

液相色谱-核磁共振联用技术在药物分析中的应用

杨婷婷¹, 段 续¹, 金松子², 蒋庆峰^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院 分析测试中心, 天津 300193

摘 要: 液相色谱 (LC) 是分离复杂混合物的较好方法, 核磁共振 (NMR) 是结构分析的强有力工具。液相色谱 - 核磁共振 (LC-NMR) 联用技术是快速分离、确定结构的一种分析手段, 具有广阔的应用前景。主要综述了 LC-NMR 联用技术在化学药物分析 (包括未知杂质的结构分析、混合物中已知成分的定量分析)、中药及天然药物分析 (包括异构体分析、新化合物的结构鉴定)、海洋生物及生化大分子、代谢产物分析中的应用。

关键词: 液相色谱-核磁共振; 色谱联用技术; 结构鉴定; 含量测定; 化学药; 天然药物

中图分类号: R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2012)06 - 0635 - 07

Application of LC-NMR in pharmaceutical analysis

YANG Ting-ting¹, DUAN Xu¹, JIN Song-zi², JIANG Qing-feng²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Center for Instrumentation Analysis, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Liquid chromatography (LC) is a good way to separate complex mixture, and nuclear magnetic resonance (NMR) is a powerful tool for structure analysis. LC-NMR is a technique for fast separation and structure identification with a wide application prospect. The application of LC-NMR in analysis on chemicals (including structure analysis of unknown impurities and quantitative analysis on the mixture of known components), traditional Chinese medicine and natural medicines (including isomers analysis and structure identification of new compound), marine organism and biochemical macromolecules, and metabolites is briefly reviewed.

Key words: liquid chromatography-nuclear magnetic resonance (LC-NMR); structure identification; content determination; chemicals; natural medicines

随着现代药学、生化技术及其他相关技术的飞速发展, 对药物分析技术提出越来越高的要求。这就要求现代分析技术能连续化、自动化、快速而高效地客观分析药物, 从单一的分析手段到联用技术更成为一种发展趋势^[1-4]。液相色谱-核磁共振 (LC-NMR) 联用技术自 1978 年出现, 已经成为快速分离、确定结构的强有力的药物分析手段。典型的 LC-NMR 联用装置是由自动进样器、泵、色谱柱和紫外检测器组成 LC 系统, 洗脱液从检测器进入用于中间存储 LC 峰的聚四氟乙烯管环路的 LC-NMR 接口, 从接口出来引至带流通池的 NMR 探头或废液收集器。LC-NMR 联用技术包括连续流动 (on-line) 和停止流动 (off-line) 两种模式。随着对药品分析要求的提高, LC-NMR 又与质谱 (MS) 等技

术联合, 发展成了 LC-SPE-NMR 联用、LC-MS-NMR 联用等, 而且各具优点。现已广泛应用于药物分析的领域有: 有机小分子药物的鉴别、定量, 生物大分子类生化药物的结构研究; 对药物的体外评价与研究、对体内药物的监控与研究等。本文综述 LC-NMR 联用技术在分析化学药、中药及天然药物、海洋生物及生化大分子、代谢产物等方面的应用。

1 化学药物分析

1.1 未知杂质的结构分析

LC-NMR 联用技术在分析未知杂质时, 无需纯品做对照, 不产生破坏性, 具有专属性强、快速、准确、精密度好等优点。可通过 LC-MS 进一步获得杂质结构信息。

Pendela 等^[5]用 HPLC-NMR 与 HPLC-MS 相结

收稿日期: 2012-08-19

作者简介: 杨婷婷, 在读硕士研究生, 研究方向为药物分析。E-mail: viala.ytt@163.com

*通讯作者 蒋庆峰, 研究员。Tel: (022)23006881 E-mail: jiangqf@tjipr.com

合研究了红霉素的降解产物。用的是 XTerra RPC₁₈ (250 mm×4.6 mm, 3.5 μm) 色谱柱, 温度 25 °C, 流动相为乙腈 - 0.2 mol/L 醋酸铵 (pH 7.0) - 水 (270 : 100 : 63, 其中一半的水用 D₂O 取代), 体积流量 1 mL/min。装有电喷雾式离子源 (ESI) 的 LCQ 型 MS 仪。NMR 条件为停流模式下, 600 MHz Varian VNMRS 仪, 探头体积 60 μL。在没有纯品对照下鉴定了 2 种未知杂质为红霉素 A 烯醇醚羧酸和红霉素 C 烯醇醚羧酸。

