

逆流色谱中多种洗脱模式的应用研究进展

张虎, 沈芒芒, 颜继忠, 童胜强* (浙江工业大学药学院, 杭州 310032)

摘要: 目的 介绍现代逆流色谱中多种洗脱模式的应用研究进展, 为分析工作者提供相关研究思路。方法 通过综述国内外相关文献、著作, 对比不同洗脱模式, 得出各洗脱模式适用范围及其优缺点。结果 总结了包括梯度洗脱模式、双向洗脱模式、多重双向洗脱模式、闭路循环洗脱模式、洗脱-推挤模式、洗脱-反推模式和 pH 区带精制模式等多种逆流色谱洗脱模式的基本原理及其近年来的研究和应用进展。结论 逆流色谱不同洗脱模式、不同分析分离手段各有着自身的优缺点, 在逆流色谱分离分析中应根据被分离溶质特性选择适当的洗脱模式以达到最佳分离效果。

关键词: 逆流色谱; 洗脱模式; 基本原理; 进展

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)05-0628-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.05.030

Progress of Different Elution Modes of Counter-current Chromatography

ZHANG Hu, SHEN Mangmang, YAN Jizhong, TONG Shengqiang* (College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To review the recent progress on various kinds of elution modes emerged during the modern counter-current chromatographic techniques in detail. **METHODS** Almost all the related literatures about studying on different kinds of elution modes for counter-current chromatography were summarized, in which its applications, advantages and disadvantages of each elution mode were introduced. **RESULTS** Totally seven types of elution modes that frequently used in the modern counter-current chromatography were described, including gradient elution mode, dual-mode elution, multiple-dual mode, closed-loop recycling mode, elution-extrusion mode, elution-back extrusion mode and pH-zone-refining mode. **CONCLUSION** Each of elution mode for counter-current chromatography owns its distinctive characteristic and should be selected in light of analytes be separated by this technique, in order to achieve better separations.

KEY WORDS: counter-current chromatography; elution mode; fundamental principle; progress

逆流色谱(counter-current chromatography)是一种固定相和流动相均为液体的液-液分配色谱技术, 利用离心力场来实现固定相的保留, 基于被分离物质在互不混溶的 2 相溶剂中的分配系数不同而实现分离^[1]。逆流色谱可避免因不可逆吸附引起的样品损失、失活和变性等问题, 样品可实现完全回收, 已作为一种新兴制备分离手段在天然产物、合成产物、生物制品和手性拆分等方面被广泛应用^[2]。逆流色谱本身存在理论板数较低、分离效率不高等缺点^[3]。因此利用逆流色谱中流动相和固定相都是液体的性质, 多种逆流色谱洗脱模式被研究利用从而在一定程度上弥补上述缺陷, 提高逆流色谱的分离效率与分离度、减少逆流色

谱分离时间与溶剂消耗等。

笔者综述了包括梯度洗脱、双向洗脱、多重双向洗脱、闭路循环洗脱、洗脱-推挤、洗脱-反推和 pH 区带精制模式等多种逆流色谱洗脱模式的基本原理及其近年来的研究和应用进展, 总结了不同洗脱模式的适用范围及其优缺点, 并展望了不同洗脱模式、技术手段联用的应用前景。

1 逆流色谱洗脱模式基本原理及应用

根据固定相的保留方式和柱体设计的不同, 建立在离心力场作用基础上的逆流色谱仪可以大体分为 2 种体系: 流体静力学平衡体系(hydrostatic equilibrium system, HSES)和流体动力学平衡体系(hydrodynamic equilibrium system, HDES)^[4-6]。基

基金项目: 国家自然科学基金(21105090); 浙江省高等学校中青年学科带头人攀登项目(pd2013031)

作者简介: 张虎, 男, 硕士生 Tel: 18267196685 E-mail: gongzizh@163.com *通信作者: 童胜强, 男, 博士, 副教授 Tel: (0571)88320613 E-mail: sqtong@zjut.edu.cn

于 HSES 的逆流色谱分离通常称为离心分配色谱(centrifugal partition chromatography, CPC), 在其运行过程中轻相总是被推到分配槽的上部, 而重相则聚集在底部。如果以轻相作为流动相, 则应该从最后一个分配槽的底部引入, 逆着离心力场的方向穿过下相固定相, 这种洗脱方式叫做上行模式, 反之则为下行模式; 基于 HDES 的逆流色谱分离通常被称为逆流色谱, 在其运行过程中轻相总是倾向于占据螺旋管柱的首端, 而重相总是倾向于占据尾端。如果以轻相作为流动相, 应该从螺旋管柱的尾端引入, 穿过重相固定相后从首端流出, 这种叫做尾→头的洗脱方式或正向洗脱, 反之则为头→尾的洗脱方式或反向洗脱。以上洗脱模式为逆流色谱常规洗脱模式, 在此基础上多种逆流色谱洗脱模式被开发应用。

