

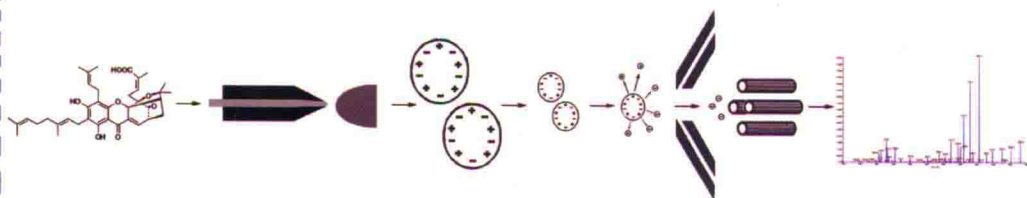
药物代谢动力学

EXPERIMENTAL GUIDE FOR PHARMACOKINETICS

实验指导

主审 □ 刘昌孝院士

主编 □ 陈卫东 李亚卓



药物代谢动力学

实验指导

主 审 刘昌孝院士

主 编 陈卫东 李亚卓

副主编 (按姓氏笔画为序)

毛小明 邢 蓉 伊秀林 刘晓平

肖学风 汪电雷 金 涌

编 委 (按姓氏笔画为序)

王 雷 毛小明 尹登科 史天陆

邢亚群 邢 蓉 伊秀林 刘晓平

刘 雁 汤继辉 孙言才 孙 靖

李见春 李亚卓 肖学风 何 宁

汪电雷 张彩云 张善堂 陈卫东

林彤远 金 涌 周 恺 居 靖

赵亚男 俞 浩 袁 靖 唐丽琴

陶春蕾 彭 灿 韩 岚 储晓琴

鄢海燕 慈小燕 臧洪梅

图书在版编目(CIP)数据

药物代谢动力学实验指导/陈卫东,李亚卓主编
—南京:江苏凤凰科学技术出版社,2015.7
ISBN 978-7-5537-4588-6

I. ①药… II. ①陈… ②李… III. ①药物代谢动力学—医学院校—教学参考资料 IV. ①R969.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 103033 号

药物代谢动力学实验指导

主 编 陈卫东 李亚卓
责任编辑 陈 静
责任校对 郝慧华
责任监制 刘 钧

出版发行 凤凰出版传媒股份有限公司
江苏凤凰科学技术出版社
出版社地址 南京市湖南路1号A楼,邮编:210009
出版社网址 <http://www.pspress.cn>
经 销 凤凰出版传媒股份有限公司
照 排 江苏凤凰制版有限公司
印 刷 南京玉河印刷厂

开 本 787 mm×1092 mm 1/16
印 张 11.25
字 数 226 000
版 次 2015 年 7 月第 1 版
印 次 2015 年 7 月第 1 次印刷

标准书号 ISBN 978-7-5537-4588-6
定 价 30.00 元

图书如有印装质量问题,可随时向我社出版科调换。

序言

药物动力学(pharmacokinetics)是动力学原理用于药物的一门边缘学科和交叉学科,它致力于研究药物及其他外源性物质(xenobiotics)在体内动态行为的量变规律,即药物的吸收、分布、代谢、消除和排泄(ADME)等的处置(disposition),数量(浓度)与时间的关系。

药物动力学前后经历了五个里程碑式的发展阶段,包括代谢物的发现,代谢酶的发现,代谢动力学模型的研究,对药物代谢多态性研究和转运蛋白的发现。我国药物动力学研究可以追溯到20世纪50年代开展的药物体内过程研究,为认识药物的体内命运研究奠定了基础,随后以数学模型和参数来表达药物体内过程的药物动力学研究得到了发展。近10年国内药物代谢和药代动力学研究深入开展国家药代平台建设,集中体现在中药的药代研究、代谢组学研究、新药发现和研究开发中的药代研究。

