

·药物分析·

智能多柱高效液相色谱系统及其在中药质量控制中的应用

赵芝兰 陆峰* 吴玉田*

(解放军第 169 中心医院 衡阳 421216)

摘要 高效液相色谱法在中药分析领域发挥了一定作用,但传统的单一色谱柱模式已无法满足现代中药研究中提供多成分乃至全成分信息的要求。智能多柱高效液相色谱系统是在多柱切换高效液相色谱与智能化技术的基础上提出的新概念。根据分析样品成分繁多、性质复杂的物点,利用切换技术的模块式分离性能,把样品分块地切换进不同性质的色谱柱,再用合适的流动相洗脱。全过程采用智能化控制,前期选择合适的色谱柱、流动相、操作条件,设计多柱色谱流路;中期控制多柱自动切换的精确性;后期对检测到的大量信息进行分析,去芜存真,得到可靠的定性定量结果。该系统的建立有望解决中药、生物体液、环境样品等复杂样品的快速、多成分分析。

关键词 智能多柱高效液相色谱系统;中药;质量控制

Intellectual multi – column high performance liquid chromatographic system and its application in the quality control of traditional chinese medicine

Zhao Zhilan, Lu Feng, Wu Yutian

(The 169th hospital of PLA Hengyang 421216)

ABSTRACT High performance liquid chromatography(HPLC) has taken some effects in the analysis of traditional chinese medicine. But conventional single – column mode can't satisfy the increasing needs of providing multi or even whole components' information in the modern research of traditional chinese medicine. Intellectual multi – column high performance liquid chromatographic system(IMC – HPLC) is a new conception based on both column switching HPLC and intellectual technology. Due to the miscellaneousness of the analytical samples, sectional separation property of column switching technique is employed to cut the sample segmentally into different kinds of columns, and then, elute with suitable mobile phases. The whole procedure is controlled intellectually. In the earlier period, favorable solid/mobile phase and chromatographic conditions are selected and multi – column flow diagram is designed. In the middle of the procedure, precision of the column – switching is controlled automatically. In the later stage, a great deal of information detected is analysed to eliminate the false and retain the true, to obtain the trustworthy qualitative and quantitative results. The system is expected to complete multi – component quick analysis of such complex samples as traditional chinese medicine, biological fluid and environmental specimen

KEY WORDS intellectual multi – column high performance liquid chromatographic system, traditional chinese medicine, quality control

* 第二军医大学药学院 上海 200433

中药研究的大趋势是全成分分析,这样才能找到从单味药到复方的不同配伍、煎煮时间等对化学成分的变化规律,才能找到与中药机理之间的有机联系。但目前即使是成药制剂中的少量几个活性有效成分、毒性成分都还难建立标准化的检测方法。鉴于中药成分的复杂性,以往凭经验选择色谱分离模式和条件的做法,已明显适应不了如此复杂介质背景下的定性定量任务。智能多柱高效液相色谱系统(IMC-HPLC),利用多柱切换模块式分离的效果,结合高效液相色谱本身优良清细的分离分析能力,加以智能化地控制,有可能解决中药复方制剂多成分分析的部分问题。

一、智能高效液相色的谱法

高效液相色谱法智能化的含义很广泛,凡能把人工总结的规律程序化,该程序又能自动地从新现象中总结规律并不断完善自身的过程都可称作智能化。因此高效液相色谱法的许多研究领域都有智能化的提法,大致可分为:

(一)最佳柱系统的推荐 就是根据物质的溶解性、极性、酸碱性等性质,选择合适的色谱模式(正相、反相、离子对等)、柱子类型(硅胶柱、苯基柱等)、流动相(种类、浓度、改性剂等)。这是最初级的智能化,但也只有正确的柱系统选择,后面的各种智能化才有意义。卢佩章等(1)在这方面做了很多卓有成效的工作。

(二)最佳操作条件的选择 就是选定最佳柱系统后,给出最佳的流动相浓度曲线,使得样品组分在具有一定分离度的条件下,分析时间最短。这种条件优化可以分为两大类:已知样品优化和未知样品优化。已知样品优化是在知道样品个数与保留值方程后,预测某条件下的保留值,并以分离度为指标进行的条件优化。Glajch等(2)的三角形法、吴文等(3)的四面体法、邹汉法等(4)的移动重叠分辨分离度法等,在一定程度上解决了

已知样品的优化。未知样品的优化相对困难些,必须先经过一定的试验把未知样品转化为已知样品,再用黄红心等(5)的串行优化(单纯形法结合智能搜索法)等进行条件优化。这里,搜索的广度和深度上的实验次数与是否局部寻优是一对矛盾。