1.1 梯度洗脱模式

逆流色谱通常使用恒定比例的溶剂系统, 但是对于组分极性变化大的样品, 用恒定比例的溶剂系统难以达到理想的分离效果, 此时可以采用梯度洗脱的方法进行分离。逆流色谱中梯度洗脱是改变流动相的组成而固定相一般不变, 使不同极性溶质的分配系数发生变化依次从柱中洗脱出, 如庚烷-甲醇-水体系, 以上相作为固定相, 先选择合适溶剂体系组成洗脱出极性较大组分, 然后增加甲醇的比例使小极性组分的分配系数减小而容易被洗脱出色谱柱。为了防止两相平衡的破坏而造成固定相的流失, 溶剂体系变化不能太大, 一般固定相的改变不超过 20%^[7]。

梯度洗脱模式可分离极性差异大的组分, 在天然产物有效组分的分离制备中得到广泛应用。如用梯度洗脱模式, Oliveira 等^[8]分离三萜类化合物; Lu 等^[9]从传统中药材中制备分离抗氧化物质; Wu 等^[10]从丹参中分离丹参酮; Das Neves 等^[11]从天然产物中分离黄酮类物质等。

1.2 双向洗脱模式

早在 20 世纪 90 年代初, Gluck 等^[12]和 Menges 等^[13]就用逆流色谱双向洗脱的模式来扩展辛醇-水分配系数的测量范围, 后来 Agnely 等^[14]对双向洗脱模式进行了保留值与分辨率的研究。双向洗脱模式的原理是基于分配系数较大的物质很难被流动相洗脱, 而容易被固定相洗脱出色谱柱的事实, 第一次真正利用逆流色谱中固定相的液体特性, 在分离过程中通过转换两相的角色和洗脱方

向来提高物质分离的效率与分辨率, 保证样品的全部回收^[14]。

双向洗脱模式的过程分为 2 步: 第 1 步用上相作为固定相, 采用从头到尾的方向洗脱; 第 2 步将原来的固定相(上相)当做流动相从尾端泵入, 而原来的流动相变为固定相, 同时洗脱方向变为从尾到头洗脱, 使柱中所有保留的样品全都洗脱出来, 反之亦然。如果一种溶质的分配系数在第 1 步的时候为 K , 那在第 2 步的时候它的分配系数就为 $1/K$, 也就是说在第 1 步中高保留的溶质, 在第 2 步中会成为保留较低而优先被洗脱出来, 并且两相角色调换后物质分离过程仍在继续。这样, 所分离样品中所有物质全部回收, 大量减少分离时间, 提高分离分辨率且扩大了逆流色谱分离物质的极性范围。

值得一提的是, 双向洗脱模式与双向逆流色谱(dual counter-current chromatography, DCCC)是不同的。前者分离过程中, 正向洗脱与反向洗脱是不连续进行的, 而后的两相溶剂相互交错从柱子的一端对流到另一端, 也就是说同时进行正向与反向两种模式的分离, 实现了真正的逆向流动, 两相都为流动相, 没有固定相存在。DCCC 操作需要特殊的逆流色谱仪器, 在其分离过程中从分离柱中部进样, 强极性和非极性组分很容易从柱子的两端被分离出, 非常适合复杂混合物的制备性分离^[15-16]。

DCCC 适合大极性范围物质的分离, 应用在小分子聚合物、多酚类、黄酮类、皂苷类、生物碱类物质及谷维素等的分离纯化中。Agnely 等^[14]在双向洗脱模式的理论研究时第一次运用逆流色谱技术分离合成聚合物乙二醇聚合物和纯化抗菌药物类化合物, 得到比常规逆流色谱洗脱模式更高的分辨率和纯化产率。Berthod 等^[17]运用双向洗脱模式对天然植物中多酚类物质进行大量分离纯化; Alvi 等^[18]运用双向洗脱模式筛选天然产物中的生物活性物质, 快速分离并回收样品所有组分; Li 等^[19]运用双向洗脱模式从淫羊藿中分离纯化黄酮类与皂苷类物质; He 等^[20]从洋金花中制备分离生物碱组分时, 将 pH 区带逆流色谱与双向洗脱模式相结合得到纯度为 99.84%和 98.78%的 2 种目标化合物; Angelis 等^[21]以庚烷-乙腈-丁醇无水溶剂体系, 运用双向洗脱模式从米糠油中分离了 γ -谷维素; Jeon 等^[22]运用双向洗脱模式从爬山虎中分

离纯化黄酮类与芪类化合物。

1.3 多重双向洗脱模式(multiple-dual mode, MDM)

