



评述

药物分析检测技术研究进展

郭磊, 吴弼东, 谢剑炜*

军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850

* 联系人, E-mail: xiejw@bmi.ac.cn

收稿日期: 2011-07-20; 接受日期: 2011-08-19

国家“重大新药创制”科技重大专项平台项目(批准号: 2009ZX09301-002 和 2010ZXJ0900X-003-002)资助

doi: 10.1360/052011-610

摘要 随着药物研发领域和分析化学学科的不断拓展和相互促进, 现代药物分析检测新技术呈现出多样化深入发展的趋势. 本文主要评述了在药物质量控制研究和体内药物分析方面, 包括光谱/波谱相关、色谱相关及电分析、热分析等其他方面在内的 3 大类技术方法的最新进展, 并展望了我国药物分析学的未来发展方向和重点.

关键词药物分析
检测
光谱
色谱
质谱
电分析
热分析

在百年诺贝尔化学奖历史中, 检测与分析技术数获殊荣. 欧洲化学联合会给予分析化学如下定义: 分析化学是一门发展并运用各种方法、仪器和策略, 在时空维度里获得有关物质组成及性质信息的一门科学 (Analytical chemistry is a scientific discipline that develops and applies methods, instruments and strategies to obtain information on the composition and nature of matter in space and time). 这就说明了分析化学的内容极其广泛, 它是利用一切可利用的性质, 研究建立新的检测原理、新的仪器设备、新的表征测量的方法与技术, 从而最大限度的获取物质结构和质量信息的一门科学.

药物分析则是分析化学在药物研发领域中的应用分支. 在药物研发领域, 没有药物分析就没有新药的发现. 从药物与蛋白质相互作用研究及其亲和常数测定、药物及有关物质结构、构型和晶型研究、纯度与手性分析到药物代谢研究、生物技术药物分析、复杂物质分离分析, 都离不开各种药物分析技术. 药物分析的特点在于需要考虑药物本身的有效性和安

全性, 主要包括两大领域: 药物质量控制研究(含原料药、制剂、制剂辅料、中间体等)和体内药物分析(药理、药物代谢过程及临床监测).

分析化学的各种技术创新推动了药物分析的迅猛发展. 现代药物分析方法从基本原理上分类, 可大致分为光谱/波谱相关、色谱相关及其他方法等 3 类. 用于药物分析的光谱/波谱相关方法主要以四大谱(紫外可见光谱(ultraviolet spectrometry, UV)、红外光谱(infrared spectrometry, IR)、质谱(mass spectrometry, MS)、核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR))和 X 射线衍射分析为主. 以下仅简要介绍与之相关的最新技术及其进展.

1 与光谱/波谱相关的研究进展

1.1 UV 光谱、荧光光谱和化学发光光谱分析

包括紫外可见光谱、荧光光谱和化学发光在内的光谱学方法仍然在药物含量分析中占据主要比重,

例如,酶法是生物技术药物中常用的含量测定方法之一,其判定终点时普遍采用的即是光度法.与紫外可见光谱相比,荧光光谱和化学发光可提供更高的灵敏度和特异性,同步荧光可应用于两种及两种以上药物含量的同时分析.近来,UV 光谱、荧光光谱和化学发光光谱多与流动注射分析(flow injection analysis, FIA)一起,用于多种药物的含量测定.新型光学探针如 pH 敏感型 CdTe 量子点等已可作为质子探针,用于药片中硫普罗宁的含量测定^[1].

药物研发领域的迅速发展也促进了对极低含量生物分子的在位、实时传感方法的发展,大部分则属于光谱分析和免疫分析/传感技术的结合,如酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、化学发光免疫、荧光免疫方法等.量子点、金纳米粒、荧光共轭高聚物等在内的新型光学探针在免疫传感方面已逐渐展开应用,例如使用近红外区(650~900 nm)发射荧光的量子点,可避免复杂基质的内源性荧光干扰.新型技术如免疫聚合酶链扩增(immuno-polymerase chain reaction, IPCR)、免疫滚环扩增(immuno-rolling cycle amplification, IRCA)、基于纳米粒的生物条形码分析等均可有效提高方法的灵敏度,如对前列腺特异膜抗原(prostate specific membrane antigen, PSMA)的检测限(limit of detection, LOD)可达到 amol 水平,较之 ELISA 的灵敏度提高 4 个数量级^[2].

免疫分析还可方便与各种技术整合,完成体内药物的含量测定及药物代谢动力学分析.例如,使用近红外荧光标记的苯妥英类似物,结合超快免疫萃取/置换技术,可从含结合蛋白 HSA 的血清样品中有效测定游离的苯妥英含量,其 LOD 达到 570 pmol/L^[3].最近亦发展了一类新型“化学抗体”——核酸适配体(Aptamer)识别传感元件^[4,5],如荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)适配体型探针或基于适配体的荧光定量 PCR 方法,适用于蛋白质(如重组人促红细胞生长素,凝血酶)、小分子(如腺苷,可卡因)的检测.

