换技术的分析。他们的方法包括使用手性及非手性柱来优化分离。Edholm^[10]用双柱双泵单阀的构型系统检测了一种 β_2 - 受体激动剂特普他林(terbutaline)的对映体。其中柱 1 为非手性苯基柱,流动相 1 为 0.01M 醋酸铵, pH4.6; 柱 2 为手性的 β - 环糊精柱,流动相 2 为 10:90 (V/V) 甲醇/0.05M 醋酸铵, pH6.0。此法经改动后被成功地用于血浆和肠液中特普他林的分析。

更进一步工作涉及了其他一些药物和更多柱子^[11,12]

3. 其它类型的生物样品

其它形式的生物样本常包括肝组织、肾脏组织、玻璃体、牛组织、细胞培养及骨盆组织等。这些样本应用于 CSHPLC 只需要组织匀浆和必要的提取,而无需其它复杂的预处理。

Tjaden 等^[13]在检查肾组织中氯霉素水平时建立了一种使用两个反相柱和两个六通阀的自动方法。由于预柱是高保留性的 PS - DVB(聚苯乙烯 - 二乙烯苯)相,而分析柱是弱亲水性的 C_{18} 柱,要求二者用不同的流动相,所以采用了二级泵系统。

Mellström^[14]在测定微粒体孵化中 4 - 羟基异喹啉时使用了四柱双阀切换系统,该系统需要两个泵,浓缩预柱置于六通阀环路位置。将上清液 100 μ l 注入 PS - DVB 浓缩柱,反冲入 5 μ m 硅胶预分离柱使废料洗去。待测物在第二根预柱上再次浓缩,然后反冲入第二根硅胶预分离柱,最后进入检测器。

(二)非生物样品

CSHPLC 技术除大量应用于生物样本中的药物分析之外,在其它领域的非生物性复杂样本分析中也发挥着广泛的作用。

在药物制剂分析中, Kenley 等^[15]用多柱切换色谱法测定了苯氧前列素(enprostil, 抗溃疡药)软质弹性明胶胶囊的溶出度。Conley 等^[16]用在线净化分析霜剂,减少了复杂的前处理。

在环境监测方面, Hogendoorn 和 Goewie^[17]利用 C_{18} 预柱和分离柱分别进行了地面水(surface water)及糖玉米(sugar - maize)中除草剂氰基吡嗪(cyanazine)及 bentazone 的测定。

在刑侦方面,用偶合的氧化铝柱和 C_{18} 柱切换系统分离并鉴定了非法的海洛因样品^[18]。Hirukawa 和 Hanai^[19]用柱切换反相离子对 HPLC,以 2 价铜离子络合和分离溶液中的自由氨基酸,一级柱和二级柱分别为 C_3 和 C_{18} 柱。

多核芳烃(PAHs, polynuclear aromatic hydrocarbons)是一类被认为能够导致多种不同癌症的环境污染物,因此这类化合物的测定非常重要。Olsson 等^[20]已发现使用环糊精键合相可以获得 PAHs 显著不同的洗脱顺序。如果用比建议的比例高的有机改性剂抑制包含形成,则尽管许多干扰物质被较牢固地保留了下来,但 PAHs 却只表现了很弱的保留性^[21]。

三、柱切换与其它技术的联合应用

近年来,随着柱切换技术应用日益广泛,人们在实践中开发出很多柱切换与其它技术的联用,使柱切换在分析复杂样品中的应用更加灵活广泛。这主要包括:

(一)在线透析

在线透析(on - line dialysis)技术与柱切换的联合应用较多,其基本构型见图 2。样品通过平面半透膜(如醋酸纤维膜)的在线透析,蛋白及类脂大分子被阻隔,而小分子被测