在双向洗脱模式的基础上,MDM 作为一种半连续的逆流色谱纯化分离手段被发展应用^[23]。顾名思义 MDM 包含一系列的双向洗脱,也就是说在样品分离纯化过程中需要多次调换固定相和流动相的角色以便提高分离分辨率,且在 MDM 中获得最大分离度的关键是用洗脱溶质的全部流动相的体积而不是两相角色的转换次数^[24]。

在二元混合物的模型分离中^[25],每一次的洗脱都会有部分纯净的化合物在各自的柱首端或尾端被收集,任意收集的产物被掺杂之前转换两相角色和流动方向,如此经历数次即可使分离因子较小的 2 种溶质分离开。且在分离过程中可周期性地多次进样,使 MDM 在大量样品的分离中有更大的作用。

MDM 有效地增大了逆流色谱的分离度,使分离因子较小的溶质也可以得到良好的分离,在合成产物、天然产物和手性拆分等方面都有很好的应用。Roullier 等^[25]运用 MDM 成功从地衣中分离出霉菌毒素-丝氨酸和谷氨酸衍生物;Mekoui 等^[26]运用 MDM 纯化考马斯亮蓝染料 G-250,把小极性和大极性的杂质分别在柱的两端收集除去,将中等极性的纯净目标化合物保留在柱中以得到纯化的目的。在手性分离方面,Rubio^[27]等将(S)-萘普生衍生物作为手性选择剂,运用 MDM 成功分离了 2 种外消旋混合物,外消旋物的分离洗脱结果与它们在手性选择剂上的分配行为一致,不会因洗脱模式的改变而受到影响;笔者所在课题组用羟丙基- β -环糊精作为手性选择剂,运用 MDM 拆分 2 种芳香族对映体 2-对甲氧萘基丙酸和 2-苯丙酸,经过 3 次循环将其分离度分别由 0.62 和 0.72 提高到 1.05 和 0.84,分离所得对映体纯度也达到 98.0%以上和 94.5%^[28]。

1.4 闭路循环洗脱模式(closed-loop recycling mode, CLRM)

在现有的逆流色谱仪器上进行物质分离,不能达到满意的分离度时可以选择 CLRM。CLRM 是一种操作简便的洗脱模式,只需在柱内溶质即将出峰的时候将逆流色谱检测器出口端与逆流色谱柱进口端相连接,形成一个闭路的循环系统,使样品进行第 2 次甚至更多次的循环分离,直到达到满意的分离度。而在此模式的研究初期,Du

等^[29]是将溶质洗脱液暂存在一段聚四氟乙烯管里面,所有溶质洗脱完全后再将这段装有目标组分的管路接到逆流色谱柱的两端进行闭路循环洗脱。简言之,CLRM 就是通过逆流色谱柱进出口的连接形成闭路的循环系统,变向地增加色谱柱的长度以提高分离度。

CLRM 被应用在天然产物的分离纯化,手性拆分等方面。Du 等^[29]用此模式分离了紫杉醇和三尖杉宁碱,经 2 次循环洗脱后分离度由 0.7 增加到 1.27。Han 等^[30]运用 CLRM 分离藤黄酸立体异构体,经过 6 次的循环洗脱,成功得到纯度分别为 97.2%和 97.5%的藤黄酸及其差向异构体。Xie 等^[31]运用 CLRM 纯化红花钓钟柳提取物中的松果菊苷,纯度达到 96.3%。Yang 等^[32]将 CLRM 与中压液相层析联用,在决明子中分离得到 9 种高纯度蒽醌类化合物。笔者所在课题组应用 CLRM 以羟丙基- β -环糊精为手性选择剂分离萘普生对映异构体,成功分离 29 mg 萘普生对映异构体,所得对映体纯度超过 99.5%,且对映体过量值达到 99.4%^[33];在 2-苯丙酸手性拆分的对比研究中也就可以看到,CLRM 在保证样品纯度和回收率的前提下可有效提高分辨率^[34],在高纯度对映体制备分离中有着良好的应用前景。

1.5 洗脱-推挤逆流色谱(elution-extrusion counter-current chromatography, EECCC)

EECCC 是法国里昂第一大学的 Alain Berthod 教授等在 2003 年提出并建立的。与传统逆流色谱相比,EECCC 可提高任意两相溶剂体系的分离能力和极性范围,使逆流分离的极性范围从零到无穷大成为可能。色谱系统中,柱内溶质的谱带宽度取决于色谱柱中溶质峰的位置,所以当溶质峰在逆流色谱柱内达到一定的分离程度后,利用固定相的液体性质,直接将强保留溶质推挤出色谱柱可以使柱内较窄的峰形得以保留,在谱图上呈现为极其尖锐的峰^[35-36]。

