

气相色谱法在体液微量药物分析应用进展

总后勤部军医学校 张 惠

一、前言

GC除对挥发性和热不稳的化合物分离条件较易选择外,另一特点是高灵敏度检测器包括选择性检测器的种类较多,熔融硅交联或化学键合毛细管柱的出现,也比过去的玻璃管柱具有非活性、耐久性、耐热性(350℃)等许多优点,可使有些化合物在玻璃毛细管柱上产生的吸附或拖尾等影响减小到最小。

生物体液中的微量药物的分析要突破两个难关,其一是选择回收率高的提取分离方法,其二是选择灵敏度高的检测方法。本文介绍比液-液提取方法回收率高的较新提取方法,同时介绍几种适合尿、汗、毛发、指甲中微量毒物的检测方法。GC的几种高灵敏度检测器,基本上可以满足这些要求。

二、固相柱分离净化

生物体液中药物分析在药物分离和法医上占很重要位置。多数微量分析要求除去干扰物质,回收率也要求高,因此使用简便迅速的预处理方法就很重要。

从生物体液中提取分离药物方法,一般

多采用液-液提取法,本法有易乳化、操作时间长、溶剂消耗量大等缺点。最近开发了操作简单回收率高的柱提取法,该法的吸附剂有以下几种:

Ambertite XAD-2: XAD-2是不溶于水的多孔性聚苯乙烯-二乙烯苯的聚合物,利用树脂表面的疏水部分与药物疏水部分结合被保留于树脂中,而后用适当的有机溶剂溶出。Ibrahim等用此吸附剂从各种生物体液中提取各种药物得到很高的回收率。有机农药也有实用例。

Ambelite XAD-4: XAD-4回收率不低于XAD-2,流速可以增加,柱中也可导入多量的样品。

Extrelut是由球状巨大细孔的硅藻土制成的,和XAD-2比较有样品容量大和回收率高的优点。对生物体液成分的除去率也高。Breiter等用XAD-2与Extrelut两种柱提取几种药物用薄层色谱比较检出限如表1。张惠用此两种柱提取了阿托品、山莨菪碱、樟柳碱、依色林等药物用薄层色谱比较检出限如表2。

表 1 用两种柱从尿中提取并用薄层色谱比较检出限

药 品	用薄层色谱检出限 (g)		显 色 剂
	XAD-2 pH9.4	Extrelut pH8.9	
吗 啡	0.5	0.3	H ₂ SO ₄ /碘化铅钾
可 待 因	1	0.6	
苯巴比妥	1	0.5	二苯胺/硫酸汞

表 2 用两种柱从尿中提取并用薄层色谱比较检出限

药 品	用薄层色谱检出限 (μ g)		显 色 剂
	XAD-2 pH9	Extrelut pH8.5	
阿托品	0.8	0.4	Dragendorff 碘铂酸 碘化铋钾
山莨菪碱	0.8	0.3	
樟柳碱	0.9	0.4	
依色林	1	0.5	
马钱子碱	1	0.4	

最近市场上出售高纯度细孔硅藻土柱商品名为Clin Elut。用于三环系抗抑郁剂、吗啡制剂的分析。回收率和再现性均好。

Sep-pak C₁₈ 和 Band Elut均为硅胶化学键合反相载体柱，使用前用甲醇、水洗

净柱后，加入样品，用甲醇、乙腈及这些含酸、碱溶剂流出。吸附力强，再现性与回收率均好。Good等将血清中的苯骞二氮草及其代谢产物用Bond Elut提取，比用液-液提取的回收率要高(表3)。

表 3 苯骞二氮草与其代谢产物用Bond Elut与液-液提取的回收率比较

药 品	Bond Elut	液-液提取
去甲氧安定	94 \pm 4%	83 \pm 5%
N-去甲基利眠宁	97 \pm 4%	80 \pm 4%
利眠宁	91 \pm 5%	80 \pm 5%
去甲安定	95 \pm 3%	91 \pm 2%
安 定	95 \pm 4%	91 \pm 3%

