

鸦片类化合物的毛细管电色谱分离

阎超等

摘要:毛细管电泳分离技术被用来分析 6 种具有相似结构的受控麻醉剂。由于这些化合物具有相同的荷质比,因此毛细管区带电泳(CZE)不能提供令人满意的分离,反之在胶束电动色谱(MEKC)上用一根 50cm 长, 50 μm 内径的毛细管柱,及 50mM 的十二烷基硫酸钠(SDS)含 12% 异丙醇的 50mM 硼酸盐溶液,能在 10 分钟里实现基线分离,可以达到 40000~150000 塔板数/米的柱效。对照用毛细管电色谱(CEC)分离这些混合物被证明具有更大的优势。选用长 15cm、内径为 75 μm 的毛细管,内填 1.5 μm 粒径的十八烷基键合相(ODS)无孔硅胶的毛细管柱。以 80% 的 10mM 三羟甲基氨基甲烷(Tris)和 20% 乙腈加入 5mM 的 SDS 作为流动相。在 2.5 分钟里就实现了完全分离,且柱效高达 250000~500000 塔板数/米。

关键词:毛细管电色谱(CEC), 鸦片类药物, 胶束电动色谱(MEKC)

1、 介绍

对鸦片类药物的分析,如:海洛因、吗啡对于法律和情报机关收集证据是必需的。因此审查和确认违禁药品对于调查毒品的可能使用者和控制吸毒者解除治疗是重要的。这些毒品通常用气相-质谱联用(GC-MS),高效液相色谱(HPLC),薄层色谱(TLC),和少数使用超临界流体色谱(SFC)的方法来检测。在线液相-气相联用被用来测定海洛因及其代谢产物在尿液中的含量。一种高级的检测方法气相-质谱联用(GC-MS)对于天然化合物及其代谢产物,利用它们的质量光谱可以实现高灵敏度的检出。许多毒品是极性物质,且受热易分解或者不挥发,因此不能用 GC-MS 对它们进行分析。TLC 常常被用来检测毒品,但是 TLC 的灵敏度对于目前低浓度的物质被证实不能进行有效检测。

在过去几年中,毛细管电泳的方法例如毛细管区带电泳(CZE),胶束电动色谱(MEKC),毛细管凝胶电泳(CGE)以及毛细管电色谱(CEC)都受到了化学分析家们相当大的关注。尤其对于 CEC 在分析中的应用更感兴趣,因为它的高柱效和相应高速度的分离。对于同时检测不同类型的毒品 CE 是一种有用的技术,举例说: β -受体阻滞剂、利尿药和麻醉药。CZE 和 MEKC 都用于同样类型的化合物上,MEKC 比 CZE 主要的优势在于对中性和带电化合物能一起进行分离。

CEC 是一种结合了 LC 的选择性和电泳迁移的分离技术。在 CEC 中流动相受电渗流驱使流经柱子,呈现为一种近似柱塞状的流型,避免了目前流体动力驱使色谱所产生的扩散效应。第一次电色谱分离在 1974 年由 Pretorius 实现,他应用了一个经过色谱柱的电场。这项工作随后在 1981 年由 Jorgenson 和 Lukacs 做了一个开拓性研究,他们帮助 CZE 在分析化学领域发展成为一种强大广泛的技术。近来 CEC 的应用包括分离多环芳烃(PAHs);多硝基甲苯;二苯和硫脲;安息香烷基脂;氯噻酮和米塞林对映体的手性分离;苯甲酸和苯乙醇酸;以及邻氨基苯乙酮和几种取代苯基,合成药物,包含 N-、O-、S-的 PAHs。对于违禁药物的 CEC 检测方法还没有太多研究,尽管 Lurie, Meyers 和 Conner 报道过用 CEC 分离大麻素,相反,许多论文报道了用 CE 或 MEKC 对违禁药物的分离。本文描述了用 CEC 分析一类重要的以前从没有用 CEC 分析过的鸦片类毒品和改变不同色谱参数对分离的影响。