EECCC 过程分为 3 个阶段:常规洗脱过程、扫除洗脱过程和推挤过程^[37]。常规逆流色谱洗脱时,色谱柱中首先泵入两相溶剂体系中的固定相,然后在预定转速下以预期的流速泵入流动相——如果固定相为双相溶剂系统中的上相,则流动相选择从头到尾的方向泵入。待色谱柱系统达到流体动力学平衡后即可进样。一定体积的流动相经过色谱柱后,分配系数较小的成分被洗脱出来,

之后流动相换成初始固定相而流速、流向和转速均不变,此时初始固定相会把色谱柱中残留的流动相扫除推挤出色谱柱,这一过程中溶质的洗脱仍在继续。第3阶段的推挤过程,泵入约一倍柱体积的初始固定相,即可使柱中保留的样品按照分配系数从小到大的顺序被推挤出色谱柱,从而实现样品的全部回收。一次洗脱-推挤操作后色谱柱系统中充满着初始固定相,方便下一次的平衡与操作,可达到连续逆流分离操作的目的。

EECCC 可用来快速筛选大量样品,极其适用于极性范围大的物质的分离纯化,如黄酮、异黄酮类、皂苷、糖苷、色素等。Cheng 等^[38]运用 EECCC 洗脱模式高效制备人参皂苷 Rg1, Rf 和 Rd,即从 300 mg 样品中,一次分离得到了人参皂苷 Rg1 区(71 mg,纯度为 96.2%)、Rf(21 mg,纯度为 94.3%)及 Rd(53 mg,纯度为 95.1%);Wu 等^[39]运用 EECCC 成功地从绞股蓝茶中制备分离出 4 种具有生物活性的黄酮类化合物;Wang 等^[40]运用 EECCC 模式从紫背天葵中一次性制备分离出 26 mg 纯度为 97.8%的大黄素-8 β -D-葡萄糖苷 B;Lu 等^[41]运用 EECCC 在干姜的乙醇提取物中快速筛选和制备分离生物活性物质,得到 4 种纯度超过 90%的毫克级别的产物;Li 等^[42]运用 EECCC 从石斛兰中一次性分离得到 5 种羟基菲类和连苳类生物活性物质,化合物纯度高达 98.0%~99.0%。对天然产物中高保留的成分,Feng 等^[43]提取分离油菜花粉中的化学成分时,Shi 等^[44]在葛根花中分离纯化 18 种异黄酮类抗氧化化合物时,都碰到了分配系数较大不易洗脱的物质,实验者运用 EECCC 模式成功高效地得到了目标化合物。EECCC 还可与其他技术联用,灵活多变地满足不同的实验需求。Wybraniec 等^[45]运用离子对逆流色谱和洗脱推挤模式从仙人掌中分离极地甜菜红色色素;Hu 等^[46]将 EECCC 与 LC/MS(液相色谱/质谱)联用在 100 min 内从大黄中分离出 6 部分溶质峰,并用 LC-MS 检测筛选良好的抗氧化活性物质。

1.6 洗脱-反推洗脱逆流色谱(elution-back extrusion counter-current chromatography, BECCC)

BECCC 是与 EECCC 相似的推挤逆流色谱,由 Lu 等^[47]首次提出。其过程分为 2 个阶段:首先是与 EECCC 相同的常规洗脱过程,之后利用一个四通阀改变流动相的流动方向,通过转换阀的进口和出口,不需要改变流动相即可使柱中互不相

溶的两相体系被破坏,而之前的固定相会在新的出口富集,随即会带着保留的溶质被推挤出色谱柱。BECCC 是一种操作简便的推挤逆流色谱模式,但由于流动相泵入方向的改变,会立即破坏柱中原有的平衡状态,使溶质按分配系数大小分裂进入到固定相和流动相两相中。所以阀的转换要在传统模式中有足够量的流动相从柱中流出,将分配系数中等和较低的化合物洗脱出之后才能进行,否则就会有一部分溶质保留在柱内的流动相中,并在固定相被洗脱之后产生一个宽峰。

通过 BECCC 与 EECCC 对儿茶酚、苯甲酸、苯甲醛、苯甲醚和异丙基苯的分离对比研究可以看出^[47],EECCC 同样可以应用在各种复杂体系分析和分离制备等领域。而在对吴茱萸的快速制备分离的对比研究中也可以看出^[48],EECCC 和 BECCC 在传统中药材有效成分的筛选分离中都有很好的应用前景,但在连续性操作上 EECCC 有着 BECCC 不能达到的优势。