此外体液中药物柱提取法，还可作为GC、GC/MS、HPLC样品予处理用。

可概括归纳如表4所示。

表 4 生物体液中药物的柱提取法及其分析法

吸 附 剂	药 物	样 品	分 析 法
Extrelut	苯妥英	血 清	HPLC
	吗啡, 可待因	血 浆	GC/ECD
	甲基苯丙胺	尿	GC/MS
	马拉硫磷	血液、尿	GC
Clin Elut	三环系抗抑郁剂	血 清	HPLC
Sep-pak C ₁₈ 草	三环系抗抑郁剂	血 浆	GC, GC/MS
	吩噻嗪, 苯骞二氮草	尿	HPLC
	三环系抗抑郁剂	血 清	HPLC
	甲基苯丙胺	尿	GC
Bond Elut	抗癫痫药	血 清	GC-NPD, GC/MS
	三环系抗抑郁剂	血 浆	GC-NPD
	苯骞二氮草	血 清	HPLC
	甲基丙胺	尿	HPLC

三、几种专用、灵敏的GC检测器

GC因灵敏度高的检测器不断出现以及高分离效能柱的发展,对生物体液中微量药物的分析应用愈广。现就应用最多的检测器扼要介绍如下。

(一) 氮磷检测器 (NPD)

NPD是对氮和磷化合物特异的高灵敏检测器,寺田等用GC-NPD对甲基苯丙胺及其代谢产物进行了检出限的研究,其结果如表5所示。灵敏度很高达到 10^{-11} g的数量级。

表5 甲基苯丙胺及其代谢产物用GC-NPD的检出限

药 品	检出限*	保留时间 (min)
去甲麻黄碱	0.26	7.2
苯丙胺	0.09	7.6
甲基苯丙胺	0.10	10.2
羟基麻黄碱	1.04	9.2
P-羟基苯丙胺	0.14	10.8
P-羟基甲基苯丙胺	0.16	12.9

* ng/0.5cm 峰高

其他尚有体液样品中安眠剂、麻醉剂、中枢神经兴奋剂、三环系抗抑郁剂、局部麻醉剂、氨基甲酸酯和有机磷农药等用GC-NPD分析,均达到高灵敏度水平。

(二) 电子捕获检测器 (ECD)

对含卤族元素化合物特别是对农药分析有用。另外亦有将甲基苯丙胺、苯丙胺、普鲁卡因作成含氟衍生物得到高灵敏度的结果。

1983年Neukermans等提出非放射源的ECD。它是用灯丝发生的热电子作为电子源。与用放射源时相比较,不形成阳离子和游离基,也不会污染放射源,因而也就不必经常洗涤检测器,曾经测定了 γ 六六六、氯甲基萘、马拉硫磷等卤素系农药。

(三) 光离子化检测器 (PID)

PID是由于在稀有气体中的放电所发生的远红外线将样品离子化,测定离子电流的检

测器。Driscoll提出的PID由氩在121.6nm (10.2eV)发射 α -射线,通过 MgF_2 窗进到离子化室的密封UV灯所构成。此PID对芳香族化合物显示很高的灵敏度,其线性范围至少可与FID媲美。色摩等探讨了放电电极的结构和放电的稳定性。此装置因放电室与样品室之间不用窗材,就没有因窗材污染而使灵敏度下降的问题,也不存在因样品气体流入放电室将电极污染的问题。此种PID因为远红外线能量大,当检测高沸点的有机物时基线不稳定。

川副等使用氩作为载气和放电气体,用氩放电生成的11.6eV的远紫外线,以检测有机化合物为主的PID。这种PID除甲烷及乙腈外可检测大多数有机化合物,特别对芳香族化合物的灵敏度很高。对甲苯的检出下限为 2×10^{-13} mol/S。Jaramillo等对16种在尿、血清中巴比妥等衍生物用PID和FID检测器进行了比较,其结果比FID的灵敏度高8~16倍。

(四) GC/MS

GC是对混合组分分离的仪器,MS是对有机化合物结构鉴定的仪器,GC和MS联机既能分离又能解析,它的一个缺点就是造价昂贵。但目前有厂家设计出台式GC/MS系列,用四极质谱,小巧轻便,质量数达800左右,价格就便宜得多。

