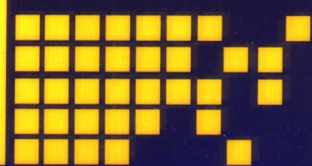


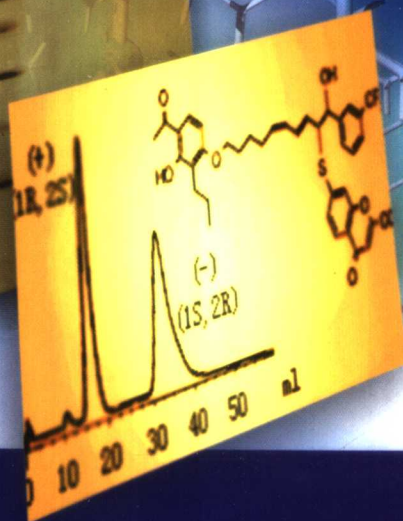
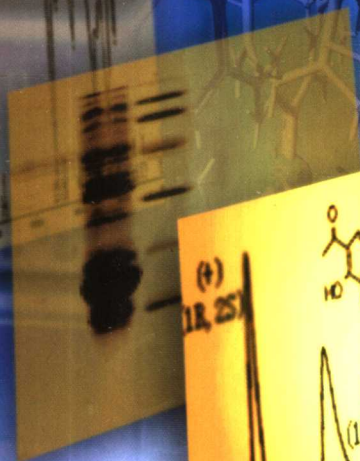
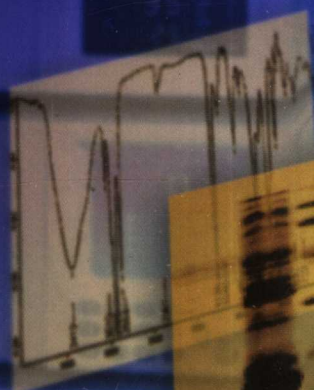


实用制药新技术丛书⑥

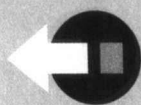


药 学 色 谱 技 术

■ 宋 航 主 编



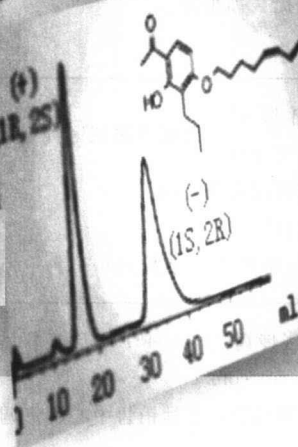
化学工业出版社
生物·医药出版分社



实用制药新技术丛书⑥

药色谱技术

■ 宋 航 主编



化学工业出版社
生物·医药出版分社

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

药色谱技术/宋航主编. —北京: 化学工业出版社, 2007. 8

(实用制药新技术丛书)

ISBN 978-7-5025-9634-7

I. 药… II. 宋… III. 色谱法-应用-药物分析 IV. R917

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 103019 号

责任编辑: 陈燕杰 余晓捷 孙小芳

文字编辑: 刘志茹

责任校对: 宋 玮

装帧设计: 关 飞

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)
生物·医药出版分社

印 刷: 大厂聚鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市延风装订厂

720mm×1000mm 1/16 印张 25 字数 506 千字 2007 年 9 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 49.00 元

版权所有 违者必究

前 言

药物的研究、开发和生产是世界各国极为重视的领域，色谱方法随着其理论和技术的日益发展和成熟，已越来越广泛地应用于医药各个领域。在药品的质量控制、药物合成反应的监测、药物体内过程和代谢动力学研究、中药成分的研究及人体内源活性物质的测定中，色谱方法都是重要的定性和定量分析手段，也是主要的制备方式。目前，色谱已成为药物研制、生产单位、药品检验部门及医院临床检验中最为常用的方法和技术。

为了向广大医药色谱工作者综合介绍色谱方法的理论和技术，促进我国制药研发和生产等领域的进一步发展，在中国药学会制药工程专业委员会的组织下，作者根据各自多年的研究工作实践和近年来的国内外文献资料，编著了本书。

本书是介绍色谱方法在医药领域具体应用的一部实用技术专著。全书内容分为 10 章，除第 1 章外，有关各章分别介绍相关色谱方法的原理、仪器、实验技术和解决实际问题的技巧，并介绍各相关色谱方法在医药领域药物分析和制备中的应用，包括正在发展的新技术和新方法。