(三)保留值的预测 就是选定色谱分离条件后,从所研究的物质结构出发,找出与基本母环、特性基团有关的理化参数如偶极距、极化率、电离能等,从而预测在特定固定相、流动相上的保留值。由于物质结构千差万别,很难找到适合于各种物质的相对较简单的几个参数,目前该类研究多停留在结构相对简单的同系物或结构相近的化合物。焦庆才等(6)在液固吸附色谱、邹汉法等(7)在离子对反相色谱等领域建立和不断完善的保留值方程有相当成功的应用范例。

以上这三类智能化方法,在一定程度上都能解决色谱分析中的某些问题,但同时也存在许多的缺陷。最佳柱系统的推荐在组分较单一或性质较相近时是可行的,但是面对组分复杂、性质差异很大的中药来说,推荐的柱系统将很多很繁,不经过简化归整根本无法实际操作;最佳操作条件的选择面临的中药是未知样品,转化为已知样品有相当大的难度;保留值的预测,因中药组分几乎找不到那些理化参数,或很少有同系物的保留数据可供参考,目前来说是不适用的。

鉴于以上种种原因,中药研究领域的高效液相色谱的应用是很经验化的,也就是说,预见性小、盲目性大、研究效率低,严重阻碍了中药的开发发展。

二、多柱高效液相色谱法

又称多维高效液相色谱法。梯度洗脱的高效液相色谱法,能分离分析较宽极性范围的样品,因此较之等度洗脱具有很大的优势。但对于组分更复杂、极性范围更宽的中药样品来说,仍有不足。多柱切换高效液相色谱法,除了具有梯度洗脱一样的能改变流动相

浓度的优点外,还可改变固定相(种类、键合度、粒径、柱内径、柱长等)、流动相(种类、浓度、改性剂),比之梯度洗脱有更大的优势。多柱切换技术能从含有大量组分的样品中“拣出”所要分离分析的组分,分段分块式地切换进不同的色谱柱进行分离分析而不需预处理;重复分析时,其间不必对柱进行再生;仪器自动化,操作简单,数据可靠,重复性好。多柱的切换时机有前端、中端、终端分割法;冲洗方式有正向、反向、循环冲洗法,这些方法与硬件的灵活结合,决定了多柱高效液相色谱法将大有作为,目前已在化工、药学、食品、环保等(8-11)领域有很多的应用。

多柱高效液相色谱法目前最大的难题在技术上,比如多个切换阀实时自动控制的准确性和流路设计的困难、柱间流路中的溶质扩散、两种截然不同的冲洗剂接触时的相互作用、溶剂的浓度甚至种类改变时对检测器本底的影响造成基线漂移等问题都将影响多柱高效液相色谱法的发展。

目前的多柱切换多数只是达到减少前处理的目的,固相萃取柱上保留的组分多半是作为杂质排除掉的。而实际上只有把每根柱子都作为分析柱,每根柱子上保留的成分都洗脱、检测,才有可能实现多成分乃至全成分分析。

三、智能多柱高效液相色谱系统

智能多柱高效液相色谱系统(IMC-HPLC)是一个全新的概念,之前只有梁鑫淼(12)有过类似的提法“智能多模式多柱色谱系统及其联用技术”。随着分析任务日益加重,分析样品的复杂性也愈加严重,传统的单模式单柱色谱系统已很难胜任这些复杂样品的分离分析。虽然在HPLC领域不断有新的方法技术出台,如胶束电色谱(13)、内表面反相色谱(14)、固相微萃取技术(15)等,而且即使是传统色谱柱的柱效也进一步升高,但单一的方法技术还是不能从根本上解决问题。多(双)柱切换高效液相色谱法虽已经很

朴素地被应用,但只是凭经验而缺乏预见性,大量数据也没得到很好的利用,是很大的资源浪费。

IMC-HPLC结合了智能高效液相色谱法与多柱高效液相色谱法的优点,除了推荐最佳柱系统和选择最佳操作条件外,还对多柱切换实施智能化控制,即解决影响多柱高效液相色谱法发展的“瓶颈”:准确切换、流路设计、溶质扩散、检测本底等问题;如何利用多柱的特性和优势以取长补短,预测出合理的多柱色谱系统等。预试或正式试验中获得的信息量大,而且可能在分析的结果上并不一致,这时判断是错误信息还是正常波动有相当大的难度,因此智能化的另一方面就是利用色谱规律对每个分析结果进行归纳,充分利用分析数据,得出尽可能准确的定性定量结果。

另外,多柱切换一个很特殊的问题是色谱峰的定性,因为经过几根柱子与几次切换后,再用保留时间作定性指标有很大的难度且准确性差。液相色谱与紫外光谱的联合定性,有望解决这个问题。由于紫外光谱不特征,普遍认为紫外定性不容乐观,但紫外光谱就象人的指纹一样,虽相似仍不同,用二极管阵列检测器采集紫外光谱信号,通过结合吴玉田(16)、俞汝勤(17)等的工作进行定性,必将有极大的突破和进展。