2、 材 料 和 方 法

2.1 柱子的填充

CEC 柱子用电动方法填充,简要地说取一根 50cm 长的包覆聚酰亚胺涂层的熔融石英管,石英管外径 360 μm , 内径 75 μm , 一端填充入 5 μm 的硅胶甲醇匀浆后,用丁烷火焰做个临时烧结,再将粒径为 1.5 μm 的无孔十八烷基键合相硅胶甲醇匀浆溶液在电场驱动下填柱,然后在压力下用一耐热线型切割器将临时烧结截去,做一个新的入口和出口。在出口烧结后 2mm 处剥去聚酰亚胺涂层做一个 2mm 的检测窗口,整个柱子最后长 28cm,其中 15cm 填充有固定相。

2.2 化学样品

6 种鸦片类毒品 (1mg/L 甲醇溶液) 从 Altech 公司购得, Figure.1 显示了这六种要用 CEC 进行分离分析毒品的结构。乙腈 (HPLC 级), 2- (N-mopholino) ethanesulfonic acid monohydrate (Mes>98%) 和三羧甲基氨基甲烷 (Tris) (>98%) 由 Sigma-Aldrich 提供并且未经再提纯。电泳级 (>99.5%) 的十二烷基硫酸钠 (SDS) 来自 Life Technologies 公司。水通过 Labconco Wather Pro PS 公司的纯化系统进行纯化。

2.3 CEC 系统

填充毛细管柱插入一个带柱上样品池的紫外可见光检测器,样品池包括一个球型棱镜,用来照射在毛细管检测窗上仅 100 μm 的区域。所有样品都在 215nm 的波长下测定吸收值。样品 (每个组份为 50mg/L) 电动进样。柱子先用

手动注射泵用一种流动相平衡。平衡后毛细管的每一端都被插入一个流动相的阀门中,然后在真空中用超声波脱气至少 15 分钟。电源电压为 0~30KV。电渗流的稳定性通过测量电流检测,串联一个 10k 的电阻和一个带显示器的电流表来测定。

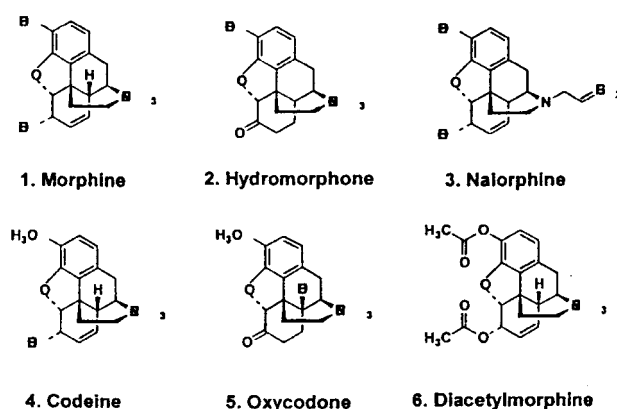
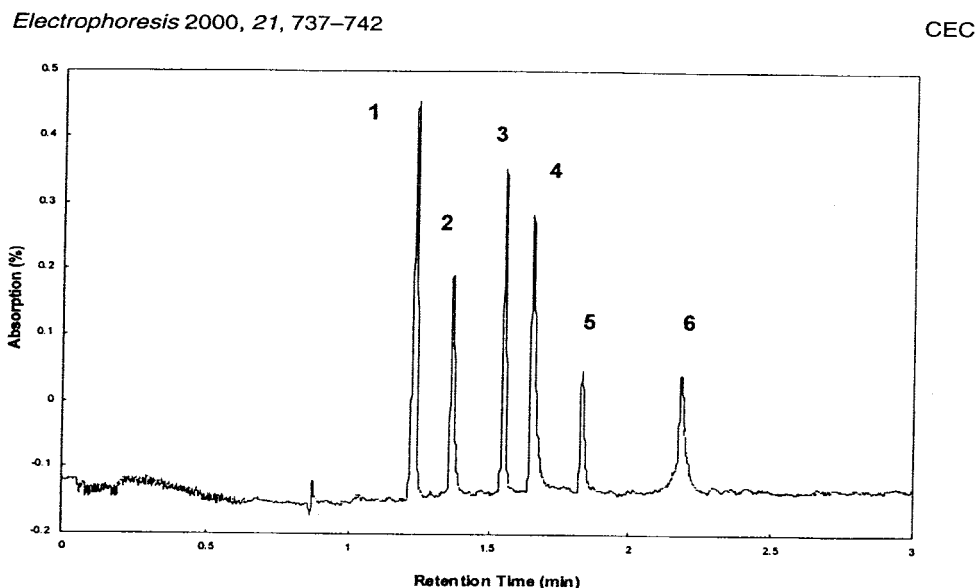


Figure 1. Structure of six opiate drugs studied.