组分则可穿过膜而进入色谱系统。这对于 HPLC 前处理不失为一种新的净化途径。

这种透析的基本模式可分为平衡透析 (equilibrium dialysis) 和连续透析 (continuous dialysis)。Merbel^[22] 对比了不同方式的特点, 可根据实验的目的和要求不同来选用不同模式。Turnedl 等^[23] 选用在线停流透析 (on-line stopped-flow dialysis) 来增加透析物的量。Aerts 等^{[24][25]} 用此法富集痕量透析物, 并测定了食用产品中的兽医药残留, 还将这种技术作了改进, 将一个微量透析探针 (micro-dialysis probe) 用外科方法植于动物脑内, 在无干扰的情况下监测了其中的儿茶酚胺 (catecholamines)。

(二) 在线衍生化

体内药分中, 为了提高某些化合物 (如氨基糖甙类、激素、氨基酸、脂肪酸等) 的检测灵敏度, 往往需要进行衍生化。离线的衍生化测定由于其时间同衍生物稳定性不易控制, 因而造成精密密度不够好。采用柱切换在线衍生化装置可自动在线完成衍生化, 并可得到很好的精密密度。Jun Haginaka^[26] 报道了一种在线氨基酸衍生化的柱切换装置。

(三) 其它

有人曾将区带电泳 (zone electrophoresis) 样品预处理与 CSHPLC 联用, 以分析生物体液中的碱性药物。这是利用不同电泳迁移率选择性地小离子及可电离的分析物导入切换阀, 进入 LC 柱。

褶合光谱法^[27] 是新近发明的一项不经分离而利用电脑智能化分析混合物的有效的方法。已成功地应用于单、双乃至多组分混合物的定量定性测定, 在解决“白色混合体系”问题上独树一帜, 并正在努力向“灰色体系”领域进军。若将 CSHPLC 与褶合光谱法有机地结合联用, 以分离与不分离相结合, 互相取长补短, 必将为复杂混合物的分析创建更加方便有效的新方法, 并使两种方法本身的应用领域拓展、使应用层次提高到一个新

的水平。

参考文献

- [1] Hubbur JFK, et al. Column switching in high-pressure liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1973, 83: 267
- [2] Ramsteiner Ka. Systematic approach to column switching. *J Chromatogr*, 1988, 456: 3
- [3] Werkhoven Goewie CE, et al. Automated determination of drug in blood samples after enzymatic hydrolysis using pre-column switching and post-column reaction detection. *J Chromatogr*, 1985, 255, 79
- [4] Kucera P, Manius G. Recycling liquid chromatography using microbore columns. *J Chromatogr*, 1981, 219: 1
- [5] Little CJ, Stahel O. Role of column switching in semipreparative liquid chromatography - - Isolation of the sweetener stevioside. *J Chromatogr*, 1984, 316: 105
- [6] Arvidsson T, et al. Procedures for direct injection of untreated blood plasma into liquid chromatographic columns with emphasis on a precolumn venting technique. *J Chromatogr*, 1984, 317: 213
- [7] Lanchno DR, et al. Improved high-performance liquid chromatographic method for analysis of cyclosporin A using an automated sample processor. *J Chromatogr*, 1990, 525: 123
- [8] 高申, 等. 柱切换高效液相色谱法在体内药物分析中应用研究. *第二军医大学学报*, 1992; 13: 265
- [9] 王卓, 刘荔荔, 等. 柱切换 HPLC 法测定血浆中阿霉素浓度. *药物分析杂志*, 1993; 13(6)
- [10] Edholm L-E, et al. Determination of drug enantiomers in biological samples by coupled column liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1988, 424: 61
- [11] Walhagen A, et al. Coupled-column chromatography on immobilized protein phases for direct separation and liquid chromatography - mass spectrometry. *J. Chromatogr*, 1989, 473: 371
- [12] Walhagen A, et al. Coupled column chromatography - mass spectrometry thermospray liquid chromatography - mass spectrometric analysis of metoprolol enantiomers in plasma using phase - system switching. *J Chromatogr*, 1989, 474: 257
- [13] Tjaden UR, et al. Liquid chromatographic determination of chloramphenicol in kidney tissue homogenates using valve-switching techniques. *Analyst*, 1988, 113: 171
- [14] Mellstrom B. High-performance liquid chromatographic quantitation of 4-hydroxydebrisoquine in microsomal incubates by use of silica columns aqueous mobile phase and automated column switching. *J Chromatogr*, 1988,