20世纪80年代,国内第一本《药物代谢动力学》著作面世,第一次使用了“pharmacokinetics”这一专业术语。随后,朱家璧翻译了Gibaldi的两本《药物动力学》著作,将经典的药物动力学概念系统地介绍给了中国的读者。后来,《药物动力学概论》《药物代谢研究意义、方法、应用》《中草药药代动力学》《实用药物动力学》《临床药代动力学基础与应用》《临床药动学》《新编药物动力学》《药物代谢》《药物代谢学》和《药物代谢动力学》等著作相继出版,为推动我国该学科的发展起了重要作用。

药物动力学这门较年轻的学科,由于它具有理论和使用价

值,则在近几十年间获得了巨大发展。它的基本理论和基本方法现已渗透到多个医学领域和药物研究开发的各个环节中。目前,药物动力学学科的影响日益扩大,在国内已有多个学校设立了药物代谢动力学硕士学位点或相关方向,同时在中国药科大学已设立药物代谢动力学博士学位点,这对其理论及实验教学工作提出更高的要求。尽管已出版了多种优秀的药物动力学专著,但却未见专门就与药物动力学紧密联系的实验教材类专著出版。本实验指导从药物动力学的理论与方法、研究中常用仪器、生物样品的处理及分析方法、实验对象管理等方面对开展药物动力学实验前必备的理论知识进行了阐述,并按照药物动力学的经典分类方法将具体实验内容分为吸收、分布、代谢、排泄等几个章节,还对一些经典的药物动力学实验进行了深入浅出的介绍,旨在为高校大学生学习及青年学者科学研究提供帮助。全书内容丰富,通俗易懂,理论联系实际,相信它的问世,定会受到广大师生和相关专业读者的欢迎。

中国工程院院士



目录

第一篇 药动学实验基础理论

第一章 药动学研究的新理论与方法	2
第一节 细胞内药物动力学	2
第二节 中药药代动力学研究	4
第二章 药物代谢实验中常用分析技术和仪器设备	7
第一节 高效液相色谱法	7
第二节 液相-质谱串联系统	11
第三章 生物样品的种类和处理方法	15
第一节 常用生物样品的特点、采集和贮藏	15
第二节 样品处理步骤与分析方法的选择	18
第四章 生物样品的分析建立与确证	24
第五章 实验动物的环境控制	28
第一节 影响实验动物的环境因素	28
第二节 动物实验过程中常用实验动物的饲养管理常识	29

第二篇 药物代谢动力学实验

第一章 吸收(Absorption)	34
【实验一】 药物在体小肠吸收实验	34
【实验二】 不同制剂中水杨酸的体外经皮渗透实验	40
【实验三】 外翻肠囊法研究阿莫西林肠吸收特性实验	45
【实验四】 以维拉帕米和环孢素为抑制剂探究 P 糖蛋白(P-GP)对布格呋喃大鼠	

肠道吸收的影响	49
【实验五】 丹参素在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收转运实验	51
【实验六】 乳香酸在小肠的跨膜转运机制研究实验	57
第二章 分布(Distribution)	64
【实验一】 校正超滤法测定磷酸川芎嗪的血浆蛋白结合率	64
【实验二】 平衡透析法测定血浆蛋白结合率	71
【实验三】 体外血-脑屏障透过之离体脑微血管片技术	75
【实验四】 大鼠下丘脑后部谷氨酸的释放及动脉血压改变时对其释放的影响	79
【实验五】 硫喷妥钠局部分布实验	83
【实验六】 整体动物组织分布实验	87
第三章 代谢(Metabolism)	94
【实验一】 离体大鼠肝脏灌流实验	94
【实验二】 重组 CYP3A4 酶中咪达唑仑代谢速率的测定	101
【实验三】 肝细胞体外温孵法	105
【实验四】 大鼠肝微粒体测定非那西丁代谢速率	110
【实验五】 测定维拉帕米肝固有清除率	115
【实验六】 代谢物药代动力学研究	118
第四章 排泄(Excretion)	122
【实验一】 姜黄素在胆汁中的排泄实验	122
【实验二】 核黄素的排泄速率和生物利用度测定	127
【实验三】 家兔肾清除率的测定	131
第五章 经典药动学实验	136
【实验一】 血药法测定家兔口服对乙酰氨基酚片的药动学参数	136
【实验二】 肝肠循环	140
【实验三】 尿药法测定对乙酰氨基酚片的药动学参数	144
【实验四】 绝对生物利用度实验	149
【实验五】 相对生物利用度实验	155
【实验六】 Cocktail 探针药物法评价异甘草酸镁对大鼠 CYP450 同工酶活性的 影响	159
【实验七】 对乙酰氨基酚在大鼠体内生物等效性实验	164
【实验八】 布洛芬混悬液家兔灌胃给药 PK-PD 实验	170