联用技术同时能得到化合物的 UV、NMR、MS 信息, 为化合物分析提供了全面的信息。Shah 等^[6] 用 HPLC 技术分析证实了厄贝沙坦降解生成了结构不明确的产品, 然后联用 LC-MS、LC-NMR 等技术进一步明确了降解产物的结构。采用 Discovery C₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇 (A) 和稀磷酸 (pH 3.0) 的磷酸二氢钾缓冲液 (B), 按照 A 与 B 40 : 60 的比例混合, 体积流量 0.5 mL/min, 温度 40 °C。JEOL JNM-ECA 500 MHz NMR 仪, 3 mm¹H/¹³C 反式探头, 有效体积为 60 μL, WET (water suppression enhanced though T1 effect) 脉冲来抑制溶剂峰, 管路存储模式下, 再结合 MS (LTQ XL MS 2.5.0), 通过 ESI 与 LC 相联。结果厄贝沙坦的降解产物分别为氨基甲胺类、环戊烷羧酸类以及四环类的四唑肼类化合物。

Novak 等^[7] 采用 LC-NMR 和 LC-MS 结合分析了新药抗真菌剂 Icofungipen 的杂质。实验在停流模式下, 用 Bruker LC 22 泵, 色谱柱 Nucleosil C₁₈ AB 柱, 流动相为 75%D₂O 和 25%乙腈, 体积流量为 0.5 mL/min, Avance DRX 500 NMR 仪, 4 mm¹H/¹³C 反式探头, WATER GATE (water suppression by gradient tailored excitation) 和 WET 脉冲来抑制溶剂峰。通过 ESI 与 LC 相联的 LCQ 型 MS 系统, LC-MS 显示了杂质的初步结构异亮氨酰类, LC-NMR 进一步验证了该结构为脂肪族和芳香族物质, 最后用 MS/MS 和 NMR 技术确认杂质的结构。

Murakami 等^[8] 用 LC-2D-NMR 和 LC-MS 结合分析了马来酸氨氯地平的降解产物, 对于预防药物降解提供参考依据, 有利于药物的优化与储存。首先用对降解产物进行预浓缩, 然后采用 Agilent 1100 型 HPLC 仪, 用 Luna C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温 60 °C, 流动相用 D₂O (A) 和氘代乙腈 (B), 梯度洗脱 0~28.5 min 15%~80% B、28.5~32 min 80% B, 体积流量为 0.4 mL/min。BPSU-12

接口与 Avance 600 NMR 仪联用, NMR 实验采用 5 mm¹H-¹³C/¹⁵N 低温反式探头以及在 ¹H 600.13 MHz 停流模式, 用氘代试剂减小溶剂响应。MS 为 Waters Q-Tof2, ESI 正离子源模式。结果降解产物 1 为 β-N-乳糖氨氯地平, 降解产物 2 为氨氯地平的天然氨基酸衍生物。

Provera 等^[9-10] 用 LC-MS、LC-NMR 有效并且快速的鉴别了 CRF1 受体拮抗剂 GW876008 主要未知杂质的结构。实验用 Varian Pro-Star5 HPLC 系统, Varian INOVA 600 MHz NMR 仪, PFG-IFC 三共振 (¹H、¹³C、¹⁵N) 探头。Q-Tof2TM 型 MS 仪通过 ESI 与 LC 相联。LC-NMR 采用停流模式, 流动相为 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 的 D₂O (A)、0.1% TFA 的乙腈溶液 (B), 体积流量为 1 mL/min, 并对流动相采用 WET 抑制溶剂峰, 色谱柱 Waters X-Terra-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 22 °C。为 GW876008 的脱氢类似物以及甲基取代物。HR-MS 和 HR-NMR 技术还可以用来纯化和分离杂质, 用 Varian Polaris AC₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 相同的仪器设备、流动相, 分析了维替吡坦在合成过程中产生的联苯杂质。采用联用技术已经证明是一种有效的研究工具, 特别是在药物研发、生产过程中。