1.2 红外光谱及拉曼光谱分析

在光谱相关的各种技术中,各种分子振动技术的应用发展最为迅速.在对药物的整体进行无损性质量控制时,近红外和拉曼技术最为重要,已应用于含量测定、水分测定、结晶行为、组成均匀度和固态

的物理化学性质相关的表征等.

近红外光谱(near infrared spectrometry, NIR)指波长在 0.75~2.5 μm (波数 13333~4000 cm^{-1})间,主要指由分子中 C—H, O—H, N—H 键的倍频及合频振动所产生的吸收光谱,普遍呈现强度弱、吸收峰相互重叠等特点.目前,采用透射、散射、漫反射等光学检测方法以及联合化学计量学途径,如偏最小二乘法(partial least squares, PLS)、主成分分析法(principal component analysis, PCA)、人工神经网络法(artificial neural network, ANN)等,建立标准混合物的数学模型,可进行各组分的准确归属,具有无污染、无前处理、无破坏性、在线监测、多组分同时测定、直接分析颗粒、糊状等不透明固体样品等优点.

近红外、中红外(波长 2.5~25 μm , 即波数 4000~400 cm^{-1})和拉曼光谱在固态药物的无损非破坏组分定量分析方面,可提供容错性强、可信度高的化学和空间信息^[6].远红外光谱(波长在 25~1000 μm , 即波数 400~10 cm^{-1})除用于表征多晶型的纯度外,还可用于蛋白质构象的确定、组分均匀度考察等.

多种新型拉曼光谱技术,如共振拉曼光谱、表面增强拉曼光谱(surface enhanced raman spectrometry, SERS)、傅立叶变换表面增强拉曼光谱(fourier transform SERS, FT-SERS)等,可与 IR 相互结合得到完整的分子振动光谱信息.其中,基于测定信号增强效应的 SERS,检测灵敏度高、操作方便,已在药物分析领域引起关注.亦可使用空间位移拉曼光谱经外包装对药品进行非侵入式识别^[7].拉曼光谱、NIR 和 X 射线粉末衍射技术三者相互结合,可对冻干工艺中药物的晶型进行监测^[8].NIR 和拉曼成像技术用于分析药物配方中活性成分的空间分布研究日呈逐渐增长趋势.上述技术亦是甄选真/假药的利器之一,从 2006 年以来我国 28 个省份的市(区)级食品药品监督管理局配备的药物快速检测车,其核心部件就是 NIR 光谱仪.可在几十秒至几分钟内完成药品初筛,能对 18 万条药品质量信息数据进行识别,对 300 多种化学药、200 多种中药材进行现场快速筛查.

1.3 质谱分析

近年来,适用于大气压下直接离子化的 MS 表面分析技术方兴未艾,同样也适用于各种材料表面的药物筛查.目前主要有电喷雾解吸电离(desorption electrospray ionization, DESI)、实时直接分析(direct

analysis in real time, DART)等两大技术和由之产生的若干分支^[9], 如电喷雾萃取离子化(extraction ESI, EESI)、电晕放电实时直接分析电离(corona DART, CDART)、介质阻挡放电低温离子源(dielectric barrier discharge ionization, DBDI)和低温等离子体电离(low temperature plasma, LTP)技术等. 这些技术的贡献在于依据方法适用性, 对气、液体和固体样品表面不做任何处理就可在大气压下直接进行实时分析, 几秒钟内便可获得结果, 使 MS 技术满足了现场实时快速分析的迫切需求. 例如, 使用空间分辨、非共振飞秒激光蒸发 ESI-MS 分析玻璃、纤维、钢铁和木材表面的药物^[10]; 使用大气压下超声喷雾(easy ambient sonic spray ionization, EASI)MS 分析薄层色谱板上的药物组分斑点, 仅需 N₂(或空气)辅助, 无需电压、介质放电、UV 或激光光束、高温等手段支持等^[11].

最近, 使用表面解吸大气压化学电离(desorption atmospheric pressure chemical ionization, DAPCI)MS, 结合 PCA 法, 成功追踪了复杂药品的组成、稳定性和制备工艺等信息^[12], 以测定的阿莫西林胶囊的化学谱为例, 除准确鉴定了低至 1 ng/g(胶囊)的药物活性成分外, 还可同时给出药物的质谱指纹谱信息, 以反映出不同厂商来源, 而无需任何样品前处理手段. 该技术还可用于测定药品的稳定性, 以及鉴别真/伪药品等. 针对组成更为复杂的六味地黄丸, DAPCI-MS 结合 PCA 分析还可准确区分天然药物的不同制备工艺, 如水蜜丸和浓缩丸的差异. 显示了实时大气压电离技术在快速鉴定药物组成、来源、真伪方面的显著优势.