3、 结果和讨论

下图显示了这 6 种鸦片类化合物经由 CEC 分离后的色谱图。



柱长 28cm(15cm 填充有 1.5 μ m 粒径的无孔 ODS 硅胶),柱内径 75 μ m ,操作电压为 20KV。流动相为 80%10mM Tris 溶液, 20%加入 5mM SDS 调节到 pH8.3 的乙腈溶液。6 种化合物在 2.5 分钟内实现基线分离为。每种化合物的理论塔板数列在表一, 从 250000 到 500000 塔板数/米。为了测定最佳分离条件, 两种无机和有机的缓冲液都被做成了不同浓度以及使用不同体积百分比的甲醇、异丙醇和乙腈作为有机相, 磷酸盐、硼酸盐作为无机盐缓冲液。当无机盐缓冲液的浓度超过 5mM 时, 气泡的产生概率就非常高, 因为磷酸盐和硼酸盐缓冲液即使在高体积百分比的有机溶剂里的也具有高电导率。当无机盐缓冲液的浓度低于 5mM 时, 气泡的问题就不存在了, 但是分离的效率却不能令人满意。在此条件下需要至少 30 分钟的洗脱时间, 而且峰形也很宽。在 CEC 的分离中, 有机盐缓冲液更好, 因为有机盐缓冲液的电导率比无机盐缓冲液低。MES 和 Tris 都被用作有机盐缓冲液, 虽然 MES 缓冲液的电导率比 Tris 的更低, 但是使用 10mM Tris 的缓冲液可以得到更快和更有效的分离。

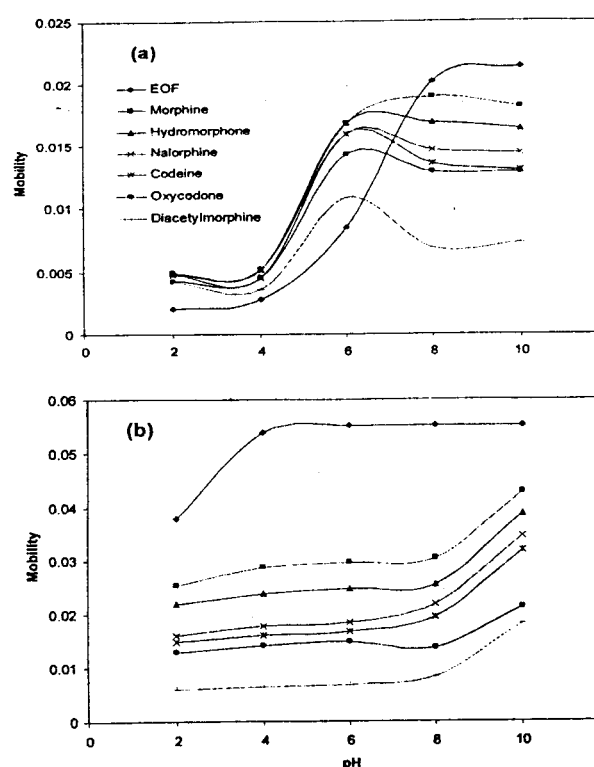
表一

化合物	CEC	MEKC
Morphine	248 000	147 000
Hydromorphone	305 000	90 000
Nalorphine	499 999	115 000
Codeine	362 000	119 000
Oxycodone	444 000	86 000
Diacetylmorphine	322 000	36 000