四、应用前景

中药成分千变万化,各种成分的性质遍布所有极性段、酸碱范围。实现多成分分离分析的最简单途径,就是在一根足够长的色谱柱上,用温和的流动相,在足够久的时间内洗脱。但这与现代分析要求的简便快速是背道而驰的。IMC-HPLC通过多次摸索建立合理的多柱色谱系统,调整各流动相及切换时间使各组分保留在相应的柱子上,再洗脱、检测得到大量的色谱信息,智能化地处理信息得到最终分析结果。这是一个很理想化的过程,而且分析时间足够短。该系统的应用

领域也远远不止于中(成)药,凡是介质复杂、组分性质差异大的样品,如生物体液样品、环境样品等都可望通过这一模式在不久的将来得到解决。

参考文献

- [1]卢佩章等. 高效液相色谱法及其专家系统. 沈阳. 辽宁科学技术出版社, 1992; 143
- [2]Glajch J. et al. Optimization of Solvent Strength and Selectivity for Reversed - phase Liquid Chromatography Using an Interactive Mixture - design Statistical Techque. J Chromatogr, 1980; 199; 57
- [3]吴文等. 高效液相色谱溶剂系统四面体优化法. 色谱, 1994; 12(5); 345
- [4]邹汉法等. 高效液相色谱法及其专家系统. 沈阳. 辽宁科学技术出版社. 1992. 305
- [5]Huang H. et al. An Intellegent Search Method for HPLC Optimization. J Chromatogr Sci, 1989, 27; 690
- [6]焦庆才等. 液固色谱中溶质保留规律的研究—多元流动相组成对保留值的影响. 分析化学, 1993; 21(12): 1392
- [7]邹汉法等. 与离子对试剂电荷相同的溶质和中性溶质的保留值变化规律式的验证. 色谱, 1992, 10(1): 1
- [8]Hogerdoom et al. Application of HPLC Column - switching in Pesticide Residue Analysis. Fresenius J Anal Chem, 1991; 339; 348
- [9]Gross - Rhode C. et al. Column Switching Technique for Group - type Separation of Different PAH Classes by Use of C₁₈ - modified Silica and Polystyrene Packings. J Liq Chromatogr, 1990; 13; 3415
- [10]Verhagen L. C. et al. Analysis of E - 2 - Nonenal in Beer at the Ultra Trace Level by HPLC Using Precolumn Derivatization and Column Switching Technique. J Chromatogr, 1987; 393; 85
- [11]Ching Y. H. et al. Two - Dimensional HPLC Method to Assay p - Hydroxyphenylphenylhydantoin Enantiomers in Biological Fluids and Stereoselectivity of Enzyme Induction in Phenytoin Metabolism. J Chromatogr, 1992; 575; 109
- [12]梁鑫淼. 智能多模式多柱色谱系统及其联用技术. 色谱, 1995; 13(5); 307
- [13]Shigeru T. et al. Electrokinetic Chromatography with Micellar solution and open - tubular capillary. Anal Chem 1985; 57; 834
- [14]Kazuhiro K. et al. Method for the Preparation of Internal - Surface Reversed - Phase Packing Materials Starting from Alkylsilylated Silica Gel. J Chromatogr, 1990; 515; 73
- [15]Arther C. L. et al. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. Anal Chem, 1992; 64; 1187
- [16]吴玉田等. 褶合光谱法与 UV/Vis - WCl 型褶合光谱仪研究. 第二军医大学学报, 1995; 16(6); 560
- [17]俞汝勤等. 含未知干扰物体系的多元光度分析的化学计量学算法. 分析化学, 1998; 17(6); 493

双波长紫外分光光度法测定双唑癬药水中益康唑克霉唑的含量

王桂芳 张守尧 沈霞 王秉均
(第一军医大学珠江医院 广州 510282)

摘要 本文采用双波长紫外分光光度法测定双唑癬药水中益康唑克霉唑的含量,方法简便,平均回收率及 RSD 分别为:100.4%, 0.8%; 100.8%, 0.6%。

关键词 双波长紫外分光光度法; 双唑癬药水; 益康唑; 克霉唑; 含量测定

Determination of econazole and clotrimazole in econazole and clotrimazole solution by dual - wavelength spectrophotometry

Wang Guifang, Zhang Shouyao, Shen Xia, Wang Bingjun
(Zhujiang Hospital, The First Military Medical University Guangzhou 510282)

ABSTRACT Two components of econazole and clotrimazole solution were determined by dual -