1.4 NMR 分析

NMR 是一种有效的药物含量测定方法, 可通过比较 ¹H 谱的特征谱线强度, 测定混合物中药物的相对含量. 但由于仪器价格昂贵等原因, NMR 技术目前主要用于药物的结构鉴定, 包括体外药物和体内药物及其代谢产物的分析方面. 其主要目标在于提高灵敏度, 如多种多脉冲技术的发展. 另外, 使用微量体积的样品管或毛细管微型探头、低温冷却射频线圈和前置放大器部件, 亦可使目前一维(1D)和 2D NMR 的灵敏度提高到 nmol 级^[13]. 各种 2D-NMR 技术, 如 ¹H¹H 化学位移相关谱(¹H¹H homonuclear chemical shift correlation spectroscopy, ¹H¹H COSY)、二维核 Overhauser 效应谱(nuclear overhauser effect spectroscopy, NOESY)、无

畸变极化转移增强谱(distortionless enhancement by polarization transfer, DEPT)、异核多量子相干谱(heteronuclear multiple-quantum correlation, HMQC)、异核多键相关谱(heteronuclear multiple-bond correlation, HMBC)已成为分子结构鉴定的重要手段, 检测自旋耦合、偶极相互作用等核自旋间的关系, 在药物-药物相互作用、药物-环糊精包合物相互作用、药物纯度及生物降解多聚物的微孔率和中孔率等的研究方面极具发展潜力.

最近, 联合使用 2D 扩散排序 ¹H NMR(2D DOSY NMR), 成像型 DESI-MS 和 DART-MS 技术, 可在药品的整体层面上判别药物真伪情况. 较之大气压直接离子化的实时 MS 分析技术, 2D DOSY 还可区分出各种辅料信息^[14]. 例如, 对于抗疟疾药青蒿琥酯, DART-MS 仅可鉴别出药物活性成分, DESI-MS 还可鉴别出赋形剂蔗糖和乳糖, 亦可使用成像型 DESI-MS 直接观察到真伪药物的表面均匀度分布情况; 2D DOSY 则可给出药物活性成分和多种不同类型的有机赋形剂如蔗糖、乳糖、硬脂酸盐、聚合物型的糊精和淀粉等有关信息, 方便的提供出药物组成的“化学谱”. 另外, 手性 NMR 和固态 NMR 技术在研究手性药物性质和药物晶型/多态性方面, 一直备受关注.

2 与色谱相关的研究进展

在我国药品质量法规方面, 《中华人民共和国药典》是最高依据, 具有法律意义, 每 5 年修订 1 次. 其现行版本为 2010 版, 分为一部(药材和饮片、植物油脂和提取物、成方和单味制剂等)、二部(化学药、抗生素、生化药品、放射性药品及药用辅料)和三部(生物制品), 共收录条目 4567 种. 在诸版中国药典分析方法的发展中, 色谱及其联用技术对药品进行鉴别、杂质检查和含量测定在药典中的比重逐年增加, 目前已发展成为应用频率最高的仪器分析方法之一.

2.1 新型色谱技术

近 30 年来, 气相色谱(gas chromatography, GC)在药物分析中展现了独特用途, 一般用于各种原料药及制剂中的残留溶剂检查^[15]、中药中各种挥发组分的定性定量分析等. 始终在药物分析中占有主流地位

的色谱技术则属高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法,在原料药及制剂质控、纯度分析和药物微量杂质(包括手性杂质)、降解产物、代谢产物的分析鉴定等方面得到普遍应用^[16,17].根据作用机制的不同,吸附色谱、分配色谱(正相、反相)、离子交换色谱、亲和色谱、凝胶过滤色谱(又称尺寸排阻色谱)和凝胶渗透色谱等各类 HPLC 技术均有广泛应用,其中应用最为广泛的仍然是反相模式(reversed phase HPLC, RP-HPLC).近年来,在分配色谱基础上又发展出了新分支如亲水作用色谱(hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC)和疏水作用色谱等. HILIC 作为正相色谱的一种变化形式,但使用亲水型固定相、水及与水相溶的有机溶剂则做为流动相,其应用有增加趋势,其优势主要体现在特别适合于高极性药物和代谢产物的保留和分离及可与质谱兼容等方面.

目前研究进展集中于使用整体柱或小孔径填料色谱柱,以降低样品分析时间、增加样品通量,即达到“快速”或“高通量”分析之目的.在可耐受约 1×10^8 Pa 的超高压液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)系统中,便可使用 1.5 及 3 μm 孔径的色谱柱,从而更适用于快速分析复杂药物样品.但在超高压条件下,由液体的可压缩性所引入的非线性升温及保留效应不可忽略,此点在方法开发时需加以特别注意.此外,在流动相中引入第二种有机添加剂,用作离子对试剂、胶束或分离极酸、极碱物质时的硅羟基掩蔽试剂亦在 HPLC 方法开发中得到重视. RP-HPLC 亦可用于纳米粒封装与释放活性成分的研究,如 0.1% 三氟乙酸作为流动相的 RP-HPLC 方法可用于表征模拟胃肠道环境下藻酸盐-壳聚糖纳米粒对于胰岛素的结合与释放效率^[18].亦有 2D LC(如正相二醇窄径柱-反相整体柱)及多维 LC 用于分离分析药物混合或提取物的报道,可有效提高峰容量.新型色谱技术还包括各种新型的分子印迹型色谱柱的开发及体内药物分析中的柱切换技术,用于达到快速在线预柱切换净化的目的.