1.7 pH 区带精制模式(pH-zone-refining mode)

pH 区带精制模式是在普通制备型高速逆流色谱的基础上发展起来的特殊逆流色谱分离制备技术。其依据物质的解离常数和疏水性的不同而实现分离,非常适合于有机酸、有机碱制备性分离。如果以有机相作为固定相,其中加入保留酸(碱);水相作为流动相,其中加入洗脱碱(酸),这叫做 pH 区带精制模式的反向置换模式,反之则为一般置换模式。有机相和水相都可以作为流动相或固定相,当流动相穿入固定相时,发生酸碱反应并最终达到平衡。有机酸在有机相和固定相中的分配系数作为量度,样品的分配系数与其之间的差距决定各样品的出峰时间。洗脱过程中被分离溶质以矩形峰的形式洗脱出来,而杂质峰则分布在矩形峰的两侧^[49]。

pH 区带精制模式与普通逆流色谱制备技术相比,有分离容量大、分离产率高、分离所得收集液高度浓缩且纯度高、少量杂质被浓缩在主峰两侧而易被检测、可通过检测 pH 值检测无紫外吸收的离子型化合物等优点^[50],被广泛应用于氨基酸和肽类、生物碱类、染料、同分异构体、多酚类、羟基蒽醌类、多聚乙酰、香豆素等可离子化化合物的分离制备中,其应用已有大量综述总结^[51-53],不再一一赘述。笔者所在课题组运用 pH 区带精制模式从延胡索中制备分离季铵生物碱,在 1.20 g 粗

品中制备分离得到 129 mg 去氢延胡索碱和 12 mg 掌叶防己碱, 各自的纯度达到 94%和 92%, 回收率达到 85%和 86%^[54]; 基于酒石酸酯-硼酸络合手性选择剂的逆流色谱手性分离方法, 成功运用 pH

区带精制模式拆分 3 种 β -受体阻滞剂药物: 普萘洛尔、吲哚洛尔和阿普洛尔。可一次性制备分离 356 mg 普萘洛尔且其各对映体纯度可达到 98.9%和 96.3%^[55]。

表 1 多种洗脱模式适用对象及其优缺点

Tab 1 Scope of application, advantages and disadvantages of the different elution modes

洗脱模式	适用对象	优点	缺点
梯度洗脱模式	极性范围大的混合物的分离制备等	扩大极性范围; 提高分离效率等	梯度溶剂的选择复杂; 如固定相被推出色谱柱干扰检测等
双向洗脱模式	极性差异较大的少组分样品的分离制备或不同极性成分组的分离制备等	提高分离效率; 样品可全部回收; 节省时间与溶剂消耗; 提高分离纯化效率; 可一次性大量进样等	分离过程不连续; 不可连续操作等
多重双向洗脱模式	分离度较差样品的分离制备、浓缩纯化; 手性拆分等	提高分离度; 富集浓缩目标产物等	操作时间延长; 溶剂消耗增加等
闭路循环洗脱模式	分离度低的样品的分离纯化; 手性拆分等	提高分离度; 不增加额外溶剂消耗	操作时间长; 不适合一次性多样品的分离等
洗脱-推挤逆流色谱	大极性范围的样品分离制备; 高通量分离制备等	扩大极性范围; 提高分离效率; 减少分离时间与溶剂消耗; 可连续操作等	紫外检测干扰较大; 需要两个泵和一个溶剂选择阀减少死体积等
洗脱-反推逆流色谱	大极性范围的样品分离制备等	扩大极性范围; 提高分离效率; 减少分离时间与溶剂消耗; 操作简便等	溶质峰劈裂; 不可连续操作等
pH 区带精制模式	有机酸、有机碱等可离子化物质的分离制备; 手性拆分等	分离容量大; 分离产率高; 分离所得收集液高度浓缩且纯度高; 少量杂质被浓缩在主峰两侧而易被检测; 可通过检测 pH 值检测无紫外吸收的离子型化合物等	只能分离可离子化的物质; 被分离物质 pKa 应有 0.2 的差异等

2 结论

逆流色谱不同洗脱模式、不同分析分离手段都有着自身的优缺点, 在应用中应扬长避短地联合使用不同模式, 从而达到最佳的分离效果, 所有 7 种洗脱模式的适用对象及其优缺点见表 1。如利用逆流色谱不同洗脱模式的优势之处, 可将 pH 区带精制模式与双向洗脱模式联用分离制备极性差异大的离子型化合物; 把 MDM、CLRM 等应用在手性化合物的拆分中, 可有效地提高其分离度; 在多组分样品特别是天然产物成分的提取分离中, 可应用逆流色谱双向洗脱模式或推挤模式先将不同极性间的组分分离开来, 然后选用 MDM 或 CLRM, 对同等极性分离因子较小的组分进行分离等。再如利用 LC-MS 的高专属性、高灵敏度与逆流色谱的高分离制备能力, 将 EEECC 与 LC-MS 联用, 可快速分离筛选目标生物活性物质等。

REFERENCES

[1] ITO Y, BOWMAN R L. Countercurrent chromatography: liquid-liquid partition chromatography without solid support [J]. J Chromatogr Sci, 1970, 8(6): 315-323.
[2] BERTHOD A, RUIZ-ANGEL M J, CARDA-BROCH S. Countercurrent chromatography: People and applications [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(19): 4206-4217.