第一篇

药理学实验基础理论

第一章 药动学研究的新理论与方法

药物动力学的发展经历了多个阶段,从最开始的代谢物的发现、代谢酶的发现,到药动学模型的研究使用、药物代谢多态性的揭示,以及近些年来转运蛋白的发现,每一次具有跨越性意义的发现和发展,都为药物代谢动力学乃至整个人类科学实现了突破和飞跃。如今药物代谢动力学的研究早已不限于房室模型、药物在体内的经时变化规律等,多种新型的药动学理念和研究方法跃入人们眼帘,使得药动学的研究不再高深莫测,尤其是大量青年学者的涌入,使整个药动学研究呈现空前的繁荣。因此,笔者认为有必要在本书的第一章介绍目前药动学研究的新理论和新方法,使读者开拓视野,掌握最新的研究动态和方向。同时,将新的理论结合到后续篇章中的药动学现代经典实验中,提出现有实验设计中的不足之处及改进方案,充分将理论知识和实践相结合。

第一节 细胞内药物动力学

传统药代动力学旨在研究药物在体内吸收、分布、代谢和排泄这一宏观过程,已被广泛应用于药物研发的每一个环节,与药效学、毒理学研究三位一体,共同构成药物研发评价体系。然而,越来越多的研究表明,传统药代动力学研究不能完全解释药物在一些特殊组织(如肿瘤、脑、胎盘等)中的作用。一般而言,药物是基于细胞内众多特定靶点而设计的分子实体,它们必须通过多重生物屏障,与胞内靶点结合,才能发挥药物效应。因此,仅以血药浓度表征药物作用浓度,可能并不足以反映真实的药物效应。研究细胞对药物的处置过程及胞内靶点处的药物浓度对改善药物治疗效果起到决定因素。如今,人们将传统的宏观的药代动力学研究拓展到细胞/亚细胞水平,进入靶细胞药代动力学研究的新领域。靶细胞药代动力学是指将细胞看作一个微观有机体,定量研究药物在细胞内吸收、转运、分布、代谢和外排的动力学过程,并通过建立数学模型阐明药物在细胞内的处置规律,评价、预测药物在细胞内的靶向性及药效。

在药物设计过程参考细胞药代动力学研究,寻找影响临床疗效的主要因素,并根据

这些因素制定策略,进而改善药物细胞药代动力学行为,可以增加药物作用效果,提高治疗水平。细胞内药代动力学在药物研发中的应用主要包括以下两个方面。

1 针对不利影响因素开发相应阻断剂

药物可以通过自由扩散或主动运输进入肿瘤细胞,但同时又会被外排转运体排出体外。外排转运体(如 P-GP,MRP,BCRP 等)的过表达是部分抗肿瘤药物产生耐药的主要原因,其会引起药物在细胞内的动力学性质改变,造成药物在肿瘤细胞内累积量降低。亚细胞水平再分布、靶点处无法达到有效浓度,最终造成临床治疗效果不佳。此时采用转运蛋白抑制剂,可增加抗肿瘤药在耐药细胞核内的累积量,从而提高疗效。