HPLC 技术所适用的检测器方面,蒸发光散射(evaporative light scattering detector, ELSD)检测器在 HPLC 中的应用有增加趋势,特别适用于多种抗生素、天然产物及磷酸酯等的分析.其他使用到的检测器还有示差检测器、荧光、化学发光及电化学检测器、电雾式检测器(charged aerosol detector, CAD)等.

ELSD, CAD 和示差检测器均属于普适型检测器,一般用于不含或少含紫外发色团的物质的检测. CAD 较之 ELSD 具有更高的灵敏度、宽至 4 个数量级的线性范围和信号响应因子恒定等特点,这两种检测器均为质量依赖型的检测器,产生的是普适性响应信号,其强弱不取决于分析物的光谱或理化性质.因此,使用一种对照品测量而得的校准曲线,同样适用于其他药物及其杂质.这就提供了在无对照品或放射性同位素标记化合物存在时准确定量的可能性. CAD 与 ELSD 所共有的缺点是,流动相组成影响检测信号,此点可通过增加一路由相反梯度组成的流动相进行补偿而解决.

2.2 色谱-质谱联用技术

LC-MS 联用技术集合了 LC 的高效分离能力和 MS 的高灵敏度与高选择性的优点,已成为色谱联用技术中的最重要分支,系分离、鉴定各种药物的重要手段之一,也在天然产物化学成分的定性定量研究、药物的残留物(农药、重金属、毒性物质等)分析及体内药物分析如药代动力学研究、代谢物鉴定等中得到了广泛应用.多维/串联质谱、衍生化试剂、小型化和基于芯片的样品引入技术是联用技术的发展热点.

目前应用最普遍的是电喷雾离子源(ESI)、大气压化学电离源(APCI)等离子源和四极杆、离子阱等质量分析器的有效结合^[19].其中,三重四极杆、四极杆-飞行时间质谱和离子阱均可实现串联质谱的功能,便于通过碰撞诱导解离(collision-induced dissociation, CID)进行谱峰解析,和应用多种串联质谱模式,如中性丢失、母离子扫描、子离子扫描等,通过离子的多种特征碎裂行为,并结合代谢物在 LC 上的保留行为等特征进行产物结构确证;同时可通过多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)定量,提高选择性和灵敏度.事实上,LC 串联质谱已成为鉴定和检测药物 I 相和 II 相代谢产物的一种主要手段^[20].

ESI 是目前液质联用最广泛应用的一种离子化方式,它适合于中高极性的化合物,尤其适于 RP-HPLC, HILIC 等色谱分离技术与 MS 联用,亦普遍应用于药物的 II 相代谢产物分析方面.同位素标记/稀释技术可以拓展 LC-ESI-MS 的线性范围及降低基质效应.近年来发展的微喷雾和纳喷雾(nanoESI)技术,更适于微量样品的高灵敏度分析.亦有 nanoESI 与大气压离子迁移谱联用测定药物的报道^[21].另外,对于

低极性或非极性的药物及其 I 相代谢产物的定量方面, APCI 和大气压光电离(atmospheric pressure photoionization, APPI)技术具有一定优势。

其他离子源电离技术, 如 MALDI/TOF-MS 质谱已成为测定大分子的精确质量数的准确工具, 但在小分子测定方面, 往往存在低分子量质量范围内存在大量基质峰干扰、样品制备易受基质共晶行为和均匀度影响等缺点, 近年来, 一种利用高重复率脉冲激光器的基质辅助激光解吸(matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)源和三重四极杆(triple quadrupole, QQQ)质谱联用方法已被初步用于 53 种化学药物分子的定量测定^[22], 该技术可从高基质背景的质量范围区域内挑选出待测离子, 谱峰行为与样品结晶质量和点样均匀度基本无关。MALDI-QQQ-MS/MS 与 ESI-QQQ-MS/MS 相比, 具有高通量、灵敏度和准确度得以提高等优点, 两者所得定量数据也存在较好的相关性。当然, 前者在去除血清的抑制效应方面还有待加强。

但应注意到的一点是, 使用 LC-MS 用于新化学实体(new chemical entities, NCEs)及其代谢产物的定量分析时, 该技术对它们的信号响应往往存在较大差异, 通常又难于得到 NCEs 的代谢产物标准品, 此时定量分析上即会存在局限性。CAD、放射性检测技术等, 则可补充做为在无标准品时的代谢物定量手段^[23]。当然, 利用簇集体试剂, ESI-MS 技术可在一定程度上实现在无标准品时的绝对定量, 如达菲、盐酸伪麻黄碱和茶苯海明等药物, 可与过量的 L-色氨酸, L-苯丙氨酸或泼尼松等簇集体试剂按比例混合, 有效消除了上述药物间的高达 100 倍的自身离子化差异, 准确度偏差小于 20%^[24]。虽然上述方法的准确度较之使用标准品时仍有待提高, 但对于上述述及的 NCEs 代谢产物的定量问题, 无异提供了一种解决之道。