1.2 混合物的定量分析

LC-NMR 广泛应用于有机化合物的定性分析, 其在混合物的含量测定中也有重要的应用, 现已经广泛应用于药物合成及生产中。

《美国药典》规定使用定量 NMR 法, 以苯甲酸苄酯为内标物, 进行亚硝酸戊酯的定量分析。此外, LC-NMR 法还应用于多种药物的副产物或降解产物含量测定, 具有快速、简便、专属性高的特点; 与其他方法相比, 有不破坏样品, 信号峰不会发生重叠等优势^[11]。

Lienau 等^[12] 用 LC-NMR 联用技术同时分离并定量分析了生育酚这一大类物质。HP1100 型 HPLC 系统, 流动相为氘代甲醇 - 甲醇 (5 : 95), 以 0.4 mL/min 的体积流量在 Bischoff C₃₀ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 3 μm) 中分离样品, 柱温 22 °C, 检测波长 280 nm。Bruker AMX 600 NMR 仪。Bruker Esquire-LC 离子阱 LC/MS⁽ⁿ⁾ 系统, 装有大气压化学电离 (APCI) 源和离子阱。生育酚中各单一成分的含量为: α-生育酚醋酸酯 96.7%、α-生育酚 1.8%、β-生育酚 0.7%、γ-生育酚 0.1%、δ-生育酚 0.1%, 检测对样品需求量少, 对微量样品也适用。

Brereton 等^[13]用 Waters 600 S HPLC 系统, 80% 乙氰和 20% 氘水为流动相, 体积流量为 0.5 mL/min, Waters Symmetry C₁₈ (100 mm×4.6 mm, 3.5 μm) 色谱柱, 柱温为室温。Jeol Alpha500 MHz NMR 仪。已知浓度的 7 种苯的衍生物 2,6-二羟基萘、2,3-二羟基萘、对甲苯甲酯磺酸盐、苯甲酸甲酯、1,2-二乙氧基苯、1,4-二乙氧基苯、1,3-二乙氧基苯为标准品。少量的四甲基硅烷 (TMS) 加入到流动相用作核磁共振谱的零脉冲参考点, 使用流动模式定量分析了 7 种混合成分的量。该方法能够满足一般的混合物的定量分析, 且成本低, 但灵敏度相对其他色谱技术低, 如果采用停流模式可以提高分析灵敏度。

2 中药及天然药物分析

中药和天然药物成分十分复杂, 而有效物质通常为多种, 因此单纯采用一种色谱分离模式通常不能够全面地解决问题, 往往需要将多种分离模式相结合。采用 LC-NMR 可以很好的表征化学成分特征和相对含量的差异。LC-NMR 技术在色谱峰分离不完全情况下仍可提供详尽信息, 使得同分异构体无需分离提取, 便可进行检测分析, 大大提高了分析速度。

2.1 药用成分异构体分析

Bobzin 等^[14]用 Hewlett-Packard 1100 HPLC 系统, Alltech Alltima C₁₈ 色谱柱, 流动相为 A 0.01% TFA 的 D₂O, B 0.01% TFA 的 10%~100% 乙腈, 梯度洗脱, 体积流量 1 mL/min, Varian Unity-Inova 500 MHz NMR 仪, 有效体积 60 μL 的 ¹H/¹³C PFG 探头, WET 脉冲来抑制溶剂峰, 连续流动模式下, 联合使用 Perkin-Elmer Sciex AP100 型 MS 仪对天然产物氨基转移酶中存在的几何异构体进行了鉴定, 分别是阿普他明、反式阿普他明、阿普他昔及其类似物。根据质子的偶合常数确定其双键的构型, 作者提出虽然 LC-NMR 联用缺乏灵敏性, 但该方法仍然广泛用于已知化合物的分析和未知化合物的结构鉴定, 将为药物的研究提供可靠地手段和提高效率。

刘宁等^[15]用 LC-10AT HPLC 仪, HPCHEM 型 LC/MS 仪, 色谱柱为 Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (80:20), 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长 216 nm。INOVA—500 MHz NMR 仪, 在 500 MHz 的工作频率下, 以氘代甲醇为溶剂并作化学位移内标, 试验在室温下进行, 对 HPLC 分离得到的两种异构体进行 NMR 分析,

得到了双氢青蒿素 β 型差向异构体向 α 型转化过程。实验中得到 α 异构体和 β 异构体的 δ 值分别为 5.42、5.55。从 NMR 图中可看到共振峰化学位移变化的过程, 也可说明双氢青蒿素的异构体转化现象的存在。