2 应用纳米技术改善药物动力学行为

传统的药代动力学研究已经证实部分纳米制剂可以延长体内循环时间、增强药物靶向性、改善药物在体水平的动力学行为。然而,药物在肿瘤组织中的蓄积并不足以表征药物的作用浓度,纳米制剂必须均匀地分布于肿瘤组织内、释放药物并与胞内靶点结合,才能发挥药效。这一过程受多种因素影响,必须借助细胞药代动力学的手段来研究。目前应用 3D-球体细胞不仅可以模拟肿瘤组织血管稀疏区缺血缺氧等生理特征,而且还具备和在体肿瘤类似的胞间紧密连接,是研究纳米制剂瘤内穿透能力的理想模型,已广泛应用于纳米靶向制剂的评价和筛选。目前研究表明,纳米制剂进入细胞的主要方式包括内吞和受体介导的转运,一方面增加药物在细胞内的摄取量,另一方面纳米材料也可能抑制外排转运体功能,从而增加细胞内药物累积量。而不同类型的抗肿瘤药物在细胞内的作用靶点不同,如紫杉醇主要作用于胞浆中的微管,而阿霉素主要作用于细胞核中的 DNA。上述因素都对纳米制剂的最终疗效有直接关联和影响,所以纳米制剂在细胞内的释放及靶向性分布也是影响制剂最终疗效的关键因素。因此,对靶细胞药代动力学研究可以阐明药物进入细胞的方式、胞内及亚细胞靶点处药物浓度,对纳米载体研发、筛选、临床应用等具有重大意义。通过全面地研究药物在细胞内的处置过程及动力学行为,可以有效指导完善因细胞药代动力学性质不佳引起的不良药效。然而,目前药代动力学评价体系还不够完善,纳米制剂进入细胞内的形式、胞内的释放程度等都仅限于单一时间点的荧光半定量分析,还未有定量的检测纳米制剂在胞内释放、亚细胞分布等动态过程的研究报道。

如果可以基于现有的小分子细胞药代动力学评价体系,借助高分辨率成像系、高灵敏度药物检测手段及单细胞药代动力学评价方法的发展,则可以更加完善细胞药代动力学研究,进一步为纳米制剂的开发提供科学依据。将细胞药代动力学研究与在体动物实验结果相结合,并通过细胞药代动力学研究推测模拟药物在体内的药代动力学行为是今后细胞药代动力学研究的热点方向,也是今后研究的重点内容之一。

第二节 中药药代动力学研究

1 中药药代动力学的概念及意义

中药是我国医学几千年的历史长河中不断传承留下的瑰宝,充分汲取中医药的理论精髓及几千年的临床用药经验,被证明具有切实疗效的药物。目前西药单成分、单靶点的药物研发模式已经受到越来越多的挑战,创新药物研发成本不断上升,而研发效率却逐渐降低的反常现象引发了学者们深刻的思考。取而代之的“多靶点、低亲和力、低选择性”的药物研发模式将可能成为未来全球创新药物研发的主体,给中药的现代化发展提供了良好机会。

中药药代动力学的研究对象是中药及其复方,是指在中医药理论指导下,利用动力学的原理与数学处理方法,定量地描述中药有效成分、有效部位、单味中药和中药复方通过各种给药途径进入机体后的吸收、分布、代谢和排泄等过程的动态变化规律。中药药代动力学研究是连接复杂化学组分和药理活性的桥梁,亦是揭示中药有效物质基础的重要研究手段。中药及其复方与化学合成药物的区别在于前者本身就是一种复杂制剂。在体外,中药的炮制、复方的煎制过程就可能发生复杂的成分变化;在体内,成分间相互作用可能对各个药物成分在体内处置过程产生显著的影响,如按化学药物的药理研究方法和思路,仅仅从化学成分的药理作用来认识中药,可能会丢失某些关键的有效成分,从而难以正确地评价中药的药代动力学行为。借助于动力学的理论和方法研究中草药,定量分析中药中各种化学成分的相互作用和变化,是中药现代化的重要途径,其研究结果对阐明和揭示中草药物质作用基础、作用机制及其科学内涵,设计及优选中草药给药方案,促进中药新药开发、剂型改进及质量控制具有重要的意义。