对于药物(包括药物制剂)中的微量未知杂质或降解产物的鉴定越来越倾向于多种技术联合使用, 以从化合物的不同性质有效阐释, 最终得到准确的结构鉴定结果。例如, LC-MS, GC-MS 和 LC-NMR 可相互补充, 提供药物稳定性和有关降解产物的结构信息^[25]。联合使用制备 GC, GC-APCI-MS, 1D 和 2D NMR 及计算机辅助化合物结构解析(computer-aided structure elucidation, CASE)技术, 对复杂药物基质中的(半)挥发性杂质进行结构鉴定^[26]。需要指出的一点是, 上述未知杂质/降解产物的最终判定“金标准”仍

然应该是合成得到该物质的标准品。例如, 2005 年, Barbas 课题组^[27]研究表明, 几种感冒药物组方在稳定性实验中生成了一种非正常降解产物, 利用 LC-DAD, LC-MS, ¹H NMR, ¹³CNMR, COSY, HMBC 和异核单量子相关(heteronuclear single quantum correlation, HSQC)-NMR 等多种手段分离鉴定后, 认为系组方中的两种药物盐酸去氧肾上腺素和马来酸氯苯那敏间产生的相互作用, 生成了化合物 I。2006 年, Chan 课题组^[28]就同一题目撰文, 在合成了可能的两种产物 I 和 II 后并与降解物进行各种图谱比对后, 认为该非正常降解产物并非为化合物 I, 而是去氧肾上腺素和马来酸经 Michael 加成反应后, 生成的化合物 II。化合物 I 和 II 的 UV, MS 图谱及精确分子量完全相同, 但 ¹H 和 ¹³C NMR 存在细微区别。

近年来, 生物质谱在大分子生物技术药物的结构修饰与鉴定方面占据了重要位置。其中, 较之二维凝胶电泳-MALDI-飞行时间(time of flight, TOF)质谱, 基于 LC-ESI 的串联质谱技术发展迅速, 如结合多种标签技术、多种蛋白酶酶切技术, 在电泳/色谱分离的基础上, 可在分子量、蛋白质的定点修饰(如二硫键的连接位点、PEG 修饰等)、(N-端、C-端)氨基酸序列、或翻译后修饰(如糖基化、甲基化、磷酸化等)各水平上, 对蛋白质等生物技术药物进行鉴别等项的质量控制。目前的研究热点则在于蛋白质的相对/绝对定量方面。

2.3 与色谱及色谱-质谱联用技术相关的新型样品前处理方法

体内药物分析时, 需注重的一点是有效的前处理方法。例如, 新出现的填充吸附微萃取(micro extraction packed sorbent, MEPS)技术, 可处理低至 10 μ L 的样品, 方法步骤与固相萃取(solid phase extraction, SPE)全面兼容, 易与 GC-MS, LC-MS 整合, 可实现高通量和自动化。已用于生物样品如血、尿中的药物及代谢产物的前处理, 例如, 可在 2~4 min 内完成人血浆样品中多种药物如美托洛尔、吲哚洛尔、局部麻醉剂等的快速 96 孔高通量提取^[29]。

在对中药进行分离分析以发现新的生物活性物质和进行质量控制时, 提取、净化、富集步骤必不可少。目前常用的前处理方法有顶空-固相微萃取(head space-solid phase microextraction, HS-SPME)、顶空-液相微萃取(HS-liquid phase microextraction, HS-LPME)、

微波蒸馏(microwave distillation, MD)、微波辅助萃取(microwave-assisted extraction, MAE)、超临界流体萃取(super fluid extraction, SFE)、加压液液萃取(pressurized liquid extraction, PLE)等, 分别适用于中药的挥发性或/和非挥发性组分的提取过程. 例如, HS-SPME, HS-LPME 等技术具有简便、快速、绿色等特点, 适用于中药中挥发性组分的分析; 2003 年以来发展的 MD 技术, 较之传统提取精油的水蒸气蒸馏, 具有更快速、高效和低能耗的特点. MAE 技术较之传统的索氏提取, 具有萃取时间短、消耗溶剂少等特点, 亦可与 HS-SPME, HS-LPME 联合使用分析挥发性组分; 在 PLE 技术中, 高温高压的存在加快了分析物和溶剂间的传质过程, 萃取效率随之增加. MAE, SFE 和 PLE 均可与色谱技术联用, 进行对中药组分的定量分析.

2.4 CE 及 CE-MS 联用技术

从 20 世纪 80 年代末期以来, 毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)技术以其高效、快速、微量、多模式等特点, 迅速在药物分析领域得到广泛应用, 主要模式包括毛细管区带电泳、非水 CE、微乳液电动色谱、毛细管等速电泳、毛细管电色谱、免疫亲和 CE 等, 诸多检测技术如二极管阵列、激光诱导荧光(laser-induced fluorescence, LIF)、质谱、电荷耦合器件(charge-coupled device, CCD)、化学发光、非接触电导等均有涉及, 以达到高灵敏度或获得分析物的三维、结构信息. 目前较为成熟的 CE-MS 方式是 CE-ESI-线性离子阱-MS 联用模式, 主要应用于手性拆分、药物杂质检查、药物活性成分分析及其体内药物分析测定等.

