

二维液相色谱技术在药物分析中的应用

杨金美

(齐鲁制药有限公司 山东 济南 250100)

摘要：药物分析是一项非常严谨的技术模式，特别是大部分药物均含有一定毒性，故需要对药物内源性物质进行定量、定性分析，了解生物样品中的基质含量，在控制干扰的过程中提高生物分析的有效性。二维液相色谱技术（Two-dimensional high performance liquid chromatography, 2D-LC）改善了传统液相色谱法（liquid chromatography, LC）峰容量、分离控制的问题，也能在自动化处理中对药品进行分析，确定药品的基本成分。基于此，文章就二维液相色谱技术在药物分析中的应用措施进行了分析。

关键词：二维液相色谱技术；药物分析；峰容量；分离控制

0 前言

二维液相色谱技术被广泛应用于生物领域的分析过程，2D-LC 技术在 2010 年被启用，该技术可分析复杂的细胞、亚细胞组织中的蛋白质，还可快速展开二维分析过程。现阶段，2D-LC 技术的内容、仪器、操作方法也逐步完善，为药物分析提供了可靠的技术依据，也能在正交性分析、色谱峰容量确定的基础上凸显出技术的分离要求^[1]。同时，该技术可借助两组分离系统峰容量及线性组合确定流动性关系，且正交性性能与色谱峰容量指标正相关，故在药物分析过程中确定 2D-LC 模式，具有较好作用。

1. 二维液相色谱技术基本概述

二维液相色谱技术可在自动化技术的支持下多次的分离处理，它是分析鉴定的实验室主要的分析仪器，能在单次色谱未完成分离的处理下展开后续循环分离，完成分离处理这一过程。因此，2D-LC 技术是一种“组合—分离”的过程，它可在一定作用机理下确保一维分离转移至二维系统当中，得到符合标准的中心切割模式、全二维分离模式体系。第一，中心切割模式应用中，系统可将某一维度的组分进行归类，将其推送至下一维度进行分离检测，可控制外界环境对分离检测过程负面影响，有利于提高 2D-LC 的纯度。在此过程中，2D-LC 技术可确保某一维度的色谱柱转入第二维度，可实现色谱柱的分离操作，即使分离中也会受到局部操作的影响，但工作人员仍然可利用自动化技术获取相关信息，方便提高复杂药品样品分离检测的有效性。同 LC 技术的应用来讲，2D-LC 技术全面提高了分离样品本身的纯度，可在确定分离要求、提高一次处理质量及纯度的基础上简化程序模型，方便控制样品检测过程所遇到的风险问题^[2]。第二，全二维分离模式应用需要考虑样品分析的兼容性问题，原因是两种分离模式所采用的原理是不同的，所以要确定针对性的分离模式，消除溶剂互相排斥而导致色谱柱损坏的问题。同时，工作人员要注意控制分离速度，比如第二维度的分离速度相对缓慢，此时要确保完成第一维度的分离后再进行下一维度的混合操作，避免分离混合浪费的影响，也能控制第一维度分离工作的浪费问题。总之，工作人员要确定不同维度分离速度的兼容与控制问题，且要保证第一维度分离作业的速度远小于第二维度。

2. 二维液相色谱分离性能的优化思路

2.1 基于色谱柱

2D-LC 技术可根据药物的类别组建不同维度的色谱系统，色谱系统可有区别的反映出不同项目的正交性参数，故正交性的大小差异与二维色谱系统有一定影响关系。当色谱柱本身的选择差异变大，其正交性参数也会逐渐变大。因此，为色谱柱系统营造一个具备分离效果的核心模型，可促进 2D-LC 系统的运行。要注意的是，影响色谱柱系统的主要因素包括填料的粒径及色谱柱的长度指标。另外，2D-LC 技术应用也要满足二维色谱柱的正交性要求，目前表征措施主要运用疏水减法模型来评估选择性参数 F_s 指标，故 F_s 的参数值提升会降低两色谱柱的选择效果。此外，建立起数据库模型，也能方便准确评估 F_s 的参数，比如：Luna Phenylhexyl 与 Zorbax Bonus 的 R_p 参数可达到 32.29。最后，以第一维度、第二维度的 $\log k$ 建立起纵坐标，确定坐标图中的相关表征系数，当该系数趋于 1 时，则表明二维色谱的选择性要求更接近，比如上述选择使用水和乙醇、水和甲醇作为流动相的线性关系系数较低，得到 $r^2=0.655$ ，故