2 中药药代动力学的研究特点

由于中药成分复杂,在体内被认为具有多成分、多靶点的特征,且含量差异大,其药代动力学研究面临诸多问题和挑战。中药药代动力学研究难点主要包括以下三个方面。

2.1 难以全面地分析中药药效的物质基础

完整地分析中药药效的物质基础是认识中药药代动力学研究的难点,也是中药研究的特点。许多中药中已知的化学成分在体内吸收、运转过程中发生较大变化,并不是原成分产生药效作用,也很难在生物体内测定到原成分的存在。例如,黄芩苷口服后经肠内微生物水解,产生其苷元黄芩素,黄芩素在吸收过程中及入血后形成多种代谢产物。因此,中药有效成分在生物体内受体内环境的影响,在体内发挥疗效的作用形式可能与原有存在形式不同,同时说明了研究中药有效成分在体内代谢情况、确定中药(复方)在体内发挥疗效的有效成分作用形式的必要性。

2.2 难以确证真正的效应成分

由于中药具有多成分、多靶点、多效应的特点,当选择不同的药效模型时,真正发挥药效的物质基础也会不同。

2.3 生物样本中成分测定困难

中药多以复方给药,其中所含成分可能多达几十甚至几百种,存在成分众多且含量低等问题。人参中共含有 180 余种皂苷类成分,且成分含量差异大,常见的只有几十种,如 Rb1、Rb2、Rb3、Rd、Re、Rf、Rg1、Rg2、Rg3 等。此外,由于中药有效成分含量低,尤其是进入人体后的血药浓度很难检测,这就需要更好的检测技术,同时要采用多种方法、多指标研究相结合才能得出更准确的结果,这也对检测分析的仪器和方法有了更高的要求。

3 中药药代动力学关键技术的研究进展

3.1 中药复杂组分快速检出与结构鉴定技术

研究中药复杂体系所含成分的结构与归属,从而确定主要成分组成,为中药药代动力学研究、中药质量控制与药效学研究提供物质基础。目前高效液相-离子阱-飞行时间质谱(LC-IT-TOF/MS)被广泛用于中药复杂组分快速检出与结构鉴定。该技术主要是利用 LC-IT-TOF/MS 分析具有高分辨且同步获得精确相对分子质量及多级碎裂信息的特点,通过同类或结构类似成分的质谱碎裂规律的关联分析,对检出组分进行快速检出与分类,在获得分类信息的基础上,结合网络化合物数据库搜寻、标准品确证等策略,对复杂、未知化合物进行结构解析。

中药多组分中药药效物质基础研究一直是中药现代化研究的核心问题之一,活性导向下的药效物质分离与筛选一度成为中药药效物质基础研究及创新药物发现的主流模式,尽管有过青蒿素等经典的成功范例,但这一模式的成功率与效率受到了越来越多的质疑。针对这一问题,有学者提出了基于“体内外物质组关联网络分析”的中药药效物质基础研究与创新中药研发思路,即在全面分析中药组分及其在生物体内形成的代谢物组的基础上,确定在生物体内具有适宜药代动力学特征的成分组作为潜在药效物质组,并通过化学信息学手段,阐明中药成分组与其在生物体内的潜在药效物质组之间的网络对应关系,针对体内潜在药效物质组进行多重药效筛选与确证,从而在体外、体内两个层次揭示中药的复杂药效物质基础。该项技术思路的核心是应在阐明中药体内外物质组对应关系的基础上,针对体内具有适宜药代动力学特征的物质组进行药效筛选与确证,这一策略应能提高从中药及方剂中进行创新中药发现与代组分中药研发的成功率与效率。进行中药体内外物质组关联分析及最后的药效物质组的的确证需要多学科研究技术手段的结合,包括分析化学、药代动力学、药效学及化学信息等。此方法基于 LC-IT-TOF/MS 技术,利用其可同步进行多级碎裂和精确质量测定的功能,分别针对中药制剂中的目标性成分(target compounds)和非目标性成分(nontarget compounds),建立中药复杂组分