CE 及 CE-MS 在药物分析中最常见用途是用于手性物质的分离与纯度分析. 多以利用手性选择剂来构建手性环境, 最常见的手性选择剂仍然是天然或修饰的 β -环糊精^[30]. 除可溶性的手性选择剂之外, 手性选择剂涂覆分散型多壁碳纳米管上亦可增强 CE 拆分效果. 各种离线和在线的样品处理技术、基于电泳和色谱原理的在柱样品富集技术、除 UV 检测器外的其他检测手段、分析物衍生化技术等, 均可用于在 CE 手性拆分中提高灵敏度^[31], 实际上, 这也是目前 CE 手性拆分领域的发展趋势之一. 几种处理/富集方法的联用, 如样品大体积堆积技术、在线推扫技术结合 CE-LIF 模式, 已可使衍生化氨基酸的 LOD 达到亚

nmol/L 水平^[32,33], 这就使复杂生物基质中的实际对映体分析和纯度控制成为可能.

由于生物工程技术的飞速发展, 抗体类药物增长迅速, 至 2010 年 6 月已有 26 种单克隆抗体(monoantibody, mAb)被 FDA 批准用于临床治疗. 在 mAb 的结构中, 其糖链部分与体内生物学活性的发挥密切相关, 不同真核细胞系、不同工艺表达所得的单克隆抗体, 其寡糖糖谱常存在差异. 但因其寡糖链具有高度的微观不均一性, 对 mAb 的糖基部分进行完全表征难度较高. 此方面, CE 技术, 包括全成像式等电聚焦分析等电点、胶束电动毛细管色谱(micellar electrokinetic chromatography, MEKC)分析糖基化比例、CE-LIF 结合衍生化技术分析糖谱及 CE-MS 分析寡糖链连接及组成等则对于评价抗体型药物的糖基化, 进行全方位的质量控制提供了较好的系列技术手段^[34].

2.5 微流控系统

微流控技术因具有分析微型化和实验通量化的特点, 已成为药物研发应用中具有潜在价值的工具. 微流控系统中可包含多种组件, 如泵、阀、混合器和加热器等, 从而便于操纵流体. 较之传统途径, 微流控通道仅使用极少试剂、反应时间快速, 更适于进行高通量的实验. 微流控系统可分为基于电渗流为驱动力及基于微泵为驱动力的两大类, 前者即为芯片 CE, 也是微流控系统发展伊始的表达形式. 几平方厘米的玻璃或塑料芯片上, 刻蚀数十至上百条电泳通道, 可实现 8, 24, 96 甚至 384 条通道的 CE. 芯片 CE 可实现高通量和自动化, 在药物筛选、DNA 序列分析等方面有着极好的应用前景.

3 其他相关技术

3.1 电化学分析/传感

目前应用最为成熟的电化学分析技术仍然是差示脉冲极谱法(differential pulse polarography, DPP), 其他基于伏安法的分析技术, 如差示脉冲伏安法、循环伏安法和快速傅立叶变换循环伏安法, 法拉第阻抗光谱法等也有应用. 除各种电化学分析技术外, 各种新型电化学传感器的设计非常踊跃, 如多壁碳纳米管修饰玻碳电极测定四环素类药物^[35]等.

3.2 热分析

2005 版中国药典附录Ⅷ Q 即已记载了 3 种用量少、快速、简便、准确的热分析法, 分别是将检测体系在程序控温过程中热量变化的差热分析(differential thermal analysis, DTA)、差示扫描量热法(differential scanning calorimetry, DSC)和测量被分析样品在加热过程中重量变化的热重法(thermal gravimetric analysis, TGA). DSC 是最常用的晶型和多态性测定方法. 已用于药物-药物、药物-赋形剂间的相互作用等. 药物分析中 DSC-TGA 法多联合使用, 用于确定药物的熔点、纯度、结晶度等热力学特征数据及药物和配方的稳定性分析, DSC-TGA 法还可用于判断药物分子中存在的是结晶水还是吸附水, 以及给出结晶水的个数. DSC, TGA 和 X 射线粉末衍射技术联合, 可用于药物分子双氯芬酸在不同晶型中固有溶解度的分析^[36]. 用 DTA 和 DSC 方法, 还可测定出同一药物不同差向异构体的纯度等. 使用扫描热显微成像技术和局部热传导率分析技术, 可给出多组分如药物扑热息痛和辅料羟丙基甲基纤维素在药片中分布的三维信息^[37].

3.3 容量分析方法

除上述各种仪器分析方法技术外, 不容忽视的一点是, 各种容量分析方法如滴定分析等在现代药物的含量测定方法中仍占据重要地位. 其特点在于

准确度高、所用设备较为简单, 故在各版药典中均占有较高比重. 目前的发展趋势则在于更低浓度、具备多化学计量点的体系的准确滴定. 对于药物中的微量水分, 多使用卡尔费休法, 于无水甲醇中进行容量法滴定, 目前则集中于解决难溶性药物中水分的准确定量问题^[38].

主要分析测试技术在药物分析及药学相关领域的应用范围总结于表 1.