两者的差异性较大^[3]。

2.2 基于流动相

流动相洗脱模式控制过程中，工作人员要评估出流动相的特点，酸碱度以及调节剂使用要求，可确保 2D-LC 的分离符合应用要求。在此过程中，工作人员要评估流动相的二维流动情况，确定影响流动相不兼容的实际性因素。其中，工作人员要注意以下几点：第一，二维流动相自身流动性不足，在正相、反相的影响下，需要选择乙酸乙酯、三氯甲烷作为正相色谱中的流动相，反相色谱流动相要选择甲醇，原因是这些有机物不相容。即使二维流动相可实现互溶，但会有部分维度的转移过程含有的流动相会受到洗脱强度过大，诱发了二维峰展宽的问题。例如在亲水作用下，反向全 2D 的分离处理中，工作人员要借助二维流动的模式进行作业，但这一过程融入导致第二维度反相柱保留物不足的问题，造成分裂峰的问题。为此，工作人员可选择真空溶剂材料，同时采用一维分流较低的洗脱模式来控制二维溶剂的强度参数，通过控制切割所使用的时间，控制转移过程的体积消耗，也能促使整体作业在低流速的状态下进行。

3. 二维液相色谱技术在药物分析中的应用

3.1 HILIC-RPLC 处理

亲水相互作用色谱（Hydrophilic interaction chromatography, HILIC）采用了一种极性固定相及有机水溶剂为流动相的色谱模式，该模式与正相色谱技术类似，组分会随着亲水性的增加次序发生一定变化，但流动相与反相色谱类似，可在亲水性化合物的分离过程应用。因此，在 2D-LC 技术中融入 HILIC 技术，总体的洗脱强度会显著高于常规洗脱过程，并且第二维度的 R_p 柱中的分析物保留值会逐渐降低，容易出现不对称峰的问题。为了消除流动相不相容问题的直接影响，工作人员可利用离线处理的模式促使第一维度的药品在洗脱处理后实现蒸发，并选择合适的溶剂进行后续分析，有利于控制第一维度流动相的洗脱强度，也能控制转移过程体积指标，降低转移过程对分离的影响。Yang 学者采用离线二维色谱技术来确黄酮类化合物的指标，初步发现亲水交互作用的色谱洗脱产物共计 11 份，经过深度分析后发现，构建的二维色谱的正交参数为 0.85^[4]。评估后发现，至少 140 种黄酮化合物可被分离鉴定。其中，在三七中成药的分析中，发现有 80 种黄酮化合物都具有一定药理作用。在 Sun 的分析过程中，利用离线二维色谱技术分析了丹参中成药的水溶性酚酸情况，通过对重要进行分离和结合处理，再使用自动化技术汇总物质信息，最终发现 264 种水溶性酚酸化合物，至少 195 种化合物为新型水溶性酚酸。此外，第一维度亲水作用和第二维度的反相色谱技术分析后，发现正交性的指标在 69.5%~92.5% 之间，实际峰容量为 1130，满足相关药物的检测需求。

3.2 NPLC-RPLC 处理

定量环—阀切换接口的二维液相色谱系统（NPLC-RPLC）的正交性性能最好，且分离质量也满足相关要求，可用于评估混合体系药品的分离过程。其中，正相色谱主要采用乙酸乙酯、三氯甲烷作为流动相，这些流动相不溶于 R_p 色谱中的水溶液中的甲醇物质，故此二维色谱峰容易出现变形问题。因此，工作人员可建立离线处理模式，在真空辅助的作用下使用可让溶剂蒸发的转换接口，或

(下转第 102 页)

(上接第 100 页)