编写本书力求其内容实用和先进，色谱理论和技术的介绍紧密结合当前医药领域面临的重要课题，如手性药物对映体的分离、体内药物和代谢产物的分析以及新药研发中的色谱法制备等，着重于实践的讨论。有的章节对样品测定的关键步骤和色谱条件的叙述内容翔实，以便读者无需查阅原文献就能进行实验。这些方法可用于药物的定性、定量测定以及分离制备。

我们希望本书能对药品质量控制人员、医院临床检验和药物检验人员、从事新药研究和开发或药品生产的人员及医药院校的研究生和本科生等，在应用色谱方法和技术方面有较大帮助。

本书由宋航教授主编，有多位作者参加了编著。其中，第1、2、4章由宋航教授（四川大学）撰写，第3、5、9章由梁冰教授（四川大学）撰写，第6章由陈俐娟教授（四川大学华西医学院）和曹学丽教授（北京工商大学）撰写，第7章由陈义研究员（中国科学院化学所）撰写，第8章由朱岩教授（浙江大学）撰写，第10章由宋航教授、徐旭（四川大学）以及杨丹（四川大学）撰写。由于作者水平所限，遗漏和不当之处在所难免，恳请读者批评指正。

作 者
2007 年 8 月

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 色谱分离法的分类	1
1.2.1 按固定相及流动相的物理状态分类	1
1.2.2 按分离过程的物理化学原理分类	2
1.2.3 按固定相形状分类	4
1.2.4 按色谱动力学过程或操作方法分类	5
1.2.5 其他色谱分类	6
1.3 几种色谱方法的比较	6
1.4 色谱方法的特点	7
参考文献	8
第 2 章 色谱法基础理论	9
2.1 引言	9
2.2 色谱分离基本原理	10
2.3 色谱分离过程基本参数	12
2.3.1 色谱图	12
2.3.2 色谱图基本术语	12
2.3.3 流动相流速	14
2.3.4 保留值	15
2.3.5 相对保留值	19
2.3.6 保留指数	20
2.3.7 分离度	22
2.3.8 色谱柱特性参数	23
2.4 色谱分离速率理论	25
2.4.1 塔板高度的统计意义	25
2.4.2 气相色谱速率理论方程	27

2.4.3 液相色谱速率理论方程	29
2.4.4 折合参数板高方程	30
参考文献	32

第3章 气相色谱法	33
3.1 引言	33
3.2 气相色谱分离的基本原理	33
3.3 气相色谱设备与操作	34
3.3.1 气路系统	35
3.3.2 色谱柱	35
3.3.3 进样系统及进样技术	43
3.3.4 气相色谱检测器	48
3.3.5 温度控制系统	51
3.4 气相色谱法分离条件的选择	51
3.4.1 载气种类及其流速	52
3.4.2 载体粒度	52
3.4.3 固定液用量	52
3.4.4 柱温	53
3.4.5 进样量和进样时间	53
3.5 气相色谱定性分析与定量分析方法	54
3.5.1 定性分析	54
3.5.2 定量分析	55
3.6 气相色谱法的应用	57
3.6.1 在药物定性鉴定上的应用	57
3.6.2 在中药指纹图谱上的应用	59
3.6.3 在残留溶剂(农药)测定上的应用	63
3.6.4 在临床药毒食物中毒分析上的应用	67
3.6.5 在体内药物分析上的应用	68
3.6.6 在分离制备中的应用	70
参考文献	81