快速检出与结构推测的分析技术方法。

3.2 中药多组分药代动力学及其配伍规律研究进展

如何定量表征中药的整体药代动力学行为,获得相应的整体药代动力学参数,从而指导临床给药方案的制订,是中药药代动力学研究的首要任务。原有的“生物效应法”虽然在一定程度上表征了中药的整体动力学特征,但对于大多数中药而言,难以选择适宜的客观、量化生物活性指标,这一方法的局限性很大。如今,“中药多组分整合药代动力学研究”这一新思路被提出,该项技术思路包含三个重要内容:① 标志性成分(PK/PD markers)的确定。综合评价中药成分的药代动力学特性与药效作用,选择具有确切药效作用和适宜药代动力学特征的成分作为标志性成分。② 多组分药代动力学研究。在建立高灵敏度同步定量分析技术的基础上,开展多组分药代动力学研究,获得各成分的药时曲线。③ 模型整合。整体思路是根据各成分对整体药代和药效的权重贡献,选择合适的建模方法,对各成分药时数据进行模型整合,获得能够最大程度表征中药整体动力学特征的参数。

参考文献

- [1] 梁艳,邢蓉,刘嘉莉,等. 药代动力学新技术与新理论的研究进展[J]. 中国药科大学学报,2014,45(6):607-616.
- [2] 郝海平,郑超浦,王广基. 多组分、多靶点中药整体药代动力学研究的思考与探索[J]. 药学报,2009,44(3):270-275.

(陈卫东 李亚卓)

第二章 药物代谢实验中常用分析技术和仪器设备

药物代谢动力学作为一门以定量分析为主的工具学科,常需使用相关分析检测技术和仪器。现阶段使用最多的两种分析技术是核磁共振技术(NMR)和色谱法(包括高效液相色谱法如 HPLC 和色谱-质谱串联技术如 GC-MS 和 LC-MS)。其中 NMR 多用于代谢组学的研究,同时也是最早使用的代谢组学研究工具,具有样品前处理简单快速、测定重复性好等优点。为了克服灵敏度低、复杂生物样品中分子的信号干扰大等缺点,现在 NMR 都采用高强磁场、低温探头以及二维核磁等技术,并发展出高分辨魔角旋转(HR-MAS)、活体磁共振波谱(MRS)和磁共振成像(MRI)等技术,极大地促进了 NMR 在代谢组学领域的应用。但 NMR 造价较高,其实际应用受到一定的限制。高效液相色谱法和色谱-质谱串联法种类丰富,使用方便快捷,可满足日常定性和定量分析要求,因此本章将重点介绍高效液相色谱法和液相-质谱串联法。

第一节 高效液相色谱法

高效液相色谱法是在经典色谱法的基础上,引用了气相色谱的理论,在技术上,流动相改为高压输送;色谱柱是以特殊的方法用小粒径的填料填充而成,从而使柱效大大高于经典液相色谱(每米塔板数可达几万或几十万);柱后连有高灵敏度的检测器,可对流出物进行连续检测。

1 高效液相色谱仪特点

1.1 高压

液相色谱法以液体为流动相(称为载液),液体流经色谱柱,受到阻力较大,为了迅速地通过色谱柱,必须对载液施加高压。一般可达 $(150\sim 350)\times 10^5$ Pa。

1.2 高速

流动相在柱内的流速较经典色谱快得多,一般可达 $1\sim 10$ mL/min。高效液相色谱法所需的分析时间较之经典液相色谱法少得多,一般少于1 h。

1.3 高效

近年来,研究出许多新型固定相,使分离效率大大提高。

1.4 高灵敏度

高效液相色谱已广泛采用高灵敏度的检测器,进一步提高了分析的灵敏度。如荧光检测器灵敏度可达 10^{-11} g。另外,用样量小,一般小于 $20\ \mu\text{L}$ 。

1.5 适应范围宽

气相色谱法与高效液相色谱法的比较:气相色谱法虽具有分离能力好,灵敏度高,分析速度快,操作方便等优点,但是受技术条件的限制,沸点太高的物质或热稳定性差的物质都难于应用气相色谱法进行分析。而高效液相色谱法只要求试样能制成溶液,不需要汽化,因此不受试样挥发性的限制。对于高沸点、热稳定性差、相对分子量大(大于 $400\ \text{Da}$ 以上)的有机物(这些物质几乎占有有机物总数的 $75\%\sim 80\%$)原则上都可应用高效液相色谱法来进行分离、分析。据统计,在已知化合物中,能用气相色谱分析的约占 20% ,而能用液相色谱分析的占 $70\%\sim 80\%$ 。