者是要使用毛细管柱控制溶剂不相容的问题。Zhang 学者的相关研究中,运用了离线背景下的“正相一反相”色谱结合质谱的模式对二烯羟酸内酯进行分离操作。其中,一维、二维分别使用了 XAmide 柱和碳十八混合的 XUmide 柱结构,最终发现整体正交性可超过 49.5%。完成二烯羟酸内酯的保留,鉴定后发现,药品中至少含有 33 种微量元素,异构体超过 10 对。在 Wang 学者的研究中,第一维度使用硅胶材料进行压色谱柱的填充操作,第二维度使用了 ODS 技术来制备色谱柱,最终发现不同维度可在一定作用支持下解决不相容的问题。其中,工作人员要选择新型气流,在吸附技术(airflow assisted adsorption technique, AAA)支持下,可用于白花、前胡等重要的制备分离过程。另外,短期处理过程中,工作人员可在电喷雾质谱(ESI-MS)的支持下检定中药成分中的化合物。在 Li 学者的研究中,利用了全二维正相一反相色谱技术,在真空作用下萃取了物质中的有毒物质,最终提取、分离了至少 19 种化合物,其纯度超过 93.1%。在 Francesco Cacciola 学者的研究过程中,一、二维分别采用了微型聚胺柱和亚二微米填料填充处理的碳十八色谱柱结构,组成了符合要求的相色谱,期间分离了中药甜菊中的蔗糖和黄酮类化合物,并在分离鉴定后进行了定量分析。最后,在 Dugo 学者的分析中,一、二维度分别使用了微内径的硅胶柱结构和整组碳十八柱,建立起了一个全二维正相一反相色谱系模型,减轻了溶剂不相容问题对分离效果的不利影响^[9]。

3.3 AC-RPLC 处理

活性炭(AC)的物理性质相对稳定,它可在逆结合的作用下分离药品的大分子,促使药品中的活性物质与固相载体相偶共同合成亲和力较好的吸附剂,并在规范的处理下促使色谱柱得到填充。AC-RPLC 技术应用过程中,工作人员要结合分析物与固定相之间的亲和力进行评估,并对其进行分析,同时联合使用 RP 技术,来分析出药品化合物生物活性的实际情况。相关研究发现,将 SiO₂ 键与人的血清蛋白的色谱柱、硅胶 ODS 柱形成两组环接口,可构建起一个可同时在线管理和离线管理的二维液相色谱,也能方便

评估龙胆泻肝汤剂中的活性成分,得到生物指纹图谱内容。该方法利用过程中,工作人员要分析龙胆泻肝汤剂的保留价值,确定人血清与蛋白质间的结合力大小,方便展开中药制剂化合物的分析过程。经实验分析后可以发现,龙胆泻肝汤剂中至少有 100 种化合物会与人体血清蛋白的色谱柱相互反应。同时,工作人员要确定保留值和相对分子质量,再结合已有的文献对其中 19 种化合物进行了结构评估,发现细胞膜色谱(cell membrane chromatography, CMC)能够将活性物质稳固在色谱载体的外侧,可为细胞膜固定相的制备提供一定帮助,对药物活性、细胞功能分析具有一定影响作用,也能在自动化技术的支持下分析出药物与细胞膜受体之间的结合关系,提高技术本身的亲和力特点。

4. 结束语

综上所述,二维液相色谱技术的应用效果较好,具有峰容量大,选择模式较多的优势,它在药品质量控制过程具有积极的作用,在分析蛋白质特点、中药活性成分的分离、检定过程具有一定优势。但是,目前该技术还受到一定发展压力,故需要工作人员重视填料、接口、联用技术的研发与分析,建立起符合规定的管理要求,可提升 2D-LC 仪器的应用价值。

参考文献

[1]李贻,贺君,王晓洁,张德殿,孙萌,王伟宇.二维液相色谱同时检测特医食品中维生素 A、E、D₃ 含量[J].烟台大学学报(自然科学与工程版),2022,35(01):121-126.

[2]王书珊.二维液相色谱-质谱联用技术在多肽类药物有关物质研究中的应用[D].南京大学,2021.

[3]夏爽.二维液相色谱法测定人血清中氟伏沙明浓度的研究[D].新乡医学院,2021.

[4]魏小东.基于 pH 调制的生物碱全二维液相色谱分析方法研究[D].塔里木大学,2017.

[5]沈保家,秦昆明,刘启迪,蔡皓,刘晓,蔡宝昌.二维色谱技术及其在中药领域中的应用[J].中国科学:化学,2013,43(11):1480-1489.