第4章 高效液相色谱法	83
4.1 引言	83
4.2 高效液相色谱法的特点	83
4.2.1 高效液相色谱法与气相色谱法的比较	83

4.2.2 高效液相色谱法的特点	83
4.3 高效液相色谱固定相	84
4.3.1 固定相的特点	84
4.3.2 固定相的分类	85
4.3.3 液固吸附色谱 (LSC) 固定相	86
4.3.4 液液分配色谱 (LLC) 固定相	87
4.3.5 离子交换色谱 (LEC) 固定相	89
4.3.6 空间排阻色谱固定相	89
4.3.7 固定相展望	90
4.4 高效液相色谱流动相	90
4.4.1 流动相的分类	91
4.4.2 对流动相的要求	92
4.4.3 梯度洗提 (梯度淋洗) 对流动相的要求	93
4.4.4 样品分离与流动相	93
4.5 高效液相色谱的设备与操作	94
4.5.1 基本构成	94
4.5.2 高压输液泵	95
4.5.3 进样系统	95
4.5.4 流分收集器	98
4.5.5 检测器	98
4.5.6 溶剂混合及脱气处理	105
4.5.7 梯度洗脱及流量程序控制	111
4.6 色谱柱的装填与维护	115
4.6.1 色谱柱装填方法分类及特点	115
4.6.2 湿法装柱加压介质及压力	117
4.6.3 色谱柱的使用维护	117
4.7 高效液相色谱定性与定量分析方法	119
4.7.1 定性分析	119
4.7.2 定量分析	123
4.8 高效液相色谱在制药行业中的应用	126
4.8.1 高效液相色谱类型的选择	126
4.8.2 药物样品的前处理方法	128
4.8.3 药物分析检测常用色谱柱	129
4.9 高效液相色谱在制药行业中的应用实例	130
4.9.1 药物中间体	130

4.9.2 药物	132
4.9.3 药物精制中制备色谱的应用	148
4.9.4 在新药研发中制备色谱的应用	153
参考文献	153

第5章 薄层色谱法	155
5.1 引言	155
5.2 薄层色谱法基本理论	156
5.2.1 吸附色谱	156
5.2.2 分配色谱	157
5.2.3 键合相色谱	157
5.2.4 离子交换色谱	158
5.2.5 凝胶色谱	158
5.3 薄层色谱法基本参数及其计算	158
5.3.1 保留值与保留常数值	158
5.3.2 分配系数与容量因子	159
5.3.3 理论塔板数与理论板高度	160
5.3.4 分离度与分离数	160
5.4 薄层色谱固定相与展开体系	161
5.4.1 固定相及其添加剂	161
5.4.2 薄层板的制备	164
5.4.3 薄层板的活度标定和预处理	164
5.4.4 展开剂的选择及展开	165
5.4.5 斑点的显色定位与定性	170
5.5 薄层色谱仪器	173
5.5.1 薄层色谱扫描仪	173
5.5.2 离心薄层色谱/旋转薄层色谱仪	173
5.5.3 棒状薄层色谱仪	175
5.6 薄层色谱定性定量分析方法	176
5.6.1 定性分析	176
5.6.2 定量分析	176
5.7 薄层色谱在制药行业中的应用	178
5.7.1 药物分析	178
5.7.2 杂质的限量检查	185
5.7.3 含量测定	186

5.7.4 药物的分离制备	189
参考文献	196

第6章 高速逆流色谱	198
6.1 引言	198
6.2 高速逆流色谱分离原理及仪器	198
6.2.1 单向性流体动力学平衡理论	198
6.2.2 高速逆流色谱仪器	200
6.3 高速逆流色谱工作方法	201
6.3.1 溶剂系统的准备	202
6.3.2 柱系统的准备	205
6.3.3 样品溶液的准备和进样	205
6.3.4 洗脱方式	206
6.3.5 检测器	208
6.3.6 高速逆流色谱的优点	209
6.4 高速逆流色谱在药物研究开发中的应用	210
6.4.1 HSCCC 在天然药用植物活性成分分离及标准品制备中的 应用	210
6.4.2 分析型 HSCCC 在快速分离和中药指纹图谱分析中的应用	210
6.4.3 HSCCC 在天然新药的研发和筛选中的应用	211
6.4.4 pH-区带精制 CCC 在氨基酸衍生物、多肽等制备分离中的 应用	214
6.4.5 正交轴双水相 CCC 在蛋白质等生物活性成分分离中的应用	214
6.5 高速逆流色谱的发展趋势	215
6.5.1 HSCCC 的微型化以及与多种结构分析技术的联用	215
6.5.2 HSCCC 在药物工业化制备方面的应用和发展	215
6.5.3 HSCCC 在生物大分子高效分离中的应用和发展	216
参考文献	217
第7章 毛细管电泳法	220
7.1 引言	220
7.2 毛细管电泳法的基本理论	220
7.2.1 速度理论	221
7.2.2 分离模式	223
7.2.3 分析窗口	225