现在在微量药毒物分析仍以使用EI-MS和CI-MS为多,另外也经常用选择特定碎片离子称之为质量碎片法(MF)作为定量法,都可达到ng到pg药物超微量分析。

山元等对汗中、铃木等对毛发中甲基苯丙胺及苯丙胺用EI-MF进行了分析,还有生物体中吗啡和可待因、尿及血浆中大麻、血清中三环系抗抑郁剂等。

CI-MF(正离子化学离子化法,PCI)有对毛发及爪甲和生物体液中的甲基苯丙胺、苯丙胺、血清及血浆中三环系抗抑郁剂的分析报告。

最近研制成功的负离子的化学离子化法 (NCI), 可期望作为超高灵敏度方法而应用。NCI分为离子反应型与电子捕获型的两大类。后者对电子亲和力的大的化合物, 其灵敏度比正离子化学离子法 (PIC) 高数百倍, 可达到fg数量级 ($10^{-15}g$) 高灵敏度的分析。NCI的应用有苯并二氮杂草及其分解产物。Karisson等将四氢大麻醇的五氟丙基-五氟丙酰衍生物用PCI和EI-MS比较得到比EI-MS高200倍的灵敏度, 检出限中约 $1 ng/ml$, 绝对量达到 $2 pg$ 。

(五) 离子阱检测器 (ITD)

ITD是专门开发用作GC检测器的一种质谱计。它具有GC/MS所具有的性能, 高灵敏度 (可达到pg水平)、线性范围宽 (10^4)、对所有种类的有机化合物有良好的响应。样品自GC经一加热的熔融石英传

输管流入离子阱, 然后用电子轰击 (EI) 法使样品电离, 可将需要的质量范围内的所有离子都被存储在阱内, 接着使ITD在其质量范围内扫描, 将离子自低质量到高质量顺序地从阱中逐发出来, 最后用普通的电子倍增器检测逐发出来的离子, 输出的是每一化合物所独特的质谱图。ITD与IBM-PC数据系统联用, 其功能可具备谱库检索、定量、绘制GC谱图和质谱图以及IPD的控制, 并可和任何商品毛细管柱GC联用。它有几个优点: ITD是一个牢靠的装置, 小巧不需要离子化器组件; 装置的机械公差严格; 高性能; 离子阱分析器的制造过程没有四级滤质器那样严格, ITD的耗资大约相当于一台研究用色谱仪 (约为4万美元)。

ITD与GC其他检测器相比较确有很多的优点, 其对比结果如表6所示。

表 6 普通GC检测器与ITD的比较

检测器	典型的灵敏度	线性范围	对化合物的选择性	注 解
ECD	<10 pg	10^3	专用的	灵敏度随化合物的负电性而变
NPD	10 pg	10^5	专用的	对含氮或磷的化合物适用
FID	10~50 pg	10^6	通用的	最好用于饱和化合物
TCD	$1\mu g$	10^5	通用的	灵敏度低
霍尔	10 pg	10^4	专用的	灵敏度随化合物的电负性而变
ITD	通用<1pg 专用时<100pg	10^4	通用和专用	对所有化合物有良好的响应, 给出质量强度数据, 容易操作

四、熔融石英柱的进展

最近从高纯度 SiO_2 制作的熔融石英毛细管柱以及将玻璃柱用聚硅氧烷处理后, 将固定液交联结合或化学键合的熔融石英柱相继出现, 这类柱有很多优点。(1) 可使固定相膜更稳定。(2) 将样品直接注入柱中, 或不分流注入大量溶剂时固定相膜不易剥离。(3) 如柱被低挥发性成分污染, 可用溶剂冲洗以恢复柱原有性能。近年来研究了各种交联和固定化的方法, 这些方法中如Grob等的方法是由于过氧化物的热分解生成游离基的作用, 对交联聚硅氧烷固定相分

子 (Si-C-C-Si) 使其固定化, 此法有简便的特点。另外一个交联法是Schomburg提出的 $^{60}Co\gamma$ 线照射在玻璃管将聚硅氧烷固定化。固定液从无极性甲基硅酮 (OV-1, SE-30, SP-2100, DB-1) 与微极性5%苯基甲基硅酮 (SE-52), 1%乙烯基-5%苯基甲基硅酮 (SE54, DB-5) 等均可使用。