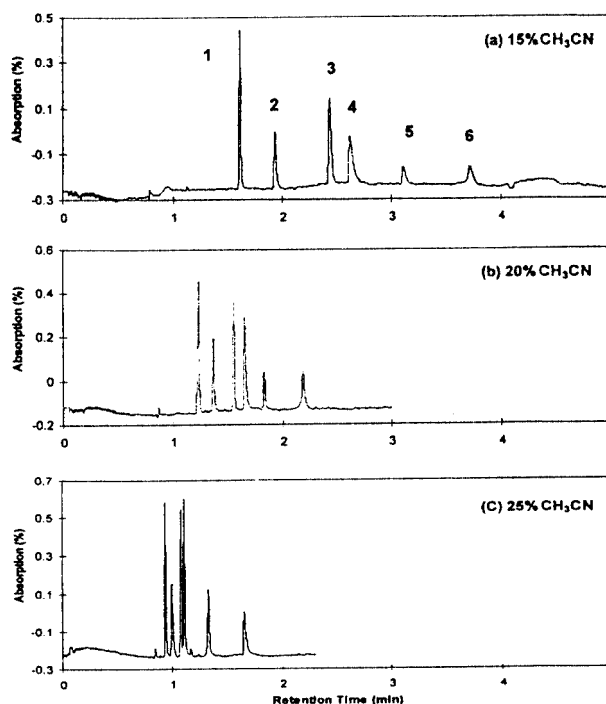
为了避免产生大量的焦耳热,人们尝试了很多方法。一种是在流动相中使用高比例的有机修饰剂,但是此方法不能得到很好的分离效率,另外一些研究小组尝试采取加压的 CEC 分离来降低或消除气泡的产生,但是这种方法太复杂,另一种途径是在流动相中加入表面活性剂,例如 SDS,在 CEC 分离中这种方法对于消除气泡的产生简单而有效,这些都已经在前文有所描述。在用 CEC 分离鸦片类药物时为了防止气泡的产生,我们加入 5mM SDS,这比 8.1mM 的 CMC 浓度低。我们发现加入 5mM 的 SDS 对于消除气泡和提高分离效率效果都非常好,虽然人们相信 SDS 通过降低固液界面的表面张力消除气泡的形成方面有重要的作用,但目前人们仍然不知道 SDS 是如何提高 CEC 的分离度的。

为了研究不同 pH 对我们系统的作用,如右图 a 为不加 SDS,图 b 为加 5mM SDS。当 pH 从 2 到 10 时,SDS 的浓度也从 0 到 5mM,在不加 SDS 时 pH2、4、6 下 6 种鸦片类药物在 EOF 标记前就出峰了,并且随着 pH 的增加表现出更长的保留时间,另一方面在 pH8 和 10 时,这六种鸦片类药物在 EOF 标记后出峰,并且比低 pH 时的保留时间短。我们认为这种现象表明所研究的鸦片类药物在低 pH 下的 Pka 值在 7.0~7.8 产生正电荷。一旦它们都被离子化,在 pH 小于 7 的时候,就会在 EOF 的标记前出峰。较高 pH 下的保留时间较长是因为总的淌度也就是电渗流和电泳淌度之和在较低 pH 下较小,增加 pH 电渗流增加。但是在 5mMSDS 中所有的样品都在 EOF 标记后出峰,而且 EOF 标记的保留时间在不同的 pH 下几乎相同。从这些结果我们得出低浓度的 SDS

和低 pH 下鸦片类药物在 EOF 标记前出峰,表明所有的样品在这些分离条件下都具有正电荷,然而高浓度的 SDS (低于临界胶束浓度)中,即便 pH 很低,鸦片类药物在 EOF 标记后出峰,在这些条件下,鸦片类药物都是中性的或呈离子对形式。根据这些结果,在所有 pH 值下高浓度的 SDS 的分离机制是基于疏水性的 C₁₂ 链和 SDS 的离子对以及固定相上 C₁₈ 链的交互作用。在反相色谱中带更多极性和较少大基团的化合物有较强的保留时间,因此带有两个羟基和较少大基团的吗啡首先出峰,更低极性更多共轭键体积更大的二乙酰吗啡最后出峰,这种现象支持了流动相和固定相之间的分配在分离机理中扮演了重要的角色。