7.2.4 分离效率	225
7.3 毛细管电泳设备系统	226
7.3.1 进样与清洗系统	226
7.3.2 毛细管及其温度控制	227
7.3.3 电极槽及其移动控制系统	228
7.3.4 驱动电源	228
7.3.5 检测与数据处理	228
7.4 样品处理与浓缩进样技术	228
7.4.1 制样基础	229
7.4.2 浓缩进样技术	229
7.5 毛细管电泳分离条件的选择	232
7.5.1 电场强度、迁移长度与毛细管总长	233
7.5.2 样品性质与 pH 值	233
7.5.3 缓冲溶液	233
7.5.4 电渗控制	234
7.5.5 温度控制	235
7.5.6 进样方法与初始区带长度	235
7.5.7 检测响应与检测方法	235
7.6 毛细管电泳法在制药行业中的应用	235
7.6.1 定量分析	236
7.6.2 定性分析	237
7.7 小结	247
参考文献	247
第 8 章 离子色谱法	250
8.1 引言	250
8.2 离子色谱法基本理论	251
8.2.1 离子色谱的分离技术	251
8.2.2 离子色谱的检测技术	252
8.3 离子色谱设备	253
8.3.1 离子色谱的分离系统	253
8.3.2 离子色谱的抑制系统	254
8.3.3 离子色谱的检测系统	255
8.4 离子交换色谱法	256
8.4.1 离子色谱固定相	256

8.4.2 阴离子交换分离	257
8.4.3 阳离子交换分离	259
8.4.4 离子交换色谱的应用	259
8.5 离子排斥色谱法	260
8.5.1 离子排斥的分离机制	260
8.5.2 影响离子排斥保留的因素	261
8.5.3 离子排斥色谱的应用	261
8.6 离子对色谱法	262
8.6.1 分离机制	263
8.6.2 影响 MPIC 分离的因素	263
8.6.3 离子对色谱的应用	266
8.7 离子色谱在制药行业中的应用	266
8.7.1 无机阴离子的分析	266
8.7.2 非金属元素的分析	268
8.7.3 有机酸的分析	269
8.7.4 金属离子及无机阳离子的分析	271
8.7.5 有机胺的分析	272
8.7.6 氨基酸的分析	273
8.7.7 糖类及相关化合物的分析	274
8.7.8 其他特别化合物的分析	275
8.7.9 离子色谱的联用技术	276
参考文献	279

第9章 凝胶色谱法	286
9.1 引言	286
9.2 凝胶色谱分离基本理论	287
9.2.1 保留机制	287
9.2.2 凝胶色谱分离过程的热力学原理	288
9.2.3 特征参数	289
9.3 设备系统	291
9.4 凝胶填料	291
9.4.1 葡聚糖凝胶	292
9.4.2 亲脂性葡聚糖凝胶	292
9.4.3 聚丙烯酰胺凝胶	292
9.4.4 琼脂糖凝胶	292

9.5 凝胶色谱技术	293
9.5.1 凝胶的选择	293
9.5.2 凝胶的溶胀处理	294
9.5.3 装柱	294
9.5.4 加样	295
9.5.5 洗脱	296
9.5.6 凝胶的再生与保存	297
9.6 凝胶色谱测定分子量	298
9.6.1 相对分子质量的测定	298
9.6.2 分子量分布的测定	299
9.7 凝胶色谱在制药行业中的应用	299
9.7.1 分离纯化	299
9.7.2 分子量测定	316
参考文献	319

第 10 章 手性色谱技术	321
10.1 引言	321
10.1.1 药物研究、开发对手性色谱技术的需求	321
10.1.2 手性色谱技术分类	323
10.2 手性气相色谱法	324
10.2.1 间接分离法	325
10.2.2 直接分离法	325
10.3 手性衍生化试剂液相色谱法	331
10.3.1 特点及原理	331
10.3.2 手性衍生化试剂的反应条件	332
10.3.3 手性衍生化试剂的种类、应用及新进展	332
10.4 手性流动相添加剂液相色谱法	335
10.4.1 手性配合交换色谱法	335
10.4.2 手性包含复合色谱法	338
10.4.3 手性离子对色谱法	339
10.4.4 其他类型添加剂色谱法	342
10.5 手性固定相液相色谱法	343
10.5.1 刷型手性固定相	344
10.5.2 蛋白质固定相	346
10.5.3 纤维素和多糖衍生物手性固定相	347