4 总结与展望

药物分析是一门应用科学, 其基本研究内容贯穿于药物研究、开发和应用的全过程. 在我国药物分析的未来发展方向上, 质量控制方面, 应着力发展新的分析检测技术方法, 特别是基于新原理新技术的色谱、质谱和核磁共振等技术, 并应用于解决一系列涵盖化学药、中药、生物技术药等质量控制所面临的关键问题, 例如, 创新的药物分析方法和联用技术、药品微量杂质的分离分析鉴定、中药活性成分鉴定及其含量测定、手性药物研究、药物晶型控制、生物技术药物结构修饰鉴定研究、新型制剂评价及质量控制、药物标准品制备及标定技术等, 实现药品研发和研发过程中规范化、国际化的全程质量监控, 使我国新药质控技术达到国际先进水平. 体内药物分析方面, 灵敏、微量和专属性的体内药

表 1 主要分析测试技术在药物分析及药学相关领域的应用范围一览

分析检测技术	应用范围
UV, 荧光和化学发光光谱	体内外药物的含量测定及药物代谢动力学分析; 药物蛋白质相互作用研究
红外、拉曼光谱	结构鉴定; 结晶行为、组成均匀度等固态物理化学性质的相关表征; 真/伪药品鉴别
MS	药物的结构鉴定(包括生物技术药物的结构修饰鉴定等); 药物中微量杂质(包括农药、重金属等)、降解产物的分析鉴定; 体内外药物分析, 如药物代谢动力学研究、代谢产物鉴定等; 天然产物化学成分的定性定量研究; 蛋白质药物相互作用及药物高通量筛选; 靶点发现与鉴定, 蛋白质组学研究; 药物筛查与真/伪药品鉴别; 药物代谢组学研究
NMR	结构鉴定(包括原料药、杂质及体内代谢产物等); 药物-药物相互作用、药物-包合物相互作用等; 药品组成“化学谱”; 药物含量及纯度的测定; 药物代谢组学研究; 药物晶型/多态性
GC	原料药及制剂中的残留溶剂检查; 中药中各种挥发组分的定性定量分析
HPLC	药物纯度及含量的测定; 药品中微量杂质、降解产物分析鉴定; 手性分离分析和手性药物的光学纯度控制; 药物透膜性研究与药物筛选药物代谢动力学分析; 制剂包封率与释放率评价
CE 及 CE-MS	手性分离分析和手性药物的光学纯度控制; 药物活性成分分析; 生物技术药物表征
微流控系统	药物筛选; DNA 序列分析
热分析	药物晶型和多态性测定; 药物熔点、结晶度等热力学特征参数表征; 药物辅料相互作用和配方的稳定性研究; 药物组成均匀度
X-射线衍射	药物分子绝对构型的分析; 药物晶型和多态性研究; 药物蛋白质相互作用与靶点确证; 药物辅料相互作用和配方的稳定性研究; 药物组成均匀度
容量分析法	药物含量测定; 药物水分测定等

物分析技术、超微量活性物质的分析方法等是其重点发展方向, 从而全面、准确地获取药物在体(*in vivo*)、原位(*in situ*)、实时(*real time*)、在线(*on line*)等各方面的动态信息.