王映红等^[16]在 HPLC-MS 分析的基础上用 HPLC-NMR 技术进一步分析了土茯苓中的二氢黄酮醇苷 4 个异构体。YMC-Pack ODS-A (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温 25 °C, 流动相为乙腈 (A)、0.05% 甲酸的 D₂O 溶液 (B), 梯度洗脱 0~10 min 5%~20% A、10~45 min 20%~55% A、45~55 min 55%~90% A, 体积流量 0.8 mL/min。Varian NOVA-500 HPLC-NMR 联用系统, 停流模式, WET 抑制溶剂峰。Agilent 1100 LC-MSD-TRAP XCT PLUS 系统, ESI 接口。土茯苓中二氢黄酮醇苷的 4 个异构体分别为落新妇苷、新落新妇苷、异落新妇苷和新异落新妇苷。该方法避免了传统的分离单体成分再鉴定结构的繁琐过程, 从而可以简便快速的获得各化合物的分子结构信息。

Strohschein 等^[17]研究了 β-胡萝卜素的顺/反异构体, 分离出 5 种顺/反异构体, 并通过 2D NMR 确定了 3 种顺/反异构体结构。用 Merck L—6200 A LC 仪, (250 mm×4.6 mm, 5 μm 和 3 μm) 硅胶 C₃₀ 色谱柱, 分别采用丙酮-氘水 (92:8, 93:7) 作为流动相, 体积流量为 1 mL/min。Bruker AMX 600 NMR 仪, BPSU 接口, 停流模式。其中在 3 μm 硅胶柱分离异构体最大峰比在 5 μm 硅胶柱大。这是由于 3 μm 硅胶柱能分离到异构体更小的洗脱体积, 在实验中 NMR 流通池为 120 μL, 这比洗脱体积小。因此认为 NMR 检测量取决于样品最大峰的浓度而不是样品的总量。

Dachtler 等^[18]用 HPLC-MS 和 HPLC-NMR 在线联合技术进行菠菜和视网膜中的叶黄素和玉米黄质立体异构体的分离和测定, 浓度在纳克水平。HP 1100 HPLC 系统, ProntoSIL C₃₀ (250 mm×4.6 mm, 3 μm) 色谱柱, 柱温为 22 °C。用氘水作为流动相以减少溶剂峰, 流动相为丙酮 (A) 和水 (B), 梯度洗脱 0~21 min 86% A、21~25 min 86%~97% A、25~40 min 97% A, 体积流量为 1 mL/min。Esquire-LC 离子阱 MS 系统, APCI 接口。NMR 采用 Bruker AMX 600NMR 仪, BPSU 接口, 停流模式和连续流动模式结合。结果提示 LC-NMR 联用技术是结构明确的异构体分析的首选方法, 可以用于

痕量样品的分析和鉴定。

2.2 新化合物的结构鉴定

Hendrawati 等^[19]对峨参 *Anthriscus lvestris* (L.) Hoffm. 中木脂素类成分的分离鉴定。采用 Agilent 1200 色谱仪, Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温为 30 °C, 流动相组分为 0.1% 甲酸水溶液 (A) 和 0.1% 甲酸的乙腈溶液 (B), 0~5 min 32% B、5~15 min 32%~86% B、15~15.1 min 95% B、15.1~20 min 95% B 梯度洗脱, 体积流量 1 mL/min。API 3000 型 MS 仪, APCI 接口。Bruker Avance III 500 MHz 仪和 5-mm CPTCI 低温探头。获得了 1D ¹H、¹H-¹H-DQF-COSY、¹H-¹H-TOCSY、¹H-¹³C-HSQC、¹H-¹³C-HMQC 和 ¹H-¹H-NOESY 谱, 最终鉴定了提取物中 14 种化合物, 其中有 6 种含甲基的木脂素是以前没有报道过的, 分别为 α-盾叶鬼臼素、β-盾叶鬼臼素、异鬼臼苦酮、去氧鬼臼毒素、换臼毒酮、β-盾叶鬼臼素甲基醚。结果证明联合使用 LC-ESI-MS, LC-SPE-NMR 技术是一种有效的分离鉴定化合物的分析手段, 样品可以通过 SPE 在线富集, 使得 NMR 灵敏度提高。