10.5.4	大环抗生素手性固定相	349
10.5.5	配体交换手性固定相	350
10.5.6	冠醚类手性固定相	350
10.5.7	环糊精类手性固定相	350
10.5.8	合成手性聚合物固定相	351
10.5.9	分子印迹手性固定相	352
10.6	手性药物的薄层色谱分离	353
10.6.1	纤维素及其衍生物手性薄层板	353
10.6.2	浸渍手性选择剂的手性薄层板	354
10.6.3	分子印迹的手性薄层板	354
10.6.4	化学键合相手性薄层板	355
10.6.5	最新应用及展望	355
10.7	手性制备色谱技术	356
10.7.1	制备拆分的重要作用	356
10.7.2	手性制备分离的规模	356
10.7.3	制备用手性固定相	358
10.7.4	气相色谱制备拆分	360
10.7.5	双柱切换制备色谱	361
10.8	手性色谱技术研究新进展	362
10.8.1	HPLC-旋光仪联用	362
10.8.2	对流手性色谱	364
10.8.3	毛细管电泳手性色谱	368
10.8.4	超临界流体色谱在手性分离中的应用	371
10.8.5	手性色谱应用策略及专家辅助系统	375
	参考文献	378

第 1 章 绪 论

1.1 引 言

从混合物中将各化合物分离并提纯，是药物研究、药物制造以及药物检验工作者的基本任务之一。自然界中的一些物质主要以混合物的形式存在，合成产品和许多化学反应的产物通常也不尽是单一物质。因此，从事药物领域以及相关领域的工作者最经常进行的工作之一，就是要把复杂的混合物分离成各个单一的组分。

色谱法或色谱学 (chromatography)，又称为色层法或层析法，是一种物理化学分离和分析方法。这种分离方法是基于物质溶解度、蒸气压、吸附能力、立体结构或离子交换等物理化学性质的微小差异，使其在流动相和固定相之间的分配系数不同，而当两相做相对运动时，组分在两相间进行连续多次分配，从而达到彼此分离。

随着色谱检测技术的发展，色谱法已不仅只是一种分离技术，同时也是一种分析方法。在色谱流程中，利用物质的物理或化学性质，例如光学性质、电学性质、热学性质、化学显色反应或微量自动酸碱滴定等，设计出各种检测装置，以对分离组分进行连续检测。当今的色谱法，包括分离和检测两个部分，同时实现分离和分析，因而通常称为色谱分析 (chromatographic analysis)。

近 30 年来，各种色谱方法，如气相色谱、高效液相色谱、薄层色谱等在化学、生物学、医药学及相邻学科领域得到广泛应用，特别是分离和分析各种复杂的混合物，解决了大量其他分析方法不能解决的分析课题。在工业上，色谱法是自动分析和自动控制的重要技术。

1.2 色谱分离法的分类

色谱法是包括多种分离类型、检测方法和操作方式的分离分析技术，有多种分类方法。因而，有时一种色谱体系或类型常有几种不同的名称。下面介绍几种主要分类方法。

1.2.1 按固定相及流动相的物理状态分类

色谱分析中总是存在着两个相——流动相和固定相。按照流动相的状态，色谱可

以分为以下类型。

(1) 液相色谱法 流动相是液体，而固定相可以是固定在适当的固相载体上，或是与流动相不相溶或部分混溶的其他液体。以此为基础，液相色谱法又可以进一步分为液-固色谱法和液-液色谱法两类。

(2) 气相色谱法 流动相是载气，而固定相可以是固体物质，也可以是一种不易挥发的液体，称为固定液，该固定液必须固定在适当的固体载体上。气相色谱法也可以分为两小类，即气-固色谱法和气-液色谱法。

(3) 超临界流体色谱 还有一种色谱即超临界流体色谱 (supercritical fluid chromatography, SFC)，与上述的液相色谱和气相色谱不同，其流动相不是一般的气体或液体，而是采用超临界流体。超临界流体的密度比一般气体大得多，而与液体相似，具有不同于一般气体和液体的特性以及独特的分离性能，故亦可称为高密度气相色谱法或高压气相色谱法。目前研究较多的是 CO₂ 超临界流体色谱。这种色谱方法能分析气相色谱法不能或难于分析的许多沸点高、热稳定性差的物质，而比液相色谱更容易获得高的柱效率。尽管已证明 SFC 不能取代 GC 和 HPLC，但它能从不同方面弥补二者的不足。