参考文献

- Wang Y, Ye C, Zhu Z, et al. Cadmium telluride quantum dots as pH-sensitive probes for tiopronin determination. *Anal Chim Acta*, 2008, 610: 50–56
- Bao Y P, Wei T F, Lefebvre P A, et al. Detection of protein analytes via nanoparticle-based bio bar code technology. *Anal Chem*, 2006, 78: 2055–2059
- Ohnmacht C M, Schiel J E, Hage D S. Analysis of free drug fractions using near-infrared fluorescent labels and an ultrafast immunoextraction/displacement assay. *Anal Chem*, 2006, 78: 7547–7556
- Stojanovic M N, de Prada P, Landry D W. Aptamer-based folding fluorescent sensor for cocaine. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 4928–4931
- Di Giusto D A, Wlassoff W A, Gooding J J, et al. Proximity extension of circular DNA aptamers with real-time protein detection. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: e64
- Amigo J M. Practical issues of hyperspectral imaging analysis of solid dosage forms. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 398: 93–109
- Eliasson C, Matousek P. Noninvasive authentication of pharmaceutical products through packaging using spatially offset raman spectroscopy. *Anal Chem*, 2007, 79: 1696–1701
- De Beer T R, Allesø M, Goethals F, et al. Implementation of a process analytical technology system in a freeze-drying process using raman spectroscopy for in-line process monitoring. *Anal Chem*, 2007, 79: 7992–8003
- Weston D J. Ambient ionization mass spectrometry: Current understanding of mechanistic theory; analytical performance and application areas. *Analyst*, 2010, 135: 661–668
- Judge E J, Brady J J, Dalton D, et al. Analysis of pharmaceutical compounds from glass, fabric, steel, and wood surfaces at atmospheric pressure using spatially resolved, nonresonant femtosecond laser vaporization electrospray mass spectrometry. *Anal Chem*, 2010, 82: 3231–3238
- Haddad R, Milagre H M S, Catharino R R, et al. Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry combined with thin-layer chromatography. *Anal Chem*, 2008, 80: 2744–2750
- Zhang X, Jia B, Huang K, et al. Tracing origins of complex pharmaceutical preparations using surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2010, 82: 8060–8070
- Molinski T F. NMR of natural products at the ‘nanomole-scale’. *Nat Prod Rep*, 2010, 27: 321–329
- Yadong L, Harris G A, Balayssac S, et al. Combining two-dimensional diffusion-ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy, imaging desorption electrospray ionization mass spectrometry, and direct analysis in real-time mass spectrometry for the integral investigation of counterfeit pharmaceuticals. *Anal Chem*, 2009, 81: 4803–4812
- Pérez Pavón J L, del Nopal Sanchez M, García Pinto C, et al. Use of mass spectrometry methods as a strategy for detection and determination of residual solvents in pharmaceutical products. *Anal Chem*, 2006, 78: 4901–4908
- 林纓, 谢剑炜. 高效液相色谱法测定辛伐他汀含量及其有关物质. *药物分析杂志*, 2005, 25: 523–525
- 姜艳红, 张淑珍, 谢剑炜, 等. 手性固定相高效液相色谱法拆分系列抗胆碱能药物对映体的研究. *分析化学*, 2005, 33: 1685–1688
- Sarmiento B, Ribeiro A, Veiga F, et al. Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the determination of insulin from nanoparticulate systems. *Biomed Chromatogr*, 2006, 20: 898–903
- 帕拉马尼克 B N, 甘古利 A K, 格罗斯 M L, 等. 电喷雾质谱应用技术. 北京: 化学工业出版社, 2005. 142–178, 206–236
- Holcapek M, Kolarova L, Nobilis M. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 391: 59–78
- Budimir N, Weston D J, Creaser C S. Analysis of pharmaceutical formulations using atmospheric pressure ion mobility spectrometry combined with liquid chromatography and nano-electrospray ionisation. *Analyst*, 2007, 132: 34–40
- Gobey J, Cole M, Janiszewski J, et al. Characterization and performance of MALDI on a triple quadrupole mass spectrometer for analysis and quantification of small molecules. *Anal Chem*, 2005, 77: 5643–5654
- Ramanathan R, Josephs J L, Jemal M, et al. Novel MS solutions inspired by MIST. *Bioanalysis*, 2010, 2: 1291–1313
- Flick T G, Leib R D, Williams E R. Direct standard-free quantitation of Tamiflu and other pharmaceutical tablets using clustering agents with electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2010, 82: 1179–1182
- Murakami T, Konno H, Fukutsu N, et al. Identification of a degradation product in stressed tablets of olmesartan medoxomil by the

- complementary use of HPLC hyphenated techniques. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 47: 553–559
- 26 Codina A, Ryan R W, Joyce R, et al. Identification of multiple impurities in a pharmaceutical matrix using preparative gas chromatography and computer-assisted structure elucidation. *Anal Chem*, 2010, 82: 9127–9133
- 27 Marín A, Espada A, Vidal P, et al. Major degradation product identified in several pharmaceutical formulations against the common cold. *Anal Chem*, 2004, 77: 471–477
- 28 Wong J, Wiseman L, Al-Mamoon S, et al. Major degradation product identified in several pharmaceutical formulations against the common cold. *Anal Chem*, 2006, 78: 7891–7895
- 29 Altun Z, Skoglund C, Abdel-Rehim M. Monolithic methacrylate packed 96-tips for high throughput bioanalysis. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 2581–2588
- 30 杜国华, 路书彦, 刘力宏, 等. 水/非水介质毛细管电泳法拆分抗胆碱能药物的研究. *药物分析杂志*, 2007, 27: 1395–1398
- 31 Sanchez-Hernandez L, Garcia-Ruiz C, Marina M L, et al. Recent approaches for enhancing sensitivity in enantioseparations by CE. *Electrophoresis*, 2010, 31: 28–43
- 32 Kirschner D L, Jaramillo M, Green T K. Enantioseparation and stacking of Cyanobenz[f]isindole-amino acids by reverse polarity capillary electrophoresis and sulfated beta-cyclodextrin. *Anal Chem*, 2007, 79: 736–743
- 33 Tseng W L, Hsu C Y, Wu T H, et al. Highly sensitive detection of chiral amino acids by CE based on on-line stacking techniques. *Electrophoresis*, 2009, 30: 2558–2564
- 34 Kamoda S, Kakehi K. Evaluation of glycosylation for quality assurance of antibody pharmaceuticals by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2008, 29: 3595–3604
- 35 Vega D, Agui L, Gonzalez-Cortes A, et al. Voltammetry and amperometric detection of tetracyclines at multi-wall carbon nanotube modified electrodes. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 389: 951–958
- 36 Llinàs A, Burley J C, Box K J, et al. Diclofenac solubility: Independent determination of the intrinsic solubility of three crystal forms. *J Med Chem*, 2007, 50: 979–983
- 37 Harding L, Wood J, Reading M, et al. Two- and three-dimensional imaging of multicomponent systems using scanning thermal microscopy and localized thermomechanical analysis. *Anal Chem*, 2007, 79: 129–139
- 38 Ronkart S, Paquot M, Fougnes C, et al. Determination of total water content in inulin using the volumetric Karl Fischer titration. *Talanta*, 2006, 70: 1006–1010