2 高效液相色谱法主要类型和分离原理

高效液相色谱按其固定相的性质可分为高效凝胶色谱、疏水性高效液相色谱、反相高效液相色谱、高效离子交换液相色谱、高效亲和液相色谱以及高效聚焦液相色谱等类型。用不同类型的高效液相色谱分离或分析各种化合物的原理基本上与相对应的普通液相层析的原理相似。其不同之处是高效液相色谱灵敏、快速、分辨率高、重复性好,且须在色谱仪中进行。

根据分离机制的不同,高效液相色谱法可分为下述几种主要类型。

2.1 液-液分配色谱法及化学键合

液相色谱法流动相和固定相都是液体。流动相与固定相之间应互不相溶(极性不同,避免固定液流失),有一个明显的分界面。当试样进入色谱柱时,溶质在两相间进行分配。

(1) 正相液-液分配色谱法:流动相的极性小于固定液的极性。

(2) 反相液-液分配色谱法:流动相的极性大于固定液的极性。

(3) 液-液分配色谱法的缺点:尽管流动相与固定相的极性要求完全不同,但固定液在流动相中仍有微量溶解;流动相通过色谱柱时的机械冲击力,会造成固定液流失。20 世纪 70 年代末发展的化学键合固定相,可克服上述缺点,现在应用很广泛($70\%\sim 80\%$)。

2.2 液-固色谱法

流动相为液体,固定相为吸附剂(如硅胶、氧化铝等)。这是根据物质吸附作用的不同来进行分离的。其作用机制是:当试样进入色谱柱时,溶质分子(X)和溶剂分子(S)对吸附剂表面活性中心发生竞争吸附,未进样时,所有的吸附剂活性中心吸附的是(S)。

2.3 离子交换色谱法

离子交换色谱法是以离子交换剂作为固定相。离子交换色谱法是基于离子交换树

脂上可电离的离子与流动相中具有相同电荷的溶质离子进行可逆交换,依据这些离子交换剂具有不同的亲和力而将它们分离。凡是在溶剂中能够电离的物质通常都可以用离子交换色谱法来进行分离。

2.4 离子对色谱法

离子对色谱法是将一种(或多种)与溶质分子电荷相反的离子(称为对离子或反离子)加到流动相或固定相中,使其与溶质离子结合形成疏水型离子对化合物,从而控制溶质离子的保留行为。

2.5 离子色谱法

离子色谱法是以离子交换树脂为固定相,电解质溶液为流动相。以电导检测器为通用检测器,为消除流动相中强电解质背景离子对电导检测器的干扰,设置了抑制柱。试样组分在分离柱和抑制柱上的反应原理与离子交换色谱法相同。离子色谱法是溶液中阴离子分析的最佳方法,也可用于阳离子分析。

2.6 空间排阻色谱法

空间排阻色谱法是以凝胶为固定相。它类似于分子筛的作用,但凝胶的孔径比分子筛要大得多,一般为数纳米到数百纳米。溶质在两相之间不是靠其相互作用力的不同来进行分离,而是按分子大小进行分离。分离只与凝胶的孔径分布和溶质的流体力学体积或分子大小有关。试样进入色谱柱后,随流动相在凝胶外部间隙以及孔穴旁流过。在试样中一些太大的分子不能进入胶孔而受到排阻,因此就直接通过柱子,首先在色谱图上出现,一些很小的分子可以进入所有胶孔并渗透到颗粒中,这些组分在柱上的保留值最大,在色谱图上最后出现。

上述方法中,以液-固色谱法最为常用。液-固色谱法通常采用硅胶颗粒填充的色谱柱以作为分离手段。其中又以键合 C 链(含 18 个 C 原子)的硅胶颗粒作为主要的填充颗粒(固定相),使用的固定相极性小于流动相的极性,因此又被称为键合相色谱柱、反相色谱柱或 C₁₈ 色谱柱等。需要注意的是,C₁₈ 色谱柱的使用应遵循以下原则:

(1) C₁₈ 色谱柱使用通常有一定的 pH 和压力限制,必须保证使用的流动相在规定的 pH 范围内,且不超过色谱柱最高能承受的压力范围,否则易造成色谱柱填料的损毁,同时长期在过高的压力下工作会缩短液相色谱系统的使用寿命。

(2) C₁₈ 色谱柱不能使用纯水作为洗脱液,否则会造成硅胶填料表面的碳链“倒塌”,造成填料流失或塌陷,影响使用,同样易缩短色谱柱寿命,通常应保证流动相中至少含有 5%~10% 的有机相。

(3) 在流动相含盐的情况下,不能使用纯有机溶剂直接替换整个流动相系统,不然会造成盐分的析出,使色谱柱堵塞,压力升高,甚至整根报废,同时易堵塞整个液相系统。在使用乙腈和磷酸盐作为洗脱溶液时特别容易发生上述情况。通常应保持流动相比例不变的情况下用纯水替换含盐的水相,并冲洗 30~40 个柱体积后方可用高有机相比例

的流动相冲洗系统。

3 高效液相色谱仪各个系统的组成和特点

高效液相色谱仪主要有进样系统、输液系统、分离系统、检测系统和数据处理系统,下面将分别叙述其各自的组成与特点。

3.1 进样系统

一般采用隔膜注射进样器或高压进样间完成进样操作,进样量是恒定的。这对提高分析样品的重复性是有益的。

3.2 输液系统

该系统包括高压泵、流动相贮存器和梯度仪三部分。高压泵的一般压强为 $(1.47 \sim 4.4) \times 10^7$ Pa,流速可调且稳定,当高压流动相通过层析柱时,可降低样品在柱中的扩散效应,可加快其在柱中的移动速度,这对提高分辨率、回收样品、保持样品的生物活性等都是有利的。流动相贮存器和梯度仪可使流动相随固定相和样品的性质而改变,包括改变洗脱液的极性、离子强度、pH,或改用竞争性抑制剂或变性剂等。这就可使各种物质(即使仅有一个基团的差别或是同分异构体)都能获得有效分离。

3.3 分离系统

该系统包括色谱柱、连接管和恒温器等。色谱柱一般长度为 $10 \sim 50$ cm(需要两根连用时,可在二者之间加一连接管),内径为 $2 \sim 5$ mm,由优质不锈钢、厚壁玻璃管或钛合金等材料制成,柱内装有直径为 $5 \sim 10 \mu\text{m}$ 粒度的固定相(由基质和固定液构成)。固定相中的基质是由机械强度高的树脂或硅胶构成,它们都有惰性、多孔性和比表面积大的特点,加之其表面经过机械涂渍(与气相色谱中固定相的制备一样),或者用化学法耦联各种基团(如磷酸基、季胺基、羟甲基、苯基、氨基或各种长度碳链的烷基等)或配体的有机化合物。

因此,这类固定相对结构不同的物质有良好的选择性。例如,在多孔性硅胶表面耦联豌豆凝集素(PSA)后,就可以把成纤维细胞中的一种糖蛋白分离出来。

另外,固定相基质粒小,柱床极易达到均匀、致密状态,极易降低涡流扩散效应。基质粒度小,微孔浅,样品在微孔区内传质短。这些对缩小谱带宽度、提高分辨率是有益的。根据柱效理论分析,基质粒度越小,塔板理论数就越大,这也进一步证明了基质粒度小,会提高分辨率的道理。此外,高效液相色谱的恒温器可使温度从室温调到 60°C ,通过改善传质速度,缩短分析时间,就可增加层析柱的效率。

3.4 检测系统

高效液相色谱常用的检测器有紫外检测器、示差折光检测器和荧光检测器三种。

(1) 紫外检测器:该检测器适用于对紫外光(或可见光)有吸收性能样品的检测。其特点是,使用面广(如蛋白质、核酸、氨基酸、核苷酸、多肽、激素等均可使用)、灵敏度高(检测下限为 10^{-10} g/mL)、线性范围宽、对温度和流速变化不敏感、可检测梯度溶液洗脱