所以，依据固定相及流动相的物理状态差异，色谱可以分为如表 1-1 所示的几类。

表 1-1 按固定相及流动相的物态分类

流 动 相	总 称	固 定 相	色 谱 名 称
气 体	气 相 色 谱	固 体	气-固色谱 gas-solid chromatography, GSC
		液 体	气-液色谱 gas-liquid chromatography, GLC
液 体	液 相 色 谱	固 体	液-固色谱 liquid-solid chromatography, LSC
		液 体	液-液色谱 liquid-liquid chromatography, LLC
超临界流体	超临界色谱	固 体	超临界色谱 supercritical fluid chromatography, SFC

1.2.2 按分离过程的物理化学原理分类

色谱法的基本原理是基于混合物中的组分在固定相与流动相之间的不均匀分配。不均匀分配的先决条件是各个单一组分对两相具有不同的“亲和力”和向两相不均匀扩散的传递性质。据此，可以分为如下几类。

(1) 分配色谱 (partition chromatography) 利用各个被分离组分在固定相和流动相两相之间分配系数的不同而进行的分离称为分配色谱。也可以说，分配色谱主要根据物质在两相中的溶解度差异而实现分离。分配系数 K_D 是固定相中一种组分的平衡浓度对流动相中同一物质的浓度之比，所以，各组分的分离效率与其分配系数的差

值成比例。

在分配色谱法中,通常使用两相系统。用液体作固定相,利用试样组分(亦称为溶质)在固定相中溶解、吸收或吸着(sorption)能力差异,在两相间分配系数不同从而将组分分离,如气-液分配色谱、液-液分配色谱。在液-液分配色谱中,根据流动相和固定相相对极性不同,又分为正相分配色谱和反相分配色谱。一般来说,以强极性、亲水性溶剂或水溶液为固定相,非极性、弱极性或亲脂性溶剂为流动相,称为正相分配色谱(normal phase partition chromatography),简称正相色谱(NPC)。若以非极性、亲脂性物质为固定相,极性、亲水性溶剂或水溶液为流动相,则称为反相分配色谱(reversed phase partition chromatography),简称反相色谱(RPC)。正相色谱和反相色谱的概念,现已推广应用到其他类型的液相色谱。

如果将一种非挥发性液体固定在适当的固体载体上,那么分配色谱法也可以在气相和非挥发性液相之间进行。液相中被分离组分溶解度的差异两次得到利用,溶解度较小或挥发的组分在一定温度下由载气迅速带走,从而使各个组分得到分离。

(2) 吸附色谱(adsorption chromatography) 由于物质对活性固体(或液体)表面吸附力具有差异,使混合物中的不同组分在固体(或液体)界面上呈现出浓度变化,发生某些组分的浓缩,这种现象称为吸附。对于各组分来说,吸附系数的差异决定于相界面上浓度的差异。若两相之间作相对移动,则这种差异就表现为色谱分离。所以,吸附色谱是以固体或液体吸附剂作固定相的气相色谱或液相色谱,它利用组分在吸附剂上吸附力的不同,因吸附平衡常数不同而将组分分离。

吸附的亲合力主要取决于物质的极性大小等因素。有机化合物分子中的官能团与非极性的碳链相比,对吸附色谱的分离效果有更大的影响。吸附色谱适宜于把混合物中的物质按其所含的极性基的数目和类型进行分离。

(3) 离子交换色谱(ion-exchange chromatography) 如果被分离的各组分在溶液中形成离子,那么这些离子就与溶液中离子交换剂的解离基团发生静电作用,这种静电的相互作用就是离子交换。液相色谱中利用这种离子交换原理而进行分离的色谱,称为离子交换色谱。这是用离子交换剂为固定相,分离离子型化合物的色谱方法。

通常,带电荷多的离子对交换剂的亲和力大于带电荷少的离子。被分离混合物中各组分的离子交换能力,将取决于各组分电荷的差异。解离组分的平均电荷与离子电荷、基团的解离常数以及介质的pH值有关,同时还取决于溶液中的离子浓度。

在离子交换色谱中固定相是具有固定电荷的离子交换树脂,带有固定正电荷的称为阳离子交换树脂。固定电荷吸引相反符号的对立离子以保持中性。

(4) 凝胶色谱(排阻色谱)(gel chromatography) 空间排阻色谱(又称排斥色谱)与其他色谱机理不同,它近似于分子筛效应。空间排阻色谱的色谱柱内填充以凝胶,凝胶内具有一定大小的孔穴。样品进入色谱柱后,随流动相在外部间隙以及凝胶孔穴旁流过。体积大的分子不能渗透到凝胶孔隙里去而排阻,因此较早地被冲洗出