由于这些柱具备以上的特性, 近来应用相当广泛。如西岛等将对热不稳定而用一般填充柱不易分析的DDVP、DEP等有机磷系或氨基甲酸酯农药, 用SP-2100熔融石英

柱(25m×0.32mm)直接分析,得到再现性好的结果。张惠用SE-54熔融石英柱对DDVP、DEP等有机磷农药用NPD检测器可检出50pg而且分离效果好。

巴比妥类药物等易被玻璃柱所吸附,一般制成烷基衍生物后才能分析。Plotczyk直接将巴比妥类药物、抗癫痫药物、生物碱等21种游离型化合物直接用交联键合的SE-54熔融石英柱(25m×0.32mm),程序升温75°C(5min)→200°C(10°C/min)→210°C(5°C/min)→280°C(15°C/min),用FID检测器也检出5ng的数量级。

Goebel等报告了对食品中95种农药,用化学键合的二甲基聚硅氧烷BP-1和甲基苯基聚硅氧烷BP-10的熔融石英柱,用联柱法及不分流法,用NPD和ECD分别检测。另外Ripley等对有机磷系、氨基甲酸酯类、有机氯系农药194种用SE-30熔融石英柱(15m×0.247mm),以NPD、ECD检测器分析,得到良好的结果。其他如镇静安眠剂、三环系抗抑郁剂及其代谢产物、麻醉药及其代谢产物均适用于熔融石英柱。可以预言熔融石英交联柱或化学键合柱,再配以上的几种高灵敏度检测器对多种微量组分的分析,将发挥巨大的作用,这是目前HPLC不可比拟的进展。

五、未知物质的检索

在法医或毒物分析中有时遇到未知物质,这就要从各种分析结果得来的数据,一面对结构的组成进行推断,一面找推测的标

准品的数据进行比较。英国新标准线规(New British Standard Wire Gauge, NBS)记载了38,791种化合物的各种数据,有生物碱、药物、杀虫剂等十种类别,可查阅作为参考。

最近微型计算机的发展开发了用计算机检索的系统,曾有以TLC的R_f值、显色反应、紫外吸收、分子量等数据基础的检索方法以及红外吸收光谱等的检索法报告。另外有美国的NTH与EPA共同开发的Chemical Information System(CIS)检索系统。CIS所包含有主要数据库为质谱、¹³C-NMR、IR、UV等的化学分析值和毒性数据等。因为可以微型计算机与联机方式检索,从分析结果得到光谱后,用较短的时间就可作出未知物质的鉴定。

六、结语

生物体液中药物分析最理想的提取方法是柱提取方法,比常用的液-液提取法既省时间,回收率也高,且节省溶剂。NPD和ECD是最常用的检测器,ITD检测器与GC联机对混合物的鉴定带来更多信息。NCI的应用使灵敏度更加以提高。熔融石英毛细管柱的进展,以不活化性、耐久性、耐热性均优于玻璃毛细管柱,也克服了有些药物被玻璃吸附的缺点。此种柱与上述检测器互相配合,可以预期对生物体液中微量药物分析将起更大的作用。

(参考文献54篇略)

· 新书信息 ·

《临床药学和医院药品管理》即将出版

《临床药学和医院药品管理》由David H. Lawson/等编著,1982年英国伦敦出版。该书中文译本由南京军区军医学校药理学教研室集体翻译,中国药科大学刘国杰教授审校,人民军医出版社出版。

本书对国外临床药学和医院药品管理工作从理论和实践上加以论述。内容丰富,通俗易懂,简明扼要,观点新颖。当前我国正大力开展临床药学和加强医院药品管理工

作,本书的出版具有较大参考价值,适合临床医师、药师、医药院校教员、医药管理人员阅读和参考。

此书1987年4月出版,每册定价2.80元,需购者可直接汇款至南京军医学校(南京中山东路311号)药理学教研室,购买1~2本者加邮寄挂号费0.40元,3本以上者免费邮寄,以示优惠。

(崔煦)