Zehl 等^[20]采用 Varian 9012 HPLC 系统, 色谱柱为 Hypersil BDS-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 25 °C, 流动相为 0.05% TFA 的氘水溶液 (A)、乙腈 (B), 梯度洗脱 0~1 min 12% B、1~20 min 12%~20% B、20~50 min 20%~50% B, 体积流量为 1.0 mL/min, 停流模式, Varian INOVA 500 MHz 仪, 有效体积为 65 μL 的 ID PFG 探头, WET 抑制溶剂峰, 联合运用三重四级杆型 MS 仪, 分析 1D (¹H, ¹³C) 和杂核 2DNMR (COSY、TOCSY、ROESY) 谱, 对茅膏菜属植物中黄酮类和鞣花酸衍生物进行了定量定性分析, 其中 2"-O-没食子酰基金丝桃苷、杨梅素-3-O-β-葡萄糖苷、山柰酚-3-O-(2"-O-没食子酸)-β-吡喃半乳糖苷这 3 种化合物首次在此种属中被鉴别。

HPLC-SPE-NMR 联用技术是分离, 分析化学或生物制品生物活性有效的手段, Goulas 等^[21]分析了狭叶香科 *Teucrium polium* L. 提取物。采用 HPLC-SPE-NMR 和 HPLC-DPPH 联用, Agilent G13311A HPLC 系统, 色谱柱为 Discovery C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温为室温, 流动相采用 0.1% 醋酸溶液 (A)、乙腈 (B), 梯度洗脱, 0~20 min 15% B、20~30 min 15%~40% B、30~40 min 40%~

80% B、40~45 min 80% B、45~55 min 80%~95% B。流动相体积流量为 0.6 mL/min。Bruker AV-500 NMR 仪, 有效体积为 60 μL 的 3 mm LC SEI ¹³C-¹H 探头。首次在狭叶香科中发现金石蚕苷, 且是其中含量最高、活性最强的成分, 毛蕊花苷以及二甲甲基槲皮素是抗氧化的主要成分。

Xu 等^[22]采用联用技术分析了链蕈木属植物 *Ormocarpum kirkii* S. Moore 中黄酮类化合物共有 14 个不同的成分, 其中有 8 种是新发现的化合物, 分别为氨基丙酰胺狼毒素、葡糖基化狼毒素、顺式 7-氧-葡糖基化狼毒素、反式 7-氧-葡糖基化狼毒素、7,7'-双氧-葡糖基化狼毒素、4'-羟基强的松龙、顺式 7,4'-双羟基强的松龙、反式 7,4'-双羟基强的松龙。LC-NMR 采用 Agilent 1200 色谱仪, 流动相为 0.05% 的 TFA 溶液和乙腈, 体积流量为 2 mL/min。Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温为 20 °C, Bruker DRX 400 NMR 仪。实验采用电子圆二色谱技术分析化合物的手性结构, 用 HPLC 技术分离得到不同的单体, 然后联用 NMR 技术对分离得到的单体化合物进行结构鉴定, 这些技术的联用将有助于推进天然产物中新的化合物的发现。

3 海洋生物及生化大分子分析

海洋药物有其独特的地方, 多具有活性基团的一类大分子药物。近年来的研究表明海洋药物具有很好的应用前景。许多大分子具有与某些相对应的专一分子可逆结合的特性, 如抗原和抗体、酶和底物及辅酶、激素和受体、RNA 和其互补的 DNA 等。因此应用 LC-NMR 联用结合色谱分析技术对生物活性筛选和测定, 而无需单体化合物的分离; LC-NMR 技术不仅可以用于海洋生物活性成分提取物结构的鉴定, 而且也可用于活性成分的筛选研究, 从而对海洋生物有效成分的研究更确切。

Bobzin 等^[23]用 Varian 9012 液相色谱仪, 色谱柱为 Alltech Alltima C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温为室温, 流动相为 0.01% TFA 的 D₂O (A)、0.01% TFA 的乙腈溶液 (B), 梯度洗脱 0~25 min 10%~100% B, 体积流量为 1 mL/min。Varian Unity Inova 500 MHz NMR 仪, 装置有 ¹H/¹³C PFG 探头, WET 脉冲来抑制溶剂峰, 采用停流模式, 并联合运用 Perkin Elmer Sciex AP100 型 MS 仪, 对海洋生物海绵体 *Aaptos sp1* 提取物中的生物碱 *aaptamine* 进行鉴定。LC-MS 确定了该复合物中活性成分的相对分