[3] BERTHOD A. Fundamentals of countercurrent chromatography [J]. Compr Anal Chem, 2002(38): 1-20.
[4] BERTHOD A, MARYUTINA T, SPIVAKOV B, et al. Countercurrent chromatography in analytical chemistry (IUPAC Technical Report) [J]. Pure Appl Chem, 2009, 81(2): 355-387.
[5] MARCHAL L, LEGRAND J, FOUCAULT A. Centrifugal partition chromatography: a survey of its history, and our recent advances in the field [J]. Chem Rec, 2003, 3(3): 133-143.
[6] ITO Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2005, 1065(2): 145-168.
[7] VAN BUEL M J, VAN DER WIELEN L A M, LUYBEN K C A M. Modelling gradient elution in centrifugal partition chromatography [J]. J Chromatogr A, 1997, 773(1/2): 13-22.
[8] OLIVEIRA R R, LEITÃO G G, MORAES M C C, et al. Gradient elution for triterpene separation from *Cecropia lyratiloba* Miquel by HSCCC [J]. J Liq Chromatogr R T, 2005, 28(12/13): 1985-1992.
[9] LU Y, HU R, DAI Z, et al. Preparative separation of anti-oxidative constituents from *Rubia cordifolia* by column-switching counter-current chromatography [J]. J Sep Sci, 2010, 33(14): 2200-2205.
[10] WU S, WU D, LIANG J, et al. Modeling gradient elution in countercurrent chromatography: Efficient separation of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. J Sep Sci, 2012, 35(8): 964-976.
[11] DAS NEVES COSTA F, GARRARD I, SILVA A J R, et al. Changes in the mobile phase composition on a stepwise counter-current chromatography elution for the isolation of flavonoids from *Siparuna glycyocarpa* [J]. J Sep Sci, 2013, 36(14): 2253-2259.