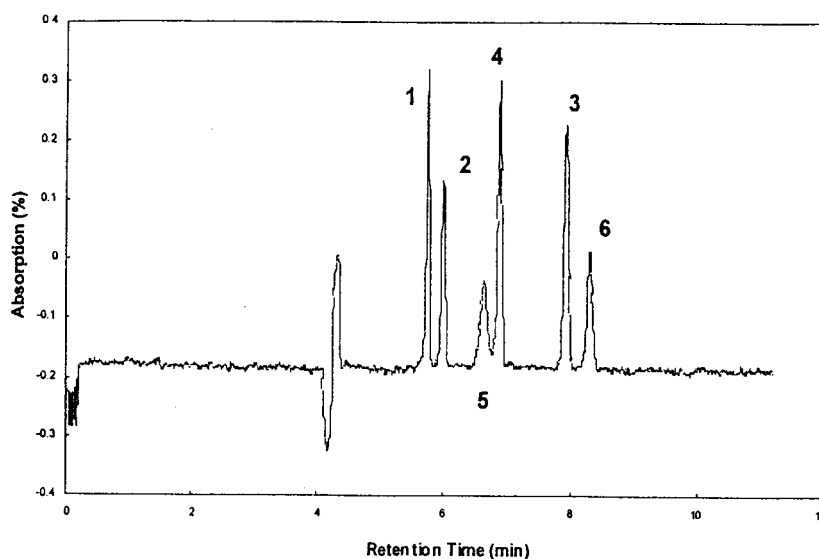


右图解释了不同浓度的乙腈在分离六种鸦片类毒品中的作用。对于所有的样品,随着乙腈浓度的增加保留时间降低。在低体积百分比的乙腈中,接近最佳分离条件,随着乙腈浓度的增加电渗流增加,对于 CZE 来说,在反相条件下,随着有机溶剂浓度的改变电渗流的变化在以前已做过研究。对于所有质子溶剂和非质子溶剂总体的趋势是一样的;随着有机溶剂,电渗流稳定下降,也就是说随着有机溶剂体积百分比的增加保留时间增加;这些结论也能够说明为什么随着乙腈体积百分比的增加,粘度和介电常数下降。同样的趋势也在无机盐缓冲液中出现。



CEC 中有机修饰剂的作用和 CZE 中的完全不同。Dittmann 和 Rozing 发现在 MES 和 Tris 缓冲液中增加乙腈浓度,淌度增加。同样 Lelievre 发现在 MES 和 Tris 缓冲液中增加乙腈浓度,淌度增加。人们认为在反向 CEC 中,缓冲盐的极性影响鸦片类毒品的保留行为。乙腈体积百分比的增加引起缓冲盐极性的增加,高极性缓冲盐同鸦片类毒品的作用更强烈,致使保留时间下降。同 EOF 相比得到一个相对的电渗流,对于所有鸦片类毒品,随着乙腈体积百分比的增加,相对电渗流增加。我们得出以下结论,在 CZE 中每种鸦片类毒品的淌度受到缓冲液的粘度和介电常数比的影响;在 CEC 中受到缓冲液极性的影响。对于 CEC 的分离机理来说,固定相的分配作用比电渗流更重要。

右图就是用 MEKC 得到的鸦片类毒品的分离。毛细管柱长 63cm (距离检测器 50cm), 50 μm 的内径。流动相是 88% 的 50mM 硼酸盐溶液和 12% 加 50mM SDS 调节 pH 为 8.3



的异丙醇溶液混合而成。为了测定用 MEKC 分析 6 种鸦片类毒品的最佳条件，磷酸盐、硼酸盐和 Tris 缓冲液同不同体积百分比的甲醇、异丙醇和乙腈混合。在 50mM 硼酸盐缓冲液中加 15%的甲醇有机修饰剂，6 种鸦片类毒品得到基线分离，但是分离时间要用 30 分钟而且峰拖尾。在高体积百分比的异丙醇和乙腈中，保留时间太短以至于不能得到令人满意的分离度。用 MEKC 分离 6 种鸦片类毒品的理论塔板数在 36000 到 147000 之间。这些值要比用 MEKC 分离的其他物质低，当我们同其他人报告的数据比较后可看出这种现象是很合理的。Tagliaro 等人用一根毛细管柱（内径 50 μ m，距离检测器 35cm）和 25mM 的硼酸盐（pH9.24），20%甲醇和 100mM SDS 作为缓冲液和 20KV 的电场分离违禁毒品。他们得到的理论塔板数在 80000 到 90000 之间。Krogh 等人能够在 MEKC 上用毛细管柱（柱长 50cm，内径 50 μ m），用 25mM SDS,10mM NaH₂PO₄, 10mM Na₂B₄O₇，pH9.0，5%的乙腈和 20KV 的电场分离像海洛因和安非他明等违禁药物，而得到的理论塔板数在 120000 到 290000 之间。对于大多数样品这些值都比从 CEC 上获得的要低。

4、 结论

用 CEC 分离 6 种受控制毒品已经得到了成功的阐述，分离效率非常高，理论塔板数达到了 500000 塔板数/米。所有的样品都在 2.5 分钟内出峰，而且有很好的分离度和重现性。用 MEKC 能对同样的化合物进行分离，但没有 CEC 如此好的分离效率。