子质量以及种类, LC-NMR 为该活性成分的结构鉴定以及分析提供了理论依据。

Wolfender 等^[24]采用 LC-NMR 联用技术并结合活性分析实验, 实现了从海洋生物粗提取物中靶向分离新型活性成分, 为原有的活性筛选进行有效补充, 获得了大量提取物的新型活性成分及结构信息。用 Agilent 1100 型液相色谱仪, Chromspher PI C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温为 24 °C。流动相采用 0.006% TFA 的氘水溶液 - 乙腈 (96 : 4), 体积流量为 2 mL/min。Bruker Avance DRX 500 MHz NMR 仪, 5 mm TXI 超低温探头。根据构效关系初步获得潜在活性的成分, 因而大大减少了分离步骤, 节约了时间提高了筛选效率。

MS-NMR 联用技术鉴定化合物结构大大促进了药物研发环节的分析过程, 并且该技术广泛用于海洋生物的大分子蛋白靶点等活性物质的分析。Moy 等^[25]应用装有 TRG 探头的 Bruker DRX 600NMR 仪, Perkin-Elmer Sciex AP100 型 MS 仪, LC-NMR 联合 MS 技术以成纤维细胞胶原酶作为蛋白质靶点进行活性成分筛选研究。对骨架金属蛋白酶-1 (MMP-1) 蛋白质配位体结合的活性成分进行了高通量筛选和结构鉴定。

4 代谢产物分析

药品中的代谢物分析在新药研究和临床用药监控方面起着极为重要的作用。由于药物及其代谢物分布在大量介质中, 存在着内源性干扰物质, 取样量少, 样品具有不重复性。因此需要选择简便连续, 灵敏度高和分辨率好的分析方法。

4.1 体内代谢物分析

LC-NMR 联用进一步提高了 ¹H-NMR 谱的分辨率以及在代谢物中的应用, 同时也为临床疾病标本检测标记物提供依据。Appiah-Amponsah 等^[26]研究了尿液中的代谢产物 4-脱氧蔗糖酸, 采用 LC-NMR 联用一些低浓度不明确分子也被检测出。色谱柱为 Hypersil Gold AQ C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温为室温, 流动相为 0.1%甲酸水溶液 (A)、甲醇 (B), 0~25 min 40%B、25~55 min 40%~80%B、55~65 min 80%~5%B, 体积流量为 250 μL/min; Bruker Avance DRX 500 MHz NMR 仪, 5 mm TXI 超低温探头, 管路储存模式。

Akira 等^[27]比较了高血压大鼠和正常大鼠尿中牛磺酸代谢物。利用 Agilent 1100 色谱仪, Atlantis dC₁₈ (100×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温为 29 °C,

流动相采用含 0.006%TFA 的 D₂O 溶液, 体积流量为 0.25 mL/min, 60 min 后流动相换为 0.006%TFA 的乙腈溶液 - 0.006%TFA 的氘水溶液 (1 : 1), 体积流量 1 mL/min 维持 8 min。采用 Bruker AV 500 NMR 仪, LC-NMR 接口为 BPSU-12, WET 抑制溶剂峰。尽管 LC-NMR 技术在灵敏度方面还欠缺, 特别是在连续流动模式下, 但该技术在生物流体学方面, 如对药物代谢产物分析取得了巨大成功, 为代谢物领域的分析提供了完整的实验思路。

4.2 药物代谢物分析

Gschwind 等^[28]分析了 5-氯苯甲酰基羊脂酸类药物经过口服在体内的代谢分布过程, 为临床上使用的一些难以代谢的药物分析提供了实验基础。采用 HP1100 HPLC 系统, LiChrospher100 RP-18e (250 mm×4 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温为室温, 流动相为 0.1%TFA 的 D₂O (A)、氘代乙腈溶液 (B), 梯度洗脱: 0~35 min 10%~30% B、35~55 min 30%~80% B、55~60 min 80% B, 体积流量 1 mL/min。NMR 采用 Bruker DMX-500 MHz NMR 仪, 4 mm¹H/¹³C 反式探头, 停流模式; 并结合 TSQ7000 型 ESI-MS/MS 仪。