- [12] GLUCK S J, MARTIN E J. Extended octanol-water partition coefficient determination by dual-mode centrifugal partition chromatography [J]. *J Liq Chromatogr*, 1990, 13(18): 3559-3570.
- [13] MENGES R A, BERTRAND G L, ARMSTRONG D W. Direct measurement of octanol-water partition coefficients using centrifugal partition chromatography with a back-flushing technique [J]. *J Liq Chromatogr*, 1990, 13(15): 3061-3077.
- [14] AGNELY M, THIEBAUT D. Dual-mode high-speed counter-current chromatography: retention, resolution and examples [J]. *J Chromatogr A*, 1997, 790(1): 17-30.
- [15] CAO X L. Separation Technology and Application of High Speed Countercurrent Chromatography(高速逆流色谱分离技术及应用) [M]. Vol 1. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 110-115.
- [16] YANG Y, AISA H A, ITO Y. Mathematical model of computer-programmed intermittent dual countercurrent chromatography applied to hydrostatic and hydrodynamic equilibrium systems [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(35): 6310-6318.
- [17] BERTHOD A, BILLARDELLO B, GEOFFROY S. Polyphenols in countercurrent chromatography. An example of large scale separation [J]. *Analisis*, 1999, 27(9): 750-757.
- [18] ALVI K A. Screening natural products: bioassay-directed isolation of active components by dual-mode CCC [J]. *J Liq Chromatogr R T*, 2001, 24(11/12): 1765-1773.
- [19] LI H B, CHEN F. Separation and purification of epimedin A, B, C, and icariin from the medicinal herb *Epimedium brevicornum* Maxim by dual-mode HSCCC [J]. *J Chromatogr Sci*, 2009, 47(5): 337-340.
- [20] HE Y, LUO J, KONG L. Preparative separation of atropine and scopolamine from *Datura Metel* Flos using pH-zone-refining counter-current chromatography with counter-rotation and dual-mode elution procedure [J]. *J Sep Sci*, 2011, 34(7): 806-811.
- [21] ANGELIS A, URBAIN A, HALABALAKI M, et al. One-step isolation of γ -oryzanol from rice bran oil by non-aqueous hydrostatic countercurrent chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2011, 34(18): 2528-2537.
- [22] JEON J S, KIM C Y. Preparative separation and purification of flavonoids and stilbenoids from *Parthenocissus tricuspidata* stems by dual-mode centrifugal partition chromatography [J]. *Sep Purif Technol*, 2013(105): 1-7.
- [23] DELANNAY E, TORIBIO A, BOUDESOCQUE L, et al. Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography, a semi-continuous development mode for routine laboratory-scale purifications [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1127(1): 45-51.
- [24] MEKAOU N, BERTHOD A. Using the liquid nature of the stationary phase. VI. Theoretical study of multi-dual mode countercurrent chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(36): 6061-6071.
- [25] ROULLIER C, CHOLLET-KRUGLER M, BERNARD A, et al. Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography as an efficient method for the purification of a mycosporine from a crude methanolic extract of *Lichina pygmaea* [J]. *J Chromatogr B*, 2009, 877(22): 2067-2073.
- [26] MEKAOU N, CHAMIEH J, DUGAS V, et al. Purification of *Coomassie brilliant* Blue G-250 by multiple dual mode countercurrent chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2012 (1232): 134-141.
- [27] RUBIO N, IGNATOVA S, MINGUILLÓN C, et al. Multiple dual-mode countercurrent chromatography applied to chiral separations using a (*S*)-naproxen derivative as chiral selector [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(48): 8505-8511.
- [28] TONG S, ZHENG Y, YAN J. Enantioseparation of chiral aromatic acids by multiple dual mode counter-current chromatography using hydroxypropyl- β -cyclodextrin as chiral selector [J]. *J Sep Sci*, 2013, 36(12): 2035-2042.
- [29] DU Q Z, KE C Q, ITO Y. Recycling high-speed countercurrent chromatography for separation of taxol and cephalomannine [J]. *J Liq Chromatogr R T*, 1998, 21(1/2): 157-162.
- [30] HAN Q B, SONG J Z, QIAO C F, et al. Preparative separation of gambogic acid and its C-2 epimer using recycling high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1127(1): 298-301.
- [31] XIE J, DENG J, TAN F, et al. Separation and purification of echinacoside from *Penstemon barbatus* (Can.) Roth by recycling high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878(28): 2665-2668.
- [32] YANG J, YE H, LAI H, et al. Separation of anthraquinone compounds from the seed of *Cassia obtusifolia* L. using recycling counter-current chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2012, 35(2): 256-262.
- [33] TONG S, GUAN Y X, YAN J, et al. Enantiomeric separation of (*R,S*)-naproxen by recycling high speed counter-current chromatography with hydroxypropyl- β -cyclodextrin as chiral selector [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(32): 5434-5440.
- [34] TONG S, ZHENG Y, YAN J. Application and comparison of high performance liquid chromatography and high speed counter-current chromatography in enantioseparation of ($\pm$)-2-phenylpropionic acid [J]. *J Chromatogr A*, 2013(1281): 79-86.
- [35] BERTHOD A, RUIZ-ANGEL M J, CARDA-BROCH S. Elution-extrusion countercurrent chromatography. Use of the liquid nature of the stationary phase to extend the hydrophobicity window [J]. *Anal Chem*, 2003, 75(21): 5886-5894.
- [36] BERTHOD A. Band broadening inside the chromatographic column: The interest of a liquid stationary phase [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1126(1): 347-356.
- [37] BERTHOD A, FRIESEN J B, INUI T, et al. Elution-extrusion countercurrent chromatography: theory and concepts in metabolic analysis [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(9): 3371-3382.
- [38] CHENG Y, LIANG Q, WANG Y M, et al. Elution-extrusion counter-current chromatography for separation of ginsenoside-Rg1, Rf and Rd [J]. *Chin Tradit Pat Med(中成药)*, 2012, 34(1): 89-93.
- [39] WU J, CHEN Z, ZHANG C, et al. Effective and preparative separation of bioactive flavonoids from *Gynostemma pentaphyllum* tea using elution-extrusion counter-current chromatography [J]. *Sep Sci Technol*, 2013, 48(6): 909-914.
- [40] WANG R, LIN X J, LU Y B, et al. Effective counter-current chromatographic method for one-step preparative isolation and purification of anthraglycoside B from *Begonia fimbriatipula* using elution-extrusion separation mode [J]. *J Liq Chromatogr R T*, 2013, 36(3): 363-371.
- [41] LU Y, LIU R, BERTHOD A, et al. Rapid screening of bioactive components from *Zingiber cassumunar* using elution-extrusion counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1181(1/2): 33-44.
- [42] LI S C, HE S, ZHONG S, et al. Elution-extrusion counter-current chromatography separation of five bioactive compounds from *Dendrobium chrysotoxum* Lindl [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(20): 3124-3128.
- [43] FENG Z, CHEN X, DI D. Online extraction and isolation of highly polar chemical constituents from *Brassica napus* L.