424:435

- [15] Kenley RA, et al. Multidimensional column - switching liquid chromatographic method for dissolution testing of enprostil soft elastic gelatin capsules. *J Pharm Sci*, 1986, 75(10):999
- [16] Conley D L, et al. Automated high - performance liquid chromatographic column switching technique for the online clean - up and analysis of drugs in topical cream formulations. *J. Chromatogr*, 1983, 257(2): 337
- [17] Hogendoorn EA, et al. Residue analysis of the herbicides J. cyanazine and bentazone in sugar maize and surface water using high - performance liquid chromatography and an on - line clean - up column - switching procedure. *J Chromatogr*, 1989, 475: 432
- [18] Billiet HA, et al. Separation and identification of illicit heroin samples by liquid chromatography using an alumina and C18 coupled column system and photodiode array detection. *J Chromatogr*, 1986, 368:351
- [19] Hirukawa M et al. Simple free amino acid separation by reversed - phase ion - pair liquid chromatography using column switching technique. *J Liq Chrom*, 1988, 11: 1741
- [20] Olsson M, et al. Comparasion of liquid chromatographic selectivity for polycyclic abomatic hydrocarbons on cyclodextrin and C18 bonded phases. *J Chromatogr*, 1989,

477:277

- [21] Fielden PR, et al. Selective determination fo benzo[α] pyrene in petroleum - based products using multi - column liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1989, 479:117
- [22] van de Merbel NC, et al. On - line dialysis sample - preparation techinque for column liquid chromatography. *TrAC*, 1993, 12(6):249
- [23] Turnell DC, et al. Automated sequential process for preparing samples for analysis by high - performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1987, 395:613
- [24] Aerts MML, et al. Monitoring of veterinary durg residues by a combination of continuous flow techniques and highperformance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1988, 435:97
- [25] Aerts MML, et al. On - line combination of dialysis and column - switching liquid chromatography as a fully automated sample preparation technique for biological samples. *J Chromatogr*, 1990, 500:453
- [26] Hagknaka J, et al. Automated precolumn derivatization of amino acids with ortho - phthalaldehyde using a hollow - fibre membrane membrane reactor. *J Chromatogr*, 1990, 502:317.
- [27] 吴玉田, 等. UV/Vis - W 褶合光谱仪研究. *光学仪器*. 1995, 17(2):21

吸收系数法测定尼美舒利片的含量

潘 旭 初

(湖北省药学会 武汉 430064)

尼美舒利是一种新的非甾体抗炎镇痛药物临床上用于治疗类风湿关节炎、骨关节炎、外伤和手术后的消炎、镇痛等,尤其适用于治疗急性炎症。该药疗效好、副作用小、安全性大^[1,2]。于1985年首先在意大利上市,随后美国、西德等国家相继上市。我国也已研制成功。有关尼美舒利及其片剂的含量测定方法,国内尚未见报道,本文研究紫外分光光度法的吸收系数法测定尼美舒利片的含量,结果表明本法简便、快速、准确,兹将结果报道如下。

一、仪器与试药

岛津 UV - 265 紫外分光光度计,岛津 UV - 260 紫外分光光度计,岛津 UV - 220 紫外分光光度计,751G 型紫外分光光度计,753W 型紫外分光光度计。乙醇(分析纯,上海振兴化工厂)。尼美舒利对照品:同济医科大学药学院提供,尼美舒利片,同济医科大学制药厂提供。

二、方法和结果

(一)测定波长的选择

精密称取干燥至恒重的尼美舒利对照品 500mg,置于 100ml 量瓶中,加 0.1mol/L HCl 溶液 3ml,加乙醇溶解至刻度,即得 500 μ g/ml