LC-NMR 联用技术可以用于一些黄酮类代谢产物的分析, Daykin 等^[29]用 LC-NMR 技术分析了绿茶的药用成分多元酚类物质的代谢物产物的主要成分。采用 Hewlett-Packard 系列 1100 型色谱仪, Prontosil C₃₀ (250 mm×4.6 mm, 3 μm) 色谱柱, 柱温为 27 °C。流动相为水和甲醇, 梯度洗脱, 0~2.5 min 100%水、2.5~5 min 100%~90%水、5~7.5 min 90%~50%水、7.5~10 min 100%甲醇, 体积流量为 0.25 mL/min。NMR 型号为 Bruker DRX 600, WET 脉冲来抑制溶剂峰。分析得到一种以前未报道的代谢物焦性没食子酸的硫酸盐, 并计算得到该代谢产物的浓度。

5 结语

LC-NMR 的特点不仅是 LC 的高效分离能力和 NMR 精确的结构分析能力, 更在于将两者巧妙结合技术。LC-NMR 已广泛应用于药物分析, 特别是近年来超低温探头技术、微探头技术、流动相抑制技术, 性能优良的 LC-NMR 接口, 软件滤波、消噪技术等先进技术的发展, 使得 LC-NMR 检测灵敏度大大增加, 应用领域也更加广泛。其优点主要表现在减少了从提取到谱学数据测定中间的样品制备步骤, 实验周期缩短, 减少样品分散, 需要样品量少,

分析速度快, 结构信息多等等。但 LC-NMR 联用技术也存在着固有的缺点, 如 LC/NMR 灵敏度较低, 只能分析混合物中含量较大的化合物, 流动相溶剂峰的存在更增加了分析困难, 而且对 $-\text{SO}_4$ 、 $-\text{NO}_2$ 等基团没有信号响应, 单独使用其鉴定未知化合物的结构是有限的^[30]。随着 LC-NMR 联用技术的进一步优化, 其应用会有更飞速的发展, 这将对我国的新药研发起到更大的推动作用。

参考文献

- [1] Spraul M. Developments in NMR hyphenation for pharmaceutical industry [J]. *Mod Magn Reson*, 2006, 1221-1228. doi: 10.1007/1-4020-3910-7_131.
- [2] 朱颖超, 刘 斌, 徐冬艳, 等. 核磁共振及其联用技术在天然产物定性定量分析中的应用 [J]. *现代药物与临床*, 2009, 24(4): 193-197.
- [3] 刘江疆, 林金明. 高效液相色谱-核磁共振联用技术 [J]. *生命科学仪器*, 2005, 3(3): 3-8.
- [4] 高 明, 颜晓丹, 金松子, 等. LC-MS 在药物有关物质分析中的应用 [J]. *药物评价研究*, 2012, 35(1): 63-66.
- [5] Pendela M, Beni S, Haghedooren E, et al. Combined use of liquid chromatography with mass spectrometry and nuclear magnetic resonance for the identification of degradation compounds in an erythromycin formulation [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 402(2): 781-790.
- [6] Shah R P, Sahu A, Singh S. Identification and characterization of degradation products of irbesartan using LC-MS/TOF, MSⁿ, on-line H/D exchange and LC-NMR [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51(5): 1037-1046.
- [7] Novak P, Tepes P, Ilijas M, et al. LC-NMR and LC-MS identification of an impurity in a novel antifungal drug icofungipen [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 50(1): 68-72.
- [8] Murakami T, Fukutsu N, Kondo J, et al. Application of liquid chromatography-two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy using pre-concentration column trapping and liquid chromatography-mass spectrometry for the identification of degradation products in stressed commercial amlodipine maleate tablets [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1181(1): 67-76.
- [9] Provera S, Rovatti L, Turco L, et al. A multi-technique approach using LC-NMR, LC-MS, semi-preparative HPLC, HR-NMR and HR-MS for the isolation and characterization of low-level unknown impurities in GW876008, a novel corticotropin-release factor 1 antagonist [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(3): 517-525.
- [10] Provera S, Martini L, Guercio G, et al. Application of LC-NMR and HR-NMR to the characterization of biphenyl impurities in the synthetic route development for vestipitant, a novel NK1 antagonist [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(3): 389-395.
- [11] Yang L, Ru G Y, Tang H R, et al. Human urinary metabolite quantification in nuclear magnetic resonance-based metabonomics using electronic reference [J]. *Chin J Anal Chem*, 2010, 38(6): 789-794.
- [12] Lienau A, Glaser T, Krucker M, et al. Qualitative and quantitative analysis of tocopherols in toothpastes and gingival tissue employing HPLC NMR and HPLC MS coupling [J]. *Anal Chem*, 2002, 74(20): 5192-5198.
- [13] Brereton R G, Shen H L, Airiau C Y. LC-NMR: An alternative to LC-MS and HPLC-DAD for the analysis of complex mixtures [J]. *Enst Dergisi*, 2002, 4(2): 60-65.
- [14] Bobzin S C, Yang S, Kasten T P. Application of liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy to the identification of natural products [J]. *J Chromatogr Biomed Sci Appl*, 2000, 748(1): 259-267.
- [15] 刘 宁, 杨腊虎, 张正行, 等. 双氢青蒿素差向异构体转化的研究 [J]. *药物分析杂志*, 2002, 22(4): 303-306.
- [16] 王映红, 李 磊, 张宏桂, 等. HPLC-MS 与 HPLC-¹H-NMR 联用鉴定土茯苓中的二氢黄酮醇苷异构体 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(11): 1281-1284.
- [17] Strohschein S, Pursch M, Albert K. Hyphenation of high performance liquid chromatography with nuclear magnetic resonance spectroscopy for the characterization of β -carotene isomers employing a C₃₀ stationary phase [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1999, 21(3): 669-677.
- [18] Dachtler M, Glaser T, Kohler K, et al. Combined HPLC-MS and HPLC-NMR on-line coupling for the separation and determination of lutein and zeaxanthin stereoisomers in spinach and in retina [J]. *Anal Chem*, 2001, 73(3): 667-674.
- [19] Hendrawati O, Woerdenbag H J, Michiels P J A, et al. Identification of lignans and related compounds in *Anthriscus sylvestris* by LC-ESI-MS/MS and LC-SPE-NMR [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(17): 2171-2179.
- [20] Zehl M, Braunberger C, Conrad J, et al. Identification and quantification of flavonoids and ellagic acid derivatives in therapeutically important *Drosera* species by LC-DAD, LC-NMR, NMR, and LC-MS [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 400(8): 2565-2576.
- [21] Goulas V, Gomez-Caravaca A M, Exarchou V, et al. Exploring the antioxidant potential of *Teucrium polium* extracts by HPLC-SPE-NMR and on-line radical-scavenging activity detection [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2011, 46(1): 104-109.
- [22] Xu Y J, Foubert K, Dhooghe L, et al. Rapid isolation and