- pollen by high shear technique coupled with high-performance counter-current chromatography [J]. J Sep Sci, 2012, 35(5/6): 625-632.
- [44] SHI S, MA Y, ZHANG Y, et al. Systematic separation and purification of 18 antioxidants from *Pueraria lobata* flower using HSCCC target-guided by DPPH-HPLC experiment [J]. Sep Purif Technol, 2012(89): 225-233.
- [45] WYBRANIEC S, STALICA P, JERZ G, et al. Separation of polar betalain pigments from cacti fruits of *Hylocereus polyrhizus* by ion-pair high-speed countercurrent chromatography [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(41): 6890-6899.
- [46] HU R, LU Y, DAI X, et al. Screening of antioxidant phenolic compounds in Chinese Rhubarb combining fast counter-current chromatography fractionation and liquid chromatography/mass spectrometry analysis [J]. J Sep Sci, 2010, 33(11): 1595-1603.
- [47] LU Y, PAN Y, BERTHOD A. Using the liquid nature of the stationary phase in counter-current chromatography V. The back-extrusion method [J]. J Chromatogr A, 2008, 1189(1/2): 10-18.
- [48] LU Y, MA W, HU R, et al. Rapid and preparative separation of traditional Chinese medicine *Evodia rutaecarpa* employing elution-extrusion and back-extrusion counter-current chromatography: Comparative study [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(19): 4140-4146.
- [49] ITO Y, MA Y. pH-zone-refining countercurrent chromatography [J]. J Chromatogr A, 1996, 753(1): 1-36.
- [50] ITO Y. pH-zone-refining counter-current chromatography: Origin, mechanism, procedure and applications [J]. J Chromatogr A, 2013, 1271(1): 71-85.
- [51] FANG L, LIU Y, YANG B, et al. Separation of alkaloids from herbs using high-speed counter-current chromatography [J]. J Sep Sci, 2011, 34(19): 2545-2558.
- [52] WEISZ A, MAZZOLA E P, MURPHY C M, et al. Preparative separation of isomeric sulfophthalic acids by conventional and pH-zone-refining counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2002, 966(1): 111-118.
- [53] MA Y, ITO Y. Recent advances in peptide separation by countercurrent chromatography [J]. Anal Chim Acta, 1997, 352(1): 411-427.
- [54] YU Q, TONG S, YAN J, et al. Preparative separation of quaternary ammonium alkaloids from *Corydalis yanhusuo* WT Wang by pH-zone-refining counter-current chromatography [J]. J Sep Sci, 2011, 34(3): 278-285.
- [55] TONG S, ZHENG Y, YAN J, et al. Preparative enantioseparation of β -blocker drugs by counter-current chromatography using dialkyl l-tartrate as chiral selector based on borate coordination complex [J]. J Chromatogr A, 2012(1263): 74-83.

收稿日期: 2013-09-18

HPLC-MS/MS 在药物代谢和药动学筛选中的应用

王海荣^{1,2}, 张兰桐¹ (1.河北医科大学药学院, 石家庄 050017; 2.石家庄以岭药业股份有限公司, 石家庄 050035)

摘要: 目的 本综述简要介绍先导化合物优化阶段, HPLC-MS/MS 应用于药物代谢和药动学(DMPK)中筛选一系列新的化学实体。方法 查阅有关文献, 进行分析总结。结果 HPLC-MS/MS 在支持体内或体外试验以及定性分析, 如代谢物鉴定等方面均有广泛应用。结论 液质联用已成为 DMPK 筛选强有力且必不可少的分析手段。

关键词: 药物代谢和药动学; 药物开发; 高效液相色谱-质谱联用; 药动学

中图分类号: R917.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)05-0634-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.05.031

HPLC-MS/MS in Drug Metabolism and Pharmacokinetic Screening

WANG Hairong^{1,2}, ZHANG Lantong¹ (1.School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2.Shijiazhuang Yiling Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE This review summarizes application of high performance liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometer(HPLC-MS/MS) methodology in drug metabolism and pharmacokinetic screens for a series of new chemical entities during the lead optimization stages. **METHODS** Relevant literatures were consulted, analysis and summary were made. **RESULTS** The HPLC-MS/MS methods were widely used to support both *in vitro* and *in vivo* experiments and for the qualitative assays, such as metabolite identification. **CONCLUSION** HPLC-MS/MS is a powerful and indispensable analytical tool in drug metabolism and pharmacokinetic screening.

KEY WORDS: DMPK; drug development; HPLC-MS/MS; pharmacokinetics

基金项目: 国家科技重大专项课题(2009ZX09313-003, 2009ZX09102-140)

作者简介: 王海荣, 女, 硕士生, 工程师 Tel: (0311)85901715 E-mail: wel_lw@163.com *通信作者: 张兰桐, 男, 博导, 教授 Tel: (0311)86266419 E-mail: zhanglantong@263.net