- identification of minor natural products by LC-MS, LC-SPE-NMR and ECD: Isoflavanones, biflavanones and bisdihydrocoumarins from *Ormocarpum kirkii* [J]. *Phytochemistry*, 2012, 79(7): 121-128.
- [23] Bobzin S C, Yang S, Kasten T P. LC-NMR: A new tool to expedite the dereplication and identification of natural products [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2000, 25(6): 342-345.
- [24] Wolfender J L, Terreaux C, Hostettmann K. The importance of LC-MS and LC-NMR in the discovery of new lead compounds from plants [J]. *Pharm Biol*, 2000, 38(Suppl 1): 41-54.
- [25] Moy F J, Haraki K, Mobilio D, *et al.* MS/NMR: A structure-based approach for discovering protein ligands and for drug design by coupling size exclusion chromatography, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Anal Chem*, 2001, 73(3): 571-581.
- [26] Appiah-Amponsah E, Shanaiah N, Gowda G A N, *et al.* Identification of 4-deoxythreonic acid present in human urine using HPLC and NMR techniques [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 50(5): 878-885.
- [27] Akira K, Mitome H, Imachi M, *et al.* LC-NMR identification of a novel taurine-related metabolite observed in ^1H NMR-based metabonomics of genetically hypertensive rats [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51(5): 1091-1096.
- [28] Gschwind H P, Glaenzel U, Waldmeier F, *et al.* Metabolism and disposition of the oral absorption enhancer ^{14}C -radiolabeled 8-(*N*-2-hydroxy-5-chlorobenzoyl)-amino-caprylic acid (5-CNAC) in healthy postmenopausal women and supplementary investigations *in vitro* [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 47(1): 44-55.
- [29] Daykin C A, Johnp M, Duynhoven V, *et al.* Nuclear magnetic resonance spectroscopic based studies of the metabolism of black tea polyphenols in humans [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(5):1428-1434.
- [30] Yang Z. Online hyphenated liquid chromatography nuclear magnetic resonance spectroscopy -mass spectrometry for drug metabolite and nature product analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 